

Streszczenie

Precyzyjna replikacja DNA ma kluczowe znaczenie dla zapewnienia dokładnego dziedziczenia informacji genetycznej. Mechanizm replikacji DNA jest wysoce zakonserwowany ewolucyjnie, począwszy od prostych organizmów jednokomórkowych, takich jak drożdże, po komórki ludzkie. Za postęp oraz regulację kolejnych etapów procesu replikacji DNA odpowiedzialnych jest wiele pojedynczych białek oraz kompleksów białkowych. Replikacja DNA u eukariontów rozpoczyna się od związania kompleksu ORC z miejscami początków replikacji na nici DNA. Kolejnym krokiem jest stworzenie replisomu, czyli molekularnej maszyny zdolnej do rozpoczęcia i kontynuacji replikacji DNA. Kluczowym składnikiem replisomu jest kompleks helikazy CMG (Cdc45-MCM-GINS), który rozwija dwuniciowy DNA oraz koordynuje pracę innych składników replisomu, w tym polimeraz DNA. Grupa białek replikacyjnych takich jak Cdc6, Dbf4, Sld3, Sld7, Sld2 i Mcm10 bierze udział w regulacji etapów składania replisomu. Niemal wszystkie komórki w trakcie swojego życia przechodzą ograniczoną liczbę rund replikacyjnych, co oznacza, że ich potencjał podziałowy jest także ograniczony. Po jego wyczerpaniu komórki z reguły nie umierają od razu lecz wchodzą w fazę starzenia, w której trwają aż do śmierci. Starzenie się definiujemy zatem jako postępujący spadek integralności fizjologicznej, prowadzący do upośledzenia funkcji biologicznych, w tym płodności i rosnącej podatności na śmierć. Zaburzenia replikacji DNA często prowadzą do stresu replikacyjnego i są identyfikowane jako jeden z potencjalnych czynników determinujących tempo starzenia. Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było sprawdzenie, w jaki sposób brak jednej kopii genów zaangażowanych w inicjację replikacji DNA, w heterozygotycznych komórkach *Saccharomyces cerevisiae*, wpływa na fizjologię i starzenie się komórek. Jako materiał badawczy wykorzystano szczepy drożdży pozbawione jednej kopii genów kompleksu *ORC*, określone jako *ORC/orcΔ*, szczepy pozbawione jednej kopii genów kompleksu *CMG*, określone jako *CMG/cmɡΔ* oraz szczepy posiadające tylko jedną funkcjonalną kopię genów kodujących niezbędne białka replikacyjne, takie jak Cdc6, Dbf4, Sld3, Sld7, Sld2 i Mcm10, określone jako lowPICC. Na podstawie zrealizowanych badań wykazano, że komórki posiadające tylko jedną kopię genów zaangażowanych w inicjację replikacji DNA, czyli *ORC/orcΔ*, *CMG/cmɡΔ* oraz grupa szczepów lowPICC w większości wykazywały znaczny spadek poziomu ich transkryptów mRNA, zaburzenia cyklu komórkowego i wydłużony czas podwojenia oraz cechowały się zmianami w profilu biochemicznym. Wykazano również, że obniżenie ekspresji genów zaangażowanych w inicjację replikacji znacząco wpływa na potencjał reprodukcyjny komórek, z wyjątkiem

ORC6/orc6Δ i *MCM2/mcm2Δ*. Co ciekawe w odniesieniu do mutantów *ORC/orcΔ* i *CMG/cmɡΔ* nie zaobserwowano różnic w całkowitym czasie przeżycia komórek aktywnych mitotycznie (model replikacyjnego starzenia). W przeciwieństwie do tego, heterozygoty *lowPICC* charakteryzowało skrócenie całkowitego czasu życia w tym modelu, czyli do pojawienia się fenotypu przyspieszonego starzenia. Wykazano także, że zaburzenia inicjacji replikacji DNA mają również wpływ na tempo starzenia komórek post-mitotycznych (chronologiczną długość życia) w każdym z badanych szczepów. Dodatkowo zaobserwowano korelację między poziomem RNA i polisacharydów w drożdżach, a ich potencjałem reprodukcyjnym, a także korelację między poziomem kwasów tłuszczowych, a czasem podwojenia komórek w heterozygotach *CMG/cmɡΔ*. Ponadto zmniejszona ekspresja genów *lowPICC* doprowadziła do nieprawidłowej odpowiedzi na uszkodzenie DNA oraz wpłynęła na zawartość komórkowego i mitochondrialnego DNA. Co ważne, wykazano również silnie ujemną korelację pomiędzy zawartością makrocząsteczek komórkowych (RNA, białek, lipidów, polisacharydów), a procesem starzenia w tej grupie. Zaprezentowane w ramach rozprawy doktorskiej dane rzucają również nowe światło na potencjalną użyteczność drożdży w badaniu możliwych celów terapeutycznych w leczeniu raka.