Starenje kvasca

Domitrović, Lidija

Undergraduate thesis / Završni rad

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:532131

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

STARENJE KVASCA

YEAST AGEING

SEMINARSKI RAD

Lidija Domitrović
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular biology)
Mentor: doc. dr. sc. Maja Matulić

Zagreb, 2009.

Sadržaj

Sadržaj 2
Uvod 1
Karakteristike replikativno starih stanica kvasca 2
Uloge proteina Sir2 u replikativnom i kronološkom starenju 5
Uloge Sir2 u replikativnom starenju 5
Uloge Sir2 u kronološkom starenju 6
Uloge proteina TOR, Sch9 i PKA 6
Zaključak 8
Literatura 9
Sažetak 10
Summary 10

Uvod

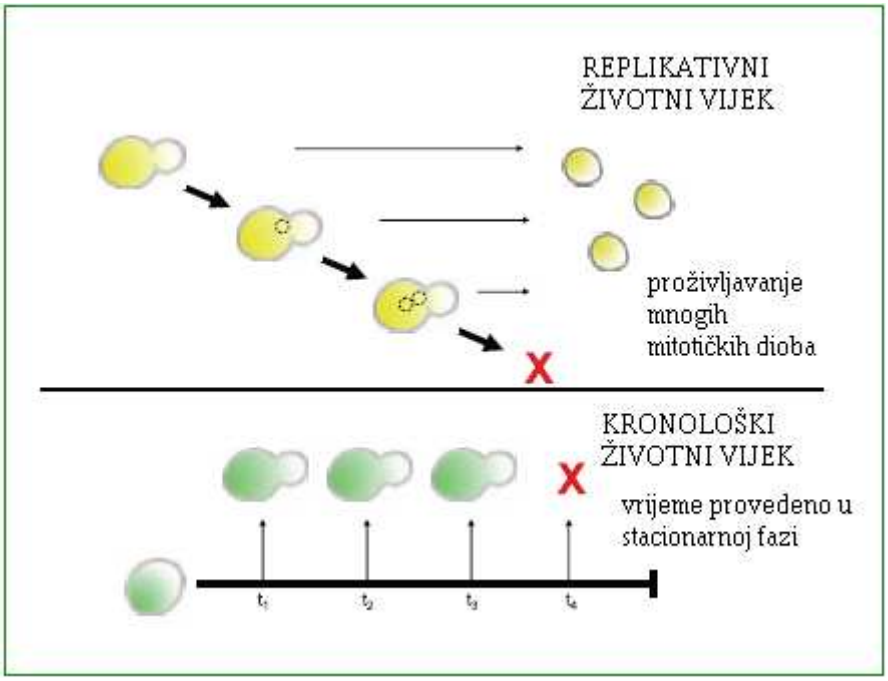
Starenje je životni proces nakupljanja staničnih promjena s vremenom. Uzroci i mehanizmi razlikuju se u biološkim skupinama sukladno evolucijskim i fiziološkim razlikama. Ipak, nastoje se utvrditi zajedničke zakonitosti i homologni geni koji bi pomogli u primjenama saznanja o starenju jednostavnijih modelnih organizama na istraživanja o procesima starenja kod čovjeka.

U eukariotskim organizmima geni su raspoređeni u linearne DNA molekule, u obliku kromosoma. Na krajevima kromosoma smješteni su visoko ponavljajući nekodirajući sljedovi – telomere, čija je uloga očuvanje strukture krajeva kromosoma, zaštita od staničnih nukleaza, i, u nekim stanicama, igraju ulogu staničnog sata. Replikacija kromosoma odvija se pomoću visoko procesivnih DNA polimeraza. Međutim, zbog mehanizma kojim rade, ne mogu replicirati sam kraj, odnosno početak kromosoma, pa se tako uzastopnim diobama stanice kromosomski krajevi skraćuju. To se očituje promjenom broja ponavljajućih sljedova u telomerama. Kad se telomere skrate do kritične dužine, mogu se aktivirati određeni procesi u stanici i nastupa starenje. Na taj način se stanice metazoa unaprijed ograničavaju na dozvoljeni životni vijek. Pupajući kvasac, *Saccharomyces cerevisiae*, predstavnik je jednostaničnih eukariota. Kao i prokariotima, i njima je potrebna neograničena mogućnost distribuiranja genetičkog materijala, jer svaka stanica čini zasebni organizam s potencijalom da u stresnim uvjetima baš on produži ili prekine očuvanje vrste. Prokarioti nemaju problem replikativnog skraćivanja krajeva kromosoma jer su cirkularni. Jednostanični eukarioti, poput kvasca, rješavaju taj problem aktivnošću telomeraza. To su enzimi koji osim proteinskog dijela nose i RNA slijed, koji odgovara ponavljajućim sljedovima telomera pripadnog organizma. Reverznom transkripcijom ti enzimi produžuju krajeve kromosoma skraćene transkripcijom, te sprječavaju programirano starenje. Na isti način djeluju i u nekim stanicama metazoa, npr. u matičnim, ili tumorskim stanicama, dok u većini somatskih stanica nema ekspresije telomeraze. Pored teorije staničnog sata, postoje i druge teorije o starenju. Zajedničko im je da se radi o akumuliranju neke stanične promjene u funkciji vremena, npr. kromosomskih oštećenja, ili oštećenja proteina. Široko je prihvaćena teorija slobodnih radikala, prema kojoj reaktivni oblici kisika, nastali oksidativnim stresom, akumuliraju razna oštećenja u stanici, što na kraju rezultira kolapsom stanične homeostaze. Među različitim teorijama starenja zapravo još ne postoji ultimativna. Najvjerojatnije se razni čimbenici preklapaju, a, ovisno o uvjetima i tipu stanica, jedan dominira.

Sredinom 20. stoljeća smatralo se da se asimetrično pupanje kvasca može događati unedogled, s obzirom na to da je kultura kvasca rasla beskonačno uz uvjet obnavljanja zalihe nutrijenata. Pedesetih je godina napravljen ključan pokus koji pobija taj postulat. Pratila se replikacija stanica majke i kćeri nastalih pupanjem (lako su se mogli razlikovati po veličini) tehnikama mikromanipulacije. Ustanovljeno je da za svaku stanicu postoji ograničeni kapacitet dijeljenja. Tako je definiran prvi vid starenja kvasca, tzv. replikativno starenje, odnosno, replikativni životni vijek – RLS (od engl. Replicative Life Span, od sad pa nadalje u tekstu).

Nešto kasnije je kod pupajućeg kvasca, *Saccharomyces cerevisiae*, o kojem će se govoriti u nastavku teksta, primijećeno je da ima i ograničeni životni vijek bez obzira na diobu. To je tzv. kronološki životni vijek, maksimalno vremensko razdoblje koje stanica može preživjeti u fazi bez dijeljenja u stacionarnoj fazi (sl.1) ili skraćeno CLS (od engl. Cronological Life Span, od sad pa nadalje u tekstu). Mjeri se frakcijom kulture koja je sposobna ponovno pokrenuti stanični ciklus nakon produžene stacionarne faze. Te karakteristike kvasca omogućuju povlačenje paralela s mehanizmima starenja proliferirajućih (RLS) i neproliferirajućih (CLS) stanica u drugim organizmima te njihovu usporedbu u okviru

iste stanice. Uz to, kvasac je vrlo jednostavan i najistraženiji eukariot među beskralješnjacima pa se unazad deset godina najviše istraživanja o mehanizmima starenja vrši na njemu.



Slika1. Replikativni životni vijek (RLS) definira se ukupnim brojem dioba koje stanica može proći. Kronološki životni vijek označava vremensko razdoblje vijabilnosti stanice u stacionarnoj fazi. Prilagođeno na temelju Kaeberlein i sur. 2007.

Identificirano je više od 20 gena koji su uključeni u proces starenja, što sugerira da je starenje ovisno o više različitih mehanizama. Sumacijom rezultata različitih istraživanja definirano je nekoliko molekularnih mehanizama u kojima sudjeluju ti geni: stanični odgovor na metaboličke puteve, modifikacija kromatina koja vodi transkripcijskom utišavanju i regulacija stabilnosti ribosomalnih DNA lokusa. Bilo bi netočno reći da su različiti istraživači utvrdili različite faktore i mehanizme starenja, zbog stalno prisutnog ispreplitanja svih tih faktora. Pojedina istraživanja promatraju starenje iz različitih kuteva i iznose činjenice koje se djelomično preklapaju s onima iz drugih istraživanja. Zato će se u dijelu teksta rezultati prezentirati u odjeljcima vezanima uz pojedini gen.

Primijećeno je da na oba vida starenja (i replikativno i kronološko) negativno utječe kalorijska restrikcija, što znači da uzgoj u uvjetima smanjene količine glukoze i aminokiselina produžuje replikativni i kronološki životni vijek. Stoga se u zadnje vrijeme mnoga istraživanja fokusiraju na mehanizme koji povezuju uvjete kalorijske restrikcije i odgodu starenja, te se na taj način pokušavaju identificirati mehanizmi starenja. Također se promatra evolucijska očuvanost ustanovljenih poveznica kod drugih modelnih organizama: nematoda (*C. elegans)*, vinskih mušica (*D. melanogaster*), miševa i čovjeka

Karakteristike replikativno starih stanica kvasca

Neke očite karakteristike replikativno starijih stanica kvasca su veći obujam, naborana površina, i veće vremensko razdoblje između zadnjih nekoliko dioba. Utvrđeno je i da kvasci potomci pokazuju različite karakteristike, ovisno o tome od kakve majke potječu, iako se teoretski u svakoj novoj stanici tek počinje odbrojavati replikativni vijek. Stanice nastale od

replikativno starijih stanica majki i same su pokazivale značajno smanjen replikativni vijek. Iz toga proizlazi da se vjerojatno neki molekularni faktor raspoređuje asimetrično u stanice majke, a kad je prisutan u većim količinama u starijim stanicama, više ga se prenese i u stanice kćeri.

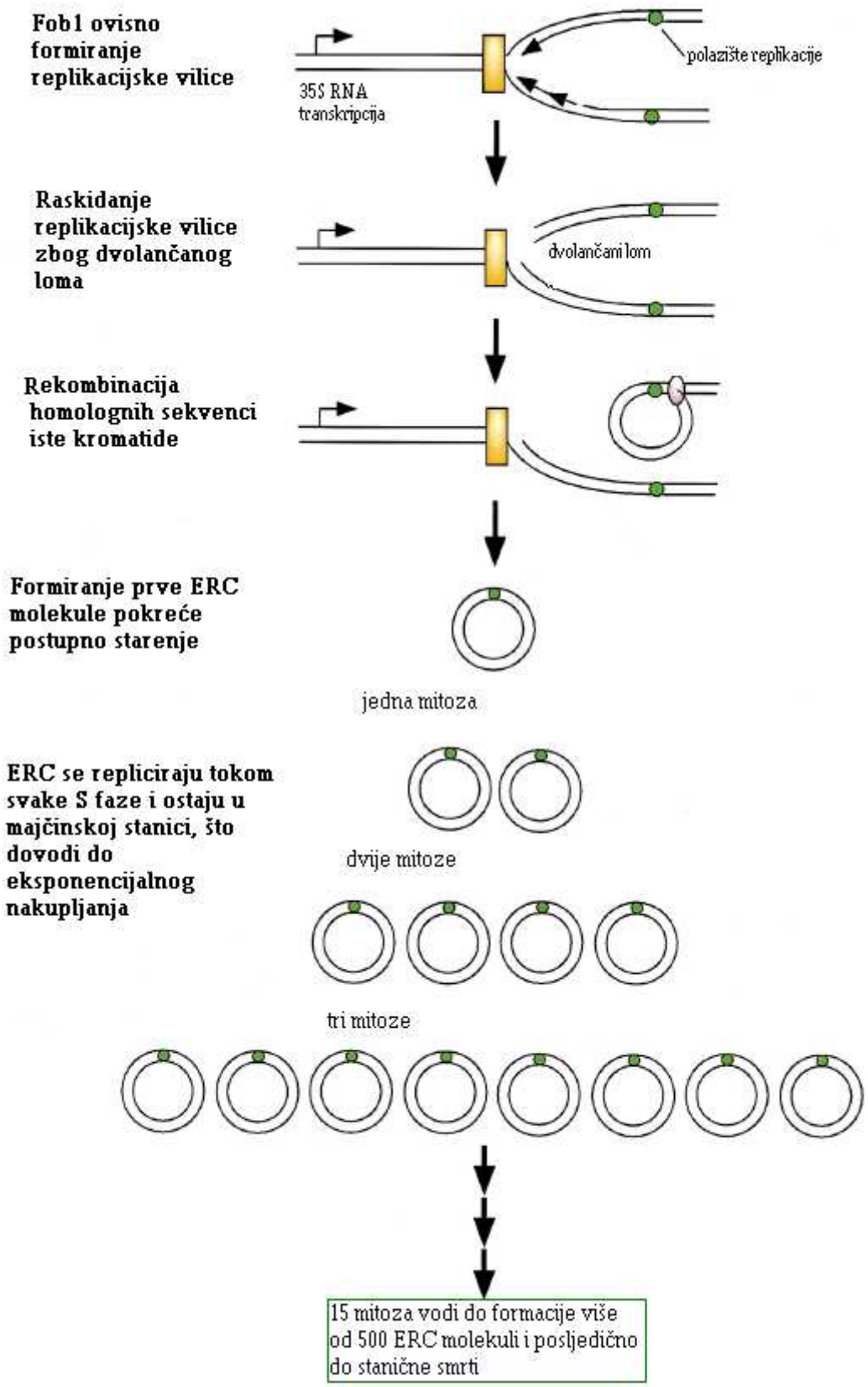
Još 1956. Harman je predložio teoriju slobodnih radikala koja kaže da starenje uzrokuju reaktivne skupine kisika s jednim nesparenim elektronom, stvarajući mutacije i oštećenja proteina. Reaktivne oksidativne skupine nakupljaju se pojačano prilikom diauksičnog prelaza i stacionarne faze, kad stanice prijeđu iz fermentacijske u oksidativnu fazu metabolizma. Primijećeno je da se karbonilirani proteini, koji nastaju reakcijom sa reaktivnim kisikom, asimetrično raspoređuju u starije stanice. Ipak, još nije dokazano da smanjenje njihove količine produžuje RLS. Također, postoji mogućnost da kao faktor starenja djeluje oštećenje pojedinog ili pojedinih proteina, a u dosadašnjim mjerenjima je praćena karbonilacija svih staničnih proteina zajedno (Henderson i sur. 2008.).

Druga hipoteza vezana uz oksidativna oštećenja jest da su faktor starenja proteinski agregati koji nastaju oštećenjem proteina. Jedini pokusi na tom polju su promatranje pojavnosti šaperona Hsp104 u replikativno starijim stanicama, budući da je Hsp104 disagregaza. Potvrđeno je da količina tog proteina raste s replikativnom starošću, no nisu napravljeni pokusi koji provjeravaju povećava li se životni raspon njihovim uklanjanjem (Laun i sur. 2007.).

Vezano uz Hsp, a primjenjivo općenito, na proteine koji popravljaju oksidativna oštećenja, faktor starenja bi moglo biti preopterećenje ostalim oštećenim proteinima koji su se tijekom vremena nakupili i trebaju popravak. Svakako, nakupljanje proteinskih oštećenja jesu važan dio fenotipa starosti (Henderson i sur. 2008.).

Jedno od svojstava replikativno starijih stanica je prisutnost izvankromosomskih cirkularnih rDNA, ERC (od engl. extrachromosomal rDNA circles). Nastaju homolognom rekombinacijom ribosomske DNA zbog specifične građe njegovog lokusa; sastoje se od 100 do 200 ponavljanja sekvence duljine 9 kb. Između ponavljajućih su neponavljajuće sekvence koje mogu služiti kao ishodište replikacije. Iz istraživanja na E. coli utvrđeno je da su replikacijske vilice nestabilne strukture koje mogu prijeći u dvolančani lom prilikom kemijskog ili fizikalnog oštećenja. Analogno, i u kvascu može doći do dvolančanog loma na ishodištima replikacije unutar rDNA lokusa. Slobodan kraj DNA može se zatim rekombinirati s homolognim sekvencama rDNA te nastaju ekstrakromosomske kružne molekule s jednom ili više kopija, ovisno o mjestu rekombinacije. Kada jednom nastane takva molekula, može se autonomno replicirati. Budući da nemaju centromera ni sličnih struktura, raspoređuju se asimetrično, pretežno u stanicame majke, stoga ih je više u replikativno starijim stanicama (sl.2). Također, ako ih se više prenese u novu stanicu, ona će imati smanjen replikativni vijek (Sinclair, 1999.). Isto tako, ako ih se odstrani iz stanice majke, produžuje joj se vijek. S druge strane, pokus s delecijskim mutantima za gen *fob1*, koji kodira protein nužan za formaciju ERC, pokazao je znatnu odgodu starenja, ali je starost naposljetku ipak nastupila. To bi isključivalo ERC kao glavni i jedini uzrok starenja. Uz to, prolazak kulture kroz stacionarnu fazu skraćuje RLS kad se kulturi obnovi medij, ali nije primijećeno dodatno nakupljanje ERC. To sugerira postojanje nekog drugog, dodatnog faktora, koji se pojavljuje u ovisnosti o nutritivnim uvijetima (Fabrizio i sur. 2003.). Važno je spomenuti i to da su ERC u korelaciji sa starenjem primijećeni samo kod kvasca.

ERC prema nekim teorijama, uzrokuju starenje tako što njihov prevelik broj dovodi do fragmentacije nukleolusa. Prema drugima, otežavaju pristup nužnim regulatornim proteinima DNA što uzrokuje poremećaje očuvanja njene stabilnosti i replikativnu starost.



Slika 2. shematski prikaz ERC (Extrachromosomal Ribosomal DNA) modela starenja; prilagođeno na temelju Sinclair 1999.

Uloge proteina Sir2 u replikativnom i kronološkom starenju

Najistraženiji protein u kvaščevom starenju je Sir2. Pripada u razred III kvaščevih deacetilaza, sirtuine (od engl. Silent Information Regulator proteins.= regulatorni proteini za utišavanje gena). Jedinstveni su po tome što kao kofaktor koriste NAD+, pa tako s proteina (histona H3 i H4) koje deacetiliraju na ciljnom lizinskom nastavku, prenose acetilnu skupinu na NAD+ pri čemu nastaje 2'OacetilADP riboza, za koju se spekulira da je sekundarni glasnik. Budući da je NAD+ supstrat, mogu reagirati na promjene staničnog metabolizma preko omjera [NAD]/[NADH]; Prilikom kalorijske restrikcije dolazi do prijelaza na oksidativni metabolizam i povećavanog omjera [NAD]/[NADH]. Ta karakteristika čini Sir2 zanimljivim istraživačima jer bi mogao djelovati kao poveznica metaboličkog stanja stanice i transkripcije (Laun i sur. 2007.).

Uloge Sir2 u replikativnom starenju

Prije nego je otkrivena njegova uloga u starenju, Sir2 je bio poznat u sklopu Sir kompleksa (Sir2, Sir3, Sir4) za represiju transkripcije dvaju rekombinacijskih mjesta i gena smještenih blizu telomera. Ključan pokus koji je proslavio Sir2 je produživanje RLS kalorijskom restrikcijom. Utvrđeno je da u stanicama kojima nedostaje Sir2 ne dolazi do povoljnog efekta kalorijske restrikcije (Fabrizio i sur. 2003). Najprije se mislilo da je to zbog aktivnosti Sir2 na telomerama. Daljnje analize su pokazale da se RLS povećava sukladno sa lokaliziranjem Sir2 u jezgrici (dio jezgre čiji kromatin nosi gene za rRNA i mjesto je sinteze ribosoma); Sir2 svojom funkcijom represora može inhibirati nastanak ranije spomenutih ERC molekula i transkripciju gena koje prepisuje RNA polimeraza III. Uz Sir2, zabilježena je i funkcija proteina Fob1 koji ima suprotan učinak, budući da blokadom replikacijske vilice u tom dijelu kromosoma pospješuje rekombinaciju rDNA. Iako je efekt produženja životnog vijeka proteinom Sir2 zabilježen i kod nematoda i mušica, kod njih nije dokazana prisutnost ERC molekula nego postoje drugi mehanizmi kojim Sir2 povoljno utječe na RLS (Sinclair 1999.).

Nakon prvih otkrića Sir2, nastavljeno je s pokusima u tom smjeru i došlo je do različitih rezultata koji upućuju na druge faktore uključene u njegovu regulaciju. U dvostrukim deletantima za Fob1 i Sir2 došlo je udvostručenja RLS, što je prvi argument da Sir2 nije jedini zaslužni faktor. Različiti istraživači su dolazili do različitih zaključaka o Sir2. Grupa znanstvenika ustvrdila je da kalorijska restrikcija ne može produžiti RLS u dvostrukim deletantima za Sir2 i Hist2, što navodi na zaključak da se produženje RLS odvija obavezno ovisno o sirtuinima, ili Sir2 ili Hst2. Također, u nekim sojevima koji imaju treći sirtuin, Hst1, on može kompenzirati učinak deletiranog Sir2. Međutim, druga grupa autora objavila je da je u pokusima nad istim sojem došlo do produženja RLS uslijed kalorijske restrikcije unatoč istovremenoj deleciji Sir2, Hst2 i Fob1 te Hst1 u sojevima u kojima je prisutan (Longo i sur. 2006.).

Iako ne postoji opći konsenzus ili precizna definicija uloge Sir2, većinom su prihvaćene slijedeće činjenice: mutacije u Sir2 (u normalnim hranidbenim uvjetima) rezultiraju povećanom rekombinacijom rDNA, posljedično, nakupljanjem ERC, te replikativnom starenju. Povećana ekspresija Sir2 povećava RLS 30-40%. Također, u uvjetima kalorijske restrikcije, Sir2 djeluje povoljno na produženje RLS, ali nije neophodan. I dalje se

vrše istraživanja na tom području s ciljem preciziranja staničnih puteva vezanih uz Sir2 i starenje općenito (Longo i sur. 2006.).

Uloge Sir2 u kronološkom starenju

Kronološko starenje kvasca u prirodnim uvjetima primjećuje se prilikom seljenja iz medija bogatog nutrijentima u vodu ili jednostavno prilikom iscrpljivanja medija. Očekivani prosječni vijek kvasca u uvjetima 2% glukoze je 6-7 dana. Produživanje CLS događa se ako se između 1. i 5. dana kvasac preseli u vodu, pri čemu se smanjuje stopa metabolizma, a povećanje je 2 do 3 puta (Fabrizio i sur. 2003.).

U normalnim uvjetima nije primijećen utjecaj Sir2 na CLS. Međutim, u uvjetima kalorijske restrikcije ili delecije proteina glukoznog metabolizma (protein kinaze A, Sch 9), delecija Sir2 uzrokuje produženje CLS, a njegova prekomjerna ekspresija ga skraćuje (npr. kod mutanata za Sch 9). Dva su procesa s kojima se efekt delecije Sir2 dovodi u svezu: pojačanje antioksidativne zaštite i pojačanje ekspresije alkohol dehidrogenaze, potrebne za oksidativni metabolizam nakon diauksičnog prelaza u mediju bez glukoze (Fabrizio i sur. 2003.).

Oksidativni stres smatra se najvažnijim čimbenikom pri ograničavanju kronološkog životnog raspona. Važno je spomenuti superoksid dismutaze, Sod1 i Sod2. Sod1 (CuZn Sod) je citoplazmatski enzim. U kvascu je dokazano da je potreban u uvjetima visoke koncentracije kisika. Enzim je evolucijski očuvan, te humani SOD može funkcionalno zamjeniti kvaščev. Sod2 (MnSod) je mitohondrijski enzim, a njegov nedostatak vodi skraćenju CLS i u uvjetima niske i visoke koncentracije kisika. Također, prekomjernom ekspresijom Sod1 i Sod2 zasebno, a pogotovo zajedno, postignuto je produživanje CLS (Fabrizio i sur. 2003.).

Smatra se da su uzrok oksidativnih oštećenja mitohondriji zbog oksidativnog metabolizma. Prvi stradavaju mitohondrijski enzimi, i to oni s mehanizmom vezanim za 4Fe-4S, kao što su akonitaza i sukcinat dehidrogenaza. Eksperiment koji je potvrdio oštećenja mitohondrija kao uzrok starenja je bio promatranje sposobnosti stanica kvasca da koriste oksidativni metabolizam u stanicama bez Sod2. U tu svrhu je definiran indeks respiratorne kompetencije (IRS), koji je opadao s odumiranjem stanica (Fabrizio i sur. 2003.).

Kao što je ranije spomenuto, delecija Sir2 u kombinaciji s kalorijskom restrikcijom ili delecijom u signalnim putevima koji signaliziraju prisutnost glukoze, rezultira pojačanjem antioksidativne zaštite; u prvom redu preko Sod1 i Sod2 (Fabrizio i sur. 2003.).

Mehanizam kojim delecija Sir2 u istim uvjetima pojačava ekspresiju alkohol dehidrogenaze nije poznat. Efekt pojačane ekspresije Adh očituje se bržim iskorištavanjem etanola iz medija. Znanstvenici predlažu da je to pokušaj stanica bez Sir2 da se pripreme na duže periode gladovanja (Longo i sur. 2006.).

Uloge proteina TOR, Sch9 i PKA

Signalni put TOR važan je regulator staničnog rasta ovisnog o nutritivnim uvjetima. Ukratko, u prisutnosti glukoze podržavaju fermentativni metabolizam i stanični rast putem regulacije sinteze proteina. U uvjetima bez glukoze stanica prelazi na oksidativni metabolizam i paralelno pojačava opseg antioksidativne zaštite inhibicijom spomenutih

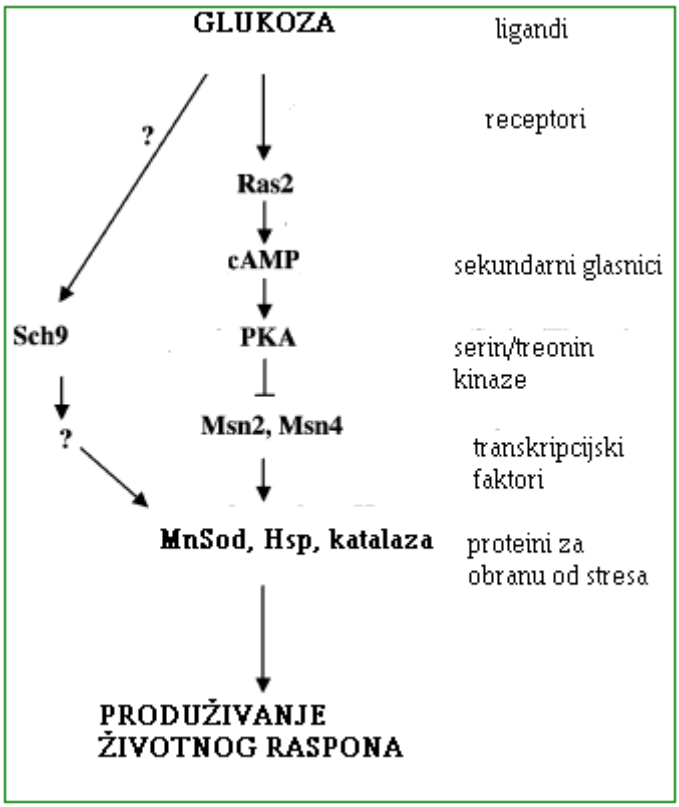
proteina. Signalni put TOR je identificiran kao važan medijator i u replikacijskom i kronološkom starenju. U nedostatku aktivnosti ovog puta produžuje se i replikativni i kronološki životni vijek. Proteini TOR-a su evolucijski očuvani, budući da im je slična uloga i u nematodama i mušici. Kod kvasca TOR djeluje zajedno s protein kinazom A (PKA) i Sch9 u koordinaciji staničnog odgovora na promjene glukoze i ostalih nutrijenata (Fabrizio i sur. 2003.).

Jedna od uloga TOR, Sch9 i PKA je reguliranje lokalizacije transkripcijskih faktora Msn2 i Msn4, koji opet reguliraju superoksid dismutaze SOD1 i SOD2. U uvjetima stresa TOR i PKA su inhibirani, Msn 2 i Msn4 se sele iz citoplazme u jezgru što pojačava otpornost na stres i temperaturni šok (sl 3). Također, inhibicijom PKA i TOR signalnih puteva dolazi do prestanka rasta i stanice ulaze u G_0 fazu. Nasuprot djelovanju TOR-a i PKA, Sch9 regulira SOD1 i SOD2, neovisno o Msn2 i Msn4 (Fabrizio i sur. 2003.).

Iako nije demonstrirano da je aktivacija Msn2 i 4 dovoljna za produžetak CLS, indirektni dokazi upućuju da su odlučujući u produžetku CLS u uvjetima delecije TOR-a. Prekomjernom ekspresijom SOD1 i SOD2 dokazano je da mogu utjecati na produživanje CLS (Fabrizio i sur. 2003.).

S druge strane, dokazano je da inhibicijom PKA i kalorijskom restrikcijom, koja inaktivira TOR, dolazi do produživanja RLS. Međutim, u tome ne sudjeluju Msn2 i Msn4. Predloženo je da, budući da su senzori nutritivnih uvjeta, nedostatak glukoze preko PKA i TOR uzrokuje diauksični prelaz, pojačava respiraciju, to aktivira Sir2 i dolazi do produživanja RLS (Fabrizio i sur. 2003.).

Prekomjrnom ekspresijom Sod1 i Sod2 CLS je povećan 30%, a delecijom u glukoza-signalnim putovima CLS povećanje je znatno veće, što sugerira na dodatne mehanizme produživanja CLS, neovisno o Sod (Fabrizio i sur. 2003.).



Slika 3. predložena shema utjecaja glukoze na životni raspon kvasca; u prisutnosti glukoze, nizom kaskadnih reakcija proteini Msn2 i Msn4 se inhibiraju. U mediju bez glukoze, oni se aktiviraju i pozitivno reguliraju niz

faktora potrebnih za obranu od stresa. Isti proteini reguliraju se i preko Sch9 nezavisno od Msn2 i Msn4; prilagođeno prema Fabrizio i sur. 2003.

Signalne molekule TOR Sch9 i PKA reguliraju translaciju proteina s obzirom na okolišne uvjete. PKA potiče transkripciju ribosomskih proteina i proteina za procesiranje rRNA. Pod uvjetima kalorijske restrikcije ili drukčije inhibicije npr. inhibicije TOR rapamicinom, dramatično se smanjuje transkripcija ribosomskih proteina i translacija općenito, a to se navodi, između ostalog, kao moguć razlog odgode starenja. Također i kod nematoda i mušica utvrđeno je da smanjenje proizvodnje proteina na ribosomima produžuje životni vijek (Henderson i sur. 2008.).

U periodima dostupnosti nutrijenata, TOR kinaza je aktivirana što potiče prijelaz G1 faze staničnog ciklusa u S fazu, inicijaciji translacije, povećanom stvaranju ribosoma i supresiji autofagije i odgovora na stres. Ograničeni nutritivni uvjeti inhibiraju TOR, pa se s obzirom na navedene funkcije, kao mehanizam starenja predlaže i autofagija. To je odgovor na izgladnjivanje u kojem se stanične makromolekule recikliraju u lizosomima. U normalnim uvjetima TOR ju inhibira. Pokazano je da je u *C. elegans* povećanje autofagije potrebno za maksimalno povećanje životnog vijeka. Iako nema direktnog dokaza, autofagija bi mogla biti bitna za povećanje životnog vijeka kvasca, pogotovo CLS. Pokazano je da kvasci s delecijom gena za proteine autofagije kraće žive. Autofagija bi mogla imati više različitih povoljnih efekata na stanice, uključujući degradaciju oksidativno oštećenih proteina, inhibiciju agregacije proteina, recikliranje oštećenih mitohondrija. Trebalo bi ispitati da li autofagija povećava i replikativni i kronološki životni vijek i je li uvjetovana samo kalorijskom restrikcijom ili nužno inhibicijom TOR (Kaeberlain i sur. 2007.).

Uz sve nadedene poveznice TOR i starenja, inhibicija TOR može pokrenuti retrogradni odgovor. To je pojava karakteristična za stanice s oštećenim mitohondrijima. Pojedine komponente mitohondrija djeluju kao transkripcijski faktori za neke jezgrine proteine koji pružaju alternativu mitohondrijskom metabolizmu. Taj proces u konačnici vodi produženju životnog raspona (Kaeberlain i sur. 2007.).

Opažanje da TOR, Sch9 i PKA mogu različito djelovati na RLS i CLS u kvascu je značajno, jer je dokazano da kalorijska restrikcija usporava različite dobno-povezane bolesti u tkivima viših životinja. Primjerice, miševi su u restriktivnim uvjetima pokazali otpornost na karcinogenezu i smanjen razvoj dobno povezanih patoloških promjena mozga, jetre, srca, mišića i drugih tkiva. Konkretno, u neuronima je za duži život stanica važno degradiranje agregiranih proteina, što je posljedica autofagije i TOR inhibicije. U fibroblastima je zaslužna povećana otpornost na stres i prikladna modulacija funkcije ribosoma. S obzirom na to, u daljnjim istraživanjima bilo bi dobro precizirati efekte inhibicije TOR signalnog puta i njihovu zaslugu u produživanju životnog raspona u restriktivnim uvjetima (Laun i sur. 2007.).

Zaključak

Protein Sir2 najaktualniji je čimbenik procesa starenja. Istraživačima je posebno zanimljiv jer ima utjecaj i u replikativnom i kronološkom starenju kvasca; potencijalna je poveznica metaboličke uloge i uloge genske stabilnosti u procesu starenja; Zadnje i možda najbitnije, evolucijski je očuvan u svim proučavanim modelima. Međutim, prilikom uspoređivanja proteinskih homologa u različitim filogenetskim skupinama treba biti oprezan zbog različitog ustrojstva različitih skupina, kako na staničnoj tako i na razini čitavog organizma. Primjerice, različita su stajališta znanstvenika u pogledu dugoročnog preživljavanja stanica u uvjetima kalorijske restrikcije; jedna strana smatra kako na temelju ERC posredovane smrti replikativno starih stanica, populacija žrtvuje stare jedinke da bi osigurala dovoljno nutrijenata za preživljavanje najperspektivnijih ″mladih″ stanica. Takva

stajališta dozvoljavaju povlačenje paralela s apoptozom starih stanica u višestaničnim organizmima. Druga struja ističe stanicu kvasca kao zaseban organizam kojem je u svakom trenutku cilj preživjeti.

Oksidativna oštećenja proteina opće su prihvaćenčimbenik starenja, za koji je proveden niz istraživanja na kvascu. Proteinski agregati dokazani su u svim proučavanim organizmima, a kod nekih je zabilježeno da njihova asimetrična raspodjela pridonosi očuvanju ″mladosti″ novih stanica (*E. coli, D. melanogaster*). Međutim, postoji niz mogućih oksidativnih oštećenja koja još nisu istražena, npr. druga oštećenja proteina osim karbonilacije; oštećenja neproteinskih molekula; disfunkcionalne membrane ili organeli; aberantne forme različitih RNA. Također, osim oksidativnog stresa, mogući su i ″prirođeni″ uzroci, kao što je nakupljanje ERC zabilježeno kod kvasca. Moguće je da je uzrok starenju kolaps stanice zbog sumarnog oštećenja proteina i ostalih molekula te remećenja njihove homeostaze. Najsigurniji zaključak iz svega je da su uzroci starenja mnogi i da ovise o datim okolišnim uvjetima i genetičkoj podlozi organizama.

Iz svega navedenog proizlazi da je kod kvasca prisutno više mehanizama odnosno faktora starenja. U većini znanstvenih izlaganja naglašava se da je otkriven tek manji dio dobno-povezanih promjena, i, posljedično, mehanizama starenja. Preciznija identifikacija dobno povezanih fenotipova potrebna je za potpuno razumijevanje procesa starenja, što čini ovo područje i dalje aktualnim u krugu znanstvenih istraživanja.

Literatura

1. Henderson K.A.**,** Gottschling D.E. : A mother's sacrifice: what is she keeping for herself?. *Curr Opin Cell Biol. 20: 723–728,* 2008.

2. Longo V.D., Kennedy B.K. : Sirtuins in Aging and Age-Related Disease. *Cell. 126: 257-68.* 2006.

3. Laun P., Bruschi C.V., Dickinson J.R., Rinnerthaler M., Heeren G., Schwimbersky R., Rid R., Breitenbach M. : Yeast mother cellspecific ageing, genetic (in)stability, and the somatic mutation theory of ageing. *Nucleic Acids Res. 35: 7514–7526.* 2007.

4. Jazwinski S.M. : Metabolic mechanisms of yeast ageing. *Exp Gerontol. 35: 671-676.* 2000.

5. Kaeberlein M., Burtner R.C., Kennedy B.K. : Recent Developments in Yeast Aging. *PloS Genet. 3(5):e84*. 2007.

6. Fabrizio P., Longo V.D. : The chronological life span of Saccharomyces cerevisiae. *Aging Cell. 2: 73–81*. 2003.

7. Sinclair D.A. : Yeast aging research: recent advances and medical relevance. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 56: 807-816*. 1999.

Sažetak

Cilj seminara bio je sustavno opisati dosadašnja znanstvena saznanja o procesima starenja kod pupajućeg kvasca, *Saccharomyces cerevisiae*. Postoji više mehanizama povezanih sa starenjem. Naglasak je stavljen na dosad najistraženiji protein Sir2 (od engl Silent Information Regulator Two proten) i njegovu ulogu u replikativnom i kronološkom starenju kvasca; Sir2 povezuje nutritivni status stanice i regulaciju sinteze proteina; reagira na omjer [NAD]/[NADH] te u uvjetima kalorijske restrikcije utišava sintezu rRNA. Uloga proteina PKA , Sch9 i TOR povezana je s regulacijom antioksidativne zaštite prilikom prijelaza na oksidativni metabolizam. Procesi starenja nisu uvjetovani jednoznačno, nego ovise o životnim uvjetima i genetičkoj podlozi. Također, još su mnoge stvari vezane uz procese starenja neistražene, a kvasac kao koristan modelni organizam na tom području pruža mnoge mogućnosti u daljnjim istraživanjima.

Summary

The main goal of the study is to systematically describe ageing process of budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. There are several mechanisms of ageing analysed up to now on yeast. Sir2 (Silent Information Regulator Two proten) is considered as the most important protein in this process. It is involved in both, replicative and chronological ageing of yeast and presents a link between the nutritional state and the regulation of the protein syntesis; it reacts to [NAD]/[NADH] ratio and supress the rRNA shyntesis during calorie restriction. On the other side, signalling pathways involving protein kinase A, TOR and Sch9 are connected with regulation of antioxidative protection during diauxic shift.

In conclusion, ageing process in yeast is not determined, but it depends on living conditions and genetic background. Many processes involved in ageing are still unknown. More careful analysis of age-associated phenotypes and related mechanisms will extend research in the field of budding yeast ageing.