

Roman Maślanka

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

Streszczenie

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

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

Badania przeprowadzono na komórkach drożdży hodowanych na podłożach zawierających różne stężenie glukozy. Do analiz wykorzystano szczep drożdży typu dzikiego reprezentujący tło genetyczne BY4741 oraz izogeniczne względem niego szczepy pozbawione wybranych genów związanych z metabolizmem glukozy tj. $\Delta gpa2$, $\Delta gpr1$ i $\Delta hck2$. Taki układ eksperymentalny oraz wykonana analiza tempa poboru glukozy przez komórki drożdży umożliwiły testowanie roli zarówno zewnątrzkomórkowego jak i wewnątrzkomórkowego stężenia glukozy w regulacji zmian metabolicznych. Stan fizjologiczny komórek drożdży oceniono określając m.in. tempo wzrostu ich populacji, żywotność, wielkość i biomasę komórek, status funkcjonalny mitochondriów, poziom generacji reaktywnych form tlenu, wewnątrzkomórkowy poziom ATP, NADP(H) oraz aktywność enzymatyczną określonych dehydrogenaz szlaku pentozofosforanowego. Z kolei potencjał reprodukcyjny oraz długość życia komórek drożdży, z podziałem na poszczególne fazy, określono wykorzystując metodę mikromanipulacji.

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