

WITOLD JAKUBOWSKI

Katedra Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego,
Banacha 12/16, 90–237 Łódź
E-mail: jakubo@biol.uni.lodz.pl

DROŹDŹE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* — WIELOASPEKTOWY MODEL PROCESÓW STARZENIA

Wiek XX przyniósł ogromny postęp w naukach biomedycznych, co otworzyło nowe możliwości badaczom starającym się rozwikłać wiele frapujących, a ciągle nie rozstrzygniętych zagadek biologii. Jednym z takich problemów jest nieuniknione starzenie się.

Teorie wyjaśniające procesy starzenia można podzielić na dwie grupy, zależnie od podejścia ich autorów do zmian w komórkach wywołanych przez upływający czas. Część badaczy widzi w starzeniu się proces niecelowy (stochastyczny), wynikający z niedoskonałości organizmów żywych. Największą rolę odgrywa tutaj wolnorodnikowa teoria starzenia sformułowana przez DENHAMA HARMANA (1956, 1992), przy czym obok niej powstało szereg innych koncepcji, dość często wzajemnie się uzupełniających. Temat ten został wyczerpująco omówiony w pracy ŻADZIŃSKIEGO (1996). Drugie ujęcie — podkreślające programowy charakter starzenia, zdaje się odgrywać coraz mniejszą rolę. Szczególnie ostra krytyka dotyczy obecnie telomerowej teorii starzenia, traktującej telomery jako biologiczne zegary odliczające liczbę dopuszczalnych podziałów komórki.

Coraz częściej w badaniach nad procesami starzenia znajdują zastosowanie niższe eukarionty jako organizmy modelowe. Mimo że są one ewolucyjnie dość odległymi od ssaków obiektami doświadczeń, mogą jednak pozwolić na lepsze zrozumienie molekularnych podstaw starzenia. Organizmy takie, przez wielu gerontologów uważane za zgoła egzotyczne, pozwalają także na identyfikację genów związanych z tymi procesami, między innymi dzięki znajomości całej sekwencji genomu.

Szczególne zainteresowanie badaczy budzi możliwość sprawdzenia kilku aspektów procesów

starzenia. Główny obszar zainteresowań to ocena znaczenia programu rozwoju organizmu i modyfikującego wpływu środowiska. Drugim bardzo ważnym celem badań jest analiza wpływu metabolizmu na procesy starzenia, w tym przede wszystkim sprawdzenie skutków bloków metabolicznych na poziomie komórkowym. Organizmy takie, jak na przykład drożdże umożliwiają stosunkowo łatwą ingerencję w przemiany wewnątrzkomórkowe. Dokładne poznanie skutków wpływu zmodyfikowanego metabolizmu na przebieg procesów starzenia może niewątpliwie znaleźć zastosowanie w medycynie. Pozostaje jeszcze możliwość analizy zmienności powstałych w toku ewolucji mechanizmów przeciwdziałających starzeniu oraz jego skutkom. Założenie, że poszczególne elementy procesu starzenia u ssaków, a w szczególności człowieka, mogą być badane z wykorzystaniem niższych eukariontów wydaje się być w pełni uzasadnione.

Modelowymi organizmami w badaniach gerontologicznych są przedstawiciele z różnych gałęzi systematycznych: owady *Drosophila melanogaster*, nicienie *Caenorhabditis elegans*, strzępkowce z rodzajów *Podospora* i *Neurospora* oraz drożdże *Saccharomyces cerevisiae* (tab. 1) często i wszechstronnie wykorzystywane w laboratoriach. Rzadziej w literaturze można spotkać prace dotyczące pierwotniaków, wrotków czy żachw.

Drożdże *S. cerevisiae* stanowią bardzo wygodny model w badaniach procesów starzenia z dwóch względów. Pozwalają na analizę na poziomie komórkowym przebiegu zmian wynikłych z upływu czasu i poszukiwanie genów związanych z tymi procesami. Drugą możliwością stanowi analiza zmian powstałych w wielomie-

sięcznych hodowlach jako model starzenia się kultur postmitotycznych.

Niewątpliwą zaletą drożdży jest możliwość ścisłego określenia cech fenotypowych oraz dzięki poznaniu pełnej sekwencji DNA genomu — ustalenie podłoża genetycznego tych zmian. Stosowane jest także planowe wprowadzanie nowych genów dla sprawdzenia ich wpływu na przebieg starzenia.

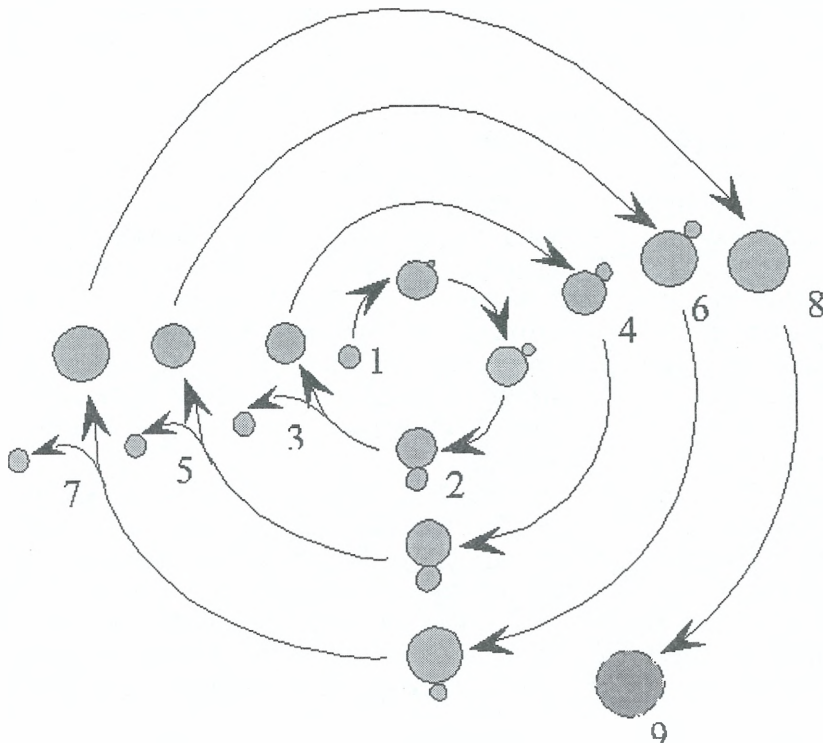
Tabela 1. Organizmy modelowe w badaniach wśród niższych eukariontów

| Gatunek | Stanowisko systematyczne |
|---------------------------------|--------------------------|
| <i>Podospora curvicola</i> | workowce |
| <i>Podospora anserina</i> | workowce |
| <i>Neurospora crassa</i> | workowce |
| <i>Neurospora intermedia</i> | workowce |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | workowce |
| <i>Didymium iridis</i> | śluzowce |
| <i>Physarium polycephaleum</i> | śluzowce |
| <i>Caenorhabditis elegans</i> | nicienie |
| <i>Drosophila melanogaster</i> | owady |

S. cerevisiae należą do organizmów jednokomórkowych, rozmnażających się głównie przez pączkowanie oraz drogą płciową, jednak pączkowanie umożliwia śledzenie zmian zachodzących w procesie starzenia. W hodowli drożdży wyróżnić można kilka grup osobników pod względem wieku i liczby podziałów. Komórkę młodą, która jeszcze nie przeszła pełnego cyklu

życiowego i nie dzieliła się, przyjęło się określać „dziewicą” (ang. virgin cell). Po przejściu pierwszego podziału komórkę taką nazywa się „matką”, a komórkę potomną „córką”. Z kolei teraz ona daje początek nowej linii komórkowej (rys. 1). Po pierwszym podziale często do nazw „matka” i „córka” dodaje się, dla uściślenia, określenie — pierwszego rzędu. Po następnym podziale mamy już do czynienia z „matką” i „córką” drugiego rzędu, a po n -tym podziale z n -tym rzędem. Jest to ważne określenie, gdyż z każdym podziałem zwiększa się czas życia kolejnego pokolenia, zarówno czas niezbędny do przygotowania się komórki do mejozy, jak i czas samego podziału. Nie są to oczywiście jedyne zmiany powstałe w wyniku starzenia.

Komórki, także drożdży, nie mogą dzielić się w nieskończoność. Prace Hayflika z użyciem fibroblastów ludzkich pozwoliły na sformułowanie tezy, że komórka posiada określoną, dopuszczalną liczbę podziałów (HAYFLICK i MOORHEAD 1961, HAYFLICK 1965). Maksymalną liczbę cykli nazwano — od nazwiska odkrywcy — limitem Hayflika i dla większości badanych komórek ludzkich wynosi on 40–50 podziałów. Prace na drożdżach przynoszą wiele ciekawych obserwacji dotyczących wpływu środowiska na liczbę podziałów i długość życia. Doskonałym tego przykładem są prace zespołu kierowanego przez Tomasza Bilińskiego (BILIŃSKI 1997). Zastosowali oni szereg szczepów defektywnych pod względem obrony przeciwko reaktywnym formom tlenu (RFT). Komórki drożdży nie posiadające katalazy, dysmutazy lub o obniżonym po-



Rys. 1. Generacja kolejnych pokoleń u drożdży *S. cerevisiae*.

1 — Komórka dziewicza. 2 — Matka 1-go rzędu. 3, 5, 7 — Oddzielenie matki i córki. 4 — Matka 2-ego rzędu. 6 — Matka n -tego rzędu. 8 — Komórka nie dzieląca się. 9 — Śmierć komórki.

ziomie glutationu są znacznie bardziej narażone na uszkodzenia powstałe w wyniku stresu oksydacyjnego. W myśl teorii wolnorodnikowych to właśnie rodniki, gromadząc się w komórkach, powodują w nich zmiany określane jako starzenie się. Okazało się, że szczepy gorzej „zabezpieczone” mają mniejszą liczbę pokoleń zarówno średnią, jak i maksymalną oraz więcej czasu upływa między podziałami. Ponieważ drożdże są względnie tlenowcami, pozwoliło to na oryginalne rozszerzenie badań. Grupa ta porównała kontrolowane parametry hodowli: w czystym tlenie oraz w czystym azocie względem hodowli w powietrzu. Wnioski płynące z uzyskanych wyników silnie przemawiają za niekorzystną rolą nadmiaru tlenu. Okazało się bowiem, że w atmosferze czystego O₂ w szczepie dzikim dochodzi do zmniejszenia się liczby podziałów, natomiast badane szczepy defektywne nie były w stanie w ogóle rosnąć w tych warunkach. Natomiast w hodowlach w atmosferze czystego azotu nie obserwowano znacznego przyrostu liczby podziałów w szczepie dzikim, ale szczepy z niepełną obroną przed reaktywnymi formami tlenu (RFT) osiągały liczbę pokoleń bardzo zbliżoną do komórek kontrolnych. Prace pokazujące wydłużenie życia komórek znajdujących się w środowisku wolnym od tlenu i jego reaktywnych form nie byłyby możliwe do zrealizowania w hodowlach komórek wyższych eukariotów.

Obserwacje pojedynczych komórek *S. cerevisiae* doprowadziły do opisu zmian jakim podlegają one w procesie starzenia (tab. 2). Dochodzi do modyfikacji cech morfologicznych. Wraz z wiekiem następuje wzrost rozmiarów komórki, a kształt z kulistego przechodzi w nieregularny, dość często walcowaty (EGILMEZ i współaut. 1990). W ścianie komórkowej starych osobników występuje zwiększona liczba chity-

Tabela 2. Zmiany w morfologii i fizjologii związane z wiekiem drożdży *S. cerevisiae*.

| Cecha podlegająca modyfikacji | Zmiana |
|-------------------------------|-------------------------|
| Wielkość komórki | wzrasta |
| Kształt | nabiera nieregularności |
| Pojawienie się granularności | |
| Utrata turgoru | |
| Liczba blizn popodziałowych | wzrasta |
| Chitynizacja | wzrasta |
| Wielkość wakuoli | wzrasta |
| Długość cyklu podziałowego | wzrasta |
| Synteza białek | obniża się |
| Poziom rRNA | obniża się |
| Długość telomeru | niezmieniona |

ny, częściowo spowodowana zwielokrotnieniem liczby blizn popodziałowych. Blizny te powstają w miejscu odpączkowania komórki potomnej, jednakże ślad jest obserwowany jedynie na ścianie komórki matki. „Córka” pozostaje „czysta”, co umożliwia odróżnienie w hodowli dziewic, a dzięki zliczeniu blizn można precyzyjnie określić wiek komórki mierzony liczbą podziałów, jakie przeszła. Ponieważ układ blizn może stanowić wskazówkę określającą jakość warunków środowiskowych (zmieniony w przypadku warunków niekorzystnych; CID i współaut. 1995), podejrzewano, iż znaczącą rolę w procesach starzenia odgrywają ślady pozostające po podziale. Blizny miały ograniczać liczbę dopuszczalnych cykli komórkowych. Część badaczy podejrzewała, że mogą one stanowić zawadę w tworzeniu się nowych pączków. Inni upatrywali w bliznach rodzaj zegara komórkowego. Żadna z tych sugestii nie znalazła jednak doświadczalnego potwierdzenia. Wykazano między innymi, że niekorzystne działanie metanolu na drożdże powoduje znaczne skrócenie czasu życia komórek bez wpływu na blizny popodziałowe (MULLER i współaut. 1980). Egilmez i Jaźwiński doprowadzili do dechitynizacji ściany komórkowej, czym uszkodzili już istniejące blizny. Nie miało to wpływu na liczbę podziałów. W innym przypadku nadekspresja genów wydłużających czas życia *S. cerevisiae* nie miała wpływu na tworzenie się blizn (CHEN i współaut. 1990, SUN i współaut. 1994).

Inne charakterystyczne cechy starzejących się komórek drożdży to postępująca utrata turgoru (MULLER 1971) oraz wzrost objętości wakuoli (EGILMEZ i współaut. 1990). Obniża się też ich zdolność do rozmnażania płciowego, pomimo nie zmienionej wrażliwości na feromony (MULLER 1985). MOTIZUKI i TSUTUGI (1992) wykazali obniżenie syntezy białek oraz zmniejszenie ilości rRNA w komórce.

Wyniki doświadczeń na drożdżach dostarczyły pierwszych poważnych zarzutów przeciwko teorii telomerowej. Wprawdzie zaobserwowano skracanie się długości telomerów wraz z podziałami fibroblastów, jednakże D'MELLO i JAŻWIŃSKI (1991) wykazali na brak zmian długości tych odcinków kończących chromosomy w starych komórkach *S. cerevisiae*. Brak oczekiwanej roli telomerów stwierdzono ostatnio także u szczepu myszy, które pomimo braku aktywności telomerazy, odtwarzającej część traconego fragmentu podczas każdego podziału komórki, funkcjonowały normalnie (BLASCO i współaut. 1997). Jeszcze inną ciekawą obserwacją jest brak akumulacji mutacji mitochondrialnych podczas życia komórki drożdżowej (MULLER 1971), mimo iż gromadzenie takich

uszkodzeń zdaje się być zasadniczą cechą komórek długo żyjących.

Uwaga i wysiłek wielu gerontologów skupia się na powiązaniu procesów starzenia z odpowiednimi genami organizmu. Przykładem mogą być opisane zespoły chorobowe przedwczesnego starzenia, takie jak zespół Wernera czy zespół Hutchinsona–Gilforda (OBRIEN i WEISS 1995, GOTO 1997). W próbach rozwiązania tych zagadnień drożdże stanowią także materiał pomocny badaczom. Przykładem tego może być praca (FOURY 1997), w której wykorzystując znajomość sekwencji genomu *S. cerevisiae* porównywano ludzkie geny o nieznannej funkcji z ich drożdżowymi homologami. Na podstawie znanej roli konkretnego genu u drożdży usiłuje się określić spełniane zadanie przez jego odpowiedniki u ludzi.

Równocześnie są prowadzone prace nad identyfikacją genów odgrywających rolę w starzeniu się komórek *S. cerevisiae* (tab. 3). Pier-

Tabela 3. Zidentyfikowane geny związane z długością życia *S. cerevisiae*

| Gen | Typ mutacji | Efekt na długość życia |
|------------------|---------------------|------------------------|
| <i>lag1</i> | utrata funkcji | wzrost o 47% |
| <i>ras1</i> | utrata funkcji | wzrost o 25% |
| <i>ras2</i> | utrata funkcji | obniżenie o 23% |
| <i>sir4/uth2</i> | modyfikacja funkcji | wzrost o 50% |
| <i>sir4/uth2</i> | utrata funkcji | obniżenie o 15% |

wszym zidentyfikowanym i sklonowanym genem z tej grupy, limitującym średnią i maksymalną długość życia, był *lag1* (ang. longevity assurance gene) (D'MELLO i współaut. 1994). Jego delecja powoduje wzrost długości życia średnio o 47%. Ustalono, że zasadniczą rolę w białku Lag1 odgrywa jego C-końcowy fragment, (JAŻWIŃSKI 1996a). Jednakże biochemiczna funkcja tego białka nie została dotychczas poznana. Najbardziej prawdopodobny wydaje się jego udział w przekazywaniu sygnałów do komórki, za czym przemawia między innymi występowanie w środkowej części łańcucha kilku potencjalnych domen transbłonowych (JAŻWIŃSKI 1996b). Warto jednak zauważyć, że w sekwencji tego białka nie znaleziono fragmentów homologicznych do żadnego znanego białka transbłonowego (KENNEDY i GUARENTE 1996). Ostatnio zidentyfikowano homolog *lag1*, nazwany *lac1*. Oba geny mają podobną funkcję, ale co ciekawe równoczesne uszkodzenie obu genów jest dla komórek letalne (JAŻWIŃSKI 1996a). Jeszcze innym genem, mającym wpływ na czas życia *S. cerevisiae*, jest *phb1*. Jego zwiększona transkrypcja jest charakterystyczna dla komórek

młodych. Niestety także w przypadku tego genu biochemiczna rola jego produktu białkowego pozostaje nie wyjaśniona (JAŻWIŃSKI 1996a).

Znacznie więcej wiadomo o parze drożdżowych homologów ssaczych onkogenów z rodziny *ras* — genach *ras1* i *ras2* (DEFEO–JONES i współaut. 1983). Wskazówka, że procesy starzenia mogą być zależne od tej niezwykle konserwatywnej grupy białek pojawiła się przy okazji badań nad ekspresją ludzkiego onkogenu *v-Ha-ras* w drożdżach (CHEN i współaut. 1990). Dokładna charakterystyka ich wpływu na komórki *S. cerevisiae* została wykonana przez grupę kierowaną przez Jażwińskiego (SUN i współaut. 1994). Oba geny *ras* są związane z przekazywaniem sygnału w komórce. Obecność przynajmniej jednego z nich jest niezbędna do normalnego wzrostu w wypadku, gdy pożywka jest bogata w substancje pokarmowe. Natomiast jeśli zawiera ona jedynie niefermentowalne źródło węgla oba geny są niezbędne dla normalnego funkcjonowania komórki. Delecja obu genów jest letalna. *Ras1* i *ras2* podlegają znacznie wydajniejszej transkrypcji w młodych komórkach, jednakże komórki stare cechuje wyższy poziom transkrypcji *ras1* niż *ras2*. Najważniejsze jest to, że ich wpływ na długość życia jest przeciwny. Nadekspresja *ras1* pozostaje bez zauważalnych efektów, podczas gdy jego delecja powoduje wzrost długości życia średnio o 30%. Z drugiej strony, nadekspresja *ras2* pozwala komórkom funkcjonować o 40% dłużej (SUN i współaut. 1994).

Rola *ras2* w wydłużeniu życia jest upatrywana w interakcji białka kodowanego przez ten gen z cyklazą adenylołą, jakkolwiek mutant z konstytutywnie wysokim poziomem cAMP nie wykazywał zmian w długości życia. Powodem tego może być niezwykle wysoka plejotropowość działania *ras2* (JAŻWIŃSKI 1996b). Białko Ras2 uczestniczy w procesie przekazywania sygnału podczas indukcji różnego rodzaju stresów: pokarmowego (głodzenie), cieplnego, związanego ze zbyt dużym zagęszczeniem komórek (BROACH i DESCHENES 1990), czy wywołanego działaniem promieniowania UV. Pojawiają się także obserwacje wskazujące na jego zaangażowanie w odpowiedź na stres oksydacyjny, a wykazana zależność oporności na UV od poziomu białka Ras2 (KALE i JAŻWIŃSKI 1996) nie jest zależna od uszkodzeń DNA (ENGELBERG i współaut. 1994). Jako cel działania *ras2* jest proponowany także gen *gcn4*, który jest regulatorem genów biosyntezy aminokwasów (JAŻWIŃSKI 1996a). Mimo że fizjologiczna rola genów *ras1* i *ras2* nie jest w pełni jasna, to doświadczenia wykonane na drożdżach spowodowały wzrost zainteresowania rolą ich ludzkich homologów, coraz częściej

tym onkogenom jest przypisywany znaczący udział w procesach starzenia (OSIEWACZ 1997).

Znana jest jeszcze jedna grupa genów ściśle związanych z procesami starzenia w komórkach *S. cerevisiae*. W jej skład wchodzi geny *sir2*, *sir3*, *sir4* oraz mutacje tego ostatniego (KENNEDY i GUARENTE 1996). *Sir2*, *sir3*, *sir4* kodują białka niezbędne do transkrypcji dwóch uspijonych regionów chromosomu. Pierwszy to miejsce kodujące typ płciowy drożdży (HML i HMR), natomiast drugi region stanowi proksymalną część telomeru. Potwierdzono tożsamość genów *sir4* i *uth2*, co wyjaśniło pewne zamieszanie pojawiające się w literaturze. Wpływ na długość życia wykazuje mutacja genu *sir4/uth2*, określana jako *sir4-42*. Powoduje ona powstanie oporności na głodzenie, sterylność komórek oraz wydłużenia czasu ich życia. Wzrost długości życia komórek powodowany przez tę mutację wymaga jednak obecności nie uszkodzonych *sir2* i *sir3* (KENNEDY i współaut. 1995). Mutacja *sir4-42* prowadzi do wydłużenia życia o około 50%, natomiast inne mutacje genu *sir4*, powodujące znaczne uszkodzenie i całkowitą utratę funkcji wywołują efekt zmniejszenia czasu życia o blisko 20% (KENNEDY i GUARENTE 1996). Obecnie badacze starają się powiązać grupę *sir* z charakterystyczną dla starych komórek utratą zdolności do płciowego rozmnażania się.

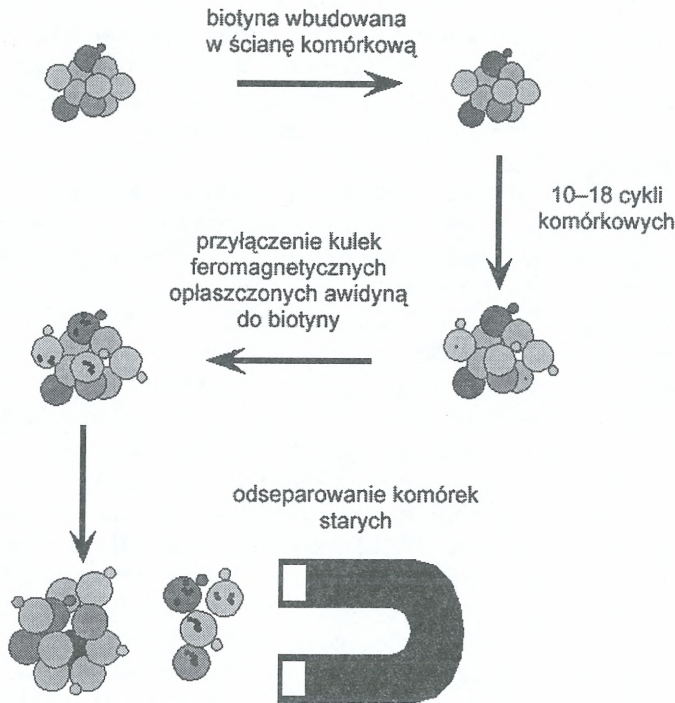
Odrębnym problemem pozostaje izolowanie starych komórek drożdży. Użycie fluorescencyjnego barwnika Calcofluor White M2R pozwala na dość łatwe odróżnienie komórek o zróżnicowanej liczbie podziałów. Barwienie to uwidacznia ilość blizn popodziałowych, znajdujących się na ścianie komórkowej, co pozwala na określenie wieku komórki. Hodowle drożdży w fazie logarytmicznej charakteryzuje niestety dość niska zawartość komórek po kilkunastu podziałach. Średnio taka hodowla zawiera około 50% „dziewic”, 25% komórek po pierwszym podziale („matek pierwszego rzędu”), 12,5% matek 2-ego rzędu, 6,25% matek 3-ego rzędu itd. W efekcie komórek po 15 podziałach jest zaledwie $1,526 \times 10^{-4}$, a po 25 podziałach — $1,49 \times 10^{-6}$. Wysiłki wielu laboratoriów są skierowane na opracowanie jak najwydajniejszych metod wyławiania komórek w „zaawansowanym wieku”. W większości przypadków osiągnięte wydajności pozwalają na przeprowadzanie analiz genetycznych. Nie są one jednak dostatecznie wydajne dla badań na poziomie fizjologicznym. Podstawą większości metod jest wzrost wielkości komórki podczas starzenia. W 1990 roku wprowadzono metodę opartą na rozdziale w gradiencie gęstości sacharozy (EGILMEZ i współaut. 1990). Komórki drożdży były synchronizowane przy

użyciu płciowego czynnika **a**, zawieszane i pozostawione do wzrostu na 6–8 godzin. Następnie poddawano je sonifikacji, dla oddzielenia świeżych pączków i odwirowywano. Pozwalało to oddzielić matki 2-ego rzędu, a procedura powtarzana do 6-razy umożliwiała wydzielenie komórek mających za sobą do 20 podziałów. Niestety metoda ta oprócz małej wydajności daje słabo powtarzalne wyniki, gdyż przyrost wielkości komórek nie jest liniowy, a izolowane frakcje praktycznie zawsze są zanieczyszczone znaczną liczbą „dziewic”.

Bardziej zaawansowaną technicznie propozycją była metoda opracowana przez WOLDIRGHA i współpracowników (1995). Zastosowali oni wielogodzinne wirowanie w specjalnym rotorze elutriacyjnym. Komórki podlegają równocześnie działaniu dwóch sił: odśrodkowej będącej efektem ruchu wirowego i dośrodkowej wynikającej z ruchu pompowanej pożywki przez komorę rotora, w której znajdowały się komórki. Odpowiednie dobranie szybkości przepływającej cieczy i liczby obrotów powodowało, że w komorze utrzymywały się tylko komórki — matki. Pączek, jako komórka o mniejszych rozmiarach, zostawał uniesiony wraz ze strumieniem pożywki. Przy użyciu rotora elutriacyjnego udaje się uzyskać frakcję komórek mających za sobą do około 15 podziałów.

Do obserwacji przebiegu procesów starzenia i wpływu warunków środowiska na długość życia zespół Bilińskiego zastosował odmienną technikę (BILIŃSKI 1997, WAWRYN i współaut. 1997). Komórki były umieszczane na podłożu stałym w obszarze obserwowanym przez mikroskop. Następnie oddzielano pączki i umieszczano w oznaczonych miejscach; stanowiły obiekt doświadczenia. Wraz z kolejnymi podziałami oddzielano „córki” od „matek” przy użyciu mikromanipulatora, „matki” pozostawiano do dalszej obserwacji. W ten sposób można dokładnie oznaczyć liczbę podziałów oraz czas upływający między podziałami. Wymaga to jednak, niejednokrotnie kilkudobowej, ciągłej obserwacji.

Ciekawa metoda izolacji starych drożdży została opracowana w Massachusetts Institute of Technology (KENNEDY i współaut. 1995). Autorzy użyli do tego celu układu wcześniej stosowanego do izolacji erytrocytów z krwiobiegu podczas badań nad starzeniem się krwinek (HOFFMANN-FREZER i współaut. 1993, CHRISTIAN i współaut. 1993). Hodowla w fazie logarytmicznej była inkubowana z pochodną biotyny (NHSLC, biotyna), którą wiąże się kowalencyjnie ze ścianą komórkową (rys. 2). Znakowane komórki pozostawiano do wzrostu na czas potrzebny dla zajścia 12–15 podziałów. Po odpowiednim cza-



Rys. 2. Izolacja starych komórek z hodowli drożdży *S. cerevisiae* (KENNEDY i współprac. 1995).

sie do breczki dodawane były kulki ferromagnetyczne opłaszczone streptawidyną. Ponieważ podczas podziału ściana komórkowa nie ulega rozdzieleniu, wbudowana pochodna biotyny pozostaje związana z komórkami-matkami. Komórki z biotynylowaną ścianą przyłączały się do streptawidyny na powierzchni paramagnetycznych kulek, które następnie odseparowywano od hodowli przy użyciu magnesu. Uzyskana w tej metodzie homogenność komórek jest niezwykle wysoka, jednak i tutaj pojawiają się zastrzeżenia. W ten sposób otrzymane komórki doskonale nadają się do badań genetycznych (co zresztą autorzy uczynili), jednak wprowadzona modyfikacja budowy ich ściany może nie pozostawać bez wpływu na zachodzące w niej procesy biochemiczne. Istnieje także możliwość równoczesnej izolacji z komórkami starymi komórek wolniej rosnących, obecnych podczas inkubacji z biotyną. W rezultacie komórki nie osiągnęłyby więcej niż 10 podziałów.

Interesującym modelem w badaniach gerontologicznych są starzejące się populacje drożdży. Długotrwałe przetrzymywanie komórek w warunkach dogodnych do normalnego wzrostu powoduje zmiany podobne do zachodzących w tkankach postmitotycznych, obserwowane także na innych modelach komórkowych (PUSZTAHELYI i współaut. 1997a, b). Duże zagęszczenie komórek powoduje zahamowanie ich wzrostu, i w rezultacie hodowle takie mogą stanowić układ modelowy dla badań procesów starzenia się komórek nie ulegających podzia-

łom. Wyniki badań dowodzą, że występuje w tych warunkach obniżenie aktywności systemu ochronnego przed niekorzystnym działaniem reaktywnych form tlenu (JAKUBOWSKI i współaut. 1997). Dochodzi także do gromadzenia się uszkodzeń powstałych w wyniku reakcji wolnorodnikowych — następuje zwiększenie ilości grup karbonylowych w białkach komórki, co uznawane jest za częściowy wyznacznik procesów starzenia.

O ile charakterystyka procesów starzenia drożdży jest obecnie dość daleko zaawansowana, to wciąż brakuje dobrego opracowania biochemicznego zmian zachodzących w starzejących się komórkach. Wynika to przede wszystkim z niedostępności materiału.

Starzenie może być także, obok prac eksperymentalnych, rozpatrywane teoretycznie. H. R. Hirsch korzystając z wcześniej przez siebie skonstruowanych modeli matematycznych dla hodowli fibroblastów przeprowadził analizę procesów starzenia się drożdży (HIRSCH 1993). Sformułowane wnioski są zasadniczo zgodne z obserwacjami doświadczalnymi. Hirsch postuluje istnienie czynnika starzenia (ang. senescence factor), który powinien gromadzić się w komórkach wraz z upływem czasu. Najczęściej czynnik ten jest identyfikowany z lipofuscyną, niestety u drożdży *S. cerevisiae* nie udało się dotychczas wykazać gromadzenia w komórkach substancji o podobnym charakterze (JAKUBOWSKI, dane niepublikowane).

Reasumując, drożdże mimo dość dużego odalenia ewolucyjnego od człowieka stanowią doskonały, acz nie doceniany model w badaniach gerontologicznych. Zdecydowanie łatwiej pokazać podwójną rolę tlenu i jego niekorzystne działanie na komórki (BILIŃSKI 1997). Możliwe jest także badanie wpływu warunków pokarmowych na przebieg procesów starzenia, w tym tak popularnego obecnie ograniczenia kalorycznego. Wydaje się, że geny *ras* mają znaczący udział w regulacji zarówno metabolizmu glukozy, jak

i omawianej długości życia komórek (JAŻWIŃSKI 1996c). Niewątpliwą zaletą drożdży są bogate możliwości wykorzystania mutantów oraz wcześniej omówione wykorzystanie ich właściwości względnych tlenowców.

Prace poświęcone badaniu przebiegu procesów starzenia drożdży znajdują także odzwierciedlenie w naukach medycznych, ale przede wszystkim pozwalają na przybliżenie czasu rozwiązania zagadki przyczyn i mechanizmów nieuniknionego starzenia się organizmów.

THE YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* — A MANY-SIDED MODEL OF AGING.

Summary

Individual cells of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* are capable of a limited number of divisions and in this sense are subject to aging. Thus, *S. cerevisiae* constitutes a unique model for studies of the aging process which makes possible experimentation not easily available in higher eukaryotes. A number of genes have been identified in *S. cerevisiae* which are associated with lifespan prolongation (i.e. an increase in the number of cell divisions). On

the other hand, cultures of yeast can be employed as a model of aging of postmitotic tissues. Another problem in the research on yeast aging is the isolation of senescent cells (cells which underwent many divisions) in amounts sufficient for biochemical studies. Emerging procedures should help in establishing yeasts as a useful model system for studies of cellular aging at the molecular level.

LITERATURA

- BILIŃSKI T., 1997. *Drożdże jako model w badaniach wolnorodnikowych*. Wykład - XXXIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego 92-93.
- BJORKSTEIN J., 1974. *Crosslinkage and the aging process, Theoretical aspects of aging*. Acad Press new York 43-59, 1974.
- BLASCO M. A., LEE H-W, HANDE M. P., SAMPER E., LANDSDORP P. M., DEPINHO R. A., GREIDER C. W., 1997. *Telomere shortening and tumor formation by mouse cell lacking telomerase RNA*. Cell 91, 25-34.
- BROACH J. R., DESCHENES R. J., 1990. *The function of RAS gene in S. cerevisiae*. Adv. Cancer Res., 54, 79-139.
- CHEN J. B., SUN J., JAŻWIŃSKI M. S., 1990. *Prolongation of the yeast life span by the v-Ha-RAS oncogene*. Mol. Microbiol. 4, 2081-2086.
- CHRISTIAN J. A., REBAR A. H., BOON G. D., LOW P. S., 1993. *Senescence of canine biotinylated erythrocytes: increased autologous immunoglobulin binding occurs on erythrocytes aged in vitro for 104 to 110 days*. Blood 82, 3469-3473.
- CID V. J., DURAN A., DEL REY F., SNYDER M. P., NOMBELA C. SANCHEZ M., 1995. *Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in S. cerevisiae*. Microbiol. Rev. 59, 345-386.
- D'MELLO N. P., CHILDRES A. M., FRANKLIN D. S., KALE S. P., PINSWASDI C., JAŻWIŃSKI M. S., 1994. *Cloning and characterization of LAG1, a longevity-assurance gene in yeast*. J. Biol. Chem. 269, 15451-15459.
- D'MELLO N. P., JAŻWIŃSKI M. S., 1991. *Telomere length constancy during aging of S. cerevisiae*. J. Bacteriol. 173, 6709-6713.
- DEFEO-JONES D., SCOLNICK E. M., KOLLER R., DHAR R., 1983. *Ras-related gene sequences identified and isolated from S. cerevisiae*. Nature 306, 707-709.
- EGILMEZ N. K., CHEN J. B., JAŻWIŃSKI M. S., 1990. *Preparation and partial characterization of old yeast cells*. J. Geront. 45, B9-B17.
- ENGELBERG D., KLEIN C., MARTINETTO H., STRUHL K., KARIN M., 1994. *The UV response involving the Ras signaling pathway and AP-1 transcription factors is conserved between yeast and mammals*. Cell 77, 381-390.
- FOURY F., 1997. *Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast*. Gene 195, 1-10.
- GOTO M., 1997. *Hierarchical deterioration of body systems in Werner's syndrome: implications for normal ageing*. Mech. Ageing Dev. 98, 239-254.
- HARMAN D., 1956. *A theory based on free radical and radiation chemistry*. J Gerontol. 1, 298-300.
- HARMAN D., 1992. *Role of free radicals in aging and disease*. Ann. New York Acad. Sci. 673, 126-141.
- HAYFLICK L., 1965. *The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains*. Exp. Cell. Res. 37, 614-636.
- HAYFLICK L., MOORHEAD P. S., 1961. *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp. Cell. Res., 25, 585-621.
- HIRSCH H. R., 1993. *Accumulation of a senescence factor in yeast cells*. Exper. Geront. 28, 195-204.
- HOFFMANN-FEZER G., MYSLIWIETZ J., MÖRTLBAUER W., ZEITLER H. J., EBERLE E., HÖNLE U., THIERFELDER S., 1993. *Biotin labeling as an alternative nonradioactive approach to determination of red cell survival*. Annu. Hematol. 67, 81-87.
- JAKUBOWSKI W., BILIŃSKI T., BARTOSZ G., 1997. *Starzenie się drożdży S. cerevisiae w kulturze stacjonarnej*. Doniesienie zjazdowe - XXXIII Zjazd PTBioch, 104-105.
- JAŻWIŃSKI M. S., 1996a. *Models of aging: invertebrates, filamentous fungi and yeasts*. Encyklopedia of Gerontology t. 2, s. 151-161.
- JAŻWIŃSKI M. S., 1996b. *Longevity, genes and aging*. Science 273, 54-59.
- JAŻWIŃSKI M. S., 1996c. *Longevity-assurance genes and mitochondrial DNA alterations: yeast and filamentous fungi*. Handbook of Biology of Aging, Academic Press, 39-54.
- KALE S. P., JAŻWIŃSKI M. S., 1996. *Differential response to UV stress and DNA damage during the yeast replicative life span*. Dev. Genet. 18, 154-160.
- KENNEDY B. K., AUSTRIACO N. R., ZHANG J. J. R., GUARENTE L., 1995. *Mutation in the silencing gene SIR4 can delay aging in S. cerevisiae*. Cell 80, 485-496.
- KENNEDY B. K., GUARENTE L., 1996. *Genetic analysis of aging in S. cerevisiae*. TIG 12, 355-359.

- MIQUEL J., ECONOMOS A. C., FLEMING J., JOHNSON J. E. Jr., 1980. *Mitochondrial role in cell aging*. *Exp. Gerontol.* 15, 575-591.
- MOTIZUKI M., TSURUGI K., 1992. *The effect of aging on protein synthesis in the yeast S. cerevisiae*. *Mech. Ageing Dev.* 64, 235-245.
- MULLER I., ZIMMERMANN M., BECKER D., FLOMER M., 1980. *Calendar life span versus budding life span of S. cerevisiae*. *Mech. Ageing Dev.* 12, 47-52.
- MULLER I., 1971. *Experiments on ageing in single cells of S. cerevisiae*. *Arch. Mikrobiol.* 77, 20-25.
- MULLER I., 1985. *Parental age and the life-span of zygotes of S. cerevisiae*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 51, 1-10.
- O'BRIEN M. E., WEISS A. S., 1995. *Hutchinson-Gilford progeria fibroblasts exhibit metabolically normal uridine uptake and RNA synthetic rates*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210, 225-230.
- OSIEWACZ H. D., 1997. *Genetic regulation of aging*. *J. Mol. Med.* 75, 715-727.
- PUSZTAHELYI T., POCSI I., KOZMA J., SZANTIRMA A., 1997a. *Aging of P. chrysogenum cultures under carbon starvation: morphological changes and secondary metabolite production*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 25, 81-86.
- PUSZTAHELYI T., POCSI I., SZANTIRMA A., 1997. *Aging of P. chrysogenum cultures under carbon starvation: protease and N-acetyl- β -D-hexosaminidase productin*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 25, 87-93.
- SUN J., KALE S. P., CHILDRES A. M., PINSWASDI C., JAŻWIŃSKI M. S., 1994. *Divergent roles of RAS1 and RAS2 in yeast longevity*. *J Biol Chem.* 269, 18638-18645.
- WAWRYN J., MYSZKA A., KRZEPILKO A., BILIŃSKI T., 1997. *Wolnorodnikowa teoria starzenia. Badania modelowe. Doniesienie zjazdowe - XXXIII Zjazd PTBioch*, 100.
- WOLDIRGH C. L., FLUITER K., HULS P. G., 1995. *Production of senescent cells of S. cerevisiae by centrifugal elutriation*. *Yeast* 11, 361-369.
- ŻADZIŃSKI R., 1996. *Program czy niedoskonałość - nierozwiktana zagadka gerontologii*. *Kosmos* 45, 69-96.