

AUTOREFERAT

Opis osiągnięć i dorobku naukowego

Małgorzata Słocińska

Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt, Wydział Biologii,
Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

Poznań, grudzień 2016

1. Imię i nazwisko: Małgorzata Słocińska

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:

- Czerwiec 1994 - dyplom mgr inż. uzyskany na Akademii Rolniczej w Poznaniu. Tytuł pracy magisterskiej: „Porównanie ekotypów kostrzewy trzcinowej *Festuca arundinacea* z jej formami hodowlanymi”; promotor: Prof. dr hab. Maria Grynia
- Czerwiec 2002 - dyplom doktora nauk biologicznych w zakresie biologii - biochemii uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Tytuł pracy: „Mitochondrialny receptor benzodiazepin u niższych Eucaryota”; promotor: Prof. dr hab. Lilla Hryniewiecka

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 01.12.1996 - 27.06.2002- studia doktoranckie w Zakładzie Bioenergetyki na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza
- 1.10.2002 - 30.10.2003- adiunkt na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
- 2004 – 2005 - staż/ kontrakt na National University of Singapore, Faculty of Medicine
- 2005 - 2006 - pracownik techniczny w Zakładzie Biochemii na Akademii Rolniczej w Poznaniu
- 1.10.2006 do chwili obecnej: adiunkt w Zakładzie Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt Wydziału Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza

4. Wykazanie osiągnięcia wynikającego z art.16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r., o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

A) Tytuł osiągnięcia naukowego

Identyfikacja i charakterystyka systemów rozpraszających energię w mitochondriach ciała tłuszczowego i mięśni karaczana *Gromphadorhina coquereliana* oraz chrząszcza *Zophobas atratus*.

B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

IF -zgodny z rokiem opublikowania, punkty MNiSW (lista z 2015 roku).

1. **Słocinska 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 *Gromphadorhina coquereliana*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. (6):717-27. **IF - 2.81, MNiSW - 25.**

2. **Słocinska 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):126-133. **IF - 2.07, MNiSW - 25.**

3. **Słocinska 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):52-59. **IF - 2.37, MNiSW - 25.**

4. **Słocińska M.**, Antos-Krzeminska N., Rosinski G., Jarmuszkiewicz W. 2016. Nonsulfated sulfakinin changes metabolic parameters of insect fat body mitochondria. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology.*93(4):177-189. **IF - 1.36, MNiSW - 20.**

5. **Słocińska M.**, Lubawy J., Jarmuszkiewicz W., Rosinski G. 2013. Evidences for an ATP-sensitive potassium channel (K_{ATP}) in muscle and fat body mitochondria of insect. *Journal of Insect Physiology* 59:1125-1132. **IF - 2.5, MNiSW - 35.**

6. **Słocińska M.**, Rosiński G., Jarmuszkiewicz W. 2016. Activation of Mitochondrial Uncoupling Protein 4 and ATP-Sensitive Potassium Channel Cumulatively Decreases Superoxide Production in Insect Mitochondria. *Protein and Peptide Letters.* 23(1):63-68. **IF - 1.07, MNiSW - 15.**

7. **Słocińska M.**, Barylski J., Jarmuszkiewicz W. 2016. Uncoupling Proteins of Invertebrates: A Review. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life.* 68(9):691-699. **IF - 2.65, MNiSW - 30.**

C) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem osiągnięć naukowo-badawczych

Osiągnięcie naukowe, będące podstawą ubiegania się o stopień doktora habilitowanego stanowi cykl sześciu oryginalnych publikacji naukowych i jednej pracy przeglądowej opublikowanych w latach 2011-2016 w czasopiśmie znajdujących się w bazie Journal Citation Reports. Sumaryczny impact factor tych prac (zgodny z rokiem opublikowania wynosi 14.83, a sumaryczna liczba punktów MNiSW to 175. We wszystkich wymienionych pracach jestem autorem pierwszym i korespondencyjnym. Trzy pierwsze publikacje (pozycja 1-3) zostały sfinansowane z projektu przyznanego przez MNiSW (Nr. N N303291634), którego byłam kierownikiem i głównym wykonawcą.

Wprowadzenie

Mitochondria odgrywają szczególną rolę w świecie Eukaryota. Oprócz swojej klasycznej roli, „elektrowni” dostarczających komórce energii w formie cząsteczek ATP, są miejscem przebiegu ważnych szlaków metabolicznych, przez co istotnie wpływają na utrzymanie homeostazy komórkowej. Mitochondria są także głównym źródłem reaktywnych form tlenu (RFT) i są zaangażowane w regulację życia i śmierci organizmów w procesach apoptozy i starzenia się komórki. Błona wewnętrzna mitochondriów, w której znajdują się kompleksy białkowe należące do łańcucha oddechowego, syntaza ATP oraz białka umożliwiające przepływ informacji między mitochondrium a wnętrzem komórki, jest nieprzepuszczalna prawie dla wszystkich jonów i cząsteczek polarnych, a metabolity i jony przenoszone są przez nią za pomocą nośników mitochondrialnych. Kontrola przepuszczalności i integralności wewnętrznej błony mitochondrialnej jest kluczowa dla wydajnej syntezy ATP i utrzymania równowagi energetycznej komórki. Związek pomiędzy procesem syntezy ATP (fosforylacja oksydacyjna), katalizowanym przez enzym - syntazę ATP, a transportem elektronów w łańcuchu oddechowym wyjaśnia teoria chemiosmotyczna sformułowana przez brytyjskiego biochemika Petera Mitchella (Nature, 1961). Teoria ta

zakłada, że transport elektronów i synteza ATP są sprzężone przez protonowy gradient elektrochemiczny wytworzony przez kompleksy enzymatyczne łańcucha oddechowego pompujące protony do przestrzeni międzybłonowej (kompleksy I, III i IV). Energia potrzebna do pompowania protonów przez wewnętrzną błonę mitochondrium do przestrzeni międzybłonowej pochodzi ze stopniowego przepływu elektronów przez elementy łańcucha oddechowego z NADH lub FADH₂ na tlen. Z kolei powrót protonów do wnętrza mitochondrium przez syntazę ATP uwalnia energię wykorzystywaną do tworzenia ATP. Sprzężenie transportu elektronów z syntezą ATP wymaga ścisłej kontroli przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej dla jonów, przede wszystkim protonów. Przepływ jonów prowadzi do rozprężenia tych procesów i spadku protonowego gradientu protonów, a w konsekwencji do obniżenia wydajności fosforylacji oksydacyjnej. Dlatego też, znajdujące się we wewnętrznej błonie mitochondrialnej kanały potasowe zależne od ATP (mitoK_{ATP}), transportujące jony K⁺ i białka rozprzegające (UCP, ang. uncoupling proteins), transportujące jony H⁺, uważa się za kluczowe mechanizmy kontrolujące przepuszczalność błony mitochondrialnej i wydajność fosforylacji oksydacyjnej.

Białka rozprzegające

Białka rozprzegające są integralnymi białkami błonowymi należącymi do dużej rodziny mitochondrialnych nośników anionów. Białka rozprzegające aktywowane przez wolne kwasy tłuszczowe i produkty peroksydacji lipidów oraz hamowane przez nukleotydy purynowe powodują rozprzeganie procesów transportu elektronów w łańcuchu oddechowym i syntezy ATP, prowadząc do obniżenia wydajności fosforylacji oksydacyjnej (Cannon i in., 2006). Aktywność UCP prowadzi do stymulacji zużycia tlenu w stanie spoczynkowym, niefosforylującym i obniżenia potencjału błonowego mitochondriów. Białka rozprzegające zostały zidentyfikowane niemal u wszystkich przedstawicieli Eukaryota, w tym u ssaków, ptaków, gadów, ryb, owadów, grzybów i pierwotniaków (Jarmuszkiewicz i in., 2010). U ssaków zidentyfikowano do tej pory 5 izoform UCP o zróżnicowanej ekspresji w poszczególnych tkankach i organach. UCP1 (wcześniej termogenina) jest charakterystyczne dla brunatnej tkanki tłuszczowej, a jego wzmożona aktywność powoduje termogenezę u zwierząt hibernujących i niemowląt (Nichols i Locke, 1984). Pozostałe izoformy, występujące

w tkankach nietermogennych, utrzymują równowagę metaboliczną i energetyczną komórek oraz działają jako systemy antyoksydacyjne. UCP2 zostało zidentyfikowane niemal we wszystkich tkankach, z kolei UCP3 występuje przede wszystkim w mięśniach szkieletowych i sercu. Z kolei, UCP4 i UCP5 są charakterystyczne dla tkanek nerwowych ssaków (Slocinska i in., 2016).

Moje zainteresowanie białkami UCP miało swój początek podczas pobytu naukowego w Laboratory of Cubic Membranes National University w Singapurze (lata 2003-2004), gdzie w zespole prof. Yuru Deng prowadziłam badania dotyczące związku między aktywnością i ekspresją UCP a długowiecznością i wysokim metabolizmem kanarków, ptaków których średnia długość życia wynosi 23 lata. Po powrocie do Polski i zatrudnieniu w Zakładzie Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt Wydziału Biologii UAM w Poznaniu, w grupie prof. Grzegorza Rosińskiego mogłam kontynuować badania tych interesujących białek u owadów. Wyzwanie to było tym bardziej interesujące, że wiedza na temat UCP u bezkręgowców, w tym najliczniejszej wśród nich grupy owadów, była szczątkowa i pochodziła głównie z analiz bioinformatycznych oraz badań w układach rekonstruowanych. Badanie UCP u bezkręgowców wydaje się bardzo istotne dla zrozumienia działania i znaczenia tych białek u różnych grup Eukaryota, w tym zachowania podstawowych uniwersalnych właściwości i pojawiania się cech charakterystycznych dla danej grupy organizmów. Ponadto, bezkręgowce, takie jak *Drosophila melanogaster* czy inne owady mają wiele genów wspólnych z ssakami, mogą służyć zatem jako organizmy modelowe do lepszego zrozumienia funkcji UCP i ich roli w powstawaniu i leczeniu chorób metabolicznych takich, jak cukrzyca czy otyłość. W międzyczasie rozpoczęłam także współpracę z prof. Wiesławą Jarmuszkiewicz z Zakładu Bioenergetyki Wydziału Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu, która od wielu lat zajmuje się tematyką UCP.

W momencie rozpoczęcia przeze mnie badań białek UCP owadów (2004 rok) nie było żadnych danych opisujących obecność i aktywność UCP w mitochondriach izolowanych z tkanek bezkręgowców. Pierwsze UCP u bezkręgowców (UCP4 i UCP5) zidentyfikowano u nicienia *Caenorhabditis elegans* i muszki owocowej *Drosophila melanogaster* na podstawie dostępnych baz poznanych genomów i unikatowych sygnatur aminokwasowych charakterystycznych dla UCP (Hanak i Jeżek, 2001). U *D. melanogaster* stwierdzono prawdopodobną obecność trzech izoform UCP4 oraz UCP5. *DmUCP5* scharakteryzowano

funkcjonalnie w układzie heterologicznym, w mitochondriach komórek drożdży (Fridell i in., 2004). Kolejne badania na muszkach pozbawionych genu kodującego UCP5 pokazały, że białko to może być zaangażowane w regulację metabolizmu i starzenie się organizmu (Sanchez-Blanco i in., 2006). Mutanty pozbawione UCP5 były bardziej wrażliwe na głód oraz wykazywały obniżoną płodność.

W celu poznania mechanizmów fizjologicznych i biochemicznych regulacji metabolizmu energetycznego owadów postanowiłam scharakteryzować UCP pod względem funkcjonalnym i molekularnym w mitochondriach izolowanych z tkanek o odmiennych funkcjach fizjologicznych. Wybrałam do tego celu 2 modele badawcze: przedstawiciela owadów hemimetabolicznych, karaczana madagaskarskiego *Gromphadorhina coquereliana*, który ze względu na swoją wielkość jest wygodnym i interesującym modelem do analiz bioenergetycznych oraz chrząszcza *Zophobas atratus*, przedstawiciela owadów holometabolicznych, o przeobrażeniu zupełnym. Mitochondria izolowałam z dwóch różnych metabolicznie tkanek: tkanki troficznej ciała tłuszczowego oraz z mięśni odnóży. Ciało tłuszczowe jest głównym organem odpowiedzialnym za pośredni metabolizm owadów, pod względem funkcjonalnym jest analogiczne do wątroby a cytologicznie do tkanki tłuszczowej ssaków. Syntetyzuje oraz magazynuje rezerwy energetyczne w postaci tłuszczów i węglowodanów, których uwalnianie kontrolowane jest przez hormon adipokinetyczny (AKH), funkcjonalny analog glukagonu ssaków. U owadów, uwolnione z tkanki tłuszczowej przez AKH węglowodany w postaci trehalozy i tłuszcze w postaci diacylogliceroli transportowane są przez hemolimfę do kurczących się mięśni, charakteryzujących się wysokim aerobowym metabolizmem energetycznym, lub do innych tkanek obwodowych, w których wzrasta zapotrzebowanie energetyczne (Lorenz and Gäde, 2009).

Prowadzone przeze mnie badania na mitochondriach izolowanych z ciała tłuszczowego oraz mięśni karaczana *G. coquereliana* (Słocińska i in., 2011, poz. 1) wykazały po raz pierwszy obecność funkcjonalnego białka rozprzegającego *GcUCP*. Białko to wykazuje cechy podobne do UCP innych organizmów, jest aktywowane przez wolne kwasy tłuszczowe i hamowane przez nukleotydy purynowe, co wskazuje na to iż UCP owadów zachowały mechanizm regulacyjny charakterystyczny dla innych organizmów (Jarmuszkiewicz i in., 2010). W spoczynkowym (niefosforylującym) stanie oddechowym podanie mikromolarnych stężeń kwasu palmitynowego (PA) powoduje wzrost oddychania i

spadek potencjału błonowego mitochondriów. Efekt ten jest częściowo znoszony przez GTP. W fosforylujących mitochondriach (po dodaniu ADP), kwas palmitynowy wywołuje obniżenie stosunku ADP/O będącego wskaźnikiem wydajności fosforylacji oksydacyjnej. Badania funkcjonalne wykazały, że aktywność rozprzegająca GcUCP w mitochondriach mięśni jest większa niż w mitochondriach ciała tłuszczowego. Podobnie, badania immunologiczne z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko ludzkiemu UCP4 wykazały, że poziom białka UCP4 w mitochondriach mięśni karaczana jest znacznie wyższy niż w mitochondriach ciała tłuszczowego. Wyniki te wskazują na istotną rolę UCP w fizjologii mięśni karaczana. Obecność GcUCP4 w mitochondriach ciała tłuszczowego i mięśni karaczana potwierdziliśmy także stosując technikę odwrotnej mikroskopii fluorescencyjnej przy użyciu sondy Mito Tracker Red i drugorzędowych przeciwciał sprzężonych z izotiocyjanianem fluoresceiny, FITC (Słocińska i in., 2011, poz. 1).

Charakterystyka molekularna UCP karaczana przy użyciu spektrometrii mas i porównanie sekwencji aminokwasowej otrzymanych peptydów ze znanymi izoformami UCP wykazały, że występująca w ciele tłuszczowym i mięśniach tego owada izoforma UCP charakteryzuje się dużym podobieństwem do UCP4 człowieka i szczura oraz UCP4 *D. melanogaster* (Słocińska i in., 2011, poz. 1). W zidentyfikowanych peptydach stwierdziliśmy obecność kilku całkowicie (lub dominująco) konserwatywnych domen charakterystycznych dla rodziny nośników mitochondrialnych i białek UCP. Obecność GcUCP4 w tkankach peryferycznych oraz jego duża homologia do 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. Otrzymane w tej pracy wyniki wskazują, że UCP4 owadów jest bliżej spokrewnione z UCP4 kręgowców niż pozostałymi UCP.

W trakcie moich badań analizowałam także wpływ aktywności GcUCP4 na obniżanie produkcji RFT (Słocińska i in., 2011, poz. 1). Stymulowana przez kwas palmitynowy aktywność GcUCP4 powodowała obniżenie produkcji anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\bullet -}$) w mitochondriach izolowanych z ciała tłuszczowego i mięśni karaczana. Hamowanie aktywności GcUCP4 przez GTP powodowało wzrost produkcji $O_2^{\bullet -}$ w mitochondriach pochodzących z ciała tłuszczowego, natomiast nie wpływało na poziom anionorodnika w mitochondriach mięśni. Różnica ta może wynikać ze stanu redoks mitochondrialnego

koenzymu Q. Ograniczenie produkcji RFT przez UCP obserwowano już wcześniej u roślin, ssaków i pierwotniaków. Zatem, nasze wyniki potwierdziły podobną antyoksydacyjną funkcję UCP w mitochondriach owadów.

Wcześniejsze badania Fridell i in. (2004) wskazały, że ekspresja genu kodującego *DmUCP5* u *Drosophila* może być zależna od stadium rozwojowego owada. Dlatego też kolejnym moim celem była identyfikacja i określenie poziomu UCP na poziomie mRNA oraz białka na różnych etapach rozwoju owadów. Do realizacji tego celu badawczego wybrałam przedstawiciela owadów o przeobrażeniu zupełnym, chrząszcza z rodziny czarnuchowatych (Tenebrionidae) – *Z. atratus*. Analizy wykonane zostały w ciele tłuszczowym larw i poczwarek, tkance która nie tylko jest głównym organem owadów odpowiedzialnym za utrzymanie homeostazy energetycznej, ale także miejscem różnicowania się nowych tkanek i ich reorganizacji podczas procesu metamorfozy (Arrese i Soulages, 2010). W stadium larwy i poczwarki ciało tłuszczowe niemal całkowicie wypełnia jamę ciała chrząszcza, u postaci dorosłej występuje jedynie w formie szczątkowej. Dlatego też charakterystyka funkcjonalna UCP *Z. atratus* (*ZaUCP4*) w izolowanych mitochondriach oraz analiza jego ekspresji na poziomie białka i mRNA wykonywane zostały dla ciała tłuszczowego larwy i poczwarki modelowego chrząszcza (Słocińska i in., 2012, poz. 2).

W celu zidentyfikowania sekwencji kodujących *ZaUCP4* zaprojektowaliśmy startery na podstawie porównania sekwencji kodujących UCP4A u *D. melanogaster* i trojszyka gryzącego *Tribolium castaneum*. Z ciał tłuszczowych larwy i poczwarki otrzymano fragmenty cDNA o spodziewanej długości 370 par zasad. Otrzymana w wyniku klonowania i sekwencjonowania częściowa sekwencja kodująca *Zaupc4* wykazuje duże podobieństwo do znanych lub przewidywanych sekwencji kodujących UCP4 owadów. Zaobserwowaliśmy ~77% homologię z *ucp4A T. castaneum*, należącego do tego samej co *Z. atratus* rzędu, chrząszczy (Coleoptera) i rodziny czarnuchowatych (Tenebrionidae) oraz ~67% homologię z *ucp4 D. melanogaster* (Słocińska i in., 2012, poz. 2). Przepisanie sekwencji nukleotydowej na sekwencję aminokwasową oraz porównanie jej ze znanymi lub przewidywanymi izoformami białka UCP4 pokazuje bardzo duże podobieństwo do znanych UCP4 ssaków i innych owadów. Największą homologię zaobserwowano dla UCP4 z *T. castaneum* (~83%). W otrzymanej częściowej sekwencji aminokwasowej, stanowiącej ~33% *ZaUCP4* stwierdzono obecność kilku reszt konserwatywnych dla rodziny nośników mitochondrialnych

i sygnatur charakterystycznych dla białek UCP. Identyfikacja UCP4 w tkankach peryferycznych owadów, ciele tłuszczowym i mięśniach karaczana oraz ciele tłuszczowym chrząszcza (Słocińska i in., 2011, 2012 poz. 1 i 2), tkankach obwodowych nicienia *C. elegans* (Iser i in., 2005), a także w oocytach, wątrobie i nerkach żaby *Xenopus laevis* (Keller i in., 2005) wskazuje, iż izoforma UCP4 nie jest ograniczona tylko do tkanek nerwowych ssaków jak sugerowano wcześniej. Obecność UCP4 w tkankach peryferycznych potwierdza hipotezę, że UCP4 ewoluowało z białka charakterystycznego dla tkanek obwodowych do białka specyficznego dla układu nerwowego (Hanak i Jeżek, 2001).

Otrzymana sekwencja aminokwasowa ZaUCP4 posłużyła do analizy filogenetycznej UCP bezkręgowców, którą oparliśmy na znanych lub przewidywanych sekwencjach UCP ze szczególnym akcentem na powiązania z kładem UCP4 (Słocińska i in., 2016, poz. 7). Opierając się na dostępnych w bazach adnotacjach oraz obecności domen/reszt konserwatywnych wyodrębniliśmy gałąź UCP4. Analiza bioinformatyczna jednoznacznie wskazuje na podział białek UCP4 na 2 grupy. Pierwsza z nich zawiera izoformę B i izoformę C UCP4, które zidentyfikowano u *Drosophila* i motyla monarchy *Danaus plexippus*. Druga gałąź, do której należy również UCP4 *Z. atratus* to izoformy A UCP4 i pozostałe UCP4 zidentyfikowane u owadów. Sugeruje to, że izoformy B oraz C owadów mogą być pozostałościami starej rodziny obecnie utraconych genów lub co bardziej prawdopodobne, produktami stosunkowo niedawnej duplikacji. Trzeba jednak zaznaczyć, że część owadziach UCP nie została do tej pory zsekwencjonowana, przypisana lub zidentyfikowana. Nie można więc wykluczyć hipotezy, że geny wykazujące podobieństwo do izoform B i C są wspólne dla wszystkich owadów. Nasza analiza pokazuje także, że filogenetyczne rozłożenie białek UCP4 odzwierciedla filogenetyczne pokrewieństwo w świecie zwierząt. Można wyodrębnić dwa główne klady UCP, które prawdopodobnie rozdzieliły się w trakcie ewolucji zanim dokonał się rozdział kręgowców i bezkręgowców. Do pierwszego kladu należą UCP1-3 kręgowców a do drugiego kladu należą UCP4 i UCP5 kręgowców i bezkręgowców.

Wykonane przeze mnie testy bioenergetyczne takie jak pomiar szybkości zużycia tlenu przez mitochondria izolowane z ciała tłuszczowego larw i poczwarek 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 i in., 2012, poz. 2). Aktywacja ZaUCP4

wyraźne obniżała wydajność fosforylacji oksydacyjnej czyli wydajność syntezy ATP przez mitochondria (spadek stosunku ADP/O). W izolowanych mitochondriach chrząszcza, UCP było aktywowane przez kwasy tłuszczowe (kwas palmitynowy) i hamowane przez GTP. Wskazuje to, że mechanizm regulujący aktywność UCP owadów jest taki jak u ssaków, roślin i organizmów jednokomórkowych. Co ciekawe, w obu stanach oddechowych mitochondriów izolowanych z ciała tłuszczowego chrząszcza, aktywność *ZaUCP4* była niższa dla poczwarki niż larwy. Analiza PCR w czasie rzeczywistym oraz immunodetekcja (z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko ludzkiemu UCP4) wykazały, że powyższe wyniki analizy funkcjonalnej są zgodne z obserwowaną niższą ekspresją *ZaUCP4* na poziomie mRNA (~43%) i białka (~57%) w ciele tłuszczowym poczwarki. Sugeruje to prawdopodobny udział *ZaUCP4* w procesie metamorfozy i zachodzącej podczas tego procesu reorganizacji ciała tłuszczowego. Obniżenie aktywności i ekspresji *ZaUCP4* może odzwierciedlać ograniczoną w porównaniu do stadium larwalnego aktywność metaboliczną poczwarki. Z kolei, wyższa ekspresja i aktywność *ZaUCP4* w mitochondriach ciała tłuszczowego larw może być związana z intensywnym wzrostem, różnicowaniem i/lub procesem dezintegracji ciała tłuszczowego w tym stadium rozwojowym. Udział UCP4 w procesie różnicowania zaobserwowano wcześniej dla komórek nerwowych (Smorodchenko i in., 2009) i adipocytów (Zhang, 2006) ssaków.

Aktywność i ekspresja UCP są regulowane przez różnego rodzaju związki chemiczne, spośród których jednymi z najważniejszych są hormony. Stosunkowo dobrze został opisany wpływ hormonów na syntezę UCP ssaków, w tym hormonu tarczycy - trójiodotyroniny hormonu trzustki – insuliny, hormonu tkanki tłuszczowej - leptyny, czy hormonu wzrostu i estrogenów (Ricquier i Bouillaud, 2000). Regulacja hormonalna UCP owadów nie została wcześniej opisana, choć przypuszcza się, że UCP5 *D. melanogaster* jest zaangażowane w kontrolę hormonalną metabolizmu (Sanchez-Blanco i in., 2006). Mutanty muszki pozbawione UCP5 wykazywały obniżony poziom cukrów, glikogenu i triglicerydów co wskazuje na udział tego białka w szlakach sygnalizacyjnych regulujących wydzielanie AKH i/lub peptydu insulino-podobnego. Ostatnie badania wykazały, że wzrost aktywności UCP5 w neuronach produkujących insulinę osłabia sygnalizację szlaków prowadzących do jej wydzielania (Fridell i in., 2009).

Jednym z najważniejszych hormonów odpowiedzialnych za zarządzanie zasobami energetycznymi w ciele owada jest hormon adipokinetyczny (AKH). AKH jest syntetyzowany i magazynowany w komórkach neuroendokrynowych *corpora cardiaca*, które są ekwiwalentem przysadki mózgowej 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 prowadząc do zwiększonego poziomu trehalozy i diacylogliceroli w hemolimfie. Ponadto, w stadium larwalnym, AKH dostarcza energię do syntezy nowej kutikuli (Lorenz and Gäde, 2009) czy niwelowania stresu oksydacyjnego (Večeřa i in., 2012). Ciało tłuszczowe jest głównym organem odpowiedzialnym za metabolizm pośredni owadów. Podczas rozwoju owada, ciało tłuszczowe podlega nieustannej przebudowie, a proces ten jest ściśle regulowany. Zarówno neurohormon AKH jak i UCP, kluczowe białko mitochondrialne odpowiedzialne za rozpraszanie energii, znacząco wpływają na metabolizm komórkowy i równowagę energetyczną. Dlatego też celem moich dalszych badań było sprawdzenie wpływu AKH na ekspresję i aktywność *ZaUCP4* w ciele tłuszczowym chrząszcza *Z. atratus* w stadium larwy i poczwarki, z uwzględnieniem towarzyszących temu zmian w metabolizmie węglowodanowym i lipidowym (Słocińska i in., 2013, poz. 3). W badaniach zastosowaliśmy neurohormon Tenmo-AKH (pELNFSPNWa), bioanalog z rodziny AKH/HrTH zidentyfikowany w gruczołach neuroendokrynowych dorosłych chrząszczy *Z. atratus* (Gäde and Rosiński, 1990). Larwom i poczwarkom iniekowano Tenmo-AKH, po czym po upływie 24 oraz 48 godzin analizowano wpływ hormonu na zawartość lipidów i węglowodanów w ciele tłuszczowym chrząszcza a obserwowane zmiany korelowano z aktywnością i ekspresją *ZaUCP4* w mitochondriach. Przeprowadzone badania pokazują, że u larw traktowanych hormonem 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, co może stanowić zabezpieczenie przed przekształcaniem się do lipidów węglowodanów pochodzących z hemolimfy. W ciele tłuszczowym poczwarek obserwowano natomiast obniżenie całkowitej puli lipidów, z jednoczesnym spadkiem zawartości wolnych kwasów tłuszczowych. Taka odpowiedź może być związana z intensywnym transportem kwasów tłuszczowych z ciała tłuszczowego do hemolimfy podczas

mobilizacji rezerw triglicerydów. Otrzymane przeze mnie wyniki wskazały wyraźnie na plejotropowe działanie hormonu adipokinetycznego i jego odmienną rolę w metabolizmie ciała tłuszczowego larw i poczwerek. AKH pełni nie tylko funkcję hormonu mobilizującego rezerwy energetyczne ale także hamuje szlaki anaboliczne, takie jak synteza lipidów w ciele tłuszczowym larw. Do tej pory nie wiadomo, które enzymy szlaków biosyntezy lipidów i kwasów tłuszczowych są kontrolowane przez AKH. Poprzez analogię z oddziaływaniem glukagonu u ssaków, sugeruje się hamowanie przez AKH acetylo-karboksylazy CoA i oddziaływanie w ten sposób na proces syntezy lipidów (Lorenz, 2003). Modyfikacjom metabolicznym zachodzącym w ciele owada pod wpływem AKH towarzyszyły zmiany w aktywności i ekspresji *ZaUCP4*. Przeprowadzone badania wykazały obniżenie jego ekspresji na poziomie mRNA oraz białka, zarówno po 24, jak i po 48 godzinach od iniekcji neurohormonu. Spadek aktywności *ZaUCP4* obserwowano dopiero po 48 godzinach i tylko w stadium larwalnym. Otrzymane przeze mnie wyniki sugerują, że AKH wpływa na ekspresję i aktywność *ZaUCP4* poprzez uruchamianie wielu procesów metabolicznych, co prawdopodobnie wynika z plejotropowego charakteru tego hormonu.

Kolejnym hormonem, którego oddziaływanie na bioenergetykę ciała tłuszczowego oraz aktywność i ekspresję *ZaUCP4* badano była niesulfonowana sulfakinina, Zopat-SK-1 (pETSDDYGHLRFa) (Słocińska i in., 2016, poz. 4), zidentyfikowana w mózgu *Z. atratus* (Marciniak i in., 2011). Sulfakininy należą do rodziny neuropeptydów bezkręgowców o strukturalnym i funkcjonalnym podobieństwie do cholecystokininy/gastryny ssaków (Dockray, 2009). Zaangażowane są w liczne procesy fizjologiczne, takie jak kontrola przyjmowania pokarmu i trawienie. Aktywność sulfakinin z niesulfonowaną resztą tyrozynową (nSK) wykazano po raz pierwszy u muszki *D. melanogaster* (Nichols 1997), u której neurohormon ten hamował skurcze jelita. Kolejne prace wskazywały na udział nSK w modulowaniu czynności kurczliwej serca, jelit oraz regulacji poziomu węglowodanów i lipidów w ciele tłuszczowym larw i poczwerek chrząszcza *Z. atratus* (Słocińska i in., 2015). W przeprowadzonych przeze mnie eksperymentach stwierdzono, że podanie larwom 20 pmoli Zopat-SK-1 powodowało obniżenie tempa oddychania mitochondriów izolowanych po 2 oraz 24 godzinach od iniekcji hormonu (Słocińska i in., 2016, poz. 4). Obniżenie oddychania obserwowano zarówno w stanie 3 fosforulującym, jak i w stanie 4 spoczynkowym, przy czym wydajność fosforylacji oksydacyjnej (syntezy ADP/O) oraz kontrola oddechowa pozostawały

bez zmian. Wpływ Zopat-SK-1 na aktywność oksydazy cytochromowej (COX), enzymu markerowego integralności błon zewnętrznych i biogenezy mitochondriów oraz syntazy cytrynianowej (CS), kluczowego enzymu cyku Krebsa i markera macierzy mitochondrialnej analizowano w homogenacie i izolowanych mitochondriach ciała tłuszczowego. Spadek aktywności COX w homogenacie ciała tłuszczowego oraz CS w izolowanych mitochondriach sugeruje obniżenie tempa oddychania tlenowego przez mitochondria, zarówno na poziomie łańcucha oddechowego, jak i cyklu Krebsa. Zahamowanie utleniania bursztynianu, użytego jako substrat oddechowy dla mitochondriów, może wskazywać na rolę Zopat-SK-1 w regulacji aktywności dehydrogenazy bursztynianowej (kompleks II łańcucha oddechowego). Zmianom w tempie oddychania mitochondriów towarzyszyła zmniejszona aktywność *ZaUCP4*, co mogłoby sugerować, że Zopat-SK-1, podobnie jak cholecystokinina ssaków bierze udział w regulacji metabolizmu energetycznego w zależności od aktualnego zapotrzebowania energetycznego zwierzęcia i w konsekwencji oddziałuje na pobieranie pokarmu przez żerującą larwę. Pomimo braku zmian na poziomie białka *ZaUCP4*, ekspresja na poziomie mRNA, wzrastała istotnie już po 2 godzinach od wstrzyknięcia hormonu. Szybka odpowiedź na poziomie mRNA może wynikać ze wzrostu ilości kwasów tłuszczowych, które obserwowano po podaniu niesulfonowanej sulfakininy Zopat-SK-1, a które prawdopodobnie aktywują miejsca promotorowe genu.

Oba badane przeze mnie hormony aktywują w ciele owadów ścieżkę sygnalizacyjną, w której pośredniczą receptory metabotropowe sprzężone z białkami G (GPCR). Stwierdzono, że u *T. castaneum* nSK mogą stymulować ścieżki sygnalizacyjne, w których powstają II- rzędowe przekaźniki sygnału, zarówno cAMP jak i Ca^{2+} , aktywujące kinazy białkowe fosforylujące i modyfikujące białka docelowe (Zels i in., 2014). Uruchomienie szlaku cAMP może powodować fosforylację kompleksów łańcucha oddechowego i hamować ich działanie, w odpowiedzi na zmniejszone zapotrzebowanie energetyczne (Velsecchi i in., 2013). Aktywacja receptorów AKH, podobnie jak receptorów sulfakininy przebiega z udziałem II rzędowych cząsteczek sygnałowych. Aktywacja receptorów AKH w wyniku stresu oksydacyjnego, podczas odżywiania, czy zmiany temperatury może wpływać pośrednio lub bezpośrednio na ekspresję i poziom *UCP4* owadów (Słocińska i in., poz. 7). Indukcja szlaków metabolicznych w ciele tłuszczowym przez AKH, takich jak lipoliza, może prowadzić do wzrostu wolnych kwasów tłuszczowych i wpływać na miejsca regulatorowe

geny, z kolei stres oksydacyjny wywołany zwiększonym metabolizmem, może prowadzić do aktywacji UCP4.

W trakcie naszych badań pojawiło się kolejne pytanie, czy u owadów białka UCP współpracują z innymi białkami rozpraszającymi energię błony wewnętrznej mitochondriów w regulacji metabolizmu energetycznego i produkcji reaktywnych form tlenu (RFT). Hipoteza postawiona wcześniej przez Szewczyka i in., (2009) wskazywała na współpracę UCP z kanałami potasowymi zależnymi od ATP (mitoK_{ATP}). Hipoteza ta zakłada, że w warunkach stresu oksydacyjnego, wzmożona produkcja RFT aktywuje obydwa mitochondrialne systemy rozpraszające energię, UCP i mitoK_{ATP}, co obniża wydajność fosforylacji oksydacyjnej.

Mitochondrialne kanały potasowe zależne od ATP

Budowa molekularna mitochondrialnych kanałów potasowych (mitoK_{ATP}) nie została dotąd poznana, a dane dotyczące właściwości kanału pochodzą głównie z testów farmakologicznych i badań w układach rekonstruowanych. Kanały mitoK_{ATP} wykazują duże podobieństwo do kanałów potasowych obecnych w błonie komórkowej. Zbudowane są z 2 podjednostek Kir6.1 i/lub Kir6.2, tworzących por kanału oraz podjednostek Sur, stanowiących receptor dla pochodnych sulfonocymidynu. Podjednostka Sur posiada domenę wiążącą ATP. Przypuszcza się, że w skład kanału wchodzi dehydrogenaza bursztynianowa (Szewczyk i in., 2009). Podobnie jak plazmatyczne kanały potasowe, mitoK_{ATP} są stymulowane przez farmakologiczne aktywatory (np. diazoksyd czy pinacidil) i hamowane przez pochodne sulfonocymidynu (np. glibenklamid) i ATP. Główną funkcją mitoK_{ATP} jest transport jonów K⁺ do matriksu mitochondrialnego, co prowadzi do wzrostu jej objętości i alkalizacji środowiska matriksu oraz regulacja poziomu RFT (Kowaltowski i in., 2009).

W momencie podejmowania przez mnie badań, mitochondrialne kanały potasowe owadów nie były jeszcze opisane. Dlatego też, pierwszym zadaniem była identyfikacja i charakterystyka mitoK_{ATP} w mitochondriach karaczana (**Słocińska i in., 2014, poz. 5**). Funkcjonalną identyfikację mitoK_{ATP} przeprowadziłam w mitochondriach izolowanych z mięśni i ciała tłuszczowego karaczana *G. coquereliana* przy pomocy znanych aktywatorów i inhibitorów kanału. Badania wykazały przyspieszenie tempa oddychania mitochondriów w niefosforylującym stanie oddechowym w obecności diazoksydu lub pinacidilu z

jednoczesnym spadkiem produkcji anionorodnika ponadtlenkowego. W mitochondriach karaczana, aktywność kanału mitoK_{ATP} była hamowana przez ATP i glibenklamid, co skutkowało obniżeniem tempa oddychania przez mitochondria i wzrostem produkcji RFT. Wyniki te wskazują, że podobnie do UCP, mitoK_{ATP} pełni rolę antyoksydacyjną w mitochondriach owadów, chroniąc komórki przed stresem oksydacyjnym. Immunologiczna identyfikacja mitoK_{ATP} w mitochondriach karaczana z zastosowaniem przeciwciał skierowanych przeciw plazmatycznemu kanałowi potasowemu ssaków, wskazuje na obecność podjednostki Kir 6.1 oraz Sur1 w strukturze kanału mitoK_{ATP} owadów.

Wiedząc, że zarówno UCP4 jak i mitoK_{ATP} biorą udział w obniżaniu produkcji anionorodnika ponadtlenkowego w mitochondriach karaczana, postanowiłam po raz pierwszy wykazać eksperymentalnie współpracę obu systemów rozpraszających w regulacji RFT w izolowanych mitochondriach owadów (Słocińska i in., 2016, poz. 6). W izolowanych mitochondriach karaczana, w warunkach kontrolnych, gdy aktywność UCP4 i mitoK_{ATP} nie była stymulowana przez specyficzne aktywatory tych białek obserwowaliśmy wysoki poziom produkcji anionorodnika ponadtlenkowego. Równoczesna aktywacja UCP4 (przez kwas palmitynowy) oraz mitoK_{ATP} (przez pinacidil) prowadziła do znacznego spadku produkcji anionorodnika ponadtlenkowego (O₂⁻). UCP oraz mitoK_{ATP} aktywowane oddzielnie nie prowadziły do tak znaczącego obniżenia RFT, jak wtedy gdy były aktywowane razem. Dodanie inhibitorów powodowało wzrost poziomu produkcji RFT, przy czym efekt GTP, inhibitora UCP był silniejszy niż ATP, inhibitora mitoK_{ATP}. Wyniki te stanowią pierwszy dowód doświadczalny pokazujący współpracę UCP i mitoK_{ATP} w regulacji produkcji RFT w mitochondriach owadów. Podobnych badań nie prowadzono dotąd na żadnym innym materiale. Kumulacyjny efekt aktywacji obu systemów rozpraszających energię był widoczny w mitochondriach karaczana nie tylko w zwiększonym obniżaniu produkcji RFT ale także w zwiększonej szybkości oddychania. Wiele danych wskazuje, że zahamowaniu formowania RFT towarzyszy rozprężenie mitochondriów i wzrost tempa oddychania (Tahara i in., 2009). Jednocześnie aktywowane UCP i mitoK_{ATP} powodowały większy wzrost szybkości oddychania niż wtedy gdy były aktywowane oddzielnie. Aktywacja obu białek w obecności inhibitorów obniżała szybkość zużycia tlenu. Silniejsze działanie GTP może sugerować większą ilość UCP4 w porównaniu z mitoK_{ATP} w wewnętrznej błonie mitochondrialnej karaczana i/lub bardziej znaczącą rolę UCP4 w obniżaniu produkcji RFT. Ponadto, zmiany

obserwowane w mitochondriach mięśni są większe niż w mitochondriach ciała tłuszczowego, co jest zgodne z wcześniejszymi naszymi obserwacjami, z których wynika, że poziom ekspresji i aktywność UCP4 w mięśniach karaczana są większe. Wpływa to na efektywniejsze obniżanie produkcji O_2^- przez UCP4 w mitochondriach mięśni niż ciała tłuszczowego karaczana.

Podsumowanie

Za moje największe osiągnięcia uważam identyfikację i charakterystykę funkcjonalną i molekularną w mitochondriach owadów dwóch systemów rozpraszających energię: białka rozprężającego UCP4 oraz kanału potasowego, $mitoK_{ATP}$. Wykazałam, że aktywność oraz ekspresja UCP4 owadów (i) zależą od rodzaju tkanki i stadium rozwojowego owada oraz (ii) są regulowane przez hormony: hormon adipokinetyczny - AKH, odpowiednik glukagonu ssaków oraz niesulfonowaną sulfakininę, fizjologiczny analog cholecystokininy ssaków. Udowodniłam, że w mitochondriach tkanek peryferycznych owadów występuje izoforma UCP4, uważana dotąd za formę charakterystyczną dla centralnego układu nerwowego. Ponadto, po raz pierwszy zidentyfikowałam i scharakteryzowałam funkcjonalnie kanał potasowy zależny od ATP ($mitoK_{ATP}$) w mitochondriach owadów. Po raz pierwszy także, na przykładzie mitochondriów owadów, wykazałam współpracę dwóch systemów rozpraszających energię, $mitoK_{ATP}$ oraz UCP, w modulowaniu poziomu RFT, co wskazuje na ich podobną ochronną rolę w warunkach stresu oksydacyjnego.

W najbliższej przyszłości chciałabym odpowiedzieć na kilka interesujących pytań:

- Czy UCP owadów pełni funkcję termogenną? Wyniki uzyskane przez da Re (2014) na mutantach muszki oraz nasze wstępne eksperymenty przeprowadzone na karaczanie *G. coquereliana* w warunkach stresu niskiej temperatury sugerują termoregulacyjną rolę UCP4 u owadów.
- W jaki sposób stres oksydacyjny (na przykład wywołany chłodem) aktywuje obydwa systemy rozpraszające energię i w konsekwencji jak wpływa na regulację poziomu RFT?
- Czy sulfonowana i niesulfonowana sulfakinina współpracują ze sobą w regulacji metabolizmu energetycznego owadów?

- W jaki sposób sulfakinina (nSK) i hormon adipokinetyczny (AKH) współuczestniczą w zarządzaniu zasobami energetycznymi w komórkach owadów oraz w jaki sposób wpływają na ekspresję i aktywność UCP4 i mitoK_{ATP}?

Literatura uzupełniająca do pkt.4

Arrese, E.L., Soulages, J.L. 2010. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Ann. Rev. Entomology* 55: 207-225.

Cannon, B., Shabalina, I.G., Kramarova, T.V., Petrovic, N. and Nedergaard, N. (2006) Uncoupling proteins: a role in protection against reactive oxygen species--or not? *Biochim Biophys Acta* 1757: 449-458.

Dockray GJ. 2009. Cholecystokinin and gut-brain signalling. *Reg Pept* 155:6-10.

Fridell, Y.W., Sanchez-Blanco, A., Silvia B.A. and Helfand, S.L. 2004. Functional characterization of a *Drosophila* mitochondrial uncoupling protein. *J Bioenerg. Biomembr* 36: 219-228

Fridell, Y.W.C., Hoh, M., Kreneisz, O., Hosier, S., Chang, C., Scantling, D., Mulkey, D.K., Helfand, S.L. 2009. Increased uncoupling protein (UCP) activity in *Drosophila* insulin producing neurons attenuates insulin signaling and extends lifespan. *Aging* 1: 699-712.

Gäde, G., Rosinski, G. 1990. The primary structure of the hypertrehalosemic neuropeptide from tenebrionid beetles: a novel member of the AKH/RPCH family. *Peptides* 11: 455-459.

Hanak, P., Jezek, P. (2001) Mitochondrial uncoupling proteins and phylogenesis—UCP4 as the ancestral uncoupling protein. *FEBS Lett* 495: 137-141.

Hauser, F., Cazzamali, G., Williamson, M., Park, Li.,B, Tanaka, Y. et al. 2008. A genome-wide inventory of neurohormone GPCRs in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Front Neuroendocrinol* 29:142-165.

Iser, W.B, Kim, D., Bachman, E. and 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: 1090-1096.

Jarmuszkiewicz, W., Woyda-Ploszczyca, A.M., Krzeminska, N. and Sluse, E.F. 2010. Mitochondrial uncoupling proteins in unicellular eukaryotes. *Biochim Biophys Acta* 1797: 792-799.

Keller, P.A., Lehr, L., Giacobino, J.P., Charnay, Y., Assimacopoulos-Jeannet, F. and Giovannini, N. 2005. Cloning, ontogenesis and localization of an atypical uncoupling protein 4 in *Xenopus laevis*. *Physiol Genomics* 22: 339-345.

Kowaltowski, A.J, de Souza-Pinto NC, Castilho, RF. Vercesi, AE. 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biol and Med* 47:333-343.

Lorenz, M.W. 2003. Adipokinetic hormone inhibits the formation of energy stores and egg production in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 136: 197-206.

Lorenz, M.W., Gäde G. 2009. Hormonal regulation of energy metabolism in insects as a driving force for performance. *Integr Comp Biol.* 49: 380-392.

Marciniak, P., Kuczer, M., Rosinski, G. 2011. New physiological activities of myosuppressin, sulfakinin and NVP-like peptide in *Zophobas atratus* beetle. *J Comp Physiol B* 81:721-730.

Nicholls, D.G., Locke, R.M. 1984. *Physiolol Rev* 64:1-64.

Nichols R. 2007. The first nonsulfated sulfakinin activity reported suggests nsDSK acts in gut biology. *Pept* 28:767-773.

Ricquier, D., Bouillaud, F. 2000. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance *J Physiol* 15: 529(Pt 1): 3-10.

Sanchez-Blanco, A., Fridell, Y.W. and Helfand, L.S. (2006) Involvement of *Drosophila* uncoupling protein 5 in metabolism and aging. *Genetics* 172: 1699-1710.

Smorodchenko, A., Rupprecht, A., Sarilova, I., Ninnemann, O., Brauer, A.U., Franke, K., Schumacher, S., Techritz, S., Nitsch, R., Schuelke, M. and Pohl, E.E. 2009. Comparative analysis of uncoupling protein 4 distribution in various tissues under physiological conditions and during development. *Biochim Biophys Acta* 1788: 2309–2319.

Szewczyk, A., Jarmuszkiewicz, W. and Kunz, W.S. 2009. Mitochondrial potassium channels. *IUBMB Life* 61, 134-143.

Tahara, E.B., Navarete, F.D. and Kowaltowski A.J. (2009). Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radical Biology and Medicine* 46: 1283-1297.

Valsecchi F, Ramos-Espiritu L, Buck J, Levin LR, Manfredi G. 2013. cAMP and mitochondria. *Physiol (Bethesda)* 28:199–209.

Van der Horst, D.J. 2003. Insect adipokinetic hormones: release and integration of flight energy metabolism. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 36: 217-226.

Večeřa, J., Krishnan, N., Mithöfer, A., Vogel, H., Kodrík, D. 2012. Adipokinetic hormone-induced antioxidant response in *Spodoptera littoralis*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 155: 389-395.

Zhang, M., Wang, B., Ni, Y.H., Liu, F., Fei, L., Pan, X.Q., Guo, M., Chen, R.H. and Guo, X.R. 2006. Overexpression of uncoupling protein 4 promotes proliferation and inhibits apoptosis and differentiation of preadipocytes. *Life Sci* 79: 1428–1435.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

Poza głównym nurtem badawczym prowadziłam i prowadzę badania w różnych obszarach biologii, głównie z pogranicza bioenergetyki i fizjologii zwierząt. Oprócz 7 prac wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego, w opublikowanym do tej pory dorobku naukowym posiadam 11 oryginalnych prac z tzw. listy filadelfijskiej (indeksowane przez ISI Web of Science), pozostałe 5 prac to publikacje w języku angielskim w czasopismach nieindeksowanych lub polskojęzycznych), oraz doniesień na 18 specjalistycznych konferencjach międzynarodowych z dziedziny bioenergetyki i fizjologii owadów (wymienione w załączniku nr 6). W 7 publikacjach (poza osiągnięciem naukowym) jestem pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym.

Sumaryczny impact factor (zgodnie z rokiem opublikowania) wszystkich publikacji stanowiących mój dorobek naukowy, łącznie z osiągnięciem habilitacyjnym wynosi 38.6, a sumaryczna liczba punktów MNiSW, 450.

Od początku mojej przygody z nauką, moje zainteresowania koncentrowały się wokół tematów związanych z bioenergetyką i fizjologią mitochondriów. Podczas studiów doktoranckich badałam zagadnienie dotyczącego mitochondrialnego receptora benzodiazepin (PRB) u jednokomórkowych *Eukaryota*, takich jak ameba *Acanthamoeba castellanii* oraz drożdże *Saccharomyces cerevisiae* (szczypty dzikie i mutanty pozbawione poryny mitochondrialnej czyli kanału VDAC). Benzodiazepiny to leki działające uspokajająco, przeciwdrgawkowo i nasennie. W ich działaniu pośredniczy receptor GABA_A znajdujący się w centralnym układzie nerwowym (CUN), ale miejsce wiązania tych substancji zidentyfikowano także w tkankach peryferycznych (Słocińska, 2002). Nasze badania wykazały, że obecność peryferycznego receptora dla benzodiazepin nie jest ograniczona tylko do ssaków, ale jest charakterystyczna także dla niższych organizmów eukariotycznych. We współpracy z prof. Adamem Szewczykiem z Laboratorium Kanałów Wewnątrzkomórkowych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w Warszawie, stosując specyficzny ligand mitochondrialnego receptora benzodiazepin Ro5-4864 wyznaczyliśmy powinowactwo, liganda do receptora, stałą dysocjacji K_D oraz liczbę miejsc wiążących B_{max} . Immunodetekcja oczyszczonej frakcji receptora potwierdziła obecność poryny mitochondrialnej, a także wskazała na obecność translokazy nukleotydów adeninowych (TNA) w budowie receptora, podobnie jak ma to miejsce u ssaków. Otrzymane wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie *Acta Biochimica Polonica* (Słocińska i in., 2004), a aktualny stan wiedzy na temat peryferycznego receptora benzodiazepin został omówiony w pracy przeglądowej i opublikowany w *Postęпах Biologii Komórki* (Słocińska, 2002).

Po obronie pracy doktorskiej (i urodzeniu mojej drugiej córki) wyjechałam na staż naukowy do Laboratory of Cubic Membranes National University w Singapurze, gdzie w ramach grantu otrzymanego przez prof. Yuru Deng badałam związek między długowiecznością kanarków *Serinus canarius* (średnia długość życia - 23 lata) a aktywnością i ekspresją białek rozpręgających (UCP). Uzyskane metodami bioenergetycznymi oraz techniką immunodetekcji wyniki wskazywały na znacznie większy poziom i aktywność UCP w mitochondriach izolowanych z mięśni szkieletowych i serca kanarków w porównaniu z mitochondriami izolowanymi z analogicznych tkanek myszy (średnia długość życia myszy *Mus musculus* to 3 lata). Choć bezpośredniego związku między długością życia badanych ptaków a białkiem rozpręgającym nie wykazano, przypuszcza się, że jego aktywacja

skutecznie obniża poziom wolnych rodników i tym samym zmniejsza stres oksydacyjny spowodowany wysokim tempem metabolicznym tych ptaków (Słocińska i in., 2010). Podczas pobytu na stażu naukowym w Singapurze byłam również zaangażowana w projekt badawczy dotyczący wpływu obniżonej wydajności pracy serca spowodowanej zawałem mięśnia sercowego na wydajność procesów energetycznych, ekspresję UCP i powstawanie ROS. Mitochondria izolowane z obszarów mięśnia sercowego nie objętych niedotlenieniem charakteryzowały się znacząco większą aktywnością i ekspresją UCP3 oraz mniej wydajną fosforylacją oksydacyjną. Poziom wolnych rodników we krwi pobranej z zatoki wieńcowej mierzony metodą elektronowego rezonansu magnetycznego (EPR) wzrastał wraz z czasem trwania niedotlenienia mięśnia sercowego, osiągając najwyższą wartość po 24 h. (Almsherqi i in., 2006), co prawdopodobnie wiązało się ze zwiększoną aktywnością i poziomem UCP3.

Po powrocie do Polski i zatrudnieniu w Zakładzie Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt skoncentrowałam swoje badania na regulacji i modyfikacji procesów fizjologicznych i metabolizmu owadów przez cząsteczki pochodzenia roślinnego oraz naturalnie występujące w ciele owadów peptydy i hormony. Jednym z pierwszych realizowanych przeze mnie w Zakładzie projektów był grant międzyuczelniany UAM-AR, „Poszukiwanie nowych aktywności antynowotworowych alloferonu i jego analogów”, którego byłam kierownikiem. Alloferon to peptyd wyizolowany po raz pierwszy z hemolimfy zainfekowanej eksperymentalnie larwy muchy *Calliphora vicina* (Chernysch i in., 2002). Wykazano, że jego aktywność stymuluje cytotoksyczną aktywność NK i syntezę interferonu u ludzi oraz wzmacnia aktywność antywirusową i antynowotworową u myszy. Nasze badania wykonaliśmy na liniach komórkowych dwóch najbardziej inwazyjnych pod względem umieralności nowotworów: raka wątrobowokomórkowego oraz gruczolakoraka. Uzyskane wyniki pokazały, że badane cząsteczki skutecznie obniżają aktywność enzymów mitochondrialnych oraz osłabiają żywotność komórek nowotworowych, co wskazywałoby na potencjalne zastosowanie alloferonu i jego analogów w terapii chorób nowotworowych. Otrzymane wyniki zaprezentowaliśmy na Central European Congress of Life Sciences “EUROBIOTECH ” w Krakowie, w 2008 roku. Działanie alloferonu oraz innych aktywnych cząsteczek produkowanych przez owady o działaniu antywirusowym oraz antynowotworowym przedstawiono w pracy przeglądowej „Insect antiviral and anticancer peptides - new leads for the future ? (Słocińska i in., 2008). W trakcie pierwszych lat mojej

pracy w ZFBRZ badałam także aktywność związków pochodzenia roślinnego, jak i peptydów owadzych na aktywność kurczliwą serca owada.

Jednymi z ciekawszych badanych przeze mnie związków były glikoalkaloidy ekstrahowane z liści ziemniaków, które okazały się być silnymi inhibitorami aktywności serca badanych chrząszczy *Z. atratus* i *T. molitor* (**Marciniak i in., 2010**). Związki te stanowią obiecującą perspektywę do dalszych badań, w których naturalne substancje modułują procesy fizjologiczne owadów. W przyszłości cząsteczki o takiej aktywności mogłyby zostać wykorzystane jako insektycydy, jednakże niezbędne są dalsze szczegółowe analizy dotyczące charakteru oddziaływania badanych związków na procesy fizjologiczne owada. Testowi sercowemu były także poddawane analogi peptydu Led-NPF-I, ze zmienioną pozycją kluczowego dla niego aminokwasu-argininy. Led-NPF-I jest odpowiednikiem krótkich neuropeptydów NPF kręgowców; u owadów wpływa na różne procesy fizjologiczne, w tym odżywianie i rozmnażanie. Z przeprowadzonych badań wynika, że zmiana argininy w pozycji 2 na *N*-końcu w mniejszym stopniu wpływa na parametry kurczliwe serca niż zamiana argininy w pozycji 7 i 9 na *C*-końcu analizowanego łańcucha aminokwasowego (**Marciniak i in., 2009**).

We współpracy z leśnikami z Akademii Rolniczej w Poznaniu badaliśmy również wpływ peptydów, takich jak: proktolina, CCAP i FMRFamid na aktywność kurczliwą jajowodów szkodnika leśnego, szeliniaka sosnowego (*Hylobius abietis*). Każdy z analizowanych peptydów w zróżnicowanym stopniu stymulował aktywność kurczliwą jajowodu. Otrzymane wyniki wykazały, że proktolina, CCAP i FMRFamid mogą być regulatorami procesów życiowych szeliniaka, takich jak składanie jaj. Kontynuacja badań wydawałaby się uzasadniona, ponieważ kontrola rozrodczości szkodnika mogłaby znaleźć swój praktyczny aspekt w leśnictwie (**Rosinski i in., 2011**).

W dalszych badaniach skoncentrowałam się na regulacji przemian metabolicznych zachodzących w ciele tłuszczowym owadów przez neurohormony przez nie produkowane. Wiele z cząsteczek wpływających na procesy fizjologiczne owadów ma swój strukturalny i/lub funkcjonalny odpowiednik u ssaków, a badanie aktywności i mechanizmów działania hormonów owadów może przyczynić się do poznania patofizjologii wielu chorób metabolicznych (np. cukrzycy i otyłości) i sposobów ich leczenia. Ciało tłuszczowe, fizjologiczny analog wątroby i cytologiczny odpowiednik tkanki tłuszczowej ssaków jest głównym miejscem metabolizmu pośredniego owadów. Kluczową rolę w regulacji poziomu

lipidów i węglowodanów w ciele tłuszczowym pełni hormon adipokinetyczny (AKH) syntetyzowany i uwalniany z *corpora cardiaca* analog glukagonu u ssaków (Gade i Rosinski, 1990). Celem naszych badań było określenie wpływu AKH na skład lipidów w ciele tłuszczowym intensywnie żerujących larw i poczwerek. Ekstrakty lipidów z ciała tłuszczowego owadów kontrolnych (iniegowanych roztworem fizjologicznym) oraz owadów, którym aplikowano hormon AKH, analizowano za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS). Otrzymane wyniki wskazują na główny udział kwasów tłuszczowych (głównie kwasu palmitynowego) i ich estrów w całkowitej puli lipidów u przedstawicieli obu stadiów rozwojowych. Poziom kwasów tłuszczowych znacząco wzrasta po dodaniu AKH w ciele tłuszczowym larw i spada w ciele tłuszczowym poczwerek. Z kolei poziom estrów kwasów tłuszczowych ulegał obniżeniu zarówno u larw jak i u poczwerek. Wskazuje to na bezpośredni udział AKH w regulacji metabolizmu poszczególnych lipidów w zależności od stadium rozwojowego, zapotrzebowania energetycznego i przyjmowania pokarmu (**Gołębiowski in., 2014**).

Innym ważnym hormonem z punktu widzenia regulacji metabolizmu i przyjmowania pokarmu przez owady jest sulfakinina, strukturalny i funkcjonalny homolog gastryny/cholecystokininy kręgowców, którego aktywność może być modulowana przez AKH (Zels i in.2014). Dlatego kolejnym naszym celem było zbadanie wpływu jedynej (do tej pory) odkrytej w mózgu chrząszcza *Z. atratus* sulfakininy, Zopat-SK-1 (pETSDDYGHLLRFa) na poziom glikogenu, białek i lipidów w ciele tłuszczowym i głównego cukru hemolimfy owadów, trehalozy (**Słocińska i in., 2014**). Po raz pierwszy wykazaliśmy, że podanie Zopat-SK-1 żerującym larwom zmienia poziom kluczowych metabolitów. W trakcie badań zaobserwowaliśmy wzrost stężenia lipidów, białka i spadek glikogenu przy jednoczesnym wzroście zawartości wolnych cukrów i obniżeniu poziomu glukozy w hemolimfie u chrząszczy traktowanych hormonem. U owadów w stadium przedpoczwarki nie obserwowano żadnych zmian. Otrzymane rezultaty wskazują na zaangażowanie niesulfonowanej sulfakininy Zopat-SK-1 w procesy magazynowania i uwalniania energii oraz regulację metabolizmu energetycznego w ciele owada.

W celu wyeliminowania czynników endokrynowych syntetyzowanych w mózgu i kompleksie retrocerebralnym, które mogłyby wpływać na aktywność Zopat-SK-1, wykonaliśmy przewiązki zagłowe i badania *in vitro*. Badania te pokazały, że Zopat-SK-1 u larw z przewiązką (którym odcięto dopływ hormonów z części mózgowej i gruczołów

neurosekrecyjnych) wywoływał dużo silniejszy efekt glikogenolityczny w ciele tłuszczowym i silniejszy efekt hipertrehalozemiczny w hemolimfie niż u larw nie posiadających przewiązki (Słocińska i in., 2015). Wskazuje to na obecność osi mózgowo- jelitowej u owadów, która kontroluje metabolizm węglowodanowy. Metodami immunologicznymi wykazaliśmy obecność receptora sulfakininy (cholecystokinin-like receptor), co sugeruje jego wysoką homologię receptora do receptora cholecystokinininy ssaków. Wpływ AKH, sulfakinin oraz innych hormonów na skład lipidów oraz stosowane obecnie w badaniach metody analizy lipidów zostały opisane w pracy przeglądowej (Cerkowniak i in., 2015). Rezultaty moich badań dotyczących regulacji metabolizmu ciała tłuszczowego przez sulfakininy miałam przyjemność zaprezentować podczas tygodniowego stażu naukowo-dydaktycznego w grupie kierowanej przez profesora Josefa van den Broecka, Molecular Developmental Physiology and Signal Transduction na Wydziale Biologii Uniwersytetu Katolickiego w Leuven w Belgii.

Jednym z równoległych kierunków badawczych, którymi zainteresowałam się w ostatnim czasie jest wpływ chłodu na metabolizm owadów tropikalnych. W obliczu globalnych zmian klimatu, temat wpływu temperatury na mechanizmy odpowiedzi zachodzące w organizmach jednej z najbardziej plastycznych pod względem przystosowania do zmian środowiskowych grup zwierząt wydają się bardzo interesujące. Owady, przystosowując się do przeżywania niskich temperatur wykształciły szereg molekularnych mechanizmów krioprotekcyjnych, które determinują zdolność owadów do ochrony ich tkanek i komórek przed skutkami oddziaływania niskich temperatur. Należą do nich mechanizmy enzymatyczne, dehydratacja udział białek przeciwdziałających zamarzaniu, białek szoku cieplnego oraz czynników indukujących powstawanie kryształów lodu w ciele owadów w reakcji na stres zimna (Gartych i in., 2015).

Mechanizmy odpowiedzi na ten czynnik stresowy u owadów strefy tropikalnej nie są dokładnie poznane. Wraz ze studentami z koła naukowego entomologów zadaliśmy sobie pytanie, czy owady tej strefy dysponują podobnymi mechanizmami ochronnymi przed stresem chłodu co owady należące do strefy umiarkowanej. Wspólnie zrealizowaliśmy projekt, w którym stresowi chłodu przez 8 h oraz 3 x 8 h poddawaliśmy karaczany madagaskarskie *G. coquereliana*, a następnie analizowaliśmy skład cukrów hemolimfy, poziom glikogenu, lipidów i białek w ciele tłuszczowym oraz ekspresję HSP i AQP (Chowański in., 2015). Przeprowadzone przez nas badania wskazują na wzrost ilości polioli i glukozy w hemolimfie, spadek zawartości glikogenu oraz wzrost poziomu białka całkowitego

w ciele tłuszczowym. Analiza poziomu AQP i HSP metodami immunologicznymi wykazała indukcję ekspresji AQP oraz zmiany w ekspresji HSP, w tym pojawienie się nowej izoformy tego białka. Otrzymane wyniki sugerują istotną funkcję ciała tłuszczowego w odpowiedzi na spadek temperatury u badanego przedstawiciela owadów tropikalnych. Przypuszcza się, że u owadów w warunkach spadku temperatury ciało tłuszczowe może pełnić funkcję termogenną. Badania nad wpływem chłodu na metabolizm owadów tropikalnych są obecnie kontynuowane, a publikacja przedstawiająca zmiany w metabolizmie energetycznym w mięśniach i ciele tłuszczowym karaczana *G. coquereliana* zachodzące pod wpływem stresu chłodu jest obecnie w recenzji (PLOS ONE).

Moja działalność naukowo-badawcza została doceniona przez JM Rektora, z rąk którego pięciokrotnie odbierałam Nagrody Zespołowe II i III stopnia.

Wykaz wszystkich prac oraz działań składających się na aktywność naukową przedstawiłam w załączonym wykazie opublikowanych prac naukowych (Załącznik 6).

Literatura uzupełniająca do pkt.5

- Chernysh, S., Kim, S.I., Bekker, G., Pleskach, V.A., Filatova, N.A., Anikin, V.B., Platonov, V.G. 2002. Antiviral and antitumor peptides from insects. *Bulet P.Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(20):12628-12632.
- Gäde, G., Rosinski, G. 1990. The primary structure of the hypertrehalosemic neuropeptide from tenebrionid beetles: a novel member of the AKH/RPCH family. *Peptides* 11: 455-459.
- Hauser F., Cazzamali, G., Williamson, M., Park, Y., Li, B., Tanaka, Y. 2008. A genome-wide inventory of neurohormone GPCRs in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Front Neuroendocrinol* 29:142-165.
- Nichols, R. 2007. The first nonsulfated sulfakinin activity reported suggests nsDSK acts in gut biology. *Pept* 28:767-773.
- Zels, S., Verlinden, H., Dillen, S., Vleugels, R., Nachman, R.J., Vanden Broeck, J. 2014. Signaling properties and pharmacological analysis of two sulfakinin receptors from the red flour beetle, *Tribolium castaneum* *PLoS One* 9:9(4)

6. Dane bibliometryczne (na dzień 19.12.2016).

- Sumaryczny impact factor wg. listy Journal Citation Reports - **38.6** (wg. roku publikacji)
- Sumaryczna liczba punktów MNiSW (2015) - **450**
- Liczba cytowań wg. Web of Science (WoS): **94**, Google Scholar: **124**
- Indeks Hirscha wg. Web of Science: **6**, Google Scholar: **7**

M. Słocińska

