

Poznań, styczeń 2019



Opis osiągnięć i dorobku naukowego

Dr Nina Antos-Krzemińska

Zakład Bioenergetyki, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

1. Imię i nazwisko: Nina Antos-Krzemińska

Dane kontaktowe:

Zakład Bioenergetyki, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza (UAM) w Poznaniu

ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań

tel. 618295901, e-mail: ninax@amu.edu.pl

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:

magister biologii – 1997, Wydział Biologii UAM Poznań

doktor nauk biologicznych, specjalność biochemia – 2003, Wydział Biologii UAM Poznań,
tytuł rozprawy doktorskiej: „Nadekspresja składników kompleksu TOM w szczepie drożdży
Saccharomyces cerevisiae pozbawionym kanału VDAC”, promotor: prof. dr hab. Lilla
Hryniewiecka

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

1. 01.10.1997 - 29.05.2003 - studia doktoranckie w Zakładzie Bioenergetyki na Wydziale Biologii UAM w Poznaniu
2. od 10.2003 do chwili obecnej - adiunkt w Zakładzie Bioenergetyki na Wydziale Biologii UAM w Poznaniu

4. a) Temat osiągnięcia naukowego:

Charakterystyka funkcjonalna i molekularna systemów rozpraszających energię w mitochondriach wybranych eukariontów.

4. b) Publikacje naukowe wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. Słocińska M., Antos-Krzemińska N., Rosiński G., Jarmuszkiewicz W. (2011) Identification and characterization of uncoupling protein 4 in fat body and muscle mitochondria from the

- cockroach *Gromphadorina coquereliana*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 43(6):717-27, **IF** (zgodnie z rokiem opublikowania) **2,813**, punkty MNiSW **25**
2. Słocińska M. *, **Antos-Krzemińska N. ***, Rosiński G., Jarmuszkiewicz W. (2012) Molecular identification and functional characterization of uncoupling protein 4 in larva and pupa fat body mitochondria from the beetle *Zophobas atratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 162(4):126-33, **IF 2,069**, punkty MNiSW **30**
 3. Słocińska M. *, **Antos-Krzemińska N. ***, Gołębiowski M., Kuczer M., Stepnowski P., Rosiński G., Jarmuszkiewicz W. (2013) UCP4 expression changes in larval and pupal fat bodies of the beetle *Zophobas atratus* under adipokinetic hormone treatment. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 166(1):52-9, **IF 2,371**, punkty MNiSW **30**
 4. **Antos-Krzemińska N.**, Jarmuszkiewicz W. (2014) Functional expression of the *Acanthamoeba castellanii* alternative oxidase in *Escherichia coli*; regulation of the activity and evidence for *Acox* gene function. *Biochemistry and Cell Biology* 92(3):235-241, **IF 2,152**, punkty MNiSW **20**
 5. **Antos-Krzemińska N.**, Jarmuszkiewicz W. (2014) External NAD(P)H dehydrogenases in *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. *Protist* 165(5):580-593, **IF 3,045**, punkty MNiSW **35**
 6. **Antos-Krzemińska N.**, Jarmuszkiewicz W. (2018) Alternative type II NAD(P)H dehydrogenases in the mitochondria of protists and fungi. Review. *Protist* 170(1):21-37, **IF 2,7**, punkty MNiSW **35**
4. c) **Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

Moje zainteresowanie mitochondriami było przyczyną podjęcia przeze mnie studiów doktoranckich w Zakładzie Bioenergetyki Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM w 1997 roku. Mój projekt doktorski dotyczył udziału mitochondrialnego kanału kompleksu translokazy błony zewnętrznej (kompleks TOM) w transporcie metabolitów. W 2003 roku, po obronie rozprawy doktorskiej, rozpoczęłam pracę w zespole badawczym prof. dr hab. Wiesławy Jarmuszkiewicz. Zajęłam się wówczas innym zagadnieniem dotyczącym mitochondriów, a mianowicie mitochondrialnymi systemami rozpraszającymi energię protonowego gradientu elektrochemicznego.

Mitochondrialne systemy rozpraszające energię

Mitochondria eukariontów są miejscem przebiegu różnych procesów metabolicznych, które zapewniają komórce homeostazę energetyczną i w konsekwencji przeżycie. Mitochondria kontrolują zarówno zachowanie energii, jak i rozpraszanie energii tak, aby zapewnić właściwe warunki do funkcjonowania komórki. W klasycznym (ssaczym) łańcuchu oddechowym znajdują się cztery kompleksy białkowe, umożliwiające transport elektronów do tlenu. Spośród nich, trzy działają jak pompy protonowe, generujące gradient elektrochemiczny, dzięki któremu, zgodnie z teorią chemiosmotyczną Mitchella, możliwa jest synteza ATP zachodząca w wyniku fosforylacji oksydacyjnej. Sprzężenie transportu elektronów z syntezą ATP wymaga ścisłej kontroli przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej dla jonów, przede wszystkim protonów. Przeciek protonów prowadzi do obniżenia elektrochemicznego gradientu protonów, i w konsekwencji do obniżenia wydajności syntezy ATP. Proces rozpraszania energii w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym prowadzi do obniżenia nadmiernej redukcji komponentów łańcucha, zapewnia więc homeostazę energetyczną mitochondriów. Niskie zapotrzebowanie energetyczne przy wysokiej podaży substratów skutkuje bowiem wysoką produkcją reaktywnych form tlenu (RFT), a w konsekwencji zniszczeniem komórki. Rozpraszanie energii w mitochondriach jest możliwe dzięki działaniu białek rozprężających, kanałów potasowych, alternatywnej oksydazy oraz alternatywnych dehydrogenaz NAD(P)H. Obecność systemów rozpraszania energii z całą pewnością zwiększa plastykę mitochondriów i możliwości adaptacyjne komórek w odpowiedzi na stresy środowiskowe (Antos-Krzemińska i Jarmuszkiewicz 2018).

Białka rozprężające (UCP, uncoupling proteins)

Białka rozprężające należą do rodziny mitochondrialnych nośników anionowych (MACP, *mitochondrial anion carrier proteins family*). Uznaje się, że uczestniczą one w rozpraszaniu energii w mitochondriach poprzez transport protonów z przestrzeni międzybłonowej do macierzy mitochondrialnej. Transport ten jest indukowany wolnymi kwasami tłuszczowymi lub produktami peroksydacji lipidów i hamowany przez nukleotydy purynowe (Cannon i in. 2006). Pierwsze białko rozprężające (termogenina, obecnie UCP1) zostało odkryte w brunatnej tkance tłuszczowej noworodków i ssaków hibernujących (Nicholls i Locke 1984). Udowodniono, że jest ono odpowiedzialne za generowanie ciepła w procesie adaptacyjnej termogenezy bezdrzeniowej. Co ciekawe, następne lata doprowadziły do odkrycia homologów tego białka w różnych tkankach ssaków (izoformy UCP2-5) oraz u innych organizmów, takich jak rośliny i grzyby. Stało się to punktem zwrotnym w

postrzeganiu roli tych białek. Chociaż wydaje się, że niektóre białka UCP u roślin mogą pełnić funkcje termogenne związane z przywabianiem owadów, czy też procesem dojrzewania owoców, a więc z roślinną reprodukcją, to nie ma dowodów na udział tych białek w termogenezie u innych organizmów. Historia staje się tym bardziej skomplikowana, że homologi UCP zaczęto opisywać na podstawie badań funkcjonalnych u organizmów jednokomórkowych, wśród których pierwsza była ameba *Acanthamoeba castellanii*. Koncepcja, że mikroorganizmy eukariotyczne mogą używać białka UCP do utrzymania termicznego gradientu pomiędzy cytozolem a środowiskiem zewnętrznym wydaje się być mało wiarygodna, ze względu na wielkość organizmów jednokomórkowych. Chociaż, co interesujące, pokazano, że stres chłodu powoduje znaczący wzrost ilości i aktywności UCP w mitochondriach ameby. Obecnie przyjmuje się, że większość UCP jest indukowana stresem i ich prawdopodobną funkcją fizjologiczną jest obniżenie nadmiernej produkcji RFT.

Alternatywna oksydaza (AOX) i alternatywne dehydrogenazy NAD(P)H (NDH2)

W przeciwieństwie do ssaczego typu łańcucha oddechowego, mitochondria roślin, grzybów i pierwotniaków zawierają dodatkowe komponenty białkowe tworzące rozgałęzienia w łańcuchu oddechowym. Do tych dodatkowych komponentów zalicza się niewrażliwą na cyjanek oksydazę alternatywną (AOX) oraz niewrażliwe na rotenon alternatywne dehydrogenazy NAD(P)H (inaczej dehydrogenazy NAD(P)H typu II, NDH2), które to razem z białkami UCP należą do mitochondrialnych systemów rozpraszających energię. Odporna na cyjanek i wrażliwa na kwas benzohydroksamowy (BHAM) alternatywna oksydaza jest dobrze opisana w mitochondriach roślin, grzybów i pierwotniaków (Roberts i in. 2004; Suzuki i in. 2004; Moore i Albury 2008; Vanlerberghe 2013), aczkolwiek ostatnie doniesienia sugerują obecność AOX również w mitochondriach bezkręgowców (Andjelković i in. 2015; Robertson i in. 2016; McDonald i Gospodaryov 2018). Szlak alternatywny w mitochondriach jest odgałęzieniem od klasycznej drogi transportu elektronów w łańcuchu oddechowym na poziomie ubichinonu i nie jest sprzężony z syntezą ATP, czego efektem jest pośrednie rozpraszanie energii. AOX jest integralnym białkiem błonowym (32-36 kDa) kodowanym przez genom jądrowy i zlokalizowanym od strony macierzy wewnętrznej błony mitochondrialnej, które przeprowadza reakcję redukcji tlenu do wody. Alternatywne dehydrogenazy NAD(P)H przeprowadzają niewrażliwe na rotenon utlenianie cytozolowego lub macierzowego NAD(P)H, przenosząc elektrony na ubichinon. W związku z tym, że stanowią m.in. drogę obejścia kompleksu I, w sposób pośredni powodują zmniejszenie gradientu elektrochemicznego. Te małe białka, o wielkości 50-60 kDa, są przytwierdzone do

wewnętrznej błony mitochondrialnej przez koniec C białka i są skierowane albo w stronę macierzy mitochondrialnej (wewnętrzne dehydrogenazy NAD(P)H), albo w stronę przestrzeni międzybłonowej (zewnętrzne dehydrogenazy NAD(P)H) (Kerscher 2000; Melo i in. 2004; Rasmusson i in. 2004). Sekwencje aminokwasowe tych białek zawierają dwa dobrze zakonserwowane motywy: jeden dla wiązania kofaktora FAD lub FMN, a drugi dla wiązania NAD(P)H. Niektóre sekwencje roślinnych zewnętrznych NDH2 zawierają insercję z mniej lub bardziej zdegenerowanym motywem dłoni EF, charakterystyczną dla wiązania jonów Ca^{+2} (Møller i in. 1981; Rasmusson i in. 2004). Działanie, regulacja i rola NDH2 u roślin została bardzo dobrze opisana (Hao i Rasmusson 2016). Jednak jak dotąd niewiele wiemy o funkcji tych białek w mitochondriach pierwotniaków. W genomach *Plasmodium falciparum* i *Plasmodium yoelli*, pierwotniaków wywołujących malarię, stwierdzono obecność genów wykazujących homologię do sekwencji kodujących te enzymy (Uyemura i in. 2004). W mitochondriach *P. falciparum* została także opisana niewrażliwa na rotenon alternatywna dehydrogenaza NADH, która pełni tam rolę kluczową dla funkcjonowania, zredukowanego u tego organizmu, łańcucha oddechowego (Fisher i in. 2007). U *Trypanosoma brucei* alternatywnym dehydrogenazom NADH przypisuje się rolę podtrzymywania funkcji łańcucha oddechowego w warunkach szybkiego wzrostu formy procyklicznej pasożytującego pierwotniaka, gdy aktywność kompleksu I jest ograniczeniem dla aktywności łańcucha (Fang i Beattie 2003a). Zainteresowanie tymi enzymami wiąże się z potencjalnym wykorzystaniem ich jako celu terapeutycznego przy zakażeniach pierwotniakami.

NDH2 oraz AOX rozpraszają gradient elektrochemiczny nie w sposób bezpośredni jak białka UCP, lecz poprzez włączanie się do transportu elektronów, powodując w ten sposób omijanie kompleksów białkowych pompujących protony do przestrzeni międzybłonowej. Zatem modulują efektywność zachowania energii w postaci cząsteczki ATP. Wszystkie te systemy działają prawdopodobnie jako wentyle bezpieczeństwa w mitochondriach, ograniczając możliwość nadmiernej produkcji RFT i dostosowując energetykę mitochondriów do warunków, w których znajduje się komórka. Niektóre doniesienia potwierdzają tę hipotezę, jako, że alternatywne szlaki mogą plastycznie ulegać zmianom na poziomie molekularnym w odpowiedzi na różne czynniki środowiskowe. Pokazano m.in., że roślinne geny kodujące NDH2 oraz AOX wykazują skoordynowaną ekspresję w odpowiedzi na czynniki stresowe, co może być wynikiem zarządzania ekspresją przez wspólne elementy regulatorowe (Clifton i in. 2005; Ho i in. 2007; Rasmusson i in. 2009). Są jednakże również przeciwstawne doniesienia wskazujące na udział NDH2 u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i świdrowca *T. brucei* w tworzeniu RFT (Fang i Beattie 2002; 2003b), co mogłoby kierować

ostatecznie komórkę na drogę programowanej śmierci. Interesujący jest przy tym fakt znalezienia homologii NDH2 z ludzkim białkiem z rodziny białek indukujących apoptozę (AIF, *apoptosis inducing factor*) (Goncalves i Videira 2015; Marreiros i in. 2016).

Pomimo dużej ilości informacji pochodzącej z sekwencjonowania genomów poszczególnych organizmów, nadal niewiele wiadomo na temat, czy gen teoretycznie kodujący dane białko, w rzeczywistości ma swój funkcjonalny odpowiednik białkowy. Dlatego identyfikacji genu powinien towarzyszyć opis funkcjonalny kodowanego białka. W związku z tym w swoich badaniach jako bardzo istotny punkt przyjął nie tylko funkcjonalną, lecz także molekularną charakterystykę mitochondrialnych systemów rozpraszających energię.

Białka rozprzegające (UCP) w mitochondriach owadów: identyfikacja molekularna i funkcjonalna (Słocińska, Antos-Krzemińska i in. 2011, Słocińska*, Antos-Krzemińska* i in. 2012, Słocińska*, Antos-Krzemińska* i in. 2013)

Badania dotyczące białek UCP u owadów prowadziłam w ramach projektu MNiSW "Identyfikacja oraz charakterystyka funkcjonalna i molekularna białek rozprzegających (UCP) w mitochondriach owadów na przykładzie karaczana *Gromphadorina coquereliana* i chrząszcza *Zophobas atratus*", który przygotowałam we współpracy z dr (obecnie dr hab.) Małgorzatą Słocińską z Zakładu Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt UAM. Ze względu na doświadczenie nabyte w czasie wykonywania pracy doktorskiej, moja rola w projekcie polegała na działaniach mających na celu przede wszystkim charakterystykę molekularną tych białek. Wspomniany projekt dotyczył stwierdzenia obecności i opisu funkcji białek UCP u owadów, karaczana madagaskarskiego *G. coquereliana* i chrząszcza *Z. atratus*. W momencie rozpoczęcia projektu wiedza dotycząca białek UCP u bezkręgowców, w tym u najliczniejszej spośród nich grupy owadów, była mocno ograniczona. Decydując się na taki obiekt badań założyliśmy, że uzyskane wyniki będą ważnym elementem zrozumienia znaczenia tych białek dla funkcjonowania mitochondriów eukariontów, w tym zachowania przez te białka podstawowych uniwersalnych właściwości, jak i pojawiania się u nich cech charakterystycznych dla danej grupy organizmów. W momencie rozpoczęcia badań, na podstawie danych genomowych i specyficznych sekwencji aminokwasowych, zwanych sygnaturami UCP, jedyne owadzie UCP (izoformy UCP4 i UCP5) zidentyfikowano wówczas tylko u muszki owocowej *Drosophila melanogaster*. DmUCP5 scharakteryzowano funkcjonalnie w układzie heterologicznym, w mitochondriach komórek drożdży *S. cerevisiae*,

do których wprowadzono plazmid zawierający odpowiednią sekwencję kodującą (Fridell i in. 2004). Z kolei, badania prowadzone nad muszkami pozbawionymi genu kodującego DmUCP5 wskazały, że białko to może być zaangażowane w regulację metabolizmu, a nawet w proces starzenia się organizmu (Sanchez-Blanco i in. 2006). Identyfikacja białek UCP u karaczana i chrząszcza oraz molekularnego podłoża regulacji ich aktywności wydawała się szczególnie ciekawa ze względu na odmienny fizjologicznie charakter tkanek, które służyły jako materiał badawczy (mięśnie i ciało tłuszczowe).

Karaczan madagaskarski *G. coquereliana* jest dużym owadem hemimetabolicznym (o przeobrażeniu niezupełnym). Był on wygodnym modelem badawczym ze względu na wielkość i w związku z tym łatwość pozyskania tkanki mięśniowej oraz ciała tłuszczowego. Rola ciała tłuszczowego jest niezwykle interesująca, nie ogranicza się bowiem tylko do przechowywania zasobów energetycznych w postaci tłuszczu, białek i glikogenu. Ciało tłuszczowe jest także organem, w którym zachodzi wiele procesów metabolicznych. Niekiedy jego funkcje porównuje się z wątrobą kręgowców. Rezerwy tłuszczów i węglowodanów uwalniane są pod wpływem hormonu adypokinetycznego (AKH), funkcjonalnie odpowiadającemu glukagonowi ssaków. U owadów, uwolnione z ciała tłuszczowego przez AKH trehaloza i diacyloglicerole transportowane są przez hemolimfę do kurczących się mięśni, charakteryzujących się wysokim metabolizmem energetycznym, lub do innych tkanek obwodowych, w których wzrasta zapotrzebowanie energetyczne (Lorenz i Gäde 2009).

Badania przeprowadzone na mitochondriach izolowanych z ciała tłuszczowego oraz mięśni karaczana *G. coquereliana* wykazały po raz pierwszy obecność funkcjonalnego GcUCP (Słocińska, Antos-Krzemińska i in. 2011). Białko to wykazuje cechy podobne do białek UCP innych organizmów, jest aktywowane przez wolne kwasy tłuszczowe i hamowane przez nukleotydy purynowe, co wskazuje na to iż białka UCP owadów zachowały konserwatywny mechanizm regulacyjny, charakterystyczny dla innych organizmów (Jarmuszkiewicz i in. 2010). W spoczynkowym (niefosforylującym) stanie oddechowym podanie mikromolarnych stężeń kwasu palmitynowego (PA) powoduje wzrost szybkości oddychania i spadek potencjału błonowego mitochondriów. Efekt ten jest częściowo znoszony przez GTP, inhibitor UCP. W fosforylującym stanie oddechowym (po dodaniu ADP), PA wywołuje obniżenie stosunku ADP/O i kontroli oddechowej, będących wskaźnikami wydajności fosforylacji oksydacyjnej. Badania funkcjonalne wykazały, że aktywność rozprzegająca GcUCP w mitochondriach mięśni jest większa niż w mitochondriach ciała tłuszczowego karaczana.

Identyfikacja immunologiczna białka, którego obecność udowodniliśmy funkcjonalnie, była niezbędna do potwierdzenia obecności tego białka w mitochondriach karaczana. W związku z brakiem danych genomowych, przeprowadziłam immunodetekcję z wykorzystaniem różnych przeciwciał skierowanych przeciwko izoformom ludzkich białek UCP, w szczególności UCP4 i UCP5, jako, że te izoformy zostały zidentyfikowane u *D. melanogaster*. **Opracowałam metodę wysalania mitochondrialnych białek błonowych karaczana, co pozwoliło na znormalizowanie metody immunodetekcji UCP i uzyskanie wyników bez reaktywności krzyżowej z innymi białkami mitochondrialnymi. Przeprowadzone przeze mnie ilościowe analizy immunologiczne z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko ludzkiej izoformie UCP4 wykazały, że poziom GcUCP w mitochondriach mięśni karaczana jest znacznie wyższy niż w mitochondriach ciała tłuszczowego.** Wyniki te wskazują na istotną rolę białek UCP w fizjologii mięśni karaczana. Obecność GcUCP w mitochondriach ciała tłuszczowego i mięśni karaczana potwierdziliśmy także stosując technikę mikroskopii fluorescencyjnej, przy użyciu sondy Mito Tracker CMXRos (Słocińska, Antos-Krzemińska i in. 2011).

Elektroforeza białek mitochondrialnych karaczana połączona z immunodetekcją pozwoliła na charakterystykę molekularną białka GcUCP przy zastosowaniu techniki spektrometrii mas (LC-MS/MS) i porównanie sekwencji aminokwasowej otrzymanych peptydów ze znanymi izoformami białek UCP. **Dzięki temu porównaniu wykazałam, że występująca w ciele tłuszczowym i mięśniach tego owada izoforma UCP wykazuje duże podobieństwo do izoformy UCP4 człowieka i szczura oraz *D. melanogaster* (Słocińska, Antos-Krzemińska i in., 2011).** Zidentyfikowane peptydy pozwoliły na złożenie niepełnej sekwencji aminokwasowej białka, w której stwierdziłam możliwość tworzenia całkowicie lub częściowo konserwatywnych domen, charakterystycznych dla rodziny nośników mitochondrialnych MACP i typowych sygnatur UCP. Duża homologia GcUCP do izoformy UCP4 ssaków pozwala przypuszczać, że jest to ewolucyjnie stare białko, które mogło ewoluować z białka typowego dla tkanek peryferycznych do białka specyficznego dla tkanki nerwowej u ssaków (Hanak i Jeżek, 2001). **Aby podkreślić tę homologię białko to nazwaliśmy GcUPC4.**

Analizowaliśmy także wpływ aktywności GcUCP4 na poziom RFT (Słocińska, Antos-Krzemińska i in. 2011). Stymulowana przez PA aktywność GcUCP4 powodowała obniżenie poziomu anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) w mitochondriach izolowanych z ciała tłuszczowego i mięśni karaczana. Hamowanie aktywności GcUCP4 przez GTP powodowało wzrost poziomu anionorodnika w mitochondriach ciała tłuszczowego, natomiast, co ciekawe,

nie wpływało na poziom O_2^* w mitochondriach mięśni. Różnica ta najprawdopodobniej wynika z różnic w redukcji mitochondrialnego koenzymu Q w mitochondriach obydwu typów tkanek. Ograniczenie produkcji RFT przez UCP obserwowano już wcześniej u różnych organizmów. **Wyniki naszych badań potwierdziły więc antyoksydacyjną funkcję UCP również w mitochondriach owadów.**

Badania Fridella i in. (2004) nad *D. melanogaster* wskazywały na zmiany ekspresji DmUCP5 w zależności od stadium rozwojowego muszki. Dlatego też podjęliśmy badania dotyczące identyfikacji oraz określenia ilości UCP na poziomie mRNA oraz białka w różnych stadiach rozwojowych innego owada. W tym celu wybraliśmy chrząszcza *Z. atratus*, który przechodzi przeobrażenie zupełne, i dlatego mógł służyć jako model do określenia funkcji UCP w mitochondriach przekształcającego się w procesie przeobrażenia ciała tłuszczowego. Badania przeprowadzono na ciele tłuszczowym larw i poczwerek, gdyż tkanka ta jest miejscem różnicowania się i reorganizacji nowych tkanek w procesie przeobrażenia się owada (Arrese i Soulages 2010). Ciało tłuszczowe w stadium larwy i poczwarki niemal całkowicie wypełnia jamę ciała chrząszcza, natomiast u postaci dorosłej występuje jedynie w formie szczątkowej. Dlatego też charakterystyka funkcjonalna UCP *Z. atratus* w izolowanych mitochondriach oraz analiza poziomu białka i mRNA wykonane zostały dla ciała tłuszczowego jedynie larwy i poczwarki (Słocińska*, Antos-Krzemińska* i in. 2012).

Genom *Z. atratus* nie został do tego momentu zsekwencjonowany, co uczyniło identyfikację molekularną UCP tego owada o wiele trudniejszą. Ze względu na brak danych genomowych, zaprojektowałam startery konsensusowe (zgodne) na podstawie porównania sekwencji kodujących UCP4A *D. melanogaster* i UCP *Tribolium castaneum*, który podobnie jak *Z. atratus* należy do rodziny *Tenebrionidae*. Z ciał tłuszczowych larwy i poczwarki wyizolowałam całkowite RNA, przeprowadziłam reakcje odwrotnej transkrypcji i na matrycy cDNA przeprowadzałam reakcje PCR przy użyciu ww. starterów. Otrzymałam fragment cDNA o spodziewanej długości 370 par zasad. Przeprowadziłam klonowanie tego fragmentu do plazmidu i po sekwencjonowaniu **uzyskałam częściową sekwencję kodującą ZaUCP.**

Sekwencja ta została przeze mnie porównana na poziomie nukleotydowym do innych sekwencji kodujących białko rozpręgające u owadów oraz izoformy UCP4 szczura i człowieka. **Na podstawie przeprowadzonej przeze mnie analizy można było stwierdzić, że częściowa sekwencja kodująca ZaUCP wykazuje duże podobieństwo do znanych sekwencji kodujących białko UCP4 owadów (Słocińska*, Antos-Krzemińska* i in., 2012).** Wykonałam również porównanie przepisanej na sekwencję aminokwasową sekwencji nukleotydowej *Zaucp* ze znanymi lub przewidywanymi na podstawie sekwencji

nukleotydowej izoformami białka UCP4. Dzięki tej analizie **wykazałam, że sekwencja aminokwasowa ZaUCP wykazuje bardzo duże podobieństwo do znanych UCP4 innych owadów oraz ssaków**. Największą homologię stwierdziłam dla UCP4 z *T. castaneum* (~83%). W otrzymanej częściowej sekwencji aminokwasowej, stanowiącej ~33% ZaUCP **pokazałam także obecność domen konserwatywnych dla rodziny nośników mitochondrialnych i sygnatur charakterystycznych tylko dla białek UCP**.

Testy bioenergetyczne mitochondriów izolowanych z ciała tłuszczowego larw i poczwerek chrząszcza *Z. atratus* wykazały obecność funkcjonalnego białka ZaUCP4 w obu badanych stadiach rozwojowych, zarówno w stanie oddechowym spoczynkowym (niefosforylującym) jak i w stanie oddechowym fosforylującym (Słocińska*, Antos-Krzemińska* i in. 2012). Aktywacja ZaUCP4 przez kwas palmitynowy istotnie obniżała wydajność fosforylacji oksydacyjnej. Stymulacja aktywności białka przez wolne kwasy tłuszczowe i hamowanie przez GTP wskazują, że mechanizm regulujący aktywność UCP owadów jest ewolucyjnie zakonserwowany. W obu stanach oddechowych w mitochondriach izolowanych z ciała tłuszczowego chrząszcza, aktywność ZaUCP4 była niższa dla poczwarki niż dla larwy.

Dzięki uzyskaniu przeze mnie fragmentu sekwencji kodującej ZaUCP4 możliwe było zbadanie ekspresji genu *Zaucp4* w stadium rozwojowym larwy i poczwarki chrząszcza. **Wykonane przeze mnie badanie PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR) oraz detekcja immunologiczna (z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko ludzkiemu UCP4) korespondowały z badaniami funkcjonalnymi**. Znacznie niższa ekspresja ZaUCP4 na poziomie mRNA (~43%) i białka (~57%) w ciele tłuszczowym poczwarki w porównaniu do larwy **wskazuje na istotny udział ZaUCP4 w procesie intensywnego wzrostu i zwiększonego metabolizmu w stadium larwy, których skutkiem może być stres oksydacyjny**.

Aktywność i poziom UCP u ssaków są regulowane między innymi przez hormony, np. hormon tarczycy - trójiodotyroninę, czy hormon trzustki - insulinę (Ricquier i Bouillaud 2000). Regulacja hormonalna poziomu UCP owadów nie została wcześniej opisana, natomiast wiadomo było, że jednym z ważniejszych hormonów odpowiedzialnych za regulację zasobów energetycznych w ciele owada jest hormon adypokinetyczny (AKH). AKH jest syntetyzowany i magazynowany w komórkach neuroendokrynowych *corpora cardiaca*, które są ekwiwalentem przysadki mózgowej u ssaków (van der Horst 2001). Podczas aktywności owadów związanych ze zwiększonymi nakładami energii, takimi jak, lot, składanie jaj czy przeobrażenie, AKH jest uwalniany z *corpora cardiaca* w celu mobilizacji

rezerw energetycznych w ciele tłuszczowym, czego skutkiem jest zwiększony poziom trehalozy i diacylogliceroli w hemolimfie. Ciało tłuszczowe jest głównym organem odpowiedzialnym za metabolizm owadów. Podczas rozwoju owada, ciało tłuszczowe podlega nieustannej przebudowie, a proces ten jest ściśle regulowany. Zarówno neurohormon AKH jak i białka UCP znacząco wpływają na metabolizm komórkowy i homeostazę energetyczną. Dlatego też postanowiliśmy sprawdzić wpływ AKH na ekspresję genu kodującego ZaUCP4 i na aktywność tego białka w ciele tłuszczowym chrząszcza *Z. atratus* w stadium larwy i poczwarki, z uwzględnieniem towarzyszących temu zmian w metabolizmie węglowodanowym i lipidowym (Słocińska*, Antos-Krzemińska* i in. 2013). Larwom i poczwarkom podawano Tenmo-AKH, bioanalog AKH, zidentyfikowany w gruczołach neuroendokrynowych dorosłych chrząszczy *Z. atratus* (Gäde i Rosiński 1990), po czym po upływie 24 oraz 48 godzin analizowano zawartość lipidów i węglowodanów w ciele tłuszczowym chrząszcza, a obserwowane zmiany korelowano z aktywnością i poziomem ZaUCP4 w mitochondriach.

Przeprowadzone badania pokazują, że u larw traktowanych AKH następowała mobilizacja rezerw węglowodanowych widoczna jako spadek zawartości glikogenu w ciele tłuszczowym i wzrost trehalozy w hemolimfie (~30%). Towarzyszył temu wzrost poziomu wolnych kwasów tłuszczowych. **W ciele tłuszczowym poczwarek obserwowano natomiast obniżenie całkowitej puli lipidów**, z jednoczesnym spadkiem zawartości wolnych kwasów tłuszczowych. Otrzymane wyniki wskazały wyraźnie na odmienne działanie AKH w metabolizmie ciała tłuszczowego larw i poczwarek. Wydaje się, że AKH pełni nie tylko funkcję hormonu mobilizującego rezerwy energetyczne ale także hamuje szlaki anaboliczne, takie jak synteza lipidów w ciele tłuszczowym larw.

Modyfikacjom metabolicznym zachodzącym w ciele owada pod wpływem AKH towarzyszyły zmiany w aktywności i poziomie ZaUCP4. **Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały obniżenie o około 40% kodującego mRNA, po 24 godzinach od iniekcji neurohormonu w obydwu stadiach rozwojowych.** W stadium larwy, drugie podanie spowodowało jeszcze większy spadek poziomu mRNA (~60%), natomiast u poczwarki nie zaobserwowano obniżenia po ponownym podaniu AKH. **Spadek ilości i aktywności białka ZaUCP4 obserwowano dopiero po 48 godzinach. Obniżenie to było większe w stadium poczwarki (~60%) w porównaniu do stadium larwy (~30%).** W stadium larwy, gdzie obserwujemy intensywne tempo metabolizmu, może występować stres oksydacyjny, a co za tym idzie większa potrzeba działania systemów rozpraszających energię. Zaobserwowaliśmy już wcześniej znaczne obniżenie aktywności i poziomu ZaUCP4 w ciele

tłuszczowym poczwarki w porównaniu do stadium larwy chrząszcza (Słocińska*, Antos-Krzemińska* i in. 2012), co może odzwierciedlać spowolnienie tempa metabolizmu w stadium poczwarki. Jednakże trzeba rozważyć, że podobnie jak w innych organach owada podczas metamorfozy, również w ciele tłuszczowym, będącym organem odpowiedzialnym za magazynowanie składników odżywczych i metabolizm energetyczny, zachodzi proces przebudowy połączony z niszczeniem tkanek przez zaprogramowaną śmierć komórki i równoczesny wzrost i różnicowanie tkanek typowych dla stadium dorosłego (Liu i in. 2009). Tak więc znaczny spadek ilości ZaUCP4 w ciele tłuszczowym poczwarki chrząszcza w porównaniu ze stadium larwy, ale też mniejsza zmiana w aktywności białka po podaniu AKH mogą być związane z intensywnym różnicowaniem lub procesami dezintegracji zachodzącymi podczas transformacji. **Otrzymane wyniki sugerują, że AKH wpływa na poziom i aktywność ZaUCP4 poprzez uruchamianie wielu procesów metabolicznych, co prawdopodobnie wynika z plejotropowego działania tego hormonu (Słocińska*, Antos-Krzemińska* i in. 2013).**

Wyniki badań z tego projektu przybliżyły poznanie roli, jaką UCP mogą pełnić w organizmie owadów, po raz pierwszy uwzględniając specyficzność tkankową, zmiany zachodzące w poszczególnych stadiach rozwojowych oraz intensywność metabolizmu komórkowego różnych gatunków. Uzyskane dane pozwoliły także poszerzyć wiedzę na temat funkcji UCP w regulacji metabolizmu energetycznego ciała tłuszczowego i mięśni w energetycznie kosztownych procesach metabolicznych związanych z linieniem, metamorfozą i rozrodem. Poznanie sekwencji genów UCP badanych owadów pozwoli także ocenić pozycję zajmowaną przez UCP owadów w filogenezie molekularnej eukariontów.

Alternatywna oksydaza ameby (AcAOX): potwierdzenie funkcjonalności genu (Antos-Krzemińska i Jarmuszkiewicz 2014a)

Inną interesującą mnie kwestią, którą badałam pracując w zespole prof. dr hab. Wiesławy Jarmuszkiewicz była próba potwierdzenia funkcjonalności genu kodującego AOX u ameby. *Acanthamoeba castellanii* jest jednokomórkowym wolno żyjącym pierwotniakiem, który zyskał uwagę naukowców, jako organizm modelowy do prowadzenia badań nad funkcjonowaniem jednokomórkowych organizmów eukariotycznych. Cykl życiowy ameby obejmuje dwa różne stadia, stadium wegetatywne (trofozoity), w którym komórki intensywnie się dzielą, oraz stadium spoczynkowe, w którym trofozoity zaczynają przekształcać się w cysty z powodu braku dostępności substancji odżywczych i akumulacji produktów przemian metabolicznych. *A. castellanii* z perspektywy ekologicznej, medycznej

(jako oportunistyczny patogen) i ewolucyjnej jest bardzo ważnym członkiem grupy *Amebozoa*. Ponieważ grupa ta traktowana jest jako siostrzana grupa grzybów i zwierząt (Eichinger i in. 2005; Adl i in. 2012), mitochondria ameby prezentują cechy wspólne dla obu tych linii rozwojowych. Badania funkcjonalne systemów rozpraszających energię u ameby, w tym AOX i UCP, zapoczątkowane zostały przez prof. dr hab. Wiesławę Jarmuszkiewicz w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku. Jednakże, nie było wówczas dostępnych danych genetycznych, umożliwiających sprawdzenie, czy istotnie gen posiadający homologię do genów kodujących AOX u innych organizmów (których genomy zostały poddane sekwencjonowaniu i złożone) ma swój funkcjonalny odpowiednik białkowy w mitochondriach ameby.

W 2009 roku ukazała się praca identyfikująca 2 sekwencje kodujące AOX u *A. castellanii* (*Acaox1* i *Acaox2*) (Henriquez i in. 2009), różniące się 12 nukleotydami w sekwencji kierującej do mitochondriów. Dzięki nawiązaniu współpracy z University of Strathclyde w Glasgow (dr Fiona Henriquez, prof. Craig Roberts) uzyskałam szczep *E. coli* transformowany plazmidem pDrive, zawierającym sekwencję kodującą AcAOX1 (pozbawioną sekwencji kierującej do mitochondriów) oraz szczep kontrolny z pustym plazmidem.

Celem moich badań było potwierdzenie funkcjonalności genu kodującego AcAOX poprzez weryfikację jego ekspresji w komórkach ameby na poziomie mRNA, białka i aktywności tego białka oraz poprzez heterologiczną ekspresję *Acaox1* w komórkach bakterii *E. coli*. W związku z tym, że obie izoformy AcAOX różnią się jedynie insercją w obrębie sekwencji kierującej do mitochondriów, badanie poziomu mRNA, jak i białka dotyczyło obydwu izoform jednocześnie, choć jest wysoce prawdopodobne, że jedna z nich ulega ekspresji w sposób konstytutywny, a druga w sposób indukowany (Rogov i in. 2014). Przeprowadzenie przeze mnie analizy ilościowej na poziomie mRNA (real time PCR) oraz białka (detekcja immunologiczna) w różnych fazach wzrostu hodowli ameby (12, 24, 48 i 72 godziny) pozwoliło stwierdzić, że poziom mRNA oraz białka dla AcAOX zmniejsza się istotnie w miarę przechodzenia hodowli z logarytmicznej fazy wzrostu do fazy stacjonarnej. Zmianom tym towarzyszą analogiczne różnice w aktywności białka (oddechaniu odpornym na cyjanek) w trofozoitach *A. castellanii* (Antos-Krzemińska i Jarmuszkiewicz 2014a). W logarytmicznej fazie wzrostu, w której trofozoity ameby intensywnie się dzielą, a droga cytochromowa w łańcuchu oddechowym działa z maksymalną wydajnością i pula ubichinonu jest silniej zredukowana (Jarmuszkiewicz i in. 2005; Czarna i in. 2007), wyższy poziom i aktywność AcAOX mogą zapobiegać nadmiernej redukcji

komponentów łańcucha oddechowego, a w związku z tym również nadmiernej produkcji RFT w mitochondriach. Podczas wzrostu hodowli ameby trofozoity zmieniają swój metabolizm energetyczny w odpowiedzi na brak składników odżywczych, wzrost ilości produktów przemian metabolicznych oraz spadek natlenienia, które są wynikiem zwiększenia gęstości komórek w hodowli. Wyniki moich badań pokazały, że obniżenie poziomu i aktywności AcAOX jest spójne z ogólną strategią „oszczędzania energii”, która wydaje się być bardzo istotna w stacjonarnej fazie wzrostu hodowli ameb, prowadzącej ostatecznie do powstania cyst ameby (form przetrwalnikowych) (Antos-Krzemińska i Jarmuszkiewicz 2014a).

Jak wspomniałam powyżej, moim celem badawczym było również bezpośrednie potwierdzenie, czy *Acaox1* może nadać komórkom *E. coli* cechę odpornego na cyjanek i wrażliwego na BHAM oddychania. Stwierdziłam, że transformowane plazmidem pDrive, zawierającym sekwencję kodującą AcAOX1, komórki bakterii *E. coli* wykazują wyższy poziom oddychania podstawowego w porównaniu do komórek szczepu kontrolnego (transformowanego pustym plazmidem pDrive), co wskazuje na uruchomienie w tych komórkach dodatkowej drogi redukcji tlenu. W komórkach szczepu kontrolnego oddychanie było prawie niewrażliwe na BHAM, podczas gdy w komórkach transformowanych *Acaox1* wrażliwość na BHAM była 15 razy wyższa. W związku z obecnością w komórkach *E. coli* odpornej na cyjanek oksydazy cytochromów *bd* (Borisov i in. 2011), w obydwu typach komórek *E. coli* obserwowałam niekompletne hamowanie oddychania przez cyjanek. Jednakże w komórkach transformowanych *Acaox1* oddychanie odporne na cyjanek było ponad 4 razy wyższe w stosunku do komórek szczepu kontrolnego. Detekcja immunologiczna z przeciwciałem skierowanym przeciwko AOX (pochodzącym z *Sauromatum gutattum*), które wcześniej wielokrotnie było wykorzystywane do identyfikacji AOX u ameby (Jarmuszkiewicz i in. 1997; Czarna i in. 2007), pokazała, że *Acaox1* ulega ekspresji, a powstałe białko wbudowuje się w błonę komórek bakterii. **Wyniki moich badań wskazały więc na ekspresję i funkcjonowanie białka AcAOX1 w układzie heterologicznym, tj. w komórkach *E. coli*. Co więcej pokazałam również, że powstające w komórkach bakterii w wyniku ekspresji sekwencji kodującej AcAOX1 białko ma identyczny mechanizm regulacji, co natywne białko w mitochondriach ameby.** Aktywność AcAOX1 jest regulowana allosterycznie przez nukleotydy purynowe, tzn. jest stymulowana przez GMP i hamowana przez ATP. Co ciekawe, regulacja ta opiera się najprawdopodobniej na mechanizmie wzajemnego wykluczania się tych nukleotydów, jako, że 4-krotne zwiększenie ilości jednego nukleotydu wypiera drugi z nukleotydów (Antos-Krzemińska i Jarmuszkiewicz

2014a), jak to było pokazane wcześniej dla natywnego białka w mitochondriach ameby (Woyda-Ploszczyca i in. 2009).

Podsumowując, wykazałam, że poziom mRNA, białka i aktywność AcAOX w komórkach ameb obniża się podczas przechodzenia tych komórek z logarytmicznej do stacjonarnej fazy wzrostu. Potwierdziłam również, że sekwencja kodująca AcAOX1 ulega ekspresji w układzie heterologicznym a powstałe w efekcie białko nadaje komórkom *E. coli* cechę odpornego na cyjanek i wrażliwego na BHAM oddychania. Białko to wykazuje również mechanizm regulacji charakterystyczny dla natywnego białka funkcjonującego w mitochondriach ameby (Antos-Krzemińska i Jarmuszkiewicz, 2014a).

Zewnętrzne alternatywne dehydrogenazy NAD(P)H (NDH2) w mitochondriach ameby: charakterystyka biochemiczna i funkcjonalna (Antos-Krzemińska i Jarmuszkiewicz 2014b)

Acanthamoeba castellanii jest oportunistycznym pasożytem, który posiada budowę łańcucha przypominającą łańcuch oddechowy grzybów i roślin. W związku z zakończeniem projektu sekwencjonowania genomu ameby *A. castellanii* w 2013 roku (Clarke i in. 2013) i częściowym jego złożeniem, postanowiłam wykorzystać dostępne sekwencje kodujące zewnętrzne NDH2 u *Arabidopsis thaliana* (NDB1–NDB4) do znalezienia w bazie NCBI sekwencji homologicznych u *A. castellanii*. **Pozwoliło to na identyfikację trzech sekwencji kodujących domniemane zewnętrzne NDH2 u ameby.** Następnie przeprowadziłam porównanie tych sekwencji z sekwencjami kodującymi zewnętrzne NDH2 u *Neurospora crassa* (NDE-1 i NDE-2). Białka z *N. crassa* zostały wcześniej dokładnie zbadane i opisane (Melo i in. 2001; Carneiro i in. 2004). Pomimo tylko 30% identyczności porównywanych sekwencji białkowych, homologia tychże sekwencji jest wyraźnie widoczna. **Sekwencje te tworzą domenę wiążącą NAD(P)H i domenę wiążącą FAD. Co więcej, analiza sekwencji domniemanych zewnętrznych NDH2 ameby pokazała obecność motywu dłoni EF we wszystkich trzech sekwencjach, co wskazywałoby na regulację przez jony wapnia.**

Ze względu na brak dostępności komercyjnych przeciwciał skierowanych przeciwko NDH2, w celu ich detekcji przeprowadziłam rozdzielanie elektroforetyczne solubilizowanych białek mitochondrialnych ameby w warunkach niedenaturujących (BN-PAGE) oraz histochemiczne barwienie przy użyciu substratu dla enzymu i NBT (błękit tetrazolowy). Uzyskałam 6 prążków o wielkości 50-70 kDa, spośród których trzy wykazywały aktywność dehydrogenazy NADH, a trzy pozostałe NADPH. Masy cząsteczkowe białek obserwowane po rozdzielaniu i detekcji korespondowały z przewidzianymi *in silico* masami

cząsteczkowymi sekwencji aminokwasowych dla NDH2 u *A. castellanii* (52-67 kDa). Co ciekawe, jeden z prążków miał podobną wielkość przy detekcji aktywności NADH, jak i NADPH, co prawdopodobnie wskazuje na mieszaną aktywność jednego białka (Antos-Krzemińska i Jarmuszkiewicz 2014b).

Aby potwierdzić obecność i funkcjonalność zewnętrznych NDH2 w mitochondriach ameby, przeprowadziłam badania funkcjonalne mierząc potencjał transbłonowy oraz szybkość zużycia tlenu przez izolowane mitochondria. Badania te przeprowadziłam w warunkach aktywności drogi cytochromowej, jak i alternatywnego szlaku oddechowego (przy udziale AOX), przy różnych wartościach pH oraz w obecności lub przy braku jonów Ca^{+2} . Dla obydwu zastosowanych substratów oddechowych (NADH i NADPH) obserwowałam podobną efektywność syntezy ATP, jak również podobne wartości potencjału transbłonowego (Antos-Krzemińska i Jarmuszkiewicz 2014b).

Wykazałam, że optymalna wartość pH dla utleniania NADH jak i NADPH wynosi 6,8, niezależnie od tego, czy badana była klasyczna droga cytochromowa, czy szlak alternatywny (Antos-Krzemińska i Jarmuszkiewicz 2014b). We wcześniejszych badaniach pokazano silną zależność aktywności AcAOX od pH, z optimum w pH 6,8 dla bursztynianu wykorzystanego jako substrat oddechowy (Jarmuszkiewicz i in. 2002). W związku powyższym można założyć, że w podobnych warunkach pH, funkcjonalne połączenie obydwu systemów rozpraszających energię w mitochondriach ameby (AOX i zewnętrznych NDH2) zapewnia możliwość utleniania substratów oddechowych całkowicie bez zachowania energii w cząsteczce ATP. Fizjologiczna rola tych alternatywnych mitochondrialnych systemów transportu elektronów może polegać zatem na dostosowaniu metabolizmu energetycznego komórki do warunków stresu.

Przeprowadzone przez mnie badania wykazały, że maksymalna aktywność utleniania NADH była dwukrotnie wyższa niż utleniania NADPH. Badania kinetyki enzymatycznej wykazały natomiast, że stała Michaelisa dla NADPH jest 3 razy niższa niż dla NADH, co oznacza, że utlenianie zewnętrznego NADPH w mitochondriach ameby jest bardziej wrażliwe na dostępność substratu. Aktywność dehydrogenazy NADPH jest także bardziej wrażliwa na obecność jonów wapnia. Stymulacja utleniania NADPH przez te jony była bowiem 10-krotnie wyższa w porównaniu ze stymulacją utleniania NADH (Antos-Krzemińska i Jarmuszkiewicz 2014b).

Ze względu na to, że nukleotydy pirymidynowe NADH i NADPH są głównymi mediatorami siły redukcyjnej w procesach metabolicznych zachodzących w komórce (Rasmusson i Wallstrom 2010), wysoce prawdopodobne jest, że obecność NDH2 zwiększa

katalityczną elastyczność utleniania NAD(P)H, będąc zarówno czujnikiem stanu redoks w komórce, jak i czynnikiem balansującym ten stan (Geisler i in. 2007). **Wyniki, które uzyskałam wskazują na to, że zewnętrzne NDH2 w mitochondriach ameby wykazują duże podobieństwo do enzymów występujących w mitochondriach roślin i grzybów. Co istotne, pokazałam po raz pierwszy aktywność zewnętrznej alternatywnej dehydrogenazy NADPH w mitochondriach pierwotniaka. Praca ta jest też pierwszą pełną charakterystyką biochemiczną i funkcjonalną zewnętrznych alternatywnych dehydrogenaz NAD(P)H u pierwotniaka (Antos-Krzemińska i Jarmuszkiewicz 2014b).**

Przegląd dostępnych informacji dotyczących budowy i funkcji alternatywnych dehydrogenaz NAD(P)H u pierwotniaków i grzybów (Antos-Krzemińska i Jarmuszkiewicz 2018)

Obecność i aktywność alternatywnych dehydrogenaz NAD(P)H w mitochondriach wzbudza ogromne zainteresowanie ze względu na ich potencjalną rolę antyoksydacyjną. Funkcja tych białek jest dobrze opisana u roślin, natomiast niezbyt dużo wiemy o ich roli w mitochondriach grzybów i pierwotniaków, pomimo coraz większej ilości danych genomowych. W związku z tym, postanowiłam zebrać w pracy przeglądowej dostępne informacje w celu porównania charakterystyki i funkcji poznanych do tej pory NDH2 w mitochondriach grzybów i pierwotniaków (Antos-Krzemińska i Jarmuszkiewicz 2018). Wiadomo, że procesy biotechnologicznej produkcji z użyciem grzyba z rodzaju *Aspergillus* są na przykład o wiele bardziej wydajne, gdy alternatywna dehydrogenaza NADH tego grzyba jest nieaktywna (mutanty pozbawione genu kodującego alternatywną dehydrogenazę NADH). Można dzięki temu osiągnąć znaczący wzrost produktywności bioprocessów przemysłowych poprzez zwiększenie szybkości wzrostu, a w konsekwencji skrócenie czasu fermentacji przy udziale tego grzyba (Voulgaris i in. 2012). Z kolei mitochondria lub mitosomy pasożytniczych pierwotniaków są badane pod kątem znalezienia leków przeciw chorobom powodowanym przez pierwotniaki. NDH2 są zatem potencjalnym celem, ze względu na to, że nie występują w łańcuchu oddechowym ssaków. Niestety, ponieważ brak specyficznych inhibitorów tych białek (Dong i in. 2009), jest to wciąż temat otwarty i pozostający dużym wyzwaniem dla nauki. Co jest niezmiernie interesujące, przy okazji badań działania i funkcji NDH2, stwierdzono, że wraz z innymi kompleksami łańcucha oddechowego tworzą one duże superkompleksy (Grandier-Vazeille i in. 2001), lub nawet struktury, które można nazwać respirosomami (Matus-Ortega i in. 2015). Prawdopodobnie umożliwia to stabilizację kompleksów mitochondrialnych, ułatwiony transport elektronów, jak również

wychwytywanie RFT (Guerrero-Castillo i in. 2009, 2012). W dodatku częściowa kompensacja poszczególnych dehydrogenaz przez inne NDH2 wskazuje na wyższy poziom regulacji komponentów łańcucha oddechowego (Carneiro i in. 2007) oraz dużą dynamikę i plastyczność mitochondriów w odpowiedzi na czynniki zewnętrzne. Sugeruje się również, że NDH2 są zaangażowane w przebieg programowanej śmierci komórki u grzybów (O'Donnell i in. 2011; Cui i in. 2012). Ze względu na filogenetyczne podobieństwo tych enzymów do rodziny białek ssaczych promujących apoptozę jest to temat szczególnie interesujący (Goncalves i Videira 2015; Marr¹eiros i in. 2016). **Praca przeglądowa, dotycząca NDH2 u pierwotniaków i grzybów, jest pierwszą, jak dotąd, próbą zebrania informacji i porównania budowy i funkcji alternatywnych dehydrogenaz NAD(P)H u tych organizmów (Antos-Krzemińska i Jarmuszkiewicz 2018).**

Za moje najważniejsze osiągnięcia naukowe uważam:

- Identyfikację molekularną i funkcjonalną białka rozprzegającego UCP4 (GcUCP4, ZaUCP4) w mitochondriach owadów. Wykazałam, że synteza i aktywność UCP4 owadów zależą od rodzaju tkanki i stadium rozwojowego owada oraz są regulowane przez hormon adypokinetyczny - AKH, odpowiednik glukagonu ssaków.
- Potwierdzenie funkcji genu kodującego alternatywną oksydazę ameby *A. castellanii* i regulacji aktywności tego białka (AcAOX) w układzie heterologicznym w komórkach bakterii oraz poprzez wyznaczenie poziomu mRNA, białka i aktywności białka w różnych fazach wzrostu hodowli komórek ameby.
- Pierwszą pełną charakterystykę biochemiczną i funkcjonalną zewnętrznych alternatywnych dehydrogenaz NAD(P)H w mitochondriach ameby *A. castellanii*, w tym pierwszą identyfikację zewnętrznej dehydrogenazy NADPH w mitochondriach pierwotniaka.
- Pierwszy, jak dotąd, przegląd dostępnych informacji dotyczących budowy i funkcji alternatywnych dehydrogenaz NAD(P)H u pierwotniaków i grzybów.

Sumaryczny IF osiągnięcia naukowego 15,15

Sumaryczna liczba punktów MNiSW¹ osiągnięcia naukowego 175

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

¹ Wg. punktacji MNiSW z 2016 r.

W trakcie studiów doktoranckich uczestniczyłam w projekcie badawczym kierowanym przez dr (obecnie prof. dr hab.) Hannę Kmitę. Dotyczył on sprawdzenia czy w nieobecności kanału VDAC kompleks TOM może prowadzić transport metabolitów przez błonę zewnętrzną mitochondriów. Kompleks TOM czyli translokaza błony zewnętrznej (TOM, *translocase of the outer mitochondrial membrane*) jest jedną ze składowych skomplikowanej maszyny importu białek do mitochondriów. Natomiast kanał VDAC (zależny od potencjału kanał o selektywności anionowej, z ang. *voltage dependent anion selective channel*), nazywany również poryną mitochondrialną, umożliwia transport metabolitów przez błonę zewnętrzną do mitochondriów. Nasze badania dotyczyły mutantów drożdży *S. cerevisiae* pozbawionych funkcjonalnego kanału VDAC czyli poryny 1 ($\Delta por1$) i syntetyzowanej na bardzo niskim poziomie poryny 2. W ramach prowadzonych badań wykazaliśmy, że w mitochondriach mutantu $\Delta por1$ kompleks TOM może uczestniczyć w transporcie metabolitów przez błonę zewnętrzną mitochondriów, oraz, że na poziomie białkowym występuje zwiększona ilość składników tego kompleksu. Co więcej, rola kompleksu TOM jest znacznie większa w mutancie drożdży pozbawionym poryny 2 ($\Delta por2$) (Antos i in. 2001a). Badaliśmy także mitochondria wyjściowego szczepu dzikiego drożdży *S. cerevisiae*, w przypadku których stwierdziliśmy, że w stanie rozprężonym nadmiar substratu ograniczał przepuszczalność kanału VDAC, co wywoływało włączenie kompleksu TOM w transport metabolitów przez błonę zewnętrzną (Antos i in. 2001b). Stwierdziliśmy także, że frakcja białek z przestrzeni międzybłonowej moduluje aktywność kanału kompleksu TOM i kanału VDAC oraz różnice dotyczące tej modulacji w przypadku frakcji izolowanej z mitochondriów szczepu dzikiego i mutantu $\Delta por1$. Co więcej, wykazaliśmy, że istotny wpływ na obserwowany efekt modulatora kanału VDAC ma stan energetyczny mitochondriów (Stobienia i in. 2002). Podsumowaniem zagadnień badawczych z tego obszaru była praca przeglądowa dotycząca udziału błony zewnętrznej w fizjologii mitochondriów (Kmita i Antos 2002). W tym czasie realizowałam również swój własny projekt badawczy („Grant dla młodego badacza”) finansowany przez KBN pt.: ”Molekularny mechanizm zwiększonej ekspresji składników kompleksu TOM w mitochondriach drożdży *S. cerevisiae* pozbawionych poryny 1”. W ramach tego projektu przeprowadziłam badania umożliwiające określenie poziomu transkrypcji genów kodujących wybrane składniki kompleksu TOM (*tom40* i *tom70*) i stabilności odpowiednich mRNA oraz poziomu syntezy kodowanych przez nie białek w komórkach mutantu $\Delta por1$ i wyjściowego szczepu dzikiego. Wyniki tych badań wskazały na zwiększony poziom mRNA w komórkach mutantu, przy czym wynikał on ze zwiększonej syntezy (*tom40*mRNA) lub stabilności (*tom70*mRNA). Zmiany w poziomie

składników kompleksu TOM, uruchamiane w nieobecności kanału VDAC, mogą mieć więc różny charakter (Kmita i in. 2004).

Po obronie pracy doktorskiej, w zespole prof. dr hab. Wiesławy Jarmuszkiewicz uczestniczyłam jako wykonawca w realizacji 6 projektów badawczych. W ramach tych projektów pracowałam nad zagadnieniem zmian aktywności i poziomu białka systemów rozpraszających energię w mitochondriach ameby *A. castellanii* w odpowiedzi na stres chłodu i stres oksydacyjny. Stres chłodu (wzrost hodowli w 6 °C) wpływa na zwiększenie ilości i aktywności białka rozprzęgającego ameby AcUCP bez zmian w ekspresji składników łańcucha oddechowego w porównaniu do hodowli kontrolnych (wzrost hodowli w 28 °C). Co więcej, przy ustalonym stężeniu kwasu linolowego, indukującego aktywność AcUCP, mitochondria izolowane z hodowli poddanych stresowi chłodu wykazywały obniżone parametry sprzężenia z syntezą ATP (niższe ADP/O) w stosunku do kontroli. Wyniki te pokazują zatem, że AcUCP jest białkiem indukowanym stresem chłodu (Jarmuszkiewicz i in. 2004), podobnie, jak to stwierdzono wcześniej dla oksydazy alternatywnej u ameby (AcAOX) (Jarmuszkiewicz i in. 2001). Sprawdzaliśmy również wpływ stresu oksydacyjnego wywołanego podaniem H₂O₂ na hodowlę *A. castellanii*. Krótka inkubacja hodowli ze stężeniami nadtlenu wodoru w zakresie 0.5-25 mM nie miała istotnego wpływu na funkcjonowanie mitochondriów izolowanych z logarytmicznej fazy wzrostu. Nie zaobserwowano zmian w wartościach prędkości oddychania, potencjału błonowego, akumulacji jonów Ca⁺², czy integralności błony zewnętrznej i uwalniania cytochromu c w stosunku do hodowli kontrolnych (Jarmuszkiewicz i in. 2008). Jednakże badania wpływu dłuższego stresu oksydacyjnego (1.4 mM H₂O₂ 24h lub 48h) na hodowlę ameb w różnych fazach wzrostu, wykazały, że komórki z fazy logarytmicznej rosną wolniej w stosunku do kontroli, lecz ich mitochondria nie są uszkodzone w funkcjach bioenergetycznych, natomiast nie obserwowano wpływu na wzrost komórek z fazy stacjonarnej, jednakże mitochondria z tej fazy wzrostu wykazywały znaczne obniżenie parametrów bioenergetycznych w stosunku do kontroli (aktywność szlaku cytochromowego, wartość potencjału błonowego, efektywność fosforylacji oksydacyjnej, aktywność AcUCP, oraz poziom redukcji ubichinonu). Co ciekawe, wzrosła zawartość ubichinonu w błonie mitochondrialnej, oraz poziom i aktywność alternatywnej oksydazy (AcAOX). Po raz pierwszy pokazaliśmy w tej pracy regulację ilości ubichinonu w błonie mitochondrium w odpowiedzi na stres oksydacyjny (Woyda-Płoszczyca i in. 2011).

Badania naszego zespołu dotyczyły także wpływu poziomu redukcji ubichinonu (Q) w mitochondriach ameby na stopień hamowania aktywności AcUCP przez nukleotydy

purynowe (GTP). Wyniki pokazały, że GTP hamuje efektywnie aktywność białka rozprzegającego tylko wtedy, gdy poziom redukcji ubichinonu jest niski. Efekt ten jest identyczny także dla mitochondriów ameby hodowanych w stresie chłodu, gdzie ilość i aktywność AcUCP jest podwyższona (Jarmuszkiewicz i in. 2005). Oddziaływanie poziomu redukcji Q na wyższą lub całkowitą aktywację UCP została także pokazana dla UCP roślinnych oraz izoformy UCP1 z brunatnej tkanki tłuszczowej ssaków. Omówienie cech funkcjonalnych i roli fizjologicznej UCP u jednokomórkowych eukariontów w odniesieniu do innych grup organizmów przedstawione zostało w zespołowej pracy przeglądowej „Mitochondrial uncoupling proteins in unicellular eukaryotes” (Jarmuszkiewicz i in. 2010). W ostatnim czasie uczestniczyłam też w badaniach nad wpływem sulfakinin, neurohormonów owadzi, które są analogiem cholecystokininy (hormonu stymulujący rozkład białek i tłuszczów) u kręgowców, na metabolizm chrząszcza *Z. atrtaus* oraz aktywność jego mitochondriów, poziom mRNA i białka ZaUCP4 (Słocińska i in. 2016).

Projekty w toku i plany badawcze

W związku z częściową dostępnością sekwencji genomowych *A. castellanii* (Clarke i in. 2013), ostatnie 2 lata poświęciłam na próbę potwierdzenia, że sekwencja kodująca domniemane białko rozprzegające u ameby jest funkcjonalnym genem. Sekwencję, adnotowaną jako *Acucp* udało mi się sklonować i przeprowadzić heterologiczną ekspresję w systemie drożdżowym, gdyż drożdże nie posiadając tego białka stanowią doskonały model do sprawdzenia jego funkcji. Białko, uzyskane po indukcji ekspresji, lokalizowało się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej i funkcjonalnie (pomiar zużycia tlenu i potencjału transbłonowego przez izolowane mitochondria drożdżowe, regulacja aktywności przez wolne kwasy tłuszczowe i nukleotydy purynowe) odpowiadało białku rozprzegającemu ameby (AcUCP). Wektorem, zawierającym sekwencję kodującą *Acucp*, transformowałam również szczepy drożdży pozbawione dysmutaz ponadtlenkowych SOD1 i SOD2, u których, w związku z powyższym, występuje stres oksydacyjny. Testy przeżywalności szczepów transformowanych w stosunku do kontrolnych wykazały, że białko AcUCP obniża stres oksydacyjny w obydwu szczepach. W międzyczasie jednakże sekwencja kodująca AcUCP uzyskała status niekompletnej na 5' końcu, co spowodowało, że wyniki należało uzupełnić przeprowadzając w pierwszej kolejności 5'RACE, aby uzyskać kompletną sekwencję kodującą *Acucp*. Obecnie jestem w trakcie prowadzenia eksperymentów dotyczących tego zagadnienia. Ciekawe może być porównanie obu sekwencji i ich odpowiedników białkowych

na poziomie funkcjonalnym, co pozwoli określić, czy obecność lub brak pierwszej domeny białkowej ma znaczenie dla funkcji AcUCP w mitochondriach.

W moich najbliższych planach badawczych mam także charakterystykę molekularną alternatywnych dehydrogenaz NAD(P)H w mitochondriach ameby *A. castellanii*. Zagadnienie to chciałabym również poszerzyć o sklonowanie dostępnych w bazie NCBI sekwencji kodujących amebowe NDH2, ekspresję tych białek *in vitro* i dookreślenie ich lokalizacji w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Warto byłoby również sprawdzić poziom mRNA dla tych białek w różnych fazach wzrostu i korelację z innymi systemami rozpraszającymi energię w mitochondriach. W związku z tym, że stwierdzono homologię tych białek z ludzkim białkiem, należącym do rodziny czynników indukujących apoptozę, jest bardzo ciekawe, czy poziom ich syntezy istotnie wpływa na przeżywalność hodowli ameb. Dokładne poznanie działania i funkcji NDH2 u ameby, która jest oportunistycznym pasożytem, może pozwolić w przyszłości na znalezienie nowych skutecznych metod leczenia chorób wywoływanych przez pierwotniaki.

Chciałabym również kontynuować współpracę z Prof. Anthony Moore z University of Sussex (Wielka Brytania) dotyczącą badań nad AOX pochodzącą z *A. castellanii* (AcAOX). Uzyskanie czystego, kwalifikującego się do badań krystalograficznych białka AcAOX, po ekspresji kodującej to białko sekwencji w systemie heterologicznym w bakteriach *E. coli*, umożliwi dokładne poznanie struktury i molekularnego mechanizmu regulacji tego białka.

Moja działalność naukowo-badawcza została doceniona przez JM Rektora UAM, który siedmiokrotnie przyznał mi Nagrodę Zespołową I, II i III stopnia. W 2002 roku odebrałam również Nagrodę Zespołową Ministra Edukacji Narodowej i Sportu za cykl publikacji. Wykaz wszystkich prac oraz działań składających się na aktywność naukową przedstawiłam w załączonym wykazie opublikowanych prac naukowych (Załącznik nr 3).

Nina Antos - Krzemińska

Bibliografia:

- Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukeš J, Bass D et al. (2012) The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol* 59(5):429-93
- Andjelković A, Oliveira MT, Cannino G, Yalgin C, Dhandapani PK, Dufour E, Rustin P, Szibor M, Jacobs HT (2015) Diiron centre mutations in *Ciona intestinalis* alternative oxidase abolish enzymatic activity and prevent rescue of cytochrome oxidase deficiency in flies. *Sci Rep.* 5:18295
- Antos N, Budzińska M, Kmita H (2001a) An interplay between the TOM complex and porin isoforms in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *FEBS Lett.* 500(1-2):12-6
- Antos N, Stobienia O, Budzińska M, Kmita H (2001b) Under conditions of insufficient permeability of VDAC1, external NADH may use the TOM complex channel to cross the outer membrane of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* 33(2):119-26
- Antos-Krzemińska N, Jarmuszkiewicz W (2014a) Functional expression of the *Acanthamoeba castellanii* alternative oxidase in *Escherichia coli*; regulation of the activity and evidence for Acox gene function. *Biochem Cell Biol.* 92(3):235-41
- Antos-Krzemińska N, Jarmuszkiewicz W (2014b) External NAD(P)H dehydrogenases in *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. *Protist* 165(5):580-93
- Antos-Krzemińska N, Jarmuszkiewicz W (2018) Alternative Type II NAD(P)H Dehydrogenases in the Mitochondria of Protists and Fungi. *Protist* 170(1):21-37
- Arrese EL, Soulages JL (2010) Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu Rev Entomol.* 55:207-25
- Arron GP, Edwards GE (1980) Oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by potato mitochondria: inhibition by sulfhydryl reagents. *Plant Physiol* 65:591-594
- Borisov, V.B., Gennis, R.B., Hemp, J., and Verkhovsky, M.I (2011) The cytochrome bd respiratory oxygen reductases. *Biochim. Biophys. Acta* 1807: 1398-1341
- Cannon B, Shabalina IG, Kramarova TV, Petrovic N, Nedergaard J (2006) Uncoupling proteins: a role in protection against reactive oxygen species-or not? *Biochim Biophys Acta.* 1757(5-6):449-58
- Carneiro P, Duarte M, Videira A (2004) The main external alternative NAD(P)H dehydrogenase of *Neurospora crassa* mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1608:45-52
- Carneiro P, Duarte M, Videira A (2007) The external alter-native NAD(P)H dehydrogenase NDE3 is localized both in the mitochondria and in the cytoplasm of *Neurospora crassa*. *J Mol Biol* 368:1114-1121
- Clifton R, Lister R, Parker KL, Sappl PG, Elhafez D, MillarAH, Day DA, Whelan J (2005) Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 58:193-212
- Cui Y, Zhao S, Wu Z, Dai P, Zhou B (2012) Mitochondrial release of the NADH dehydrogenase Ndi1 induces apoptosis in yeast. *Mol Biol Cell* 23:4373-4382
- Czarna M, Sluse FE, Jarmuszkiewicz W (2007) Mitochondrial function plasticity in *Acanthamoeba castellanii* during growth in batch culture. *J Bioenerg Biomembr.* 39(2):149-57
- Eichinger L, Pachebat JA, Glöckner G, Rajandream MA, Sugang R et al. (2005) The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum* *Nature.* 435(7038):43-57
- Fang J, Beattie DS (2002) Rotenone-insensitive NADH dehydrogenase is a potential source of superoxide in procyclic *Trypanosoma brucei* mitochondria. *Mol Biochem Parasitol* 123(2):135-42
- Fang J, Beattie DS (2003a) External alternative NADH dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential source of superoxide. *Free Radic Biol Med.*34(4):478-88
- Fang J, Beattie DS (2003b) Identification of a gene encoding a 54 kDa alternative NADH dehydrogenase in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 127:73-77
- Fisher N, Bray PG, Ward SA, Biagini GA (2007) The malaria parasite type II NADH:quinone oxidoreductase: an alternative enzyme for an alternative lifestyle. *Trends Parasitol* 23(7):305-10
- Fridell YW, Sánchez-Blanco A, Silvia BA, Helfand SL (2004) Functional characterization of a *Drosophila* mitochondrial uncoupling protein. *J Bioenerg Biomembr.* 36(3):219-28
- Gäde G, Rosiński G (1990) The primary structure of the hypertrehalosemic neuropeptide from tenebrionid beetles: a novel member of the AKH/RPCH family. *Peptides.* 11(3):455-9
- Geisler DA, Broselid C, Hederstedt L, Rasmusson AG (2007) Ca²⁺-binding and Ca²⁺-independent respiratory NADH and NADPH dehydrogenases of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 282:28455-28464
- Goncalves AP, Videira A (2015) Mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases in fungal cell death. *Microb Cell* 2:68-73
- Grandier-Vazeille X, Bathany K, Chaignepain S, Camougrand N, Manon S, Schmitter JM (2001) Yeast mitochondrial dehydrogenases are associated in a supramolecular complex. *Biochemistry* 40:9758-9769
- Guerrero-Castillo S, Cabrera-Orefice A, Vazquez-AcevedoM, Gonzalez-Halphen D, Uribe-Carvajal S (2012) During the stationary growth phase, *Yarrowia lipolytica* prevents the overproduction of reactive oxygen species by activating an uncoupled mitochondrial respiratory pathway. *Biochim Biophys Acta* 1817:353-362

- Guerrero-Castillo S, Vazquez-Acevedo M, Gonzalez-Halphen D, Uribe-Carvajal S (2009) In *Yarrowia lipolytica* mitochondria, the alternative NADH dehydrogenase interacts specifically with the cytochrome complexes of the classic respiratory pathway. *Biochim Biophys Acta* 1787:75–85
- Hanák P, Jezek P (2001) Mitochondrial uncoupling proteins and phylogenesis--UCP4 as the ancestral uncoupling protein. *FEBS Lett.* 495(3):137-41
- Hao MS, Rasmusson AG (2016) The evolution of substrate specificity-associated residues and Ca(2+) -binding motifs in EF-hand-containing type II NAD(P)H dehydrogenases. *Physiol Plant* 157(3):338-51
- Henriquez FL, McBride J, Campbell SJ, Ramos T, Ingram PR, Roberts F, Tinney S, Roberts CW (2009) *Acanthamoeba* alternative oxidase genes: identification, characterisation and potential as antimicrobial targets. *Int J Parasitol.* 39(13):1417-24
- Ho LH, Giraud E, Lister R, Thirkettle-Watts D, Low J, Clifton R, Howell KA, Carrie C, Donald T, Whelan J (2007) Characterization of the regulatory and expression context of an alternative oxidase gene provides insights into cyanide-insensitive respiration during growth and development. *Plant Physiol* 143:519–1533
- Iser WB, Kim D, Bachman E, Wolkow C (2005) Examination of the requirement for *ucp-4*, a putative homolog of mammalian uncoupling proteins, for stress tolerance and longevity in *C. elegans*. *Mech Ageing Dev.* 126(10):1090-6
- Jarmuszkiewicz W, Antos N, Świda A, Czarna M, Sluse FE (2004) The effect of growth at low temperature on the activity and expression of the uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. *FEBS Lett.* 569(1-3):178-84
- Jarmuszkiewicz W, Antos-Krzemińska N, Drachal-Chrul D, Matkovic K, Nobik W, Pienkowska J, Swida A, Woyda-Ploszczyca A, Budzińska M (2008) Basic energetic parameters of *Acanthamoeba castellanii* mitochondria and their resistance to oxidative stress. *Acta Biochim Pol.* 55(2):349-55
- Jarmuszkiewicz W, Czarna M, Sluse FE (2005) Substrate kinetics of the *Acanthamoeba castellanii* alternative oxidase and the effects of GMP. *Biochim Biophys Acta.* 1708(1):71-8
- Jarmuszkiewicz W, Fraczyk O, Hryniewiecka L (2001) Effect of growth at low temperature on the alternative pathway respiration in *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. *Acta Biochim Pol.* 48(3):729-37
- Jarmuszkiewicz W, Hryniewiecka L, Sluse FE (2002) The effect of pH on the alternative oxidase activity in isolated *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 34:221–226
- Jarmuszkiewicz W, Świda A, Czarna M, Antos N, Sluse-Goffart CM, Sluse FE (2005) In phosphorylating *Acanthamoeba castellanii* mitochondria the sensitivity of uncoupling protein activity to GTP depends on the redox state of quinone. *J Bioenerg Biomembr.* 37(2):97-107
- Jarmuszkiewicz W, Wagner AM, Wagner MJ, Hryniewiecka L. (1997) Immunological identification of the alternative oxidase of *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. *FEBS Lett.* 411(1):110-4.
- Jarmuszkiewicz W, Woyda-Ploszczyca A, Antos-Krzemińska N, Sluse FE (2010) Mitochondrial uncoupling proteins in unicellular eukaryotes. *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics.* 1797(6-7):792-9. Review
- Keller PA, Lehr L, Giacobino JP, Charnay Y, Assimacopoulos-Jeannet F, Giovannini N (2005) Cloning, ontogenesis, and localization of an atypical uncoupling protein 4 in *Xenopus laevis*. *Physiol Genomics.* 22(3):339-45
- Kerscher SJ (2000) Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta* 1459:274–283
- Kmita H, Antos N (2002) Udział błony zewnętrznej w fizjologii mitochondriów. *Postępy Biologii Komórki* 29(2):203-220
- Kmita H, Antos N, Wojtkowska M, Hryniewiecka L (2004) Processes underlying the upregulation of Tom proteins in *S. cerevisiae* mitochondria depleted of the VDAC channel. *J Bioenerg Biomembr.* 36(2):187-93
- Liu Y, Liu H, Liu S, Wang S, Jiang RJ, Li S (2009) Hormonal and nutritional regulation of insect fat body development and function. *Arch Insect Biochem Physiol.* 71(1):16-30
- Lorenz MW, Gäde G (2009) Hormonal regulation of energy metabolism in insects as a driving force for performance. *Integr Comp Biol.* 49(4):380-92
- Marreiros, BC, Sena, FV, Sousa, FM, Batista, AP, Pereira MM (2016) Type II NADH:quinone oxidoreductase family: phylogenetic distribution, structural diversity and evolutionary divergences. *Environ. Microbiol.* <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.13352>
- Matus-Ortega MG, Cardenas-Monroy CA, Flores-Herrera O, Mendoza-Hernandez G, Miranda M, Gonzalez-Pedrajo B, Vazquez-Meza H, Pardo JP (2015) New complexes containing the internal alternative NADH dehydrogenase (Ndi1) in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 32:629–641
- McDonald AE, Gospodaryov DV (2018) Alternative NAD(P)H dehydrogenase and alternative oxidase: Proposed physiological roles in animals. *Mitochondrion.* S1567-7249(17)30107-1
- Melo AM, Bandejas TM, Teixeira M (2004) New insights into type II NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:603–616
- Melo AM, Duarte M, Møller IM, Prokisch H, Dolan PL, Pinto L, Nelson MA, Videira A (2001) The external calcium-dependent NADPH dehydrogenase from *Neurospora crassa* mitochondria. *J Biol Chem* 276:3947–3951
- Moller IM, Palmer JM (1981) Charge screening by cations affects the conformation of the mitochondrial inner membrane. A study of exogenous NAD(P)H oxidation in plant mitochondria. *Biochem J* 195:583–588

- Moore AL, Albury MS (2008) Further insights into the structure of the alternative oxidase: from plants to parasites. *Biochem Soc Trans.* 36:1022-6. Review.
- Nicholls DG, Locke RM (1984) Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev.* 64(1):1-64
- O'Donnell A, Harvey LM, McNeil B (2011) The roles of the alternative NADH dehydrogenases during oxidative stress in cultures of the filamentous fungus *Aspergillus niger*. *Fungal Biol.* 115:359–369
- Rasmusson AG, Fernie AR, van Dongen JT (2009) Alternative oxidase: a defence against metabolic fluctuations? *Physiol Plant* 137:371–382
- Rasmusson AG, Soole KL, Elthon TE (2004) Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. *Annu Rev Plant Biol* 55:23–39
- Rasmusson AG, Wallstrom SV (2010) Involvement of mitochondria in the control of plant cell NAD(P)H reduction levels. *Biochem Soc Trans* 38:661–666
- Ricquier D, Bouillaud F (2000) Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol.* 529 Pt 1:3-10. Review.
- Roberts CW, Roberts F, Henriquez FL, Akiyoshi D, Samuel BU, Richards TA, Milhous W, Kyle D, McIntosh L, Hill GC, Chaudhuri M, Tzipori S, McLeod R (2004) Evidence for mitochondrial-derived alternative oxidase in the apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum*: a potential antimicrobial agent target. *Int J Parasitol.* 34(3):297-308
- Robertson A, Schaltz K, Neimanis K, Staples JF, McDonald AE (2016) Heterologous expression of the *Crassostrea gigas* (Pacific oyster) alternative oxidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bioenerg Biomembr.* 48(5):509-520
- Rogov AG, Sukhanova EI, Uralskaya LA, Aliverdieva DA, Zvyagilskaya RA (2014) Alternative oxidase: distribution, induction, properties, structure, regulation, and functions. *Biochemistry (Mosc).* 79(13):1615-34
- Sánchez-Blanco A, Fridell YW, Helfand SL (2006) Involvement of *Drosophila* uncoupling protein 5 in metabolism and aging. *Genetics.* 172(3):1699-710
- Slocinska M*, Antos-Krzeminska N*, Golebiowski M, Kuczer M, Stepnowski P, Rosinski G, Jarmuszkiewicz W (2013) UCP4 expression changes in larval and pupal fat bodies of the beetle *Zophobas atratus* under adipokinetic hormone treatment. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 166(1):52-9; *equal contribution
- Slocinska M*, Antos-Krzeminska N*, Rosinski G, Jarmuszkiewicz W (2012) Molecular identification and functional characterization of uncoupling protein 4 in larva and pupa fat body mitochondria from the beetle *Zophobas atratus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 162(4):126-33; *equal contribution
- Slocinska M, Antos-Krzeminska N, Rosinski G, Jarmuszkiewicz W (2011) Identification and characterization of uncoupling protein 4 in fat body and muscle mitochondria from the cockroach *Gromphadorhina cocquereliana*. *J Bioenerg Biomembr.* 43(6):717-27
- Slocinska M, Antos-Krzeminska N, Rosinski G, Jarmuszkiewicz W (2016) Nonsulfated sulfakinin changes metabolic parameters of insect fat body mitochondria. *Arch Insect Biochem Physiol.* 93(4):177-189
- Stobienia O, Wróblewska S, Antos N, Budzińska M, Kmita H (2002) The key role of the energized state of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria in modulations of the outer membrane channels by the intermembrane space proteins. *J Bioenerg Biomembr.* 34(6):507-16
- Suzuki T, Nihei C, Yabu Y, Hashimoto T, Suzuki M, Yoshida A, Nagai K, Hosokawa T, Minagawa N, Suzuki S, Kita K, Ohta N (2004) Molecular cloning and characterization of *Trypanosoma vivax* alternative oxidase (AOX) gene, a target of the trypanocide ascofuranone. *Parasitol Int.* 53(3):235-45
- Uyemura SA, Luo S, Vieira M, Moreno SN, Docampo R (2004) Oxidative phosphorylation and rotenone-insensitive malate- and NADH-quinone oxidoreductases in *Plasmodium yoelii yoelii* mitochondria in situ. *J Biol Chem* 279:385–393
- Van der Horst DJ, Van Marrewijk WJ, Diederer JH (2001) Adipokinetic hormones of insect: release, signal transduction, and responses. *Int Rev Cytol.* 211:179-240
- Vanlerberghe GC (2013) Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *Int J Mol Sci.* 14(4):6805-47. Review.
- Voulgaris I, O'Donnell A, Harvey LM, McNeil B (2012) Inactivating alternative NADH dehydrogenases: enhancing fungal bioprocesses by improving growth and biomass yield? *Sci Rep* 2:322
- Woyda-Ploszczyca A, Koziel A, Antos-Krzeminska N, Jarmuszkiewicz W (2011) Impact of oxidative stress on *Acanthamoeba castellanii* mitochondria bioenergetics depends on cell growth stage. *J Bioenerg Biomembr.* 43(3):217-25
- Woyda-Ploszczyca AM, Sluse FE, Jarmuszkiewicz W (2009) Regulation of *Acanthamoeba castellanii* alternative oxidase activity by mutual exclusion of purine nucleotides; ATP's inhibitory effect. *Biochim Biophys Acta* 1787(4):264-71