

Uniwersytet Rzeszowski
ul. Rejtana 16c, 35-959 Rzeszów

za pośrednictwem:
Rady Doskonałości Naukowej
pl. Defilad 1
00-901 Warszawa
(Pałac Kultury i Nauki, p. XXIV, pok. 2401)

Mateusz Moloń
Instytut Biologii i Biotechnologii
Kolegium Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Rzeszowski

Wniosek

z dnia 09.01.2023 r.

o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie¹ nauk biologicznych.

Określenie osiągnięcia naukowego będącego podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego:

Czynniki determinujące proces starzenia się w układzie modelowym drożdży pączkujących *Saccharomyces cerevisiae*

Wnioskuje – na podstawie art. 221 ust. 10 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 zm.) – aby komisja habilitacyjna podejmowała uchwałę w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w głosowaniu **tajnym/jawnym**^{*2}

Zostałem poinformowany, że:

Administratorem w odniesieniu do danych osobowych pozyskanych w ramach postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego jest Przewodniczący Rady Doskonałości Naukowej z siedzibą w Warszawie (pl. Defilad 1, XXIV piętro, 00-901 Warszawa).

Kontakt za pośrednictwem e-mail: kancelaria@rdn.gov.pl, tel. 22 656 60 98 lub w siedzibie organu. Dane osobowe będą przetwarzane w oparciu o przesłankę wskazaną w art. 6 ust. 1 lit. c) Rozporządzenia UE 2016/679 z dnia 27 kwietnia 2016 r. w związku z art. 220 - 221 oraz art.

232 – 240 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, w celu przeprowadzenie postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego oraz realizacji praw i obowiązków oraz środków odwoławczych przewidzianych w tym postępowaniu.

Szczegółowa informacja na temat przetwarzania danych osobowych w postępowaniu dostępna jest na stronie www.rdn.gov.pl/klauzula-informacyjna-rodo.html


(podpis wnioskodawcy)

Załączniki:

1. Dane wnioskodawcy w języku polskim (Załącznik 1a) i w języku angielskim (Załącznik 1b)

¹ Klasyfikacja dziedzin i dyscyplin wg. rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 20 września 2018 r. w sprawie dziedzin nauki i dyscyplin naukowych oraz dyscyplin w zakresie sztuki (Dz. U. z 2018 r. poz. 1818).

² * Niepotrzebne skreślić.

2. Kopia dokumentu potwierdzającego posiadanie stopnia doktora (Załącznik 2)
3. Autoreferat w języku polskim (Załącznik 3a) i w języku angielskim (Załącznik 3b)
4. Wykaz osiągnięć naukowych stanowiących znaczący wkład w rozwój określonej dyscypliny w języku polskim (Załącznik 4a) i w języku angielskim (Załącznik 4b)
5. Kopie publikacji stanowiących osiągnięcia naukowe (Załącznik 5)
6. Oświadczenia współautorów o indywidualnym wkładzie w prace składające się na osiągnięcie naukowe (Załącznik 6)
7. Potwierdzenie staży naukowych (Załącznik 7)
8. Potwierdzenie udziału w projektach badawczych (Załącznik 8)
9. Dokumentacja wniosku w wersji elektronicznej

AUTOREFERAT

dr Mateusz Mołoń
Katedra Biologii
Instytut Biologii i Biotechnologii
Kolegium Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Rzeszowski

Rzeszów 2023

1. Dane osobowe

Imię i nazwisko: Mateusz Mołoń

Nr ORCID: 0000-0002-9962-6788

2. Wykształcenie (miesiąc i rok uzyskania dyplomu, jednostka nadająca tytuł, tytuł pracy, promotor)

06.2010 – Uniwersytet Rzeszowski; Wydział Biologiczno-Rolniczy; magister biologii, specjalność: biologia eksperymentalna

Tytuł pracy: Charakterystyka komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* zatrzymanych w fazie G1 cyklu komórkowego

Promotor: dr Renata Zadrag-Tęcza

06.2013 – Uniwersytet Jagielloński; Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii; studia podyplomowe – biologia molekularna

09.2014 – Uniwersytet Rzeszowski, Wydział Biologiczno-Rolniczy; doktor nauk biologicznych

Tytuł pracy: Rola tempa wzrostu objętości komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w determinowaniu ich potencjału replikacyjnego i długości życia

Promotor: prof. dr hab. Tomasz Biliński

Promotor pomocniczy: dr Renata Zadrag-Tęcza

3. Zatrudnienie i odbyte staże naukowe

3.1. Zatrudnienie:

09.2011 – 12.2014 – Uniwersytet Rzeszowski; Wydział Biologiczno-Rolniczy; stanowisko: asystent

01.2015 – 12.2018 – Uniwersytet Rzeszowski; Wydział Biologiczno-Rolniczy; stanowisko: adiunkt

01.2019 – obecnie – Uniwersytet Rzeszowski; Kolegium Nauk Przyrodniczych; Instytut Biologii i Biotechnologii; stanowisko: adiunkt badawczo-dydaktyczny

3.2. Staże naukowe:

09.2010 – Zakład Genetyki, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie

03.06 – 14.06.2013 – Zakład Biologii Molekularnej UMCS w Lublinie

06.06 – 08.07.2016 – Instytut Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego w Krakowie

17.02 – 20.03.2020 – Instytut Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego w Krakowie

4. Odbyte kursy i szkolenia

– Spektrometria mass i proteomika w badaniach mikrobiologicznych (18.09.2013, Łódź)

– 30-godzinne szkolenie pn. Kompetencje dydaktyczne i informatyczne kadry Uniwersytetu Rzeszowskiego w zakresie kształcenia na odległość (11.2018, Rzeszów)

- Warunki prowadzenia studiów w świetle zapisów ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (15.03.2019, Rzeszów)
- „Przyjazny nURt” – rozwój dostępności UR”, cykl szkoleń realizowanych w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 (25.01.2021, Rzeszów)

4. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Czynniki determinujące proces starzenia się w układzie modelowym drożdży pączkujących *Saccharomyces cerevisiae*

4.2. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

H1 Molon M, Zebrowski J. Phylogenetic relationship and Fourier-transform infrared spectroscopy-derived lipid determinants of lifespan parameters in the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. FEMS Yeast Res. 2017;17(4) (autor korespondujący)

IF₂₀₁₇: 2.609, IF₂₀₂₁: 2.923

punktacja MNiSW₂₀₁₇: 30, punktacja MEiN₂₀₂₂: 100

Udział własny: autorstwo koncepcji pracy, określenie celu badań, wybór i pozyskanie szczepów drożdży, analiza potencjału reprodukcyjnego, analiza długości życia reprodukcyjnego i po reprodukcyjnego, określenie całkowitej długości życia, analiza czasu podwojenia na poziomie pojedynczych komórek, izolacja DNA, wykonanie reakcji PCR, analiza filogenetyczna, przygotowanie materiału oraz analiza FTIR, współudział w statystycznym opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowanie wersji roboczej manuskryptu oraz końcowej pracy, korespondencja z wydawnictwem (recenzentami i redakcją).

H2 Molon M, Woznicka O, Zebrowski J. Cell wall biosynthesis impairment affects the budding lifespan of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. Biogerontology. 2018;19(1):67-79. (autor korespondujący)

IF₂₀₁₈: 3.805, IF₂₀₂₁: 4.284

punktacja MNiSW₂₀₁₈: 30, punktacja MEiN₂₀₂₂: 100

Udział własny: autorstwo koncepcji pracy, określenie celu badań, wybór i pozyskanie szczepów drożdży, analiza potencjału reprodukcyjnego, analiza kinetyki wzrostu objętości komórek podczas kolejnych podwojeń, przygotowanie materiału do analiz SEM, TEM i AFM, określenie grubości ściany komórkowej analizowanych szczepów, analiza fenotypowa szczepów, statystyczne opracowanie i interpretacja wyników, przygotowanie wersji roboczej manuskryptu oraz końcowej pracy, korespondencja z wydawnictwem (recenzentami i redakcją).

H3 Molon M, Panek A, Molestak E, Skoneczny M, Tchorzewski M, Wnuk M. Daughters of the budding yeast from old mothers have shorter replicative lifespans but not total lifespans.

Are DNA damage and rDNA instability the factors that determine longevity? Cell Cycle. 2018;17(10):1173-1187. (autor korespondujący)

IF₂₀₁₈: 3.259, IF₂₀₂₁: 5.173

punktacja MNiSW₂₀₁₈: 30, punktacja MEiN₂₀₂₂: 100

Udział własny: autorstwo koncepcji pracy, określenie celu badań, wybór i pozyskanie szczepów drożdży, pozyskanie komórek potomnych pochodzących od starych reprodukcyjnie komórek drożdży, przygotowanie zestawu szczepów kontrolnych pozbawionych mtDNA, barwienie za pomocą DAPI i analiza mikroskopowa komórek, analiza potencjału reprodukcyjnego, analiza długości życia reprodukcyjnego i po reprodukcyjnego, określenie całkowitej długości życia, analiza kinetyki wzrostu na podłożu płynnym i podłożu stałym, analiza wzrostu na podłożu selekcyjnym, analiza fenotypowa szczepów, statystyczne opracowanie i interpretacja wyników, przygotowanie wersji roboczej manuskryptu oraz końcowej pracy, korespondencja z wydawnictwem (recenzentami i redakcją).

H4 Borkiewicz L[#], **Moloń M[#]**, Molestak E, Grela P, Horbowicz-Drożdżal P, Wawiórka L, Tchórzewski M. Functional Analysis of the Ribosomal uL6 Protein of *Saccharomyces cerevisiae*. Cells. 2019;8(7):718. (autor korespondujący) [#]równorzędne pierwsze autorstwo
IF₂₀₁₉: 4.366, IF₂₀₂₁: 7.666

punktacja MNiSW₂₀₁₉: 140, punktacja MEiN₂₀₂₁: 140

Udział własny: współautorstwo koncepcji pracy, analiza potencjału reprodukcyjnego, analiza długości życia reprodukcyjnego i po reprodukcyjnego, określenie całkowitej długości życia komórek na podłożu zawierającym glukozę i galaktozę, współudział w analizie kinetyki wzrostu na podłożu płynnym i podłożu stałym, analiza zdolności komórek szczepu GAL::uL6A do pączkowania i przeżycia (znakowanie jodkiem propidyny) na podłożu zawierającym glukozę i galaktozę, współudział w statystycznym opracowaniu i interpretacji wyników, współudział w przygotowaniu wersji roboczej manuskryptu oraz końcowej pracy, korespondencja z wydawnictwem (recenzentami i redakcją).

H5. Moloń M, Zaciura M, Wojdyła D, Molestak E. Increasing the number of ribosomal uL6 mRNA copies accelerates aging of the budding yeast. Molecular Biology Reports. 2022 (doi: 10.1007/s11033-022-08187-2) (autor korespondujący)

IF₂₀₂₁: 2.742

punktacja MEiN₂₀₂₁: 70

Udział własny: autorstwo koncepcji pracy, określenie celu badań, wybór szczepów drożdży do analiz, analiza potencjału reprodukcyjnego, analiza długości życia reprodukcyjnego i po reprodukcyjnego, określenie całkowitej długości życia, analiza fenotypowa, współudział w analizie usuwania plazmidu przez komórkę, statystyczne opracowanie i interpretacja wyników, przygotowanie wersji roboczej manuskryptu oraz końcowej pracy, korespondencja z wydawnictwem (recenzentami i redakcją).

H6 **Moloń M**, Molestak E, Kula-Maximenko M, Grela P, Tchórzewski M. Ribosomal Protein uL11 as a Regulator of Metabolic Circuits Related to Aging and Cell Cycle. *Cells*. 2020;9(7):1745. (autor korespondujący)

IF₂₀₂₀: 6.600, IF₂₀₂₁: 7.666

punktacja MNiSW₂₀₂₀: 140, punktacja MEiN₂₀₂₁: 140

Udział własny: współautorstwo koncepcji pracy, określenie celu badań, analiza potencjału reprodukcyjnego, analiza długości życia reprodukcyjnego i po reprodukcyjnego, określenie całkowitej długości życia komórek, analiza czasu podwojenia na poziomie pojedynczych komórek, analiza kinetyki wzrostu na podłożu płynnym i podłożu stałym, analiza fenotypowa, analiza kinetyki wzrostu objętości komórek podczas kolejnych podwojeń, analiza mikroskopowa zmian w morfologii wakuoli, izolacja RNA, udział w analizie wyników uzyskanych z sekwencjonowania RNA-Seq, przygotowanie komórek do analizy spektroskopii Ramana, finansowanie badań ze środków zewnętrznych, współudział w statystycznym opracowaniu i interpretacji wyników, współudział w przygotowaniu wersji roboczej manuskryptu oraz końcowej pracy, współautor korespondujący.

H7 Szajwaj M, Wawiórka L, Molestak E, Michalec-Wawiórka B, **Moloń M**, Wojda I, Tchórzewski M. The influence of ricin-mediated rRNA depurination on the translational machinery in vivo - New insight into ricin toxicity. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2019;1866(12):118554.

IF₂₀₁₉: 4.105, IF₂₀₂₁: 5.011

punktacja MNiSW₂₀₁₉: 140, punktacja MEiN₂₀₂₁: 140

Udział własny: analiza potencjału reprodukcyjnego, analiza długości życia reprodukcyjnego i po reprodukcyjnego, określenie całkowitej długości życia komórek na podłożu zawierającym glukozę i galaktozę, analiza czasu podwojenia na poziomie pojedynczych komórek, współudział w analizie przeżywalności komórek, współudział w statystycznym opracowaniu i interpretacji wyników dotyczących starzenia.

4.3. Omówienie celu naukowego prac stanowiących osiągnięcie naukowe i otrzymanych wyników

4.3.1 Wstęp

Starzenie jest wieloczynnikowym procesem prowadzącym do utraty funkcji komórek, tkanek i całego organizmu, a w konsekwencji doprowadza do śmierci. Od wielu dekad prowadzone są badania nad identyfikacją czynników i szlaków metabolicznych, które determinują proces starzenia się. Dynamiczny rozwój współczesnej biogerontologii nie byłby możliwy bez zaangażowania modeli eksperymentalnych. Do najczęściej wykorzystywanych organizmów modelowych zalicza się drożdże pączkujące *Saccharomyces cerevisiae*, nicienia *Caenorhabditis elegans*, wywilżnę karłowatą *Drosophila melanogaster*, a wśród kręgowców mysz *Mus musculus* i szczur *Rat norvegicus*. W ostatnich latach do tej grupy zaliczono również psa domowego *Canis familiaris* [1,2]. Moje zainteresowania naukowe dotyczą głównie analizy

i poszukiwania potencjalnych czynników starzenia i długowieczności wykorzystując model drożdżowy, dlatego poniżej skoncentruję się jedynie na tym organizmie.

Drożdże pączkujące *Saccharomyces cerevisiae* są jednokomórkowymi grzybami należącymi do gromady workowców. Pomimo znacznej odległości ewolucyjnej od ludzi, do dnia dzisiejszego wykorzystywane są jako organizm modelowy w wielu dziedzinach nauki, w tym i starzeniu. Do pożądanых cech charakterystycznych drożdży należą szybki wzrost, krótki czas podwojenia, łatwość i niskie koszty hodowli, mały genom, mała liczba genów z intronami, łatwość manipulacji genetycznych, czy możliwość pracy w układzie haploidalnym i diploidalnym. Te atrybuty pozwoliły na szybki postęp badań gerontologicznych, polegających głównie na zdefiniowaniu molekularnych mechanizmów starzenia się tego organizmu i identyfikacji wielu czynników, które modyfikują jego długowieczność. Jednak istotne jest pytanie ile z tego, czego dowiadujemy się o starzeniu się drożdży, dotyczy ludzi, a w jakim procencie badania poświęcone są jedynie starzeniu się drożdży. Innymi słowy, czy badając starzenie się w układzie modelowym drożdży nie bada się jedynie starzenia się drożdży. Do dnia dzisiejszego brak jest jednoznacznej odpowiedzi na to pytanie, ale dotychczasowe dowody sugerują, że chociaż niektóre aspekty starzenia się drożdży są specyficzne dla tego organizmu, wiele z najważniejszych cech zostało zachowanych ewolucyjnie u różnych grup organizmów [3]. Pomimo pozytywnych cech jakimi charakteryzują się drożdże pączkujące, praca z tym modelem obarczona jest pewnymi problemami. Do głównych problemów należy obecność ściany komórkowej, której zmiany składu chemicznego mogą determinować tempo starzenia. Innym potencjalnym czynnikiem ograniczającym wykorzystanie tych jednokomórkowców jest zamknięta mitotyczna oraz pączkowanie jako sposób rozmnażania bezpłciowego. Dodatkowo istotne wydaje się również wykorzystanie odpowiedniego tła genetycznego szczepów drożdży. Mechanizm molekularny, czynnik środowiskowy lub gen można uznać za istotny dla starzenia, jeśli występuje u większości szczepów typu dzikiego. W przeciwnym razie jest to tylko zależna od tła genetycznego zmiana. Dlatego spore obawy budzi fakt, że niektóre szczepy drożdży stosowane rutynowo w laboratoriach mają średnią liczbę podwojeń o połowę niższą niż w przypadku większości szczepów typu dzikiego [4]. W konsekwencji nawet niewielka pozytywna zmiana, może być opisana jako nowy gen lub czynnik determinujący długowieczność, czego nie można wykazać w szczepie o zwiększonej liczbie podwojeń.

Wielu badaczy sugerowało, że starzenie się aktywnych mitotycznie ludzkich komórek może zasadniczo różnić się od starzenia się tych, które pozostają w stanie postmitotycznym. Podobnie jest w przypadku jednokomórkowych grzybów. Dlatego u drożdży ustalono dwa główne modele starzenia: starzenie replikacyjne i starzenie chronologiczne. Starzenie replikacyjne to model starzenia się komórek aktywnych mitotycznie, w którym według standardowego podejścia długość życia jest określona jako liczba komórek potomnych wyprodukowanych przez drożdżową komórkę matkę. Długość życia replikacyjnego mierzy się poprzez fizyczne usunięcie lub odseparowanie komórek potomnych, które można łatwo odróżnić od komórek matek ze względu na asymetrię podczas pączkowania [5]. Ta asymetria zostaje zaburzona pod koniec limitu proliferacyjnego komórki, przynajmniej u części analizowanej populacji komórek. Z kolei starzenie chronologiczne to model starzenia się komórek postmitotycznych, w którym długość życia jest określana przez czas, w którym

komórka drożdży może przetrwać w hodowli, która utraciła zdolność do pączkowania i znajduje się w stanie przypominającym spoczynek. Długość życia chronologicznego jest najczęściej mierzona poprzez hodowanie komórek w podłożu płynnym, gdzie po wyczerpaniu się źródła węgla przechodzą one w stan postmitotyczny [6]. Następnie monitoruje się przeżywalność komórek w czasie mierzoną jako zdolność do wznowienia mitotycznego wzrostu w świeżej pożywce. W literaturze opisywany jest również trzeci model starzenia, tzw. starzenie w kolonii. Badania eksperymentalne wykazały, że podczas wzrostu i starzenia się kolonii drożdży dochodzi do zmiany pH otoczenia, gradientu metabolitów oraz substancji pokarmowych wokół kolonii. Carmona-Gutierrez i Buttner dopatrują się w zmianach kolonii fenotypów starzenia się organizmu wielokomórkowego [7]. Jednak ten sposób oceny długowieczności nie jest popularny wśród gerontologów drożdży, a wykorzystuje go zaledwie kilka laboratoriów na świecie [8].

O ile w przypadku starzenia chronologicznego jednostką długowieczności jest czas, to w przypadku starzenia replikacyjnego do dnia dzisiejszego w większości laboratoriów wiek określa się jako liczbę podwojeń wykonanych przez drożdżową komórkę matkę. Ten brak kluczowego dla starzenia parametru czasu stanowi problem w jednoznacznej interpolacji danych pomiędzy różnymi gatunkami, w tym i ludzi. Podstawą braku jednostki czasu w badaniach nad aktywnymi mitotycznie drożdżami było przeświadczenie, że komórka po zakończeniu ostatniego pączkowania umiera. Po wprowadzeniu parametru czasu zdefiniowano czas reprodukcji, jako czas życia komórki od powstania aż do zakończenia pączkowania, czas po reprodukcyjny to z kolei czas od zakończenia podwojeń aż do śmierci. W konsekwencji suma tych dwóch parametrów daje całkowitą długość życia [9,10]. Co ciekawe, całkowita długość życia komórek jest wypadkową wielu czynników, w tym zmian w czasie podwojenia, czy przeżycie komórki w spoczynku po reprodukcji.

W historii badań nad starzeniem istotny wkład miał pogląd, że śmierć jest nieuniknioną konsekwencją uniwersalnego procesu starzenia się organizmu [11] oraz istotne podobieństwo w przebiegu krzywych przeżywalności między jednokomórkowymi drożdżami a innymi organizmami, w tym nicieniem, myszą i człowiekiem. W ostatnim dziesięcioleciu nastąpił fundamentalny postęp w naszym zrozumieniu procesu starzenia się. Istotnym stało się wykazanie, że czynniki długowieczności odkryte u drożdży modulują również tempo starzenia w modelach bezkręgowców i ssaków [3]. Według standardowego podejścia w modelu replikacyjnego starzenia uszkodzenia są dziedziczone asymetrycznie pomiędzy komórkę matkę i komórkę potomną. Dlatego komórki potomne produkowane przez starzejące się komórki matki zachowują pełną zdolność replikacji prawie do końca zdolności reprodukcyjnych matek, co dowodzi, że drożdże są w stanie zatrzymać większość uszkodzeń i czynników starzenia związanych z wiekiem umożliwiając pełną reprodukcję komórek potomnych [12]. Najlepiej opisanym czynnikiem molekularnym determinującym starzenie replikacyjne jest specyficzna dla drożdży akumulacja pozachromosomalnych kółek rybosomalnego DNA (ERCs). ERCs powstają w wyniku rekombinacji homologicznej w obrębie rDNA (chromosom XII), podczas której powstaje samoreplikująca się kolistą cząsteczką DNA, która jest asymetrycznie zatrzymywana w jądrze komórki matki podczas pączkowania. Co ciekawe, białka które modulują rekombinację rDNA i tworzenie ERCs również mają wpływ na potencjał reprodukcyjny komórki. Należą do nich deacetylaza histonów Sir2 i białko Fob1 (blokuje widelki replikacyjne). W związku z tym delecja *FOB1* lub nadekspresja *SIR2* prowadzi do

spowolnienia starzenia replikacyjnego, podczas gdy delekcja *SIR2* przyspiesza ten proces [13-15]. Nie do końca jasne jest, czy gromadzenie ERCs jest przyczyną, czy skutkiem starzenia się aktywnych mitotycznie komórek. Jedną z hipotez zakłada, że nagromadzone kółka rDNA stanowią balast dla komórki. Inną możliwością jest to, że rosnąca ilość DNA kodującego rybosomalne RNA wraz z wiekiem prowadzi do zaburzenia równowagi między rRNA i białkami rybosomalnymi, przez co upośledza biogenezę rybosomów i funkcjonowanie maszyneryi translacyjnej. Inne dane sugerują, że ERCs mogą przyspieszać starzenie replikacyjne indukując niestabilność rDNA podczas życia [16]. Warto jednak podkreślić, że gromadzenie tego balastu w jądrze komórkowym jest wynikiem charakterystycznej, między innymi dla drożdży, mitozy zamkniętej. ERCs przez lata były traktowane jako główny czynnik regulujący długowieczność u drożdży. Do innych czynników, które brano pod uwagę jako potencjalne czynniki wpływające na starzenie należały uszkodzenia makromolekuł komórkowych wywołane przez wolne rodniki tlenowe oraz dysfunkcje mitochondriów. Wykazano, że zarówno oksydacyjnie uszkodzone białka, jak i dysfunkcyjne mitochondria są asymetrycznie rozdzielana między komórkę matkę i córkę, co miało wpływ na zdolność reprodukcyjną. Sugerowano również związek między akumulacją uszkodzonych mitochondriów w komórce matce i niestabilnością genomową, wynikającą z utraty mtDNA [17]. Drożdże miały również swój istotny wkład w poznanie mechanizmów molekularnych prowadzących do spowolnienia starzenia wynikającego ze stosowania restrykcji kalorycznej i pokarmowej [15,18]. Oprócz interwencji polegającej na ograniczeniu podaży kalorii lub pokarmu opisano również kilka genetycznych modeli restrykcji. Modele genetyczne dotyczyły głównie wprowadzenia mutacji do genów zaangażowanych w wykrywanie glukozy lub szlaków prowadzących do zmniejszonej aktywności kinaz reagujących na składniki odżywcze, w tym kinaza białkowa A, TOR i Sch9. Pozytywny wpływ tych interwencji upatruje się głównie w przewodzie oddychania tlenowego nad fermentacją, nasileniu autofagii, zmniejszeniu aktywności translacyjnej, czy w zwiększeniu odporności na stres. W kontekście restrykcji kalorycznej istotne były badania wykazujące długowieczność szczepów z nadekspresją *SIR2* i delecją *TOR1*. O ile mutacje w *TOR1* miały klarowne przełożenie na organizmy wyższych eukariontów, o tyle działanie *SIR2* było trudno wytłumaczalne. Jest to związane z odkryciem, że nadekspresja tej deacetylasy histonów prowadzi do długowieczności w sposób specyficzny dla drożdży poprzez redukcję ERCs. Sugeruje to, że sirtuiny ewoluowały u różnych gromad niezależnie, prowadząc do długowieczności w sposób nie związany z powstawaniem rDNA [19]. Ten krótki wstęp stanowi jedynie fragment kluczowego wykorzystania drożdży w biogerontologii.

Badania nad starzeniem stanowią intrygujący obszar badań biologicznych i biomedycznych. Pomimo wielu lat pracy i zaangażowaniu naukowców nie do końca jest jasny nie tylko sam mechanizm, który prowadzi do długowieczności, ale niejednokrotnie stawiany jest znak zapytania nad zasadnością stosowania niektórych modeli eksperymentalnych.

4.3.2 Cel pracy

Celem prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego było określenie nowych czynników, które determinują starzenie komórkowe wykorzystując układ modelowy drożdży pączkujących *Saccharomyces cerevisiae*. W przedstawionym cyklu prac zaprezentowałem zarówno,

tzw. „prywatne” dla drożdży czynniki, które determinują starzenie, w tym udział ściany komórkowej, czy zasadność stosowania tła genetycznego, jak i tzw. „czynniki publiczne”, które mogą determinować tempo starzenia się wyższych eukariontów, w tym i człowieka. Wskazanie prywatnych dla drożdży czynników determinujących starzenie wynika z faktu, że biogerontolodzy drożdży starają się nie dostrzegać wad modelu drożdżowego, wierząc że uzyskiwane i publikowane wyniki w najlepszych czasopismach na świecie przybliżają nas do poznania panaceum na długowieczność. Dlatego wydaje się, że poznanie udziału czynników specyficznych dla drożdży jest kluczowe dla przyszłości wykorzystania tych jednokomórkowych grzybów jako modelu w badaniach nad starzeniem. W kontekście czynników i mechanizmów, tzw. publicznych skoncentrowałem się na zmianach maszyneryi translacyjnej, które mają wpływ na tempo starzenia. Dotyczą one zaburzeń, na poziomie centrum GTPazowego rybosomu, wywołanych mutacjami w paralogicznych genach *uL6* i *uL11*, zwiększeniem liczby kopii mRNA *uL6* oraz wpływem rycyny. Jest to nowatorskie podejście, otwierające nowy rozdział w badaniach nad starzeniem.

4.3.3 Uzyskane wyniki

4.3.3.1 Wybór tła genetycznego jako istotny czynnik w badaniach nad starzeniem z wykorzystaniem drożdży

Do tej pory możliwe związki między starzeniem się a biochemią komórki i procesami metabolicznymi nie były szeroko badane w drożdżach. Istnieją szczątkowe dane metabolomu wykazujące związek między czasem życia komórek a spektroskopią mas na podstawie „odcisku palca” izogenicznych mutantów *S. cerevisiae* różniących się długowiecznością [20]. Niedawno podkreślono również pewną rolę metabolizmu lipidów w starzeniu chronologicznym [21]. Dlatego w świetle tych obiecujących danych, w pracy **Moloń i Żebrowski 2017 [H1]** szukano możliwych powiązań między wybranymi parametrami długowieczności i metabolicznym „odciskiem palca” populacji komórek wygenerowanych za pomocą spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR). Ta wysokowydajna technika z powodzeniem jest stosowana do kompleksowej charakterystyki biochemicznej komórek drożdży i tworzenia zależności metabolicznych [22], co stanowi obiecujące narzędzie w badaniach nad starzeniem się i poszukiwaniu determinantów tego procesu. W tej pracy użyto zestawu siedmiu szczepów laboratoryjnych szeroko wykorzystywanych jako referencje w laboratoriach na całym świecie. Motywacją do powstania tej pracy były pojawiające się dane o zależnym od tła genetycznego wpływie mutacji na proces starzenia się komórek. Biorąc pod uwagę potencjał reprodukcyjny, czyli płodność jako kryterium wyboru, najbardziej pożądaną cechą szczepów powinien być stosunkowo długi potencjał reprodukcyjny lub powinniśmy porównać wyniki z wielu laboratoriów [4]. Dodatkowo, jak do tej pory brak było wyników, które pokazywałyby różnice w długości życia standardowo używanych szczepów laboratoryjnych. W związku z tym ta publikacja była pierwszą pracą, w której przedstawiono długość życia zestawu szczepów laboratoryjnych. Brak wyrażenia długości życia w jednostkach czasu może prowadzić do powstawania skrajnie rozbieżnych wniosków. Dodatkowo wydaje się, że wykorzystywanie sformułowania długowieczność w przypadku braku parametru czasowego jest nieuzasadnione. Wynika to głównie z różnic fizjologicznych i morfologicznych szczepów referencyjnych, różnic w tempie wzrostu, czy reakcji na czynniki stresowe. Badania pokazały, że najmniejszą płodność miał szczep CEN.PK2-1C, natomiast najwyższą SP-4. Stosunkowo niskim

potencjałem reprodukcyjnym charakteryzował się również jeden z najczęściej wykorzystywanych szczepów BY4741. Istotnym w tej pracy było wykazanie, że wiele szczepów referencyjnych ma znacznie lepsze parametry starzeniowe od standardowego BY4741 również dlatego, że ten szczep przez swoją historię wykazuje różną średnią płodność w zależności od laboratorium [23,24]. W związku z tym zauważalne były różnice między laboratoriami w kontekście analiz tych samych warunków środowiskowych, czy mutacji. Wykonana została również analiza czasu reprodukcji, czasu podwojenia oraz czasu po reprodukcji. Wykazanie parametrów czasowych w analizach starzenia replikacyjnego nie jest standardem, a moim zdaniem w dyskusjach z wykorzystaniem różnych układów modelowych powinniśmy stosować te same jednostki określające wiek. Dla *S. cerevisiae* został przyjęty termin całkowita długość życia jako suma czasu reprodukcji i czasu po reprodukcji. Ten parametr świadczący o długowieczności jest modulowany przez wiele czynników, między innymi przez czas podwojenia, płodność szczepu, czy długość życia po reprodukcji, czego nie wykazują dane w standardowym podejściu replikacyjnego starzenia. W tej pracy wykazano, że najbardziej długowiecznym szczepem jest FY1679-01B i SY991, z kolei najszybciej starzeje się CEN.PK2-1C. Te dane wskazują, że tło genetyczne może mieć istotny wpływ nie tylko na potencjał reprodukcyjny, ale także długowieczność. Niestety efekty zależne od tła genetycznego są problemem w kontekście formułowania uniwersalnych wniosków, ale podkreślają wpływ, tzw. prywatnych czynników drożdży na starzenie. Dodatkowo pokazano, że zmiana markerów auktotroficznych może determinować długowieczność, ale nie potencjał reprodukcyjny. Udało się to wykazać stosując układ eksperymentalny szczepów FY1679-01B i FY1679-05A, które różnią się zastosowanymi markerami auktotroficznymi. Następnie skupiono się na wykazaniu zależności filogenetycznej pomiędzy analizowanymi szczepami. Aby osiągnąć ten cel, użyto fragment ITS1-5.8S-ITS2. Regiony rybosomalnego DNA (rDNA) to wysoce zmienne sekwencje o dużym znaczeniu w filogenetyce molekularnej. Dzięki tej analizie udało się wykazać związek pomiędzy pokrewieństwem szczepów a ich zdolnością do reprodukcji. Dlatego wydaje się wysoce prawdopodobne, że blisko spokrewnione szczepy mogą osiągać podobną płodność. Ostatnim etapem części eksperymentalnej w tej pracy było poszukiwanie możliwych biochemicznych markerów determinujących starzenie. Ta część została wykonana przy użyciu cieszącej się coraz większym zainteresowaniem techniki FTIR. Biorąc pod uwagę opublikowane wcześniej dane [20], podjęto próbę ustalenia możliwych zależności między wybranymi parametrami starzenia się szczepu a „odciskiem palca” generowanego przez spektroskopię FTIR. Co ważne, metoda ta zapewnia kompleksowy obraz biochemii komórki oraz daje wgląd we wzajemne oddziaływania głównych związków chemicznych tworzących komórkę. Dzięki technice FTIR odkryto, że pasmo drgań charakterystycznych dla grup karbonylowych pozwala na rozróżnienie szczepów zgodnie z ich długością życia po reprodukcji. W związku z tym analizy otrzymane dzięki zastosowaniu metody FTIR wskazały, że utrzymanie fosfolipidów na relatywnie niskim poziomie w komórce w stosunku do puli wolnych kwasów tłuszczowych może istotnie wpływać na fazę życia po reprodukcji. Jak wspomniano wcześniej, faza po reprodukcyjna stanowi kluczowy etap w życiu komórki i determinuje długowieczność.

Reasumując, w tej pracy po raz pierwszy zaprezentowano porównanie długości życia standardowo wykorzystywanych szczepów referencyjnych. Wykazano, że potencjał

reprodukcyjny szczepów jest zależny od pokrewieństwa filogenetycznego. Co ciekawe, szczepy bliźniacze pomimo identycznego potencjału reprodukcyjnego mają istotnie różne czasy życia komórki. Dodatkowo, co istotne uzyskane wyniki dają nowe światło na znaczenie metabolizmu lipidów i homeostazy w procesie starzenia aktywnych mitotycznie komórek drożdży. Po raz pierwszy pokazano również związek homeostazy lipidów z fazą życia po reprodukcji, a zatem można uznać wykorzystanie technik FTIR oraz analiz poziomu fosfolipidów za wygodny marker w badaniach nad starzeniem się.

4.3.3.2 Ściana komórkowa, jako czynnik determinujący potencjał reprodukcyjny

W porównaniu z komórkami ssaków drożdże *S. cerevisiae* wykazują szereg specyficznych cech dla tej grupy organizmów, do której należą asymetryczna cytokineza, zamknięta mitoz, czy też obecność ściany komórkowej [25,26]. O ile konsekwencje pączkowania jako sposobu rozmnażania bezpłciowego i zamkniętej mitozy były szeroko dyskutowane, to jak do tej pory niewiele wiadomo o wpływie zmian w strukturze ściany komórkowej na starzenie. Było jasne od lat, że wraz z wiekiem replikacyjnym dochodzi do zmian w składzie chemicznym ściany komórkowej oraz jej wielkości, czy też topografii powierzchni komórki [27,28]. Ściana komórkowa jest niezbędna do wzrostu drożdży i innych grzybów, rozmnażania się i interakcji z otoczeniem. W szczególności kontroluje kształt komórki i tempo wzrostu, zapewniając jednocześnie ochronę przed zewnętrznymi czynnikami mechanicznymi i wewnętrznymi czynnikami, jak np. ciśnienie osmotyczne [29]. Co ciekawe, synteza ściany komórkowej, utrzymanie jej stabilności i przebudowa kontrolowana jest przez około 1200 genów z 6275 genów obecnych u *S. cerevisiae* [30]. Zaangażowanie tak dużej grupy genów w utrzymanie stabilności ściany komórkowej i jej rearanżacji jest ważną motywacją do badania wpływu zmian w biosyntezie tej struktury na procesy starzenia.

Do dzisiaj niewiele wiadomo o zaangażowaniu ściany komórkowej w długowieczność grzybów, w tym i drożdży. Dlatego w pracy **Mołóń i in. 2018 [H2]** po raz pierwszy przedstawiono wpływ zaburzeń biosyntezy ściany komórkowej na zdolność do pączkowania drożdży, co jest standardowym podejściem do wykorzystania drożdży jako modelu w badaniach nad starzeniem replikacyjnym. Jako materiał wykorzystano szczepy z zaburzeniami w biosyntezie głównych związków budujących ścianę komórkową, w tym 1,3- β -glukany, chitynę i mannoproteiny. Analizy potencjału reprodukcyjnego wykorzystanych szczepów pokazały, że mutanty *mnn9 Δ* , *chs3 Δ* i *cts1 Δ* miały istotnie statystycznie zmniejszoną, z kolei mutant *knr4 Δ* istotnie zwiększoną zdolność do pączkowania. Nie wykazano zmian potencjału reprodukcyjnego jedynie w przypadku mutantu *fks1 Δ* . Co ciekawe, w przypadku szczepu *chs3 Δ* zaobserwowaliśmy zjawisko pęknięcia komórek, co jest moim zdaniem konsekwencją utraty integralności komórek przez niedobory chityny na poziomie blizn podziałowych. Tą hipotezę wydają się potwierdzać obserwacje z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej skaningowej (SEM). Jednocześnie warto podkreślić, że obserwacje fenotypu pęknięcia komórek są stosunkowo rzadkie u drożdży, w dodatku praktycznie nie do zarejestrowania na poziomie standardowych procedur wzrostowych stosowanych u drożdży. Dlatego przewagą metody analizy na poziomie pojedynczych komórek są obserwacje nie tylko zaburzenia w asymetrii podwojeń komórek, ale również ich pęknięcie. Sugeruje to, że pomimo niewielkiego procentowego udziału chityny w budowie ściany komórkowej jest to kluczowy

składnik zapewniający stabilność komórki *S. cerevisiae*. Wykorzystane tło genetyczne BY4741 charakteryzuje się niewielkimi rozmiarami komórek, zakładam że zastosowanie innego tła genetycznego, np. W303 mogłoby doprowadzić do jeszcze mniejszej zdolności reprodukcyjnej mutantu delecyjnego *chs3Δ*. Z pewnością w przyszłości warto sprawdzić i taką możliwość. Jedną z konsekwencji wyboru pączkowania jako sposobu rozmnażania bezpłciowego jest ciągły wzrost objętości komórki. Podczas kolejnych podwojeń komórka powiększa się i zmienia swój kształt, co jest w dużym stopniu kontrolowane przez właściwości ściany komórkowej. Przez lata gorąco dyskutowana była jedna z hipotez, która zakładała że objętość komórki może być czynnikiem ograniczającym liczbę podwojeń u drożdży. Ta hipoteza została wcześniej poparta przez kilka prac eksperymentalnych. Dlatego przetestowano tę hipotezę w zaproponowanym układzie eksperymentalnym. Dane otrzymane z analizy zmian objętości komórki podczas kolejnych podwojeń dają nowe światło na hipotezę hipertrofii i jednocześnie pokazują, że podstawowe założenia tej hipotezy mogą nie być oczywiste. W zaprezentowanym układzie eksperymentalnym jedynie mutanty *fks1Δ* i *knr4Δ* osiągnęły podobną do szczepu typu dzikiego maksymalną objętość po zakończeniu pączkowania. Jednak co ciekawe, w przypadku mutantów *chs3Δ*, *cts1Δ* i *mnn9Δ* maksymalna objętość była o około 50% niższa w porównaniu ze szczepem typu dzikiego. W konsekwencji, w przypadku tej grupy szczepów, większa objętość komórek była związana ze stosunkowo dłuższym okresem pączkowania. Jest to pierwszy wynik, który wskazuje, że komórki są w stanie osiągnąć znacznie mniejszą maksymalną objętość od szczepu kontrolnego zatrzymując proliferację. W związku z tym ściana komórkowa jest kluczowym czynnikiem w procesie determinującym zmiany wielkości komórek podczas starzenia. Następnie wykorzystano technikę transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) i SEM oraz sił atomowych (AFM) w celu dodatkowej charakterystyki szczepów oraz próby znalezienia korelacji dla otrzymanych wyników. Analiza grubości ściany komórkowej wykonanej z wykorzystaniem TEM wskazała, że zaburzenia w biosyntezie ściany komórkowej w analizowanym układzie eksperymentalnym mają istotny wpływ na zwiększenie grubości ściany komórkowej w szczepie *cts1Δ* i *fks1Δ* w porównaniu z kontrolnym szczepem BY4741 i istotne zmniejszenie grubości ściany komórkowej w przypadku mutantu *mnn9Δ*. Pomimo że nie udało się uzyskać korelacji pomiędzy potencjałem reprodukcyjnym i grubością ściany komórkowej, to należy podkreślić, że ta analiza została wykonana z wykorzystaniem populacji komórek w fazie logarytmicznej, a więc młodej reprodukcyjnie populacji i stanowiła jedynie element charakterystyki tych szczepów. Dlatego jest możliwe, że szczególnie w przypadku mutantu *mnn9Δ* drastyczny przyrost objętości i jednocześnie istotna redukcja potencjału reprodukcyjnego jest pochodną zmiany tego parametru. Następnie skoncentrowano się na analizie morfologicznej powierzchni komórki. Wykorzystano do tego dwa uzupełniające się narzędzie: SEM oraz AFM. Komórki mutantów różniły się w pewnym stopniu kształtem, objętością i morfologią blizny podziałowej w porównaniu ze szczepem typu dzikiego. Najbardziej uderzające różnice w topografii powierzchni zaobserwowano dla komórek szczepu *fks1Δ*, które wykazywały pewne wypukłości w postaci zmarszczek. Ten wynik pozwolił wykluczyć współdział zmian w powierzchni komórki, jakimi są zmarszczki, na potencjał reprodukcyjny. Wcześniejsze dane sugerowały, że konsekwencją starzenia się komórek drożdży jest pomarszczenie ściany komórkowej. W związku z tym, że delecja genu *FKS1* nie prowadzi do zmian w reprodukcji szczepu należy założyć, że zmarszczki komórek

powstające w starzejących się komórkach nie mogą być czynnikiem limitującym płodność szczepu, a stanowią jedynie fenotyp komórki po kilkunastu lub kilkudziesięciu podwojeniach. Zauważano również, że szczepy z zaburzeniami w syntezie chityny, tj. *chs3Δ* i *cts1Δ* mają widoczne zmiany na poziomie blizn podziałowych. Szczególne zmiany w przypadku *chs3Δ* są skorelowane z pękaniem znacznej części populacji starszych komórek. Co ciekawe, oba szczepy nie miały również możliwości osiągnięcia objętości maksymalnej szczepu dzikiego. Sugeruje to również kluczowy udział chityny na wzrost objętości komórki drożdży.

Następnie przeanalizowano możliwy związek między elastycznością ściany komórkowej a potencjałem reprodukcyjnym. Elastyczność ściany komórkowej była generalnie niższa w badanych mutantach w porównaniu ze szczep BY4741, z wyjątkiem *mn9Δ*. Zarówno w parametrze elastyczności jak i szorstkości komórek nie udało się wykazać istotnych zależności, które wyjaśniałyby zmiany w potencjale reprodukcyjnym analizowanych szczepów. Ostatecznie, aby zbadać, czy mutanty rzeczywiście wykazywały defekty w biosyntezie ściany komórkowej, przeprowadzono testy toksykologiczne z wykorzystaniem metody kropelkowej na podłożach zawierających Calcofluor White (CW) lub czerwien Kongo (CR). Obydwa związki są znane z zakłócania biosyntezy ściany komórkowej w szczepach dzikich. Nasze badania pokazują, że komórki mutantów *fs1Δ* i *knr4Δ* były nadwrażliwe na CW i CR, z kolei mutant *chs3Δ* był hiper odporny na oba inhibitory. Ponadto nie wykazano zmian wrażliwości komórek w porównaniu ze szczepem dzikim na czynnik metylujący (0.01% metanosulfonian metylu) i stres osmotyczny (0.5 M i 1 M NaCl).

Podsumowując, uzyskane w tej pracy dane jednoznacznie dowodzą, że zmiany na poziomie biosyntezy ściany komórkowej są czynnikiem determinującym potencjał reprodukcyjny, co stanowi nowatorski wkład w badania nad starzeniem. Dodatkowo wykazano, że ściana komórkowa jest kluczowym czynnikiem w procesie determinującym zmiany objętości komórek podczas starzenia, ze szczególnym udziałem chityny. Dlatego wydaje się, że w przyszłości niezbędne są dodatkowe analizy zmian na poziomie ściany komórkowej wynikające z działania czynników środowiskowych, czy genetycznych. W ten sposób będzie możliwe jednoznaczne wykazanie, na ile analizowany czynnik determinuje starzenie, a w jakim stopniu uzyskane zmiany w potencjale reprodukcyjnym są pochodnymi zmian na poziomie ściany komórkowej.

4.3.3.3 Wiek drożdżowej komórki matki, jako czynnik determinujący starzenie się komórek potomnych. Komórki drożdży mogą mieć zaprogramowaną długość życia.

Do tej pory wiele wysiłku włożono w poszukiwanie czynników odpowiedzialnych za starzenie się drożdżowej komórki matki. Natomiast wiedza na temat zmian w komórkach potomnych (komórkach córkach) pochodzących od starych matek jest wciąż mocno ograniczona. Wynika to z trudności w uzyskaniu materiału do badań. Komórka matka zatrzymuje wszystkie uszkodzenia w swoich komórkach, przynajmniej przez pierwszą część swojego życia replikacyjnego. Dzięki temu poświęceniu komórki potomne mają zresetowany zegar reprodukcyjny [31], co umożliwia funkcjonowanie populacji na wysokim poziomie sprawności reprodukcyjnej. Część tych czynników starzenia, jak np. dobrze opisane pozachromosomowe kółka rDNA (ERCs) komórka matka gromadzi w swoim jądrze komórkowym jako konsekwencja charakterystycznej dla drożdży mitozy zamkniętej. Jednak po kilkunastu

podwojeniach nie jest w stanie zatrzymać wszystkich uszkodzeń w swoich komórkach i zaczyna przenosić je do komórki potomnej.

Dlatego w artykule **Moloń i in. 2018 [H3]** wchodzącym w skład osiągnięcia, po raz pierwszy przedstawiono potencjał reprodukcyjny oraz długość życia komórek córek pochodzących od starych matek. Celem tej pracy było wykazanie, że wiek komórki matki jest kluczowym czynnikiem determinującym starzenie komórek potomnych. Jako materiał wykorzystano szczep referencyjny BY4741 oraz mutanty *lcl1Δ*, *lcl2Δ* (opisane wcześniej jako długowieczne w modelu chronologicznego starzenia) oraz mutant delecyjny *bud1Δ* (białko Bud1 zaangażowane jest w pierwszy krok podczas pączkowania). Kluczowym punktem w tej pracy było pozyskanie materiału badawczego. Komórki córki izolowane zostały z komórek matek po ich dwudziestym podwojeniu podczas rutynowej analizy potencjału reprodukcyjnego dzięki zastosowaniu mikromanipulacji. Pojedyncze komórki przeniesiono na szalce Petriego, gdzie wytworzyły kolonie, które stanowiły materiał wyjściowy dla eksperymentów (klony). Po pierwsze sprawdzono wzrost klonów w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Komórki klonów wykazywały znacznie wolniejszą kinetykę tempa wzrostu od kontroli i były mniejsze w obserwacjach mikroskopowych, dlatego podejrzewano zaburzenia na poziomie pozyskiwania energii. Sprawdzono wzrost na podłożu z niefermentowalnym źródłem węgla. Brak wzrostu na podłożu zawierającym glicerol jako źródło węgla wskazał zaburzenia na poziomie oddychania tlenowego, dlatego następnie wyznakowano DNA za pomocą barwnika fluorescencyjnego DAPI. Otrzymany wynik jednoznacznie potwierdził, że klony uzyskane ze starych komórek matek nie posiadały mtDNA, czyli były to komórki określane jako rho0. Na tej podstawie skonstruowano kontrole dla tych szczepów, wykorzystując do tego standardowy protokół z wykorzystaniem bromku etydyny. W związku z tym cały układ eksperymentalny składał się z komórek kontrolnych *rho+* (kompetentnych oddechowco), *rho0* oraz klonów (po sześć dla mutantów i trzy dla szczepu dzikiego). W tej pracy wykazano, że w przypadku większości klonów ich potencjał reprodukcyjny był istotnie statystycznie zmniejszony w porównaniu z kontrolą. Oznacza to, że podczas kolejnych podwojeń komórka matka przekazała tym komórkom szereg uszkodzeń ograniczających ich zdolność do reprodukcji. Z drugiej strony, analiza czasu życia pokazała, że zaskakująco o ile analizowane klony mają ograniczoną zdolność do pączkowania to w znakomitej większości ich długość życia jest na poziomie szczepu kontrolnego. Wykazano również silnie negatywną korelację pomiędzy czasem po reprodukcji a czasem reprodukcji oraz pomiędzy czasem po reprodukcji a potencjałem reprodukcyjnym. Oznacza to, że komórka pomimo krótkiego czasu reprodukcji ma wydłużony czas po reprodukcyjny, dlatego całkowita długość życia jest na poziomie szczepu kontrolnego. Dodatkowo potwierdza to wnioski zasugerowane w pracy [H1]. W związku z tym, co ciekawe uzyskane wyniki sugerują, że komórki drożdży mogą mieć zakodowaną i zdefiniowaną dla szczepu długość życia.

Następnie skoncentrowano się na zmianach w genomie i aparacie translacyjnym analizowanych szczepów i klonów. Analiza kariotypu z zastosowaniem metody separacji PFGE nie wykazała istotnych zmian na poziomie aberracji chromosomów, czy zmian wzoru kariotypu w analizowanym materiale. Z kolei analiza uszkodzeń DNA za pomocą metody komet wykazała, że w analizowanych klonach gromadzi się niewielka, ale istotna w porównaniu z kontrolą ilość pęknięć DNA w części z klonów. Następnie zbadano stabilność rDNA w analizowanych szczepach, ponieważ rDNA jest jednym z najbardziej niestabilnych regionów

w genomie drożdży. Prawie wszystkie analizowane klony wykazały statystycznie istotne zmiany w poziomie chromosomu XII (chromosom XII drożdży *S. cerevisiae* zawiera locus rDNA). Zatem istnieje korelacja między pęknięciami DNA a poziomem chromosomu XII, głównie w klonach szczepu dzikiego, *lcl1Δ* i *bud1Δ*. Reasumując, analizowane klony są bardziej podatne na pęknięcia podwójnej nici DNA, które z kolei zależą od poziomu rDNA. Dodatkowo byliśmy zainteresowani skorelowaniem różnic w potencjale reprodukcyjnym ze zmianami w architekturze jąderka, jego kształcie i rozmiarze, który odzwierciedla z kolei potencjał transkrypcyjny rRNA i biogenezę całego aparatu translacyjnego. Jak wiadomo, jąderko reprezentuje główne miejsce biogenezy rybosomów, dlatego można wnioskować, że w analizowanych klonach zachodzą zaburzenia, które mogą wpływać na aparat translacyjny. Uzyskane dane sugerują, że istnieje silny związek między potencjałem reprodukcyjnym, poziomem rDNA, uszkodzeniami DNA i zmianami w architekturze jąderka.

Ponieważ analizowane klony miały istotne zmiany na poziomie architektury jąderka, następnie skoncentrowano się na analizie profili polisomów. Związek między poszczególnymi frakcjami, w tym poziom podjednostek 40S, 60S, monosomu 80S i polisomów, pozwala na wgląd w kilka kluczowych zdarzeń metabolicznych, takich jak biogeneza, inicjacja, elongacja i terminacja aparatu translacyjnego. Profil polisomu dla szczepów kontrolnych (rho+) BY4741 *lcl1Δ*, *lcl2Δ* i *bud1Δ* odzwierciedlał typowy kształt frakcji rybosomalnych występujący w dzikim szczepie drożdży, z dobrze zaznaczonymi podjednostkami 40S, 60S, monosomem 80S i polisomem. Z kolei szczepy kontrolne (rho0) BY4741, *lcl1Δ* i *bud1Δ* wykazały pewne zmiany w profilu polisomów przede wszystkim na poziomie dominującej frakcji 60S, co wskazuje na akumulację wolnej podjednostki rybosomu 60S i w konsekwencji znaczną redukcję poziomu monosomu 80S. Reasumując, uzyskane dane dotyczące profilu polisomów sugerują, że w szczepie BY4741 (rho0) oraz w klonach *lcl1Δ* i *bud1Δ* występuje akumulacja podjednostki 60S, co wskazuje na defekt biogenezy rybosomów. Ten wynik jest zgodny z obserwacją zmian w morfologii jąderka w tych szczepach. Uzyskane dane pozwalają wnioskować, że za redukcję potencjału reprodukcyjnego, ale również spowolnione tempo wzrostu klonów odpowiadają pęknięcia nici DNA oraz ogólne zaburzenia w aparacie translacyjnym. W związku z tym, komórki potomne powstałe od starych drożdżowych komórek matek posiadają liczne zaburzenia, które sprawiają, że w dynamicznie rozwijającej się populacji nie mają szans na sukces ewolucyjny. Jest to zrozumiałe w kontekście utrzymania populacji jednokomórkowców na wysokim poziomie reprodukcyjnym.

W celu pełnego zobrazowania zmian została dodatkowo wykonana analiza metodą porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy (aCGH). Wstępne dane wykonane przy użyciu PFGE nie wykazały dużych zmian w liczbie chromosomów analizowanych szczepów. Wyniki uzyskane metodą aCGH potwierdziły brak znaczącej aneuploidii w wybranych szczepach. Ponadto potwierdzono obserwacje mikroskopowe dotyczące braku mtDNA przez klony. Metoda aCGH posłużyła sprawdzeniu, czy stare komórki matki przekazały swoim córkom zmodyfikowaną dawkę genu. Wykazano, że najbardziej znaczące różnice są związane z metabolizmem aminokwasów, głównie metioniny, histydyny, lizyny i leucyny. Pokazano również, że istotne zmiany dotyczą białek zaangażowanych w strukturę rybosomów mitochondrialnych, których geny znajdują się w genomie jądrowym. Inne zmiany w dawkowaniu genów były związane między innymi z wyciszaniem telomerów, stresem oksydacyjnym i osmotycznym, mejozą, ale dotyczyły również genów zaangażowanych

w strukturę akwaporyn, czy filamentów aktynowych. Co ciekawe, analiza aCGH wykazała również, że komórki pozbawione funkcjonalnego genu *BUDI* mają zwiększoną podatność na heteroplazmię.

Konkludując, zaprezentowana praca stanowi pierwsze doniesienie na temat zmian w potencjale reprodukcyjnym i starzeniu komórek potomnych pochodzących od starych reprodukcyjnie matek. Klony mają istotnie zredukowany potencjał reprodukcyjny bez zmian w czasie życia komórek. Dodatkowo analizowane klony są bardziej podatne na pęknięcia podwójnej nici DNA, które z kolei zależą od poziomu rDNA. Za redukcję potencjału reprodukcyjnego, ale również spowolnione tempo wzrostu klonów odpowiadają pęknięcia nici DNA oraz ogólne zaburzenia w aparacie translacyjnym. Warto podkreślić, że starzejące się komórki matki dodatkowo przekazują komórkom potomnym uszkodzone mitochondria, co sugeruje, że zatrzymanie cyklu komórkowego może być związane z nagromadzeniem uszkodzeń, czego konsekwencją jest, tzw. katastrofa mitotyczna.

4.3.3.4 Zmiany na poziomie maszyneryi translacyjnej jako czynniki regulujące potencjał reprodukcyjny i starzenie się komórek

W pracy **Moloń i in. 2018 [H3]** zaprezentowanej jako osiągnięcie wykazano, że zmiany w aparacie translacyjnym mogą mieć kluczowe znaczenie szczególnie dla potencjału reprodukcyjnego analizowanych szczepów. Dlatego problem zmian w aparacie translacyjnym, w kontekście starzenia został szerzej omówiony w pracach **Borkiewicz i in. 2019, Moloń i in. 2022, Moloń i in. 2020 oraz Szajwaj i in. 2017 [H4-H7]**. Zaburzenia w budowie małej, czy dużej podjednostki rybosomu były dyskutowane kilkakrotnie, ale jak do tej pory mało poznany jest udział zmian na poziomie centrum GTPazowego w procesie starzenia. Centrum GTPazowego zlokalizowane jest w dużej podjednostce rybosomu. W rybosomach eukariotycznych centrum GTPazowe stanowi, tzw. pętla sarcynowo-rycynowa (SRL), pętla tiostreptonowa oraz kciuk rybosomowy złożony z białek uL10, uL11 i dimeru P1-P2. W bliskiej odległości od SRL znajdują się białka uL11 oraz uL6, które razem z SRL tworzą sieć interakcji. Drugim aspektem, który chciałem podkreślić w tej części to udział genów paralogicznych w starzeniu komórki. Tempo i wydajność translacji są ściśle powiązane z długością życia, a jak wskazują badania zaburzenia w składzie białek rybosomalnych lub czynników translacyjnych mogą znacząco spowolnić proces starzenia u wszystkich eksperymentalnych modeli. Biosynteza białek, w tym i synteza samych rybosomów, jest najbardziej energochłonnym procesem, dlatego wszelkie zaburzenia w obrębie tych procesów ograniczają zużycie energii przez co mogą prowadzić do długowieczności. Może to stanowić również pewne wytłumaczenie korzystnego wpływu ograniczenia kalorii i uruchomienie szlaków metabolicznych spowalniających starzenie. Pomimo że u drożdży 137 genów koduje białka rybosomalne, to aż 59 z nich jest kodowana przez parę genów, które można uznać za paralogi [32]. Paralogi powstały jako konsekwencja duplikacji genomu i w większości przypadków białka kodowane przez parę genów są identyczne lub prawie identyczne [33]. Co ciekawe, delecja obu zduplikowanych genów często prowadzi do śmierci komórki, co pokazuje, że obie wersje białka są niezbędne do przynajmniej jednej podstawowej funkcji biologicznej, jednak samo biologiczne znaczenie tworzenia paralogów jest do dnia dzisiejszego niewyjaśnione [34]. Nie do końca jasny jest również wpływ delecji paralogów na procesy starzenia komórkowego. Jak pokazują dane literaturowe, w niektórych paralogach efekt usunięcia jednego z genów

znacząco wydłużał żywotność, podczas gdy usunięcie drugiego nie, co sugeruje pewną funkcjonalną dywergencję w obrębie poszczególnych izoform [35]. Ten problem w kontekście starzenia został rozwinięty w obrębie trzech publikacji przedstawionych jako osiągnięcie [H4-H6].

W publikacji Borkiewicz i in. 2019 [H4], w której byłem równorzędnym pierwszym autorem zbadano wpływ jednego ze zduplikowanych białek rybosomalnych na aparat translacyjny wraz z jego implikacjami dla potencjału reprodukcyjnego i starzenia się komórek drożdży. Rola białka uL6, zwłaszcza jego paralogów u eukariontów, pozostaje niejednoznaczna. Wcześniejsze badania, m. in. z wykorzystaniem *Drosophila melanogaster* i *Danio rerio* wykazały znaczenie uL6 dla prawidłowego wzrostu, rozwoju i żywotności tych organizmów [36,37]. W tej pracy wykazano, że paralogi *uL6A* i *uL6B* mają wysoki stopień homologii w sekwencji aminokwasowej równe 98.5%. Analiza przesiewowa fenotypu mutantów drożdży narażonych na różne warunki stresowe, m.in. stres osmotyczny, stres termiczny, stres oksydacyjny, stres proteotoksyczny czy czynniki powodujące zaburzenia w biosyntezie ściany komórkowej nie ujawniła żadnych istotnych różnic we wzroście w porównaniu ze szczepem typu dzikiego. Sugeruje to, że izoformy A i B białka uL6 nie odgrywają istotnej roli w adaptacji komórek drożdży do zmieniających się warunków środowiskowych. Następnie został przygotowany podwójny mutant (szczep pozbawiony obu paralogów). Usunięcie obu wersji genu uL6 nie prowadzi do wzrostu komórek, dlatego został wykorzystany wektor pYES2. W tym szczepie gen *uL6A* ulega ekspresji pod promotorem GAL1 (szczep GAL::uL6A). Kinetyka wzrostu szczepu na pożywce stałej uzupełnionej galaktozą była podobna do wzrostu szczepu typu dzikiego, a wzrost został całkowicie zatrzymany na podłożu uzupełnionym glukozą. Ta wstępna obserwacja sugerowała, że białko uL6 jest niezbędne do przeżycia drożdży. Jednak analizy tempa wzrostu na podłożu płynnym wykazały, że po przejściu z pożywki opartej na galaktozie na represyjną pożywkę opartą na glukozie, szczep GAL::uL6A znacząco spowolnił wzrost. Te dane zostały potwierdzone przez obserwacje mikroskopowe prowadzone na podłożu stałym, które potwierdziły, że w ciągu 24 h szczep GAL::uL6A był w stanie wykonać jedynie kilka podwojeń. Powolny wzrost zmutowanego szczepu można prawdopodobnie przypisać stabilności białek rybosomalnych, które są obecne w komórce przez ponad 24 godziny i mogą wspierać syntezę białek, przy jednoczesnym spowolnieniu tempa wzrostu. Niejednokrotnie standardowym podejściem do określenia przeżywalności komórek jest test wzrostowy na podłożu płynnym lub podłożu stałym, w tym i współczynnik formowania kolonii. Innymi słowy, jeśli komórka nie rośnie w podłożu, to oznacza, że nie żyje. W fenotypie drożdży, który znajduje się w bazach danych wielokrotnie możemy również spotkać się z określeniem, że szczep jest nieżywotny jako homodiploid czy haploid, a badania można prowadzić jedynie w wersji heterodiploida. Dlatego próbowano w tej pracy odpowiedzieć na fundamentalne pytanie, czy rzeczywiście usunięcie obu wersji genu *uL6* jest letalne dla komórki, czy prowadzi jedynie do zahamowania wzrostu poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego. W tym celu przygotowano hodowle płynne prowadzone na podłożu bogatym i wykonano test przeżywalności (znakowanie jodkiem propidyny). Okazało się, że zaledwie kilka procent komórek jest martwych, co wyraźnie pokazuje, że rybosomalne białka uL6 nie są niezbędne do przeżycia komórki, ale są niezbędne do progresji cyklu komórkowego. W celu uzyskania wglądu w udział obu paralogów *uL6* w funkcjonowaniu mechanizmu translacji, zbadano szybkość translacji przez pomiar inkorporacji znakowanej radioaktywnie

35S-metioniny dla pojedynczych mutantów w odniesieniu do szczepu referencyjnego. Badania jednoznacznie wykazały, że wydajność translacji mutantów z pojedynczą delecją była niższa o 20% dla obu zmutowanych szczepów w porównaniu z typem dzikim, co wskazuje, że brak jednej izoformy białka uL6 w konkretnym szczepie drożdży wpływa negatywnie na wydajność translacji. Przeprowadzono również analizę profilu polisomu w zaproponowanym układzie eksperymentalnym. Jak wspomniano wcześniej, analiza profilu polisomów pozwala na doskonałą charakterystykę maszynierii translacyjnej na poziomie podjednostek rybosomu, monosomu oraz polisomu. Badania wykazały prawie identyczne profile polisomów obu pojedynczych mutantów w porównaniu z komórkami typu dzikiego, co oznacza że działanie aparatu translacyjnego pojedynczych mutantów przypomina to w szczepie dzikim. Co ciekawe, pomimo ogólnych podobieństw w mutantach pojawia się charakterystyczna struktura, tzw. „half-mer” co sugeruje, że skutkiem braku tych pojedynczych białek w komórce są defekty w inicjacji translacji lub zaburzenia w biogenezie dużej podjednostki rybosomu. Analiza podwójnego mutantu na podłożu z galaktozą nie wykazała zmian w profilu polisomów, z kolei przeniesienie komórek na podłoże represyjne oparte na glukozie z jednoczesną represją ekspresji genu *uL6A* spowodowało dramatyczne zmiany w profilu polisomów. Dotyczyły one obniżeniu poziomu polisomów, któremu towarzyszyła akumulacja podjednostki 40S i istotna redukcja podjednostek 60S. Ta cecha wskazuje na kluczowe znaczenie białka uL6 dla biogenezy dużej podjednostki rybosomów. Analiza komplementacji wykazała, że dodatkowe kopie białka uL6 przywracają fenotyp typu dzikiego. We wszystkich analizowanych przypadkach zaobserwowano powrót do charakterystycznego dla szczepu dzikiego profilu polisomów.

Nie wiele wiadomo o wpływie delecji paralogów na starzenie się komórek. Dlatego wykorzystano białko uL6 do prześledzenia zmian na poziomie starzenia w układzie pojedynczych delecji izoformy A lub B oraz w przypadku podwójnego mutantu. Już wcześniej pojawiały się dane, że obniżenie wydajności mechanizmu translacyjnego może przynieść pozytywne zmiany w przeżywalności komórek eukariotycznych [23,35]. Te dane, pomimo że traktują o starzeniu to w rzeczywistości dotyczą jedynie ich potencjału reprodukcyjnego. Dlatego w tej pracy, podobnie jak w pracach [H1] i [H3] wykorzystano jako jednostkę starzenia się czas, a nie jedynie liczbę wyprodukowanych komórek potomnych. Analizy dotyczące starzenia wykonano na podłożu z glukozą oraz na podłożu z galaktozą. Podczas wzrostu na podłożu z glukozą wykazano, że brak jednego z genów *uL6A* lub *uL6B* prowadzi do statystycznie istotnego wzrostu średniego potencjału reprodukcyjnego w porównaniu ze szczepem dzikim. Z kolei delecja obu genów drastycznie redukuje liczbę komórek potomnych wyprodukowanych przez drożdżową komórkę matkę do około 3 podwojeń, w porównaniu z około 20 dla szczepu typu dzikiego. Różnicom tym towarzyszył istotnie statystycznie wydłużenie czasu życia reprodukcyjnego pojedynczych mutantów i skrócona długość życia reprodukcyjnego podwójnego mutantu. Co ciekawe, delecja obu wersji genów uL6 jednocześnie prowadzi do długowieczności komórek tego szczepu, zwiększając średnią długość życia ponad dwukrotnie w porównaniu ze szczepem referencyjnym. Długowieczność podwójnego mutantu wiąże się ze znacznym wydłużeniem czasu życia po reprodukcji w porównaniu z kontrolą, co jak wspomniałem wcześniej [H1], wydaje się być kluczowym parametrem determinującym długowieczność. Dodatkowo na szczególną uwagę zwraca brak istotnego statystycznie wydłużenia czasu życia pojedynczych mutantów. Dlatego, pomimo

istotnego zwiększenia liczby wyprodukowanych pączków, długość życia komórek tych szczepów pozostaje na poziomie szczepu dzikiego. W związku z tym otrzymane dane po raz kolejny potwierdzają, że potencjał reprodukcyjny szczepów nie powinien być wykorzystywany jako jedyny wyznacznik długowieczności w badaniach nad starzeniem z wykorzystaniem drożdży.

Co ciekawe, analizy tempa starzenia pojedynczych komórek wykonane na podłożu zawierającym galaktozę jako źródło węgla wykazały z kolei, że w wyniku delecji jednego z genów *uL6A* lub *uL6B* nie dochodzi do zmian w potencjale reprodukcyjnym w porównaniu ze szczepem typu dzikiego, podczas gdy w podwójnym mutancie (*GAL::uL6A*) dochodzi do redukcji tego parametru prawie o połowę. Ponadto nie zaobserwowano zmian w czasie reprodukcji u mutantów z pojedynczą delecją w porównaniu z kontrolą, podczas gdy podwójny mutant wykazywał znacznie skrócony czas reprodukcji. Istotne różnice odnotowano natomiast podczas analizy czasu życia po reprodukcji i w całkowitej długości życia. We wszystkich przypadkach mutanty (pojedyncze lub podwójny) miały znacznie wydłużony czas po reprodukcji oraz całkowitą długość życia (zwłaszcza *GAL::uL6A*). Badania dotyczące tempa wzrostu oraz starzenia pokazują, że zatrzymanie wzrostu szczepu *GAL::uL6A* na podłożu z glukozą jest głównie związane z zaburzeniami na poziomie cyklu komórkowego, a nie szlaku determinującego starzenie się i śmierć komórki. Dodatkowo warto podkreślić, że brak jednej izoformy białka uL6 wywiera większy wpływ na parametry fizjologiczne w przypadku dynamicznie rosnących komórek na podłożu z glukozą, w przeciwieństwie do warunków panujących na podłożu zawierającym galaktozę.

Reasumując, w tej pracy wykazano, że uL6 nie jest wymagany do przeżycia komórek, chociaż brak tego białka zmniejsza tempo wzrostu i istotnie obniża zdolność do pączkowania. Białko uL6 ma kluczowe znaczenie dla wydajnego składania podjednostki rybosomu 60S, a obie izoformy uL6 najprawdopodobniej pełnią tę samą funkcję, odgrywając ważną rolę w dostosowaniu działania mechanizmu translacji do potrzeb metabolicznych komórki. Brak jednej izoformy białka uL6 wywiera większy wpływ na parametry fizjologiczne w przypadku dynamicznie rosnących komórek na podłożu z glukozą, niż na podłożu zawierającym galaktozę. Delecja pojedynczego genu *uL6* znacząco zwiększa liczbę podwojeń drożdżowej komórki matki, ale tylko w komórkach o wysokim tempie metabolizmu (wzrost na podłożu z glukozą). W związku z tym utrzymanie dwóch kopii genu *uL6* umożliwia komórce sprostanie wysokim wymaganiom skutecznej syntezy rybosomów. Dużym wkładem w rozwój biogerontologii, ale również mikrobiologii ogólnej jest wynik uzyskany dla podwójnego mutantu. Warto podkreślić, że brak wzrostu komórki nie musi być równoznaczny z jego śmiercią. W tej pracy wykazano, że wręcz przeciwnie, zatrzymanie cyklu komórkowego spowodowanego przez brak białka uL6 prowadzi do długowieczności.

W pracy **Moloń i in. 2022 [H5]** kontynuowano wątek udziału paralogów *uL6* w procesie starzenia. Celem tej pracy było wykazanie wpływu nadekspresji *uL6A* i *uL6B* w mutantach delecyjnych i w szczepie referencyjnym na starzenie komórek. Dane zaprezentowane we wcześniejszej pracy wykazały, że komplementacja mutacji genu *uL6A* lub *uL6B* prowadzi do powrotu fenotypu dzikiego pod względem profilu polisomów. Jako pierwsze sprawdzono kinetykę wzrostu. Zaskakująco nadekspresja uL6 prowadzi do spowolnienia kinetyki wzrostu analizowanych szczepów (dane niepublikowane). Ta wstępna obserwacja była podstawą do określenia względnego poziomu mRNA obu paralogów pochodzących z genomu

i plazmidów. Główny wynik uzyskany z tego eksperymentu wskazuje, że względna ilość mRNA pochodzącego z plazmidu w formie B jest kilkakrotnie większa niż ilość mRNA pochodzącego z plazmidu niosącego wariant formy A genu *uL6*. Dodatkowo poziom mRNA pochodzącego z plazmidu jest wielokrotnie większy w porównaniu z mRNA pochodzenia genomowego. Największe zmiany odnotowano podczas nadekspresji formy *uL6B*. W przypadku mutanta *uL6bΔ* komplementacja plazmidem niosącym gen *uL6B* prowadzi do wzrostu poziomu mRNA prawie 152 razy, w szczepie *uL6aΔ* prawie 108 razy, natomiast w szczepie typu dzikiego około 75 razy. Z kolei poziom mRNA podczas nadekspresji *uL6A* wzrósł 6-krotnie w szczepie dzikim, 12-krotnie w mutancie *uL6aΔ* i prawie 24-krotnie w mutancie *uL6bΔ*. Zastanawiające było zróżnicowanie poziomu ekspresji paralogów *uL6* w analizowanych szczepach, dlatego następnie wykorzystaliśmy testy utraty plazmidu i toksyczności, aby wykazać, że znacznie niższy poziom formy A genu *uL6* jest związany z toksycznością tego białka lub samego mRNA. Badania jednoznacznie pokazują, że obecność dwóch wersji *uL6A*, tj. genomowej i plazmidowej jednocześnie w przypadku szczepu dzikiego i mutanta *uL6bΔ* prowadzi do utraty plazmidu w krótkim czasie po wzroście na podłożu bogatym. Po trzech pasażach mniej niż 10% komórek szczepu dzikiego i *uL6bΔ* posiadało plazmid i było następnie zdolne do wzrostu w podłożu selekcyjnym SD-ura. W przypadku nadekspresji *uL6B* nie zauważyliśmy żadnych istotnych zmian, albo efekt był pozytywny (np. *uL6aΔ*) w porównaniu z kontrolą. Dodatkowo, co istotne wzrost poziomu mRNA *uL6A* prowadzi do wzrostu wrażliwości na stres środowiskowy, w tym osmotyczny, oksydacyjny i inhibitory biosyntezy ściany komórkowej. Ten wynik sugeruje nie tylko udział *uL6A* w odpowiedzi na stres środowiskowy, ale również kluczową rolę tego białka w biosyntezie ściany komórkowej lub jej przebudowie. Co zaskakujące, nasze badania pokazują, że stres ten jest niezależny od czynnika Hac1, który jest zaangażowany w odpowiedź na stres retikulum endoplazmatycznego.

Kluczowe w zrozumieniu roli zwiększenia ilości mRNA paralogów genu *uL6* były analizy tempa starzenia na poziomie pojedynczych komórek. W tej pracy wykazano, że nadekspresja zarówno genów *uL6A*, jak i *uL6B* prowadzi do statystycznie istotnego zmniejszenia potencjału reprodukcyjnego dla wszystkich analizowanych szczepów ($p < 0.001$) w porównaniu z kontrolą. Co zaskakujące, komplementacja genów *uL6A* lub *uL6B* w mutanty nie spowodowały powrotu do fenotypu typu dzikiego, co oczekiwano na podstawie danych z profilu rybosomów. Odnotowano również skrócenie długości życia reprodukcyjnego ($p < 0.001$) szczepów z nadekspresją *uL6A* lub *uL6B* niezależnie od szczepu kontrolnego. Analiza całkowitej długości życia wykazała, że zwiększenie ilości mRNA paralogów *uL6* w komórce przyspiesza starzenie. Dodatkową wartością tej pracy jest wykazanie, że pojedyncze mutanty zawierające wektor kontrolny miały istotnie zwiększony potencjał reprodukcyjny w porównaniu ze szczepem dzikim. Pokazuje to, że zastosowane źródło węgla, a nie podłoże (bogate/ubogie) jest czynnikiem krytycznym dla uzyskania przez komórki drożdży zwiększonego potencjału reprodukcyjnego.

Reasumując, nadekspresja zarówno *uL6A*, jak i *uL6B* przyspiesza starzenie się komórek drożdży. Poziom mRNA *uL6A* jest ściśle kontrolowany przez komórki, a białko *uL6a* odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi na stres środowiskowy, m.in. stres oksydacyjny i osmotyczny w sposób niezależny od Hac1. Zatem białka *uL6* są zaangażowane w liczne zdarzenia

biologiczne, wykraczające poza translację, z funkcją pozarybosomalną lub aktywnością wielofunkcyjną podkreślającą ich funkcjonalną heterogeniczność.

W pracy **Mołóń i in. 2020 [H6]** skupiono się na białku uL11 zlokalizowanym w obrębie dużej podjednostki rybosomu. Badania do tej pracy zostały zrealizowane w ramach otrzymanego projektu badawczego przez NCN - Miniatura-2.

Translacja podobnie jak i inne procesy komórkowe wymagają dostarczenia energii. W przypadku rybosomów energia ta pochodzi z hydrolizy GTP przy udziale centrum GTPazowego. Białko uL11, które jest przedmiotem tej pracy reprezentuje silnie zakonserwowane ewolucyjnie białko rybosomalne i jest uważane za jeden z ważniejszych składników centrum GTPazowego, biorące udział w wielu aspektach cyklu życiowego rybosomu, począwszy od biogenezy podjednostki 60S, inicjacji translacji, a na elongacji kończąc. uL11 podobnie jak uL6 występuje w genomie w formie paralogu. Jak wcześniej wspomniano rola zduplikowanego białka rybosomalnego w komórce nie została ostatecznie wyjaśniona, natomiast jedna z hipotez zakłada, że białka rybosomalne spełniają funkcje regulacyjne. Istnieje kilka propozycji podkreślających regulacyjną rolę białek rybosomalnych, w tym możliwy udział wielofunkcyjnych białek rybosomalnych, tzw. protein moonlighting, w determinowaniu starzenia, które nigdy nie zostały dokładnie zbadane w kontekście heterogeniczności tych białek. Warto podkreślić, że dotychczasowe badania nie rozstrzygnęły również, czy wydłużenie życia jest bezpośrednio związane z redukcją syntezy białek, czy też stanowi efekt związany z pozarybosomalną aktywnością białek rybosomalnych. Wydaje się, że kolejne odkrycia wielofunkcyjnych białek rybosomalnych są kluczowe w rozstrzygnięciu roli rybosomu i jego biogenezy w zapewnieniu długowieczności.

Materiałem badawczym w tej pracy były pojedyncze mutanty *uL11aΔ* i *uL11bΔ* oraz podwójny mutant *uL11abΔ*, a kontrolę stanowił szczep BY4741. Początkowo wykonano standardowy test kinetyki tempa wzrostu. Badania pokazały, że usunięcie paralogu A nie miało żadnego wpływu na tempo wzrostu, natomiast usunięcie paralogu B lub usunięcie obu zduplikowanych genów istotnie zaburzyło wzrost komórek. Potwierdziły to dane czasu podwojenia wykonane podczas analizy potencjału reprodukcyjnego. Czas podwojenia podwójnego mutantu był dwukrotnie dłuższy w porównaniu z kontrolą. Co ciekawe, oba paralogi mają identyczną sekwencję aminokwasową, a w szczepie dzikim ich ekspresja jest na podobnym poziomie (analiza na podstawie danych z sekwencjonowania metodą RNA-Seq). Pomimo tego już wstępne analizy wykazały istotne różnice w fenotypie pomiędzy mutantami. Następnie wykonano analizę cyklu komórkowego. Podwójny mutant wykazywał zaburzenia w przejściu z fazy G1 do G2 cyklu komórkowego ze znaczną akumulacją w fazie S. Dane te uzupełniają wynik analizy czasu podwojenia i wskazują, że efekt powolnego wzrostu mutantu *uL11abΔ* jest głównie związany z zaburzeniami cyklu komórkowego. Następnie wykonano standardowe analizy wpływu czynników stresowych na wzrost komórek. Badania pokazują, że izoformy A i B białka uL11 nie odgrywają istotnej roli w adaptacji komórki drożdży do zmieniających się warunków środowiskowych. Jednak brak obu izoform *uL11* prowadzi do nadwrażliwości na czynniki powodujące zaburzenia w syntezie ściany komórkowej (Czerwień Kongo i Calcafluor White). Dodatkowo komórki pozbawione izoformy B lub obu izoform wykazywały wrażliwość na nadtlenek wodoru, co sugeruje pewną rolę białka uL11 w adaptacji na stres oksydacyjny. Kolejne analizy dotyczyły sprawności translacyjnej analizowanych szczepów. Największe upośledzenie translacji, bo aż o 70% w porównaniu z kontrolą,

odnotowano dla komórek pozbawionych obu wersji genu *uL11*, natomiast najmniejsze (o 10%) dla komórek pozbawionych izoformy A. Brak paralogu B upośledził istotnie translację aż o 40% w porównaniu z kontrolą. Te wyniki potwierdzają poprzednie analizy, pokazując korelację między defektem wzrostu a zaburzeniami na poziomie wydajności translacji. Następnie skoncentrowano się na analizie profilu polisomów analizowanych szczepów. Analizy wykazały, że delecje pojedynczych izoform *uL11* mają wpływ na profil polisomu, zwłaszcza na parametr dotyczący stosunku polisomu do monosomu 80S. Badania wskazują, że frakcja polisomalna jest zmniejszona, co sugeruje zaburzenia w aktywnej frakcji rybosomów. Z kolei jednoczesny brak izoform A i B spowodował dramatyczne zmiany w profilu polisomów z pojawieniem się struktury half-mer. Struktury half-mer, o czym wspomniano wcześniej, mogą powstać w wyniku zakłóceń w biogenezie podjednostki 60S lub w wyniku defektu inicjacji translacji. Dodatkowo zmienił się stosunek podjednostki 40S/60S, pokazując jednocześnie nagromadzenie podjednostki 40S i niedobór 60S. W związku z tym half-mery najprawdopodobniej powstają w wyniku defektu biogenezy dużej podjednostki rybosomu. Brak obu wersji białka uL11 prowadzi również do obniżenia stosunku polisomu do monosomu, co sugeruje zaburzenie maszyneryi translacyjnej i jednocześnie wspiera bardzo niską zdolność translacyjną i wyjaśnia fenotyp powolnego wzrostu. Następnie skierowano pytanie, czy te zaburzenia mają wpływ na potencjał reprodukcyjny i długość życia komórek w badanym układzie eksperymentalnym. Brak pojedynczych paralogów istotnie zwiększa potencjał reprodukcyjny komórek, przy czym ponad dwukrotnie w przypadku paralogu A i o 66% w przypadku wersji B. Te dane są spójne z uzyskanymi danymi w pracy **H4**, gdzie wykazano również zwiększenie potencjału reprodukcyjnego pojedynczych mutantów. Pomimo istotnych zaburzeń w maszyneryi translacyjnej w przypadku podwójnego mutantu dochodzi do zwiększenia liczby komórek córek wyprodukowanych przez komórkę matkę w porównaniu z kontrolą, ale ten wynik nie był istotny statystycznie. Analizy czasu reprodukcji pokazują, że wszystkie analizowane szczepy miały istotnie statystycznie wydłużony czas reprodukcji w porównaniu z kontrolą. W przypadku pojedynczych mutantów była to pochodna znacznego zwiększenia potencjału reprodukcyjnego, natomiast w przypadku podwójnego mutantu związana z istotnym wydłużeniem czasu podwojenia. Z kolei analizy czasu po reprodukcji pokazały, że podwójny mutant ma drastycznie skrócony czas życia po reprodukcji w porównaniu z BY4741. Istotnie statystycznie skrócenie czasu po reprodukcji odnotowano również w przypadku pojedynczych mutantów. Ponadto oznaczono całkowitą długość życia analizowanych szczepów. Uzyskane w tej pracy wyniki wskazują, że komórki szczepu *uL11aΔ* mają istotnie wydłużony czas życia w porównaniu z kontrolą, co czyni go szczepem długowiecznym. Brak izoformy B lub obu izoform nie miało wpływu na czas życia, co pokazuje po raz kolejny, że brak parametru czasowego w badaniach z wykorzystaniem drożdży jako modelu jest niewystarczający i generuje rozbieżne wnioski. Można zatem konkludować, że łagodne zmiany tempa syntezy białek zwiększają przeżywalność komórek. Podczas eksperymentu określającego potencjał reprodukcyjnych zaobserwowano znaczny wzrost objętości komórek w porównaniu z kontrolą, dlatego następnie przeanalizowano kinetykę wzrostu komórek podczas kolejnych podwojeń. Zmiany wielkości komórek są istotne w świetle hipotezy hipertrofii. Dlatego tutaj skoncentrowano się na testowaniu tej hipotezy. Zaprezentowane wyniki badań pokazują, że komórki pozbawione paralogu A lub B mają istotnie zwiększony przyrost objętości komórek podczas kolejnych podwojeń w porównaniu

z kontrolą. Te analizy podważają podstawy hipotezy hipertrofii. W tym przypadku objętość nie może być kluczowym czynnikiem w determinowaniu liczby podwojeń, o czym dyskutowano również w pracy [H2]. Zaobserwowany przyspieszony przyrost objętości komórek podwójnego mutantu na podwojenie oraz towarzyszący fenotyp pękanie komórek stał się podstawą do analizy morfologii wakuoli. Otrzymane dane pokazują, że usunięcie obu izoform genu *uL11* istotnie wpłynęło na morfologię wakuoli, wykazując tworzenie się jednej dużej wakuoli, co może wskazywać na ich fuzję. Z drugiej strony, szczep typu dzikiego i pojedyncze mutanty wykazały podobny wzór morfologii wakuoli, z kilkoma małymi wakuolami w komórce, co jest charakterystyczne dla tego tła genetycznego. Obserwowane zjawisko fuzji wakuoli u podwójnego mutantu wraz z dysfunkcją na poziomie biosyntezy ściany komórkowej tłumaczą zjawisko pęknięcia komórek tuż po zakończeniu reprodukcji i istotną redukcję czasu po reprodukcji. Najprawdopodobniej wakuola wywiera mocny nacisk na ścianę komórkową, prowadząc do jej stresu. Fenotyp pękających komórek jest rzadki u drożdży o czym wspomniano wcześniej, ale moje badania pokazują, że istotnie determinuje potencjał reprodukcyjny w przypadku mutantów, które mają zaburzenia w biosyntezie chityny [H2]. Dlatego ten eksperyment silnie potwierdza moje wcześniejsze obserwacje dotyczące kluczowego udziału ściany komórkowej w starzeniu się drożdży. W związku z tym ten prywatny czynnik starzenia staje się kluczowym graczem podczas wykorzystania modelu drożdżowego w badaniach nad starzeniem. Następnie, w celu oceny odpowiedzi komórek na delecję genu *uL11*, przeprowadzono szeroką analizę transkryptomu w analizowanym układzie eksperymentalnym. Badania pokazały, że w przypadku szczepu *uL11aΔ* doszło do istotnego zaburzenia ekspresji ok. 1500 genów, a w przypadku *uL11bΔ* ponad 2000 genów (z 6275 genów, które posiadają drożdże). Najwyraźniejszy efekt odnotowano dla komórek pozbawionych obu izoform genu *uL11*, gdzie doszło do istotnego zakłócenia ekspresji ponad 3500 genów. W przypadku podwójnego mutantu te zmiany dotyczyły grupy genów związanych z jądrem, pre-rybosomami, cytoszkieletem, mikrotubulami wrzeciona kariokinetycznego, wakuolami czy genami związanymi z biogenezą ściany komórkowej.

Następnie skupiono się na ocenie liczby genów, których ekspresja uległa zmianie pomiędzy kontrolą, a komórkami pozbawionymi białek uL11. Przeanalizowano kilka szlaków związanych głównie ze starzeniem się i śmiercią komórki, cyklem komórkowym, translacją, biogenezą ściany komórkowej, biogenezą rybosomów oraz odpowiedzią na stres oksydacyjny. Dominujący efekt zaobserwowano w obszarze translacji, w tym biogenezy rybosomów oraz w cyklu komórkowym i odpowiedzi na stres oksydacyjny. Najbardziej wyraźny efekt związany był z usunięciem obu paralogów *uL11*. Jednoczesny brak form A i B wywarł najsilniejszy wpływ na aparat translacyjny, prowadząc do nadekspresji 291 genów związanych z translacją i biogenezą rybosomów oraz obniżając ekspresję 171 genów w tych samych kategoriach. Duże zmiany odnotowano na poziomie genów regulujących cykl komórkowy. Delecja obu wersji genu *uL11* prowadzi do nadekspresji 129 genów, a ekspresja 249 genów zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego była obniżona.

Uzyskane w tej pracy wyniki pokazały jednoznacznie, że mutacje w paralogicznych genach *uL11* prowadzą do istotnych zmian metabolicznych na poziomie komórki. Dlatego następnie sformułowano pytanie, czy te zmiany mają wpływ na skład chemiczny komórki, co jest swoistym odzwierciedleniem metabolomu komórki. Aby odpowiedzieć na to pytanie zastosowano spektroskopię Ramana. Wszystkie analizowane próbki wykazywały widma

z licznymi pikami odzwierciedlającymi skład chemiczny komórki. Wzór pików był podobny we wszystkich analizowanych szczepach, ale miał różną intensywność. Różnice w intensywności pików wynikają z różnych ilości związków chemicznych w badanych komórkach drożdży, co wskazuje na zmienność chemiczną analizowanych mutantów drożdży w porównaniu ze szczepem typu dzikiego. Analiza komórek szczepu *uL1labΔ* wykazała, że wszystkie wyraźne sygnały w widmie ramanowskim miały statystycznie istotnie niższe intensywności pików w porównaniu z kontrolą, co wyraźnie wskazuje na zmianę metabolomu tego szczepu. Co ciekawe, szczep *uL1laΔ* wykazywał podobne do kontroli lub wyższe wartości niektórych składników chemicznych. Te istotne zmiany dotyczą między innymi pików odpowiedzialnych za RNA, polisacharydy i fosfolipidy. Może to sugerować istotny wpływ tych makromolekuł w utrzymaniu wysokiego potencjału reprodukcyjnego i/lub długowieczności.

Podsumowując, w tej pracy wykazano, że brak paralogów *uL1IA* lub *uL1IB* prowadzi do zwiększenia potencjału reprodukcyjnego komórki, z kolei brak obu wersji tego genu nie wpływa na ten parametr. W przypadku szczepu *uL1labΔ* obserwujemy fuzję wakuoli, co prowadzi do gwałtownego wzrostu tempa objętości. Ten szczep wykazuje również fenotyp pęknięcia komórek, co jest skorelowane z fuzją wakuoli oraz wrażliwością na inhibitory biosyntezy ściany komórkowej. Pojedyncze mutanty wykazują znacznie wyższe maksymalne objętości w porównaniu ze szczepem kontrolnym, co stoi w kontrze z podstawami gorąco dyskutowanej hipotezy hipertrofii. Brak obu wersji paralogów *uL1I* wywiera wpływ na ekspresję ponad 3500 genów.

W publikacji **Szajwaj i in. 2019 [H7]** włączonej jako osiągnięcie przedstawiono kompleksowy obraz wpływu depurynacji pętli sarcynowo-rycynowej (SRL) na aparat translacyjny *in vivo*. Pętla sarcynowo-rycynowa stanowi najbardziej konserwowaną część rRNA dużej podjednostki rybosomalnej. Z kolei sama rycyna uważana jest za jedną z najsilniejszych toksyn roślinnych inaktywujących rybosomy. Zbudowana jest z dwóch podjednostek: A (RTA) i B (RTB), przy czym właściwości toksyczne (depurynacja adeniny w rRNA SRL) ma podjednostka A rycyny. SRL stanowi zasadniczy element centrum GTPazowego i jej rolą jest hydroliza GTP przez białka o aktywności GTPaz. Jak wspomniałem wcześniej w bliskiej odległości od SRL znajdują się białka uL11 oraz uL6, które razem z SRL tworzą sieć interakcji. Badania w układzie *in vitro* wykazały, że depurynacja pętli sarcynowo-rycynowej po działaniu rycyną inaktywuje rybosomy poprzez hamowanie translokacji podczas elongacji translacji. Do eksperymentów wykorzystano drożdże w tle genetycznym W303 oraz skonstruowany plazmid zawierający RTA. Ekspresja genu była ściśle kontrolowana za pomocą promotora GAL1. W konsekwencji hodowla na podłożu zawierającym galaktozę jako źródło węgla indukowała ekspresję toksycznej rycyny, natomiast wzrost na podłożu z glukozą działał jako represor ekspresji tego genu. Brak wzrostu na galaktozie świadczył o poprawności układu eksperymentalnego i jednoczesnym toksycznym działaniu rycyny. Analiza RT-qPCR wykazała, że w warunkach ekspresji rycyny jedynie 10% rybosomów było depurynowanych po 6 godzinach eksperymentu. Co ciekawe, w warunkach represji ekspresji 1.6% rybosomów wykazywało depurynację, co może świadczyć o tzw. przeciekaniu wykorzystanego promotora. Zakłada się, że rycyna wyłącza rybosomy *in vitro*, ale wpływ na translację *in vivo* nie został jak do tej pory wyjaśniony. Badania pokazują, że wydajność translacji została zmniejszona do 47% w warunkach represji w porównaniu z kontrolą, co wskazuje, że nawet niewielki poziom depurynacji pętli sarcynowo-rycynowej przez rycynę

jest w stanie nieproporcjonalnie zmniejszyć ogólną aktywność translacyjną. Co ważne, po przełączeniu źródła węgla na galaktozę, komórki z ekspresją RTA wykazywały dalszy spadek sprawności translacyjnej. Należy jednak zaznaczyć, że poziom hamowania translacji po indukcji galaktozy był proporcjonalny zarówno w komórkach kontrolnych, jak i w komórkach z ekspresją RTA. Dodatkowo wydajność translacji mierzona podczas indukcji galaktozy, była taka sama w komórkach kontrolnych i komórkach z ekspresją RTA w czasie trwania eksperymentu. W związku z tym poziom zahamowania translacji nie korelował z poziomem depurynacji SRL. Dodatkowo wykonane analizy poziomu wprowadzeniu błędnego aminokwasu pokazują, że komórki, w których doszło do ekspresji rycyny mają zwiększony poziom wprowadzania błędnego aminokwasu co również nie korelowało z poziomem depurynacji SRL.

Kluczowe i interesujące wyniki uzyskano analizując tempo starzenia. Wcześniej wykazano, że obecność rycyny w komórce powoduje jej śmierć prawdopodobnie na drodze apoptozy [38]. Co ciekawe, zahamowanie wzrostu drożdży, na które działała rycyna okazało się odwracalne. Gdy komórki ekspresyjnie RTA po indukcji galaktozą wysiano na nioselektywną bogatą pożywkę YPD (Yeast extract Peptone Dextrose), wzrost został przywrócony. Na podłożu bogatym komórki powróciły do cyklu komórkowego, co wskazuje, że rycyna nie jest czynnikiem prowadzącym do śmierci komórki, a jedynie hamuje proliferację. Potwierdziły to testy mikroskopowe, gdzie wykazano zaburzenia w morfologii komórek traktowanych rycyną oraz zmniejszony indeks pączkowania, co wskazuje na zaburzenia w cyklu komórkowym. Te obserwacje potwierdziły analizy z zastosowaniem cytometrii przepływowej. Badania żywotności nie wykazały istotnych różnic w śmiertelności komórek z ekspresją rycyny. Dlatego kluczowym było określenie potencjału reprodukcyjnego oraz czasu życia pojedynczych komórek. Eksperyment wykonano na podłożu zawierającym glukozę i galaktozę jako źródło węgla. Analizy na pożywce zawierającej glukozę wykazały, że komórki zawierające plazmid RTA żyły istotnie dłużej niż komórki kontrolne. Natomiast co kluczowe, ekspresja rycyny nie wpłynęła na całkowitą długość życia, co wykazano na podłożu zawierającym galaktozę. Wskazuje to jednoznacznie, że rycyna nie ma wpływu na przeżywalność i starzenie się komórek. Istotne różnice zaobserwowano analizując potencjał reprodukcyjny komórek. Zarówno liczba komórek potomnych wyprodukowanych przez komórkę matkę, jak i czas reprodukcji były zredukowane w przypadku komórek zawierających plazmid z rycyną rosnących na podłożu z glukozą lub galaktozą. Jest to konsekwencja zatrzymania cyklu komórkowego. Jak pokazały badania, czas po reprodukcji był czynnikiem determinującym długowieczność komórek szczepu zawierającego plazmid z rycyną. Po raz kolejny wskazano, że ten parametr jest kluczowy w determinowaniu długości życia. Podczas hodowli na obu analizowanych źródłach węgla, czas po reprodukcji komórek szczepu niosącego plazmid RTA był istotnie wydłużony w porównaniu z komórkami szczepu kontrolnego. W związku z tym analizy długości życia i potencjału reprodukcyjnego były kluczowe, aby wykazać, że depurynacja pętli sarcynowo-rycynowej za pośrednictwem rycyny spowodowała istotne zmniejszenie potencjału reprodukcyjnego komórek, ale nie zmniejszyło ich całkowitej długości życia.

Reasumując, badania sugerują, że toksyczne działanie rycyny nie jest związane z inaktywacją rybosomów na drodze depurynacją pętli sarcynowo-rycynowej, jak do tej pory sądzono. Najprawdopodobniej pojawienie się nawet niewielkiej puli rybosomów z depurynacją

prowadzi do aktywacji szlaków metabolicznych obniżających wydajność translacji i regulujących cykl komórkowy. Odkryciem i kluczowym wynikiem w tej pracy są dane pokazujące, że rycyna jest czynnikiem, który zatrzymuje cykl komórkowy, czego konsekwencją jest obniżona zdolność do reprodukcji. Nie ma jednak wpływu na przeżywalność i średnią długość życia,

Do najważniejszych odkryć naukowych opisanych w przedstawionym osiągnięciu naukowym zaliczam:

1. Wskazanie ściany komórkowej i zaburzeń w jej biosyntezie jako jednego z czynników determinujących potencjał reprodukcyjny szczepów.
2. Parametr czasowy, a nie sam potencjał reprodukcyjny jest kluczowym wynikiem opisującym starzenie w modelu drożdżowym.
3. Czas życia po reprodukcji jest istotnym parametrem determinującym starzenie się komórek.
4. Komórki drożdży należące do tego samego tła genetycznego mogą mieć zaprogramowany czas życia.
5. Komórki potomne pochodzące od starych komórek matek są pozbawione mtDNA, a także są podatne na pęknięcia podwójnej nici DNA, mają zmienioną morfologię jąderka oraz zaburzenia w aparacie translacyjnym.
6. Komórki potomne pochodzące od starych komórek matek mają zredukowany potencjał reprodukcyjny, ale średni czas życia komórek pozostaje na poziomie komórek szczepu kontrolnego.
7. Zaburzenia komponentów budujących centrum GTP-azowego rybosomu są kluczowe w starzeniu komórek drożdży.
8. Zwiększenie liczby kopii mRNA paralogów genu *uL6* stanowi czynnik przyspieszający starzenie się i istotnie obniżający potencjał reprodukcyjny.
9. Białko uL11 ma dodatkowe funkcje związane z regulacją cyklu komórkowego.
10. Rycyna jest toksyną, która zatrzymuje cykl komórkowy i zaburza potencjał reprodukcyjny, ale nie ma wpływu na długość życia komórek.
11. Komórki drożdży z zaburzeniami w biosyntezie ściany komórkowej mają zdolność do osiągnięcia mniejszej lub większej maksymalnej objętości niż szczep kontrolny. W związku z tym, hipertrofia nie może być jedynym czynnikiem ograniczającym potencjał reprodukcyjny komórek drożdży, jak sądzono wcześniej.
12. Istnieje zależność między metabolizmem lipidów a czasem życia po reprodukcyjnym.
13. Drożdże mogą stanowić dogodny model w badaniach nad starzeniem pod warunkiem wyeliminowania wpływu prywatnych dla drożdży czynników regulujących starzenie się.

Bibliografia

1. Creevy, K.E.; Austad, S.N.; Hoffman, J.M.; O'Neill, D.G.; Promislow, D.E.L. The Companion Dog as a Model for the Longevity Dividend. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2016**, *6*, doi:10.1101/cshperspect.a026633.
2. Hoffman, J.M.; Creevy, K.E.; Franks, A.; O'Neill, D.G.; Promislow, D.E.L. The companion dog as a model for human aging and mortality. *Aging Cell* **2018**, *17*, doi:10.1111/acel.12737.

3. Kaeberlein, M. Lessons on longevity from budding yeast. *Nature* **2010**, *464*, 513-519, doi:10.1038/nature08981.
4. Bitterman, K.J.; Medvedik, O.; Sinclair, D.A. Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Linking metabolism, genome stability, and heterochromatin. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2003**, *67*, 376-+, doi:10.1128/mmbr.37.3.376-399.2003.
5. Steinkraus, K.A.; Kaeberlein, M.; Kennedy, B.K. Replicative Aging in Yeast: The Means to the End. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology*; Annual Review of Cell and Developmental Biology; Annual Reviews: Palo Alto, 2008; Volume 24, pp. 29-54.
6. Fabrizio, P.; Longo, V.D. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell* **2003**, *2*, 73-81, doi:10.1046/j.1474-9728.2003.00033.x.
7. Carmona-Gutierrez, D.; Buttner, S. The many ways to age for a single yeast cell. *Yeast* **2014**, *31*, 289-298, doi:10.1002/yea.3020.
8. Vachova, L.; Cap, M.; Palkova, Z. Yeast Colonies: A Model for Studies of Aging, Environmental Adaptation, and Longevity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2012**, doi:10.1155/2012/601836.
9. Minois, N.; Frajnt, M.; Wilson, C.; Vaupel, J.W. Advances in measuring lifespan in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 402-406, doi:10.1073/pnas.0408332102.
10. T, Z.R.B.G.B. Is the yeast a relevant model for aging of multicellular organisms? An insight from the total lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*. **2008**, *1*, 159-165.
11. Polymenis, M.; Kennedy, B.K. Chronological and replicative lifespan in yeast: Do they meet in the middle? *Cell Cycle* **2012**, *11*, 3531-3532, doi:10.4161/cc.22041.
12. Egilmez, N.K.; Jazwinski, S.M. EVIDENCE FOR THE INVOLVEMENT OF A CYTOPLASMIC FACTOR IN THE AGING OF THE YEAST *SACCHAROMYCES-CEREVISIAE*. *Journal of Bacteriology* **1989**, *171*, 37-42.
13. Molon, M.; Szajwaj, M.; Tchorzewski, M.; Skoczowski, A.; Niewiadomska, E.; Zadrag-Tecza, R. The rate of metabolism as a factor determining longevity of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Age* **2016**, *38*, doi:10.1007/s11357-015-9868-8.
14. Kaeberlein, M.; Powers, R.W. Sir2 and calorie restriction in yeast: A skeptical perspective. *Ageing Research Reviews* **2007**, *6*, 128-140, doi:10.1016/j.arr.2007.04.001.
15. Kaeberlein, M.; Kirkland, K.T.; Fields, S.; Kennedy, B.K. Sir2-independent life span extension by calorie restriction in yeast. *Plos Biology* **2004**, *2*, 1381-1387, doi:10.1371/journal.pbio.0020296.
16. Ganley, A.R.D.; Ide, S.; Saka, K.; Kobayashi, T. The Effect of Replication Initiation on Gene Amplification in the rDNA and Its Relationship to Aging. *Molecular Cell* **2009**, *35*, 683-693, doi:10.1016/j.molcel.2009.07.012.
17. Veatch, J.R.; McMurray, M.A.; Nelson, Z.W.; Gottschling, D.E. Mitochondrial Dysfunction Leads to Nuclear Genome Instability via an Iron-Sulfur Cluster Defect. *Cell* **2009**, *137*, 1247-1258, doi:10.1016/j.cell.2009.04.014.
18. Delaney, J.R.; Murakami, C.; Chou, A.; Carr, D.; Schleit, J.; Sutphin, G.L.; An, E.H.; Castanza, A.S.; Fletcher, M.; Goswami, S.; et al. Dietary restriction and mitochondrial function link replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Experimental Gerontology* **2013**, *48*, 1006-1013, doi:10.1016/j.exger.2012.12.001.
19. Kaeberlein, M.; McVey, M.; Guarente, L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes & Development* **1999**, *13*, 2570-2580, doi:10.1101/gad.13.19.2570.
20. Yoshida, R.; Tamura, T.; Takaoka, C.; Harada, K.; Kobayashi, A.; Mukai, Y.; Fukusaki, E. Metabolomics-based systematic prediction of yeast lifespan and its application for semi-rational screening of ageing-related mutants. *Aging Cell* **2010**, *9*, 616-625, doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00590.x.
21. Handee, W.; Li, X.B.; Hall, K.W.; Deng, X.X.; Li, P.; Benning, C.; Williams, B.L.; Kuo, M.H. An Energy-Independent Pro-longevity Function of Triacylglycerol in Yeast. *Plos Genetics* **2016**, *12*, doi:10.1371/journal.pgen.1005878.

22. Correa-Garcia, S.; Bermudez-Moretti, M.; Travo, A.; Deleris, G.; Forfar, I. FTIR spectroscopic metabolome analysis of lyophilized and fresh *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells. *Analytical Methods* **2014**, *6*, 1855-1861, doi:10.1039/c3ay42322k.
23. Molon, M.; Zadrag-Tecza, R.; Bilinski, T. The longevity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: A comparison of two approaches for assessment the lifespan. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2015**, *460*, 651-656, doi:10.1016/j.bbrc.2015.03.085.
24. Pernice, W.M.; Vevea, J.D.; Pon, L.A. A role for Mfb1p in region-specific anchorage of high-functioning mitochondria and lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Communications* **2016**, *7*, doi:10.1038/ncomms10595.
25. Lippuner, A.D.; Julou, T.; Barral, Y. Budding yeast as a model organism to study the effects of age. *Fems Microbiology Reviews* **2014**, *38*, 300-325, doi:10.1111/1574-6976.12060.
26. Clay, L.; Caudron, F.; Denoth-Lippuner, A.; Boettcher, B.; Frei, S.B.; Snapp, E.L.; Barral, Y. A sphingolipid-dependent diffusion barrier confines ER stress to the yeast mother cell. *Elife* **2014**, *3*, doi:10.7554/eLife.01883.
27. Cabib, E.; Drgon, T.; Drgonova, J.; Ford, R.A.; Kollar, R. The yeast cell wall, a dynamic structure engaged in growth and morphogenesis. *Biochemical Society Transactions* **1997**, *25*, 200-204.
28. Egilmez, N.K.; Chen, J.B.; Jazwinski, S.M. PREPARATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF OLD YEAST-CELLS. *Journals of Gerontology* **1990**, *45*, B9-B17.
29. Gow, N.A.R.; Latge, J.P.; Munro, C.A. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiology Spectrum* **2017**, *5*, doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016.
30. de Groot, P.W.J.; Ruiz, C.; de Aldana, C.R.V.; Duenas, E.; Cid, V.J.; Del Rey, F.; Rodriguez-Pena, J.M.; Perez, P.; Andel, A.; Caubin, J.; et al. A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comparative and Functional Genomics* **2001**, *2*, 124-142, doi:10.1002/cfg.85.
31. Henderson, K.A.; Gottschling, D.E. A mother's sacrifice: what is she keeping for herself? *Current Opinion in Cell Biology* **2008**, *20*, 723-728, doi:10.1016/j.ceb.2008.09.004.
32. Planta, R.J.; Mager, W.H. The list of cytoplasmic ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **1998**, *14*, 471-477, doi:10.1002/(sici)1097-0061(19980330)14:5<471::aid-yea241>3.0.co;2-u.
33. Steffen, K.K.; McCormick, M.A.; Pham, K.M.; MacKay, V.L.; Delaney, J.R.; Murakami, C.J.; Kaeberlein, M.; Kennedy, B.K. Ribosome Deficiency Protects Against ER Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **2012**, *191*, 107-+, doi:10.1534/genetics.111.136549.
34. Dean, E.J.; Davis, J.C.; Davis, R.W.; Petrov, D.A. Pervasive and Persistent Redundancy among Duplicated Genes in Yeast. *Plos Genetics* **2008**, *4*, doi:10.1371/journal.pgen.1000113.
35. Steffen, K.K.; MacKay, V.L.; Kerr, E.O.; Tsuchiya, M.; Hu, D.; Fox, L.A.; Dang, N.; Johnston, E.D.; Oakes, J.A.; Tchao, B.N.; et al. Yeast life span extension by depletion of 60S ribosomal subunits is mediated by Gcn4. *Cell* **2008**, *133*, 292-302, doi:10.1016/j.cell.2008.02.037.
36. MacInnes, A.W.; Amsterdam, A.; Whittaker, C.A.; Hopkins, N.; Lees, J.A. Loss of p53 synthesis in zebrafish tumors with ribosomal protein gene mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 10408-10413, doi:10.1073/pnas.0805036105.
37. Schmidt, A.; Hollmann, M.; Schafer, U. A newly identified Minute locus, M(2)32D, encodes the ribosomal protein L9 in *Drosophila melanogaster*. *Molecular & General Genetics* **1996**, *251*, 381-387, doi:10.1007/bf02172530.
38. Fabbrini, M.S.; Katayama, M.; Nakase, I.; Vago, R. Plant Ribosome-Inactivating Proteins: Progresses, Challenges and Biotechnological Applications (and a Few Digressions). *Toxins* **2017**, *9*, doi:10.3390/toxins9100314.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowych, których wyniki umieszczone są w pracach naukowych (Załącznik 4 „Wykaz osiągnięć naukowych”)

5.1 Temperatura jako abiotyczny czynnik regulujący procesy życiowe

Mechanizm starzenia może być modulowany zarówno przez czynniki środowiskowe, jak i genetyczne. Temperatura jest jednym z parametrów termodynamicznych, które wpływają na praktycznie wszystkie procesy biochemiczne w komórce. Dlatego jednym z moich zainteresowań badawczych jest analiza wpływu temperatury na długość życia oraz zmiany metaboliczne u różnych grup organizmów. Materiałem badawczym stały się jednokomórkowe drożdże pączkujące *S. cerevisiae*, a wśród modeli zwierzęcych wywilżna karłowata *Drosophila melanogaster* oraz mszyce.

W publikacji **Molon i Zadrąg-Tecza 2016** (załącznik 4; **P12**) wykazałem, że temperatura ma większy wpływ na czas życia komórki niż na potencjał reprodukcyjny. Pokazuje to jednoznacznie, że standardowe wyrażanie długości życia modelu drożdżowego jako liczba podwojeń jest nieuzasadnione. Obniżenie temperatury wzrostu komórek do 22°C istotnie wydłuża czas życia komórek aktywnych mitotycznie, z kolei podniesienie temperatury do 37°C prowadzi do przyspieszenia starzenia się tych jednokomórkowców, przy jednoczesnym skróceniu czasu podwojenia i zwiększeniu poziomu reaktywnych form tlenu. Zaprezentowane wyniki sugerują również, że agregaty białkowe związane z białkiem Hsp104, traktowane jako marker starzenia drożdży, nie wydają się wpływać na wartość liczbową potencjału reprodukcyjnego.

W pracy **Molon i in. 2020** (załącznik 4; **P22**) analizowałem zależność pomiędzy zmianą temperatury, tłem genetycznym owadów (pochodzenie muszki owocowej), tempem metabolizmu a długością życia. Materiałem badawczym były szczepy dzikie *D. melanogaster* pochodzące z Australii, Kanady i Beninu oraz referencyjny szczep OregonR. Tempo metabolizmu *D. melanogaster* mierzono w kalorymetrze izotermicznym w temperaturze 20°C, 25°C i 28°C. Uzyskane dane wykazały silny negatywny związek między całkowitym wpływem ciepła a długowiecznością. Wysokie tempo metabolizmu prowadzi do przyspieszonego starzenia się zarówno samców i samic we wszystkich analizowanych szczepach. Dodatkowo wykazałem, że temperatura jest kluczowym czynnikiem wpływającym na płodność, sukces reprodukcyjny i masę ciała. W tej pracy wykazałem również przydatność metody kalorymetrii izotermicznej do badania wpływu warunków stresowych środowiska na aktywność metaboliczną owadów. Może to mieć istotne znaczenie dla prognozowania wpływu globalnego ocieplenia na aktywność metaboliczną, długość życia i bionomię różnych gatunków owadów. Analizy kalorymetryczne wykonywałem w ramach stażu w Instytucie Fizjologii Roślin PAN w Krakowie (Załącznik 7 – staż 2). Ta publikacja powstała również we współpracy międzynarodowej z dr. Ralphem Doblerem z Wydziału Biologii Politechniki w Dreźnie.

Zmiany klimatyczne, a w szczególności obserwowany obecnie wzrost temperatury, mogą mieć wpływ na owady roślinożerne. Celem pracy **Dampe i in. 2020** (załącznik 4; **P21**) było wyjaśnienie, w jaki sposób mszyce *Aphis pomi* reagują na stres abiotyczny, w tym przypadku wywołany wzrostem temperatury otoczenia. Owady te charakteryzują się wąską tolerancją termiczną, a tempo ich rozwoju jest silnie uzależnione od temperatury otoczenia.

Wykazano, że podwyższenie temperatury o 2°C skutkuje zwiększeniem występowania od jednej do pięciu generacji w sezonie. Dodatkowo podwyższenie temperatury ma wpływ na zwiększenie płodności, migracje sezonowe, czy zwiększenie przeżywalności w zimie. W konsekwencji może być to kluczowe w aspekcie ekonomicznym gospodarstw specjalizujących się w uprawach, m.in. jabłoni. Wszystkie eksperymenty prowadzono w trzech temperaturach: 20, 25 i 28°C w komorze klimatycznej. Określono zmiany aktywności markerów enzymatycznych, tj. dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy, S-transferazy glutationowej, β -glukozydazy, oksydazy polifenolowej i peroksydazy w tkankach mszyc, w każdej z analizowanych temperatur. Następnie za pomocą mikrokalorymetrii izotermicznej określono zmiany wpływu ciepła emitowanego przez mszyce w każdej z temperatur. Nasze wyniki wskazują na zależną od temperatury reakcję obronną *A. pomi*. Jak wykazano w tej pracy, aktywność analizowanych enzymów i wzrost tempa metabolizmu odegrały rolę mechanizmów adaptacyjnych i działały skuteczniej w wyższych temperaturach. W ten sposób mszyce są w stanie szybko zareagować na stres środowiskowy i ochronić się, m.in. przed nadmierną indukcją wolnych rodników tlenowych.

Temperatura jest jednym z głównych czynników regulujących bionomię owadów, w tym rozwój, rozmnażanie, przeżywalność, czy cykle życiowe. Dlatego celem publikacji **Durak i in. 2021** (załącznik 4; **P24**) było określenie różnic w aktywności enzymatycznej nimf i dorosłych mszyc należących do trzech gatunków: *Aphis pomi*, *Macrosiphum rosae* i *Cinara cupressi* oraz zmian w ich reakcji na wzrost temperatury. Zaprezentowane w tej pracy wyniki wykazały, że aktywność enzymów antyoksydacyjnych, detoksykujących i oksydoredukcyjnych determinowane były głównie przez stadium rozwojowe mszyc. Zaobserwowaliśmy silnie dodatnią korelację między aktywnością enzymów detoksykujących i oksydoredukcyjnych, a rozwojem mszyc oraz ujemną korelację między aktywnością enzymów antyoksydacyjnych, a rozwojem mszyc. Co ciekawe, system enzymów antyoksydacyjnych był bardziej wydajny u nimf mszyc, a podczas rozwoju mszyc zmniejszyła się aktywność enzymów antyoksydacyjnych, co wydaje się zapewniać skuteczną ochronę nimfom i osobnikom dorosłym w warunkach stresu. W tej pracy wykazaliśmy również, że wzrost aktywności metabolicznej spowodowany wzrostem temperatury prowadził do przyspieszenia starzenia się mszyc.

Zmiany temperatury otoczenia mogą wywierać wpływ zarówno na owady roślinożerne, jak i na rośliny. Dodatkowo wzrost temperatury może również pośrednio wpływać na mszyce, zmieniając jakość tkanek rośliny żywicielskiej. Dlatego w pracy **Dampc i in. 2021** (załącznik 4; **P26**) wykazano wpływ zmian temperatury otoczenia na interakcje między rośliną żywicielską (*Rosa rugosa*) a owadami (*Macrosiphum rosae*). Jak wykazano w tej pracy, stres termiczny w zakresie od 25 do 28°C ma istotny wpływ na interakcje mszyca-roślina żywicielska, wpływając na kondycję mszyc i aktywność enzymów związanych ze stresem oksydacyjnym zarówno u owadów, jak i roślin. Reakcje obronne mszyc i roślin różniły się w zależności od temperatury i były najwyższe podczas inkubacji w 28°C u mszyc i 20°C u roślin. Reakcje obronne mszyc przebiegały dwuetapowo. Pierwszym etapem była reakcja na krótkotrwałą ekspozycję na ciepło (28°C), natomiast drugim była reakcja obronna mszyc na zmiany w roślinie żywicielskiej poddanej długotrwałemu stresowi abiotycznemu i biotycznemu. Co ciekawe, istnieje szansa, że wzrost temperatury otoczenia będzie wpływał

niekorzystnie na mszycę również w kontekście zmian biochemicznych i reakcji fizjologicznych roślin na podwyższoną temperaturę.

Odpowiedź enzymatyczna w tkankach mszyc jest związana również ze zmianą żywiciela. W pracy **Durak i in. 2018** (załącznik 4; **P17**) wykazaliśmy, że stres środowiskowy wywołany przez zmianę żywiciela indukuje organizmy mszyc do natychmiastowej odpowiedzi, co przejawia się zwiększoną aktywnością enzymów antyoksydacyjnych, w tym dysmutazy nadtlenkowej i katalazy w zaledwie 24 godziny po kolonizacji nowej rośliny żywicielskiej. Wykazaliśmy również, że enzymy te działają w ciele mszycy w sposób komplementarny z enzymami oksydoredukcyjnymi i detoksykacyjnymi. Dzięki elastycznej aktywności enzymów mszycę są w stanie szybko reagować i dostosowywać się do różnych żywicieli, co prowadzi do osiągnięcia sukcesu adaptacyjnego.

Wyniki przeprowadzonych badań zaprezentowane w pracach **Dampc i in. 2020 oraz Dampc i in. 2021** (załącznik 4; **P21, P26**) stały się podstawą do ubiegania o stopień naukowy doktora nauk biologicznych przez Doktoranta mgra Jana Dampca. Miałem przyjemność być promotorem pomocniczym rozprawy doktorskiej mgra Jana Dampca zatytułowanej „Reakcje adaptacyjne wybranych gatunków mszyc (*Hemiptera: aphidoidea*) na wzrost temperatury”. Dnia 27 października 2022 r. Rada Naukowa Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego nadała stopień naukowy doktora Panu Janowi Dampcowi.

Moje ogólne zainteresowania biologiczne, w tym i konsekwencje związane ze zmianami temperatury zaprezentowałem również jako współautor dwóch publikacji popularnonaukowych, co stanowi nowe dane na temat rozmieszczenia populacji modliszki zwyczajnej *Mantis religiosa* w południowo-wschodniej Polsce (załącznik 4; **P10, P18**).

5.2 Wykorzystanie drożdży pączkujących jako modelu do analiz właściwości składników pochodzenia naturalnego

Chęć długiego życia z jednoczesnym zapewnieniem dobrej kondycji fizycznej i psychicznej stają się dzisiaj nieodłączną motywacją coraz większej części populacji ludzi. Poszukujemy diety lub suplementacji diety w celu zapewnienia sobie dobrego zdrowia i opóźnienia procesów starzenia. Dlatego moje zainteresowania naukowe związane są również z wykorzystaniem drożdży jako dogodnego modelu w badaniach nad wpływem wybranych substancji na procesy fizjologiczne komórki, w tym i starzenie. Do tej pory opublikowałem cztery prace z tej tematyki moich zainteresowań, a kolejne są w przygotowaniu.

Swoją uwagę skupiono na karnozynie. Karnozyna to naturalnie występujący dipeptyd o właściwościach antyglukujących, chelatujących i potencjalnych właściwościach antystarzeniowych. W publikacji **Kwolek-Mirek i in. 2016** (załącznik 4; **P15**) wykazano, że L-karnozyna jest czynnikiem spowalniającym kinetykę wzrostu drożdży i wydłużającym potencjał reprodukcyjny oraz reprodukcyjny czas życia komórki, co może być wynikiem zmniejszonego potencjału błony mitochondrialnej i zmniejszonej zawartości ATP w komórkach drożdży.

Prozdrowotne i przeciwstarzeniowe właściwości kurkuminy znane są od lat. Jednak nie do końca jasny jest wpływ tej substancji na starzenie się. W pracy **Stępien i in. 2020** (załącznik 4; **P20**) wykazano, że kurkumina znacząco zwiększa stres oksydacyjny i jednocześnie przyspiesza replikacyjne i chronologiczne starzenie się komórek drożdży pozbawionych ochrony antyoksydacyjnej i mechanizmów naprawy DNA. Udało się jednak wykazać, że prawdopodobnie poprzez hormezę kurkumina opóźnia starzenie się szczepu kontrolnego.

Kawa jest jednym z najbardziej pożądanых napoi na świecie. Pomimo wielu wysiłków badaczy do dnia dzisiejszego brak jest jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, w jakim stopniu kawa ma pozytywny wpływ na organizm. Dlatego w pracy **Czachor i in. 2020** (załącznik 4; **P23**) porównano dwa rodzaje kawy klasy *speciality*: Arabica i Robusta. Pokazano, że kawa typu Robusta ma znacznie większą zdolność antyoksydacyjną niż Arabika. Wykorzystując model drożdżowy wykazano, że wykorzystane kawy wydłużają chronologiczną długość życia komórek drożdży poprzez ochronę komórek przed reaktywnymi formami tlenu, pękaniem podwójnej nici DNA i spadek aktywności metabolicznej.

Pod względem wielu określonych korzyści zdrowotnych, miód wzbogacony owocami aronii można uznać za ciekawą alternatywę żywności funkcjonalnej. Dlatego w pracy **Milek i in. 2021** (załącznik 4; **P25**) badano wpływ dodatku owoców aronii w miodzie rzepakowym pod kątem właściwości fizykochemicznych i aktywności biologicznej. Właściwości przeciwutleniające wzbogaconych miodów badano zarówno w układzie *in vitro* jak i *in vivo* wykorzystując model drożdżowy. Badania pokazały, że dodatek aronii znacząco zmodyfikował właściwości fizykochemiczne miodu oraz wzmocnił jego potencjał antyoksydacyjny. Ponadto zmodyfikowany miód chronił komórki drożdży przed stresem oksydacyjnym wywołanym przez nadtlenek wodoru.

5.3 Wykorzystanie modelu drożdży w badaniach nad zmianami fizjologicznymi komórki

Drożdże Saccharomyces cerevisiae jako model badawczy są mi bliskie od początku mojej aktywności naukowej. Tematyka wykorzystania drożdży jako modelu badawczego nad starzeniem aktywnych mitotycznie komórek została zaproponowana mi przez promotora mojej rozprawy doktorskiej prof. Tomasza Bilińskiego. Za sprawą tej współpracy (trwającej do września 2015 roku) powstały prace traktujące o wykorzystaniu modelu drożdżowego w badaniach nad starzeniem **Zadrag-Tęcza i in. 2013** (załącznik 4; **P7**) w tym weryfikujące hipotezę hipertrofii, jako jednej z potencjalnych przyczyn zatrzymania potencjału reprodukcyjnego **Moloń i Zadrag-Tęcza 2016** (załącznik 4; **P14**). W pracy **Moloń i in. 2016** (załącznik 4; **P13**) wykazałem, że zmiana tempa metabolizmu może prowadzić do opóźnienia starzenia aktywnych mitotycznie komórek, wówczas opisałem również jako pierwszy szczep drożdży wykazujący fenotyp długowieczności. W związku z tym, kilka lat badań dało pewność, że istnieją czynniki, w tym genetyczne, które mogą sterować starzeniem u drożdży, co sprawia że drożdże jako jednokomórkowe grzyby mogą stanowić model badawczy. Wówczas otrzymano również wstępne dane na temat udziału aparatu translacyjnego w starzeniu drożdży wynikające z mutacji w jednym z czynników transkrypcyjnych polimerazy RNA II. Energetyka komórki jest podstawowym czynnikiem regulującym wszystkie procesy metaboliczne. Dlatego w pracy **Kwolek-Mirek i in. 2019** (załącznik 4; **P19**) wykazano, że szczepy drożdże pozbawione enzymu ograniczającego szybkość szlaku pentozofosforanowego wykazują

zmiany w komórkowym statusie redoks, co jest spowodowane zaburzeniami w generowaniu NADPH. Co ważne, prowadzi to do zmniejszenia potencjału reprodukcyjnego szczepu, ale bez istotnego wpływu na całkowitą długość życia komórki. Drożdże posłużyły mi również jako model w badaniach nad starzeniem komórek postmitotycznych w pracy **Lewińska i in. 2014** (załącznik 4; **P9**). W tej publikacji wykazano, że na chronologiczne starzenie może wpływać niestabilność chromosomu XII, prowadząca zarówno do niestabilności rDNA, jak i aneuploidii całego chromosomu. W kontekście starzenia replikacyjnego wykazano, że zawartość rDNA w chronologicznie starzejących się komórkach może być czynnikiem determinującym późniejszą długość życia replikacyjnego. W ramach współpracy z prof. Markiem Tchórzewskim (UMCS) oprócz opisanych wcześniej prac (załącznik 4; **H3-7, P13**), drożdże wykorzystano również w pracy **Wawiórka i in. 2017** (załącznik 4; **P16**), w której wykazano, że rybosomy pozbawione białka P1/P2 wykazują zmniejszoną wierność translacji na etapach elongacji i terminacji. Co ciekawe, brak białek P1/P2 istotnie wydłuża czas podwojenia komórek w porównaniu z kontrolą, ale ma niewielki wpływ *in vivo* na wydajność innych etapów syntezy białek zależnych od GTPazy translacyjnej. W tej pracy wykazano również, że wyczerpanie białek P1/P2 jest główną przyczyną spowolnienia translacji i obniża aktywność metaboliczną komórek. Drożdże zostały również wykorzystane w pracy **Sadowska-Bartosz i in. 2013** (załącznik 4; **P8**) w kontekście wskazania dimetylosulfotlenku (DMSO) jako czynnika indukującego stres oksydacyjny u drożdży. Pomimo że, DMSO jest szeroko wykorzystywany, m.in. jako krioprotektant do konserwacji komórek oraz jako rozpuszczalnik związków chemicznych ma właściwości pro-oksydacyjne. Poziom powstawania wolnych rodników tlenowych jest zależny od stosowanego stężenia DMSO. W tej pracy wykazano również, że zawartość glutationu komórkowego wzrastała proporcjonalnie wraz ze wzrostem stężenia DMSO, co najprawdopodobniej stanowi odpowiedź kompensacyjną komórki drożdży. W ramach współpracy międzynarodowej, której owocem stała się publikacja **Mołóń i in. 2022** (załącznik 4; **P30**) wykazano, że dwa podstawowe składniki chromatyny, łącznik histonowy Hho1 i białko związane z aktyną 4 (Arp4) mają wpływ nie tylko na chronologiczną długość życia co opisano wcześniej, ale również na starzenie komórek aktywnych mitotycznie. Co ciekawe, w skonstruowanym w tej pracy zestawie heterozygot nie zaobserwowano zmian w tempie starzenia komórek, co wskazuje jednoznacznie, że dla zachowania długości życia charakterystycznej dla szczepu dzikiego niezbędna jest zaledwie jedna wersja genu *ARP4* i *HHO1*.

Drożdże są dogodnym modelem ze względu na możliwość pracy w układzie haploidalnym i diploidalnym, w tym i heterozygotycznym. Jest to kluczowe w sytuacji wykorzystania układu eksperymentalnego, w którym wykorzystuje się geny niezbędne do życia. Do tej grupy genów zaliczamy, m.in. te które są ściśle związane z inicjacją replikacji genomowego DNA. Dlatego w pracy **Stępień i in. 2022** (załącznik 4; **P27**) wskazano, że heterozygoty *ORC/orcΔ* charakteryzują się zmniejszeniem poziomu białek Orc1-6, co znacząco wydłuża czas podwajania i średnią długość życia chronologicznego, a także zwiększa potencjał reprodukcyjny. Co ciekawe, w tej pracy jako piersi wykazaliśmy, że heterozygotyczne komórki *ORC/orcΔ* i komórki diploidalne typu dzikiego łatwo ulegają haploidyacji podczas starzenia chronologicznego. Są to nowe dane, które wskazują że tak zwany *ploidy shift* może być silnie związany z głodem odżywczym (wyczerpaniem składników pokarmowych podczas chronologicznego starzenia się) lub niezdolnością do przetrwania w warunkach stresu.

Dodatkowo, co wydaje się być również kluczowe dla analiz starzenia, technika spektroskopii Ramana pomogła nam wzmocnić hipotezę o znaczeniu metabolizmu lipidów i homeostazie w procesie starzenia, co dodatkowo popiera moje wnioski przedstawione w cyklu publikacji stanowiącej osiągnięcia. Ta publikacja powstała we współpracy z dr hab. Adrianną Skoneczną, prof. IBB (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN) i stanowi jedno z osiągnięć doktorantki, której jestem promotorem pomocniczym.

TEMPO, jest jednym ze związków zwanych nitroksydami, które są wykorzystywane w przemyśle chemicznym, a dodatkowo jest szeroko stosowanym przeciwutleniaczem w badaniach naukowych. W związku z wykorzystaniem technologicznym istnieje obawa, że substancja ta może mieć negatywny wpływ na biosferę. W pracy **Moloń i in. 2023** (załącznik 4; **P32**) wykazano, że TEMPO spowalnia kinetykę wzrostu komórek drożdży, jednocześnie spowalniając starzenie się komórek postmitotycznych w populacji. Ponadto komórki drożdży traktowane TEMPO wykazywały znacznie zwiększony poziom metabolizmu, a sam nitroksyd wykazywał działanie genoprotekcyjne poprzez zmniejszenie liczby pęknięć dwuniciowego DNA w komórkach. Dodatkowo wykazano, że wbrew ogólnej opinii TEMPO ma również działanie toksyczne, zwłaszcza na komórki aktywne mitotyczne. Na podstawie analiz RNA-Seq postawiono hipotezę, że upośledzenie translacji lub zaburzenie biogenezy rybosomów można najprawdopodobniej uznać za czynnik prowadzący do zatrzymania cyklu komórkowego. Te dane są spójne z uzyskanymi przeze mnie wcześniej danymi zaprezentowanymi jako osiągnięcie.

5.4 Opracowanie nowych nieinwazyjnych biomarkerów stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego

Reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS) definiuje się jako cząsteczki zawierające niesparowany elektron zdolny do zainicjowania utleniania. Stres oksydacyjny jest wynikiem braku równowagi między endogenną produkcją ROS a skutecznością mechanizmów antyoksydacyjnych. Chociaż ROS odgrywają rolę w obronie gospodarza (np. fagocytozie), nadprodukcja tych cząsteczek może powodować uszkodzenie tkanek i stany zapalne, a nawet śmierć komórek. Do reaktywnych form azotu (ang. *reactive nitrogen species*) zalicza się tlenek azotu oraz jego pochodne, które powstają w wyniku przemian metabolicznych. Nadmiar reaktywnych form azotu uszkadza komórki, powodując stres nitrozacyjny, zjawisko analogiczne do stresu oksydacyjnego.

W ramach badań realizowanych wraz z Instytutem Nauk Medycznych Kolegium Nauk Medycznych UR oznaczane są biomarkery stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego w surowicy pacjentów chorujących na mukowiscydozę, atopowe zapalenie skóry, przewlekłą pokrzywkę spontaniczną oraz schorzenia urologiczne (nowotwory urogenitalne: nerek, gruczołu krokowego, moczowodu, pęcherza moczowego oraz jądra, a także pacjenci z kamicią górnych oraz dolnych dróg moczowych). Badania te mają na celu opracowanie nowych nieinwazyjnych biomarkerów, które mogłyby pomóc w ocenie stanu pacjentów, a także ocenie korelacji tych markerów z nasileniem, jak i postępem chorób oraz z odpowiedzią terapeutyczną. Techniki używane do pomiaru biomarkerów są proste, szybkie i niedroge, dlatego mogą być stosowane w codziennej rutynowej praktyce laboratoryjnej do oceny i monitorowania stanu zdrowia chorych.

W ramach tej współpracy prowadzone są badania z następującymi Jednostkami.

Jednostki UR:

- Zakład Biochemii i Chemii Ogólnej (dr n. biol. Sabina Galiniak)
- Zakład Histologii i Embriologii (dr hab. Agata Wawrzyniak, prof. UR)
- Zakład Anatomii Prawidłowej i Klinicznej (dr n. med. Krzysztof Balawender)
- Katedra Pediatrii (dr hab. n. med. Marta Rachel)
- Pracownia Ewaluacji Wiedzy (mgr inż. Marek Biesiadecki)

Współpraca ze szpitalami:

- Kliniczny Oddział Urologii i Urologii Onkologicznej Samodzielnego Publicznego Zespołu Opieki Zdrowotnej nr 1 w Rzeszowie (dr n. med. Krzysztof Balawender)
- Klinika Alergologii i Mukowiscydozy Szpitala Wojewódzkiego Nr 2 im. Św. Jadwigi Królowej w Rzeszowie (dr hab. n. med. Marta Rachel i dr n. med. Agnieszka Bożek)

Wyniki tej współpracy zaowocowały dwiema publikacjami **Galiniak i in. 2022** oraz **Galiniak i in. 2022** (załącznik 4; **P28, P29**).

Warto zaznaczyć, że praca **Galiniak i in. 2022 [P28]** dotycząca mukowiscydozy została dostrzeżona przez portal *rarediseaseadvisor.com* w sekcji '*CF news briefs*' dnia 16 maja 2022.

6. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

Pracę doktorską wykonywałem w latach 2010-2014 w Katedrze Biochemii i Biologii Komórki Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego będąc doktorantem Międzynarodowego Studium Doktoranckiego Nauk Przyrodniczych Polskiej Akademii Nauk w Krakowie. Swoje doświadczenia badawcze, oprócz macierzystej jednostki, zbierałem również podczas staży. Pierwszy z nich realizowałem we wrześniu 2010 roku w Zakładzie Genetyki Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Celem stażu było przygotowanie mutantów delecyjnych, które po części miały stanowić materiał badawczy mojej rozprawy doktorskiej. Moimi opiekunami były prof. Joanna Rytko, dr Róża Kucharczyk (obecnie doktor habilitowany) oraz dr Monika Wysocka-Kapcińska. Kolejny staż odbyłem w Zakładzie Biologii Molekularnej UMCS w Lublinie: 03–14.06.2013 r (Załącznik 7 - staż 1). Staż był współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego: UR – nowoczesność i przyszłość regionu. Celem stażu było wykonanie i analiza profili polisomów oraz wydajności translacyjnego drożdży pączkujących za pomocą inkorporacji znakowanej radioaktywnie metioniny. W ramach tego stażu powstała publikacja **Moloń i in. 2016** (załącznik 4; **P13**). Kolejne dwa staże odbyłem w Instytucie Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego PAN w Krakowie. Pierwszy z nich 06.06–08.07 2016 r (Załącznik 7 - Staż 2). Celem tego stażu było wykonanie analiz wpływu ciepła za pomocą metody mikrokalorymetrii izotermicznej, a opiekunem był prof. Andrzej Skoczowski. W ramach tego stażu powstała publikacja **Moloń i in. 2020** (załącznik 4; **P22**). Drugi ze staży odbył się w dniach 17.02–20.03. 2020 r. (Załącznik 7 - staż 3). Celem stażu było z kolei wykonanie analiz

składu chemicznego komórek za pomocą spektrometrii Ramana, a opiekunem była dr Monika Kula-Maximenko. W ramach tego stażu powstała publikacja **Moloń i in. 2020 (H6)**.

Współpracowałem również z zespołem Pani prof. Małgorzaty Cytryńskiej (Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie) w ramach pomocy w badaniach realizowanych przez doktorantkę nad wpływem lizozymu na potencjał reprodukcyjny i długość życia klinicznych szczepów *Candida albicans*. Miałem również swój udział w realizację części badań realizowanych przez doktorantkę Panią Karolinę Podgórną z Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera PAN w Krakowie. Badania obejmowały immobilizację komórek drożdży *S. cerevisiae* w zmodyfikowanych kulkach na bazie alginianu wapnia. Moje współprace dotyczą również wykorzystania drożdży jako układu modelowego do badania ludzkich mutacji determinujących nowotwory (dr hab. Róża Kucharczyk – Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie). Z kolei w ramach współpracy z dr hab. Adrianną Skoneczną, prof. IBB próbujemy wyjaśnić jak do tej pory nieznanym mechanizm prowadzący do zmiany ploidii szczepów podczas starzenia chronologicznego drożdży. W ramach współpracy z prof. Markiem Tchórzewskim wykonywałem badania w dwóch projektach "Rybosomalne miejsce P jako modulator pracy rybosomu w zmiennych warunkach środowiska" (2014/13/B/NZ1/00953) oraz "Fosforylacja rybosomalnych białek P jako źródło wyspecjalizowanych rybosomów - nowy poziom regulacji ekspresji genów u Eukariota" (2018/29/B/NZ1/01728) (Załącznik 8). Udało mi się również nawiązać współpracę międzynarodową. Moimi partnerami we współpracy międzynarodowej są dr Milena Georgieva z Laboratory of Molecular Genetics Institute of Molecular Biology "R.Tsanev" Bulgarian Academy of Sciences. Celem tej współpracy jest poznanie udziału białek Arp4 i białka łącznikowego histonu H1 (Hho1) w starzeniu replikacyjnym. W ramach tej współpracy powstała publikacja **Moloń i in. 2022** (załącznik 4; **P30**). We wrześniu 2022 r. zostałem zaproszony do współpracy w projekcie badawczym realizowanym przez *Bulgarian Science Fund* pt. Mechanizmy epigenetyczne, ograniczenie kalorii i energetyka komórkowa w przebiegu starzenia replikacyjnego: model koncepcyjny. Liderem projektu jest prof. George Miloshev z Laboratory of Molecular Genetics Institute of Molecular Biology "R.Tsanev" Bulgarian Academy of Sciences. Obecnie realizuję również we współpracy z dr Eugene Ong Boon Beng z Institute for Research in Molecular Medicine, Universiti Sains Malaysia, Penang, Malaysia, projekt dotyczący zaangażowania białek przyspieszających reprodukcję i jednocześnie skracających czas podwojenia w starzeniu replikacyjnym. Współpracę międzynarodową realizuję również od 2021 roku z dr Dana Laor Bar-Yosef z Department of Molecular Microbiology and Biotechnology, George S. Wise Faculty of Life Sciences, Tel Aviv University, Tel Aviv, Izrael. W ramach tej współpracy próbujemy odpowiedzieć na pytanie dotycząc udziału struktur podobnych do amyloidu na tempo starzenia w drożdżowym modelu akumulacji adeniny.

Od roku 2015 wykonałem łącznie 60 recenzje prac naukowych (w 30 czasopismach), m.in. w *Acta Biochimica Polonica*, *Advancement in Medicinal Plant Research*, *Aging-US*, *Antioxidants*, *Beverages*, *Biogerontology*, *Cell Cycle*, *Clinical Sciences Research and Reports*, *European Journal of Clinical and Experimental Medicine*, *FEMS Yeast Research*, *Fermentation*, *Frontiers in Genetics*, *Foods*, *Fungal Biology*, *International Journal of Molecular Sciences*, *iScience*, *Journal of Fungi*, *Molecules*, *Journal of Genetic Engineering*

and Biotechnology, Journal of the Science of Food and Agriculture, Mechanisms of Ageing and Development, Microorganisms, Molecules, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, Pathogens, Vibrational Spectroscopy, Yeast (załącznik 4, **II.13**).

7. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

7.1. Działalność dydaktyczna

7.1.1. Prowadzone zajęcia dydaktyczne

Od początku swojej pracy zawodowej jako nauczyciel akademicki aktywnie uczestniczę w procesie dydaktycznym. Prowadziłem lub współprowadziłem ćwiczenia laboratoryjne z kursów: Biologia komórki, Genetyka, Biochemia, Bioinżynieria komórki, Substancje o znaczeniu biologicznym, Genetyka molekularna drożdży (kierunek: biologia), Genetyka ogólna, Biologia komórki (kierunek: biotechnologia), Podstawy genetyki (kierunki: ochrona środowiska, pedagogika specjalna), Biologia komórki z biochemią (kierunek: ochrona środowiska).

Dodatkowo prowadziłem lub współprowadziłem wykłady dla kursów: Genetyka, Biologia molekularna, Substancje o znaczeniu biologicznym, Nauki biologiczne a problemy cywilizacyjne, Organizmy genetycznie modyfikowane, Organizmy modelowe w badaniach biologicznych, Priony i choroby prionowe, Elementy genetyki klinicznej (kierunek: biologia), Podstawy genetyki (kierunek: pedagogika specjalna), Podstawy biologii i biochemii (kierunek: wychowanie fizyczne).

7.1.2. Promotorstwo prac doktorskich, magisterskich i inżynierskich

Od 2016 roku byłem promotorem pomocniczym jednej zakończonej pracy doktorskiej, dziewięciu prac magisterskich, dwunastu prac licencjackich i jednej pracy inżynierskiej. Obecnie jestem promotorem jednej pracy licencjackiej, pięciu prac magisterskich oraz promotorem pomocniczym jednej pracy doktorskiej (obrona zaplanowana jest na koniec 2023 r.). Miałem również przyjemność być trzykrotnie opiekunem studentów podczas praktyk zawodowych oraz trzykrotnie przygotowywać uczniów do międzynarodowej olimpiady biologicznej.

Poniżej szczegółowe informacje na temat mojego udziału w pracach promotora.

- **Prace doktorskie**

mgr inż. Karolina Stępień – promotor pomocniczy w przewodzie doktorskim wszczętym decyzją Rady Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego dnia 19.09.2018 roku. Temat rozprawy doktorskiej: Zaburzenia inicjacji replikacji genomowego DNA jako czynnik regulujący długość życia drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w modelu chronologicznego i replikacyjnego starzenia

mgr Jan Dampc – promotor pomocniczy w przewodzie doktorskim wszczętym decyzją Rady Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego dnia 15.03.2018 roku. Temat

rozprawy doktorskiej: Reakcje adaptacyjne wybranych gatunków mszyc (Hemiptera, Aphidoidea) na wzrost temperatury.

Przewód doktorski zakończony. Pan Jan Dampc otrzymał stopień naukowy doktora nauk biologicznych dnia 27.10.2022 r.

- **Prace magisterskie**

inż. Kinga Czyrka: Cytotoksyczność nanocząstek srebra względem wybranych szczepów drożdży piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae*. Obrona pracy – lipiec 2017 r. (Kierunek Technologia żywności i żywienia człowieka)

inż. Natalia Fuglewicz: Wpływ nanocząstek srebra na wybrane gatunki drożdży wykorzystywane w technologii żywności i w biotechnologii. Obrona pracy – wrzesień 2017 r. (Kierunek Technologia żywności i żywienia człowieka)

Katarzyna Nowak: Wpływ kurkuminy na przeżywalność drożdży pączkujących *Saccharomyces cerevisiae* w modelu chronologicznego starzenia. Obrona pracy – lipiec 2018 r. (Kierunek: Biologia)

Dominik Wojdyła: Analiza funkcjonalna rybosomalnego genu uL6 drożdży pączkujących *Saccharomyces cerevisiae*. Obrona pracy: czerwiec 2019 r. (Kierunek: Biologia)

Jadwiga Czachor: Wpływ naparów kawy jakości specjality na wybrane parametry fizjologiczne drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Obrona pracy – wrzesień 2020 r. (Kierunek: Biologia)

Beata Ciak: Wykorzystanie modelu drożdży pączkujących *Saccharomyces cerevisiae* w badaniach nad nowotworami u ludzi. Obrona pracy – wrzesień 2020 r. (Kierunek: Biologia)

Kinga Goleń: Zmiany biochemiczne komórek podczas starzenia chronologicznego w układzie modelowym drożdży pączkujących. Obrona pracy – wrzesień 2022 r. (Kierunek: Biologia)

Gabriela Małek: Zaburzenia biosyntezy ściany komórkowej jako potencjalny czynnik regulujący starzenie w modelu eksperymentalnym drożdży pączkujących *Saccharomyces cerevisiae*. Obrona pracy – lipiec 2022 r. (Kierunek: Biologia)

Jarosław Winiarski: Thiolutin jako inhibitor polimeraz RNA o potencjalnym działaniu antystarzeniowym. Obrona pracy – wrzesień 2022 r. (Kierunek: Biologia)

- **Prace licencjackie**

Katarzyna Nowak – Wpływ inhibitorów transkrypcji i translacji na stan fizjologiczny komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Obrona pracy – czerwiec 2016 r. (Kierunek: Biologia)

Mateusz Chmielowski: Starzenie drożdży *Saccharomyces cerevisiae* – podstawy molekularne, aktualny stan wiedzy i perspektywy. Obrona pracy – czerwiec 2016 r. (Kierunek: Biologia)

Łukasz Wiewióra: Wpływ delecji genów *RPL9A* i *RPL9B* na przeżywalność drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w modelu chronologicznego starzenia. Obrona pracy – lipiec 2017 r. (Kierunek: Biologia)

Dominik Wojdyla: Wpływ wybranych inhibitorów translacji na przeżywalność drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w modelu chronologicznego starzenia. Obrona pracy – lipiec 2017 r. (Kierunek: Biologia)

Beata Ciak: Charakterystyka wybranych czynników spowalniających starzenia eukariotycznych organizmów modelowych. Obrona pracy – lipiec 2018 r. (Kierunek: Biologia)

Jadwiga Czachor: Charakterystyka wybranych czynników przyspieszających starzenie drożdży pączkujących *Saccharomyces cerevisiae*. Obrona pracy – lipiec 2018 r. (Kierunek: Biologia)

Ewa Panas: Biologiczne teorie starzenia się. Obrona pracy – lipiec 2019 r. (Kierunek: Biologia)

Filip Rucki: Szlaki sygnalizacyjne determinujące starzenie. Obrona pracy – lipiec 2019 r. (Kierunek: Biologia)

Gabriela Małek: Drożdże pączkujące *Saccharomyces cerevisiae* jako model w badaniach wybranych chorób człowieka. Obrona pracy: lipiec 2020 r. (Kierunek: Biologia)

Jarosław Winiarski: Znaczniki fizjologiczne i molekularne procesu starzenia komórkowego. Obrona pracy – wrzesień 2020 r. (Kierunek: Biologia)

Faustyna Grzyb: Regulacja molekularna głównych szlaków metabolicznych determinujących starzenie. Obrona pracy – wrzesień 2022 r. (Kierunek: Biologia)

Przemysław Werelusz: Białka wielofunkcyjne – moonlighting proteins. Obrona pracy - wrzesień 2022 r. (Kierunek: Biologia)

- **Prace inżynierskie**

Dominika Szlachcikowska: Analiza fizjologiczna i molekularna drożdży pączkujących traktowanych TEMPO (2,2,6,6-Tetrametylopiperydydno-1-oksyl). Obrona pracy – luty 2022 r. (Kierunek: Biotechnologia)

7.1.3 Opieka nad praktykantami

Beata Ciak – 03.07–18.07.2017 r.

Gabriela Małek – 01.07–19.07.2019 r.

Zofia Kobylńska – 01.12.2022–31.01.2023 r.

7.1.4 Opieka nad uczestnikami Międzynarodowej Olimpiady Biologicznej:

Jaromir Hunia – 2017 r. i 2018 r.

Marcin Maniak – 2019 r.

7.2. Działalność organizacyjna

- Zastępca Dyrektora Instytutu Biologii i Biotechnologii – od 09.2020 r. – 10.2021 r.
- Kierownik Zespołu programowego dla kierunku wiodącego biologia – od 09.2020 r. – 10.2021 r.
- Przewodniczący Zespołu ds. Promocji Instytutu Biologii i Biotechnologii – 01.10 2019 r. – 30.09.2020 r.
- Pełnomocnik Rektora ds. Klas Akademickich i Uniwersyteckiego Portalu Wiedzy – od 01.10.2018 r.
- Członek Zespołu ds. modernizacji kierunku Biologia – 18.02.2019 – 31.08.2019 r.
- Członek Rady Instytutu Biologii i Biotechnologii od 11.2019 r.
- Koordynator ds. Klas Akademickich Wydziału Biologiczno-Rolniczego oraz Instytutu Biologii i Biotechnologii od 10.2017 r.
- Opiekun Roku na kierunku Biologia dla rocznika rozpoczynającego naukę w roku akademickim 2018/2019
- Koordynator projektu „Biologia kluczem do sukcesu” z ramienia Uniwersytetu Rzeszowskiego (2022-2024)
- Członek komitetu organizacyjnego i naukowego podczas Konferencji Młodych Naukowców Spojrzenie młodych naukowców na rozwój nauk biologicznych i chemicznych, Kraków 22.10 2016 r.
- Członek komitetu organizacyjnego - XXVI Ogólnopolska Konferencja hemipterologiczna “Mszyce i inne pluskwiaki” Berezka – 17-20 września 2019 r.
- Koordynator Nocy Biologów (edycja 2023)

7.3. Działalność popularyzatorska

Czynny udział w:

- Dni Wydziału Biologiczno-Rolniczego – 2015 r. - 2018 r. (warsztaty laboratoryjne)
- Noc Biologów – 2017 (wykład, warsztaty laboratoryjne), 2018 (warsztaty laboratoryjne), 2019 (warsztaty laboratoryjne), 2020 (warsztaty laboratoryjne), 2021 (warsztaty laboratoryjne)
- Klasa akademicka – od 2016 r. - warsztaty laboratoryjne oraz wykłady
- Uniwersytecki Portal Wiedzy – od 2016 r. – wykłady dla uczniów Liceów i Szkół Podstawowych
- Piknik Nauki EKSPLORACJE – 2019 r. współorganizacja wydarzenia oraz warsztaty

7.4. Nagrody i wyróżnienia

- Nagroda Rektora UR za prace doktorską
- Wyróżnienie za zajęcie I miejsca w konkursie na najlepsze wystąpienie ustne podczas IV Ogólnopolskiej Mikrobiologicznej Konferencji Naukowej Microbs. 13-14 czerwca 2019 r. w Nałęczowie

Rzeszów, 09.01.2023 r.



(podpis)