

---

**AUTOREFERAT**

---

Dr Małgorzata Wojtkowska

**Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu**  
**Wydział Biologii,**  
**Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii**  
**Zakład Bioenergetyki**

Poznań 2018

**1. Imię i Nazwisko**

Małgorzata Wojtkowska

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

1997

Dyplom ukończenia studiów magisterskich na kierunku Biologia, specjalność biologia molekularna, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza Poznań, Wydział Biologii.

2004

Dyplom doktora w zakresie biologia specjalność - Biochemia, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Biologii, tytuł: „Analiza kompleksu TOM mitochondriów ameby *Acanthamoeba castellanii*”.

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

2004 - obecnie

Adiunkt: Zakład Bioenergetyki, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza

**4. Wskazanie 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

**„Maszyneria importu białek do mitochondriów u przedstawicieli Amoebozoa”**

b) Wykaz autorskich publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

\*autor korespondujący; autor równorzędny

**[1] Wojtkowska M, Jąkowski M, Pieńkowska J, Stobienia O, Karachitos A, Przytycka TM, Weiner J, Kmita H, Makałowski W (2012). Phylogenetic analysis of mitochondrial outer membrane  $\beta$ -barrel channels. *Genome Biol Evol* 4, 110-125. [IF 4,759; (5-Yr IF 4,859), MNiSW 35, liczba cytowań 8]**

**[2] Wojtkowska M\*, Buczek D, Stobienia O, Karachitos A, Antoniewicz M, Słocińska M, Makałowski M, Kmita H (2015). The TOM Complex of Amoebozoans: the Cases of the Amoeba *Acanthamoeba castellanii* and the Slime Mold *Dictyostelium discoideum*. *Protist* 166, 349-362. [IF 2,898 (5-Yr IF 2,949), MNiSW 30, liczba cytowań 3]**

**[3] Buczek D, Wojtkowska M, Suzuki Y, Sonobe S, Nishigami Y, Antoniewicz M, Kmita H, Makałowski W (2016). Protein import complexes in the mitochondrial outer membrane of Amoebozoa representatives. *BMC Genomics* 17, 99. [IF 3,729, (5-Yr IF 4.284), MNiSW 35, liczba cytowań 3]**

[4] **Wojtkowska M\***, Kmita H (2016). Organizacja kompleksów importowych - perspektywa filogenetyczna. *Postępy Biochem.* 2016;62(2):103-110. [MNIŚW 8]

[5] **Wojtkowska M\***, Buczek D, Suzuki Y, Shabardina V, Makałowski W, Kmita H (2017). The emerging picture of the mitochondrial protein import complexes of Amoebozoa supergroup. *BMC Genomics*, 2017; 18:997. [IF 3,79, (5-Yr IF 4.284), MNIŚW 40]

Osiągnięcie naukowe, będące podstawą ubiegania się o stopień doktora habilitowanego, stanowi cykl czterech oryginalnych publikacji naukowych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports i jednej pracy przeglądowej, opublikowanych w latach 2012-2017. **Sumaryczny „impact factor”** tych prac (zgodny z rokiem opublikowania) wynosi **15,115**, a sumaryczna liczba punktów **MNIŚW - 148**. W trzech jestem pierwszym autorem oraz autorem korespondującym. Trzy pierwsze publikacje (pozycja 1-3) finansowane były w ramach projektu „Charakterystyka kompleksów błony zewnętrznej mitochondriów modelowych mikroorganizmów eukariotycznych przy wykorzystaniu analizy filogenetycznej”, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (N N303143937) i realizowanego w latach (2009-2013), którego byłem kierownikiem i głównym wykonawcą.

**c) Omówienie celu naukowego/ ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

Import białka do mitochondriów ma fundamentalne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania mitochondriów. Kluczową rolę w procesie rozpoznawania, translokacji i „składania” importowanych białek odgrywają występujące we wszystkich przedziałach mitochondrialnych kompleksy białkowe. Kompleksy te zbudowane są z szeregu podjednostek i pełnią funkcje translokaz i/lub insertaz. W oparciu o dane pochodzące z badań nad organizmami modelowymi, takimi jak drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, w błonie zewnętrznej wyróżniane są co najmniej trzy kompleksy, w błonie wewnętrznej cztery i trzy w przestrzeni międzybłonowej (Backers i Hermann, 2018; Stiller i in., 2016). W błonie zewnętrznej są to: kompleks TOM (z ang. translocase of the outer membrane), kompleks TOB/SAM (z ang. topogenesis of the mitochondrial outer membrane  $\beta$ -barrel proteins/sorting and assembly machinery) oraz MIM (z ang. mitochondrial import machinery). Kompleks TOM rozpoznaje i wprowadza większość białek kierowanych z cytozolu do różnych przedziałów mitochondrialnych, kompleks TOB/SAM odpowiada za wbudowanie w tę błonę białek o strukturze  $\beta$ -beczułki i bierze udział w złożeniu kompleksu TOM, a kompleks MIM prowadzi insercję białek zawierających jedną lub więcej transbłonowych helis i zlokalizowanych w błonie zewnętrznej. W wewnętrznej błonie zlokalizowane są następujące kompleksy; kompleks TIM22 (z ang. translocase of the inner membrane 22), kompleks TIM23 (z ang. translocase of the inner membrane 23), kompleks PAM (z ang. presequence translocase-associated motor) oraz OXA (z ang. cytochrome oxidase assembly). Kompleksy TIM22 i TIM23 odpowiadają za import prekursorów białek z sekwencją kierującą zlokalizowaną odpowiednio, wewnątrz sekwencji prekursora oraz na jego N końcu. Kompleks PAM oddziałuje z TIM23 podczas translokacji białka do macierzy mitochondrialnej, natomiast kompleks OXA uczestniczy we wprowadzaniu białek do błony wewnętrznej od strony macierzy mitochondrialnej (tzw. eksport białka). W przestrzeni międzybłonowej znajduje się kompleks MIA (z ang. mitochondrial intermembrane space import and assembly) oraz kompleksy małych białek opiekuńczych zwane „małymi białkami Tim”, tj. kompleksy Tim8-Tim13 i Tim9-Tim10-Tim12. Kompleks MIA jest odpowiedzialny za import białek przestrzeni międzybłonowej, które zawierają reszty cysteiny zdolne do tworzenia mostków siarczkowych i uczestniczące w reakcjach oksydo-redukcyjnych. Natomiast kompleksy Tim8-Tim13 i Tim9-Tim10-Tim12 oddziałują z kompleksami TOB/SAM i TIM22, nie dopuszczając do niewłaściwego, w obszarze przestrzeni międzybłonowej, fałdowania importowanego białka.

Dostępne dane literaturowe wskazują na nadal rosnącą liczbę identyfikowanych podjednostek kompleksów importowych, oraz złożoność dróg importu białek do różnych przedziałów mitochondrialnych (Kang i in., 2017; Neupert 2015). Dane te wskazują na występowanie podjednostek tworzonych przez białka obecne u przedstawicieli różnych linii rozwojowych, jak i podjednostek tworzonych przez białka charakterystyczne dla określonych linii rozwojowych. Te powtarzające się podjednostki to najczęściej białka pełniące kluczową rolę w importowych kompleksach, w tym białka o aktywności kanałów takie, jak Tom40, Tob55/Sam50, Tim22 i Tim23 (Mani in., 2015; Makiuchi i Nozaki, 2014). Co więcej, znane są też przykłady silnej redukcji składu podjednostkowego i złożoności analizowanych kompleksów importowych (Jedelsky i in., 2011), co z kolei można tłumaczyć brakiem homologów znanych podjednostek i możliwą obecnością białek o całkowicie odmiennej charakterystyce, lecz pełniących podobne funkcje związane z importem, lub wspomnianą redukcją w budowie aparatu importu. Wyłaniający się zatem obraz organizacji kompleksów importowych w mitochondriach przedstawicieli różnych linii rozwojowych Eukariota wskazuje na wyraźne zróżnicowanie. Co więcej, dotychczas w ukazujących się doniesieniach zwracano bardziej uwagę na różnice u przedstawicieli różnych linii rozwojowych niż w obrębie jednej wybranej linii. Stąd, jak dotąd brak wielu istotnych danych, które z pewnością mogłyby rozszerzyć naszą podstawową wiedzę o podjednostkach kompleksów importowych i ich funkcjonowaniu.

Supergrupa Amoebozoa, stanowi fascynującą grupę organizmów, zróżnicowaną pod względem budowy oraz funkcji życiowych. Do Amoebozoa zaliczamy organizmy z klasycznymi tj. „tlenowymi” mitochondriami takie, jak śluzowiec *Dictyostelium discoideum* i ameba *Acanthamoeba castellanii*, a także organizmy zawierające mitosomy, czyli zredukowaną formę mitochondriów, do których zalicza się żyjąca beztlenowo *Entamoeba histolitica*, uważana za pasożyta człowieka (Santos i in., 2016). Ameba *A. castellanii* oraz śluzowiec *D. discoideum* to organizmy wolnożyjące, jednokomórkowe, występujące głównie w wodach słodkich oraz w glebie (Wojtkowska i in., 2005). *A. castellanii* stanowi interesujący przedmiot badań z medycznego punktu widzenia, ponieważ uznawana jest za fakultatywnego pasożyta wywołującego u człowieka akantamebozę (Saheb i in., 2014; Leger i in., 2013). *A. castellanii*, łączy cechy świata roślin ze względu na obecność alternatywnej oksydazy (Henriquez i in., 2009) i zwierząt ponieważ zawiera białko rozprzegające (UCP z ang. uncoupling proteins) (Jarmuszkiewicz i in., 2010). Z kolei *D. discoideum* charakteryzuje się wyjątkowym cyklem życiowym, ponieważ w warunkach stresu jakim jest brak pożywienia, komórki dzięki uruchomionym procesom sygnalizacyjnym, agregują tworząc struktury wielokomórkowe. Stąd śluzowiec stanowi wyjątkowy model w badaniach nad procesami sygnalizacyjnymi, jak i w badaniach na poziomie jedno- i wielokomórkowym.

Pod względem ewolucyjnym, zgodnie z systemem klasyfikacji (Adl i in., 2012), supergrupa Amoebozoa została wyróżniona jako jedna z sześciu supergrup w królestwie Eukariota; Opisthokonta, Archeoplastida, Excavata, oraz Rhizaria i Chromoalveolata. Amoebozoa uznana została za siostrzaną grupę Opisthokonta, w skład, której wchodzi grzyby i zwierzęta (Adl i in., 2012). W obrębie supergrupy Amoebozoa wyróżniono zaś dwa taksony: Lobosa do której należy *A. castellanii* i Conosa reprezentowany przez *Dictyostelia* (m.in. *D. discoideum*). Zarówno więc pozycja filogenetyczna Amoebozoa, jak i jej zróżnicowanie pod względem budowy i wymagań życiowych oraz i przede wszystkim, brak wystarczających danych o budowie kompleksów importowych u jej przedstawicieli sprawiły, że supergrupa ta stała się dla mnie warta zainteresowania.

Zagadnieniem importu białka do mitochondriów zainteresowałam się już na studiach doktoranckich, w czasie których zajmowałam z importem białka do mitochondriów ameby *A. castellanii*. W wyniku przeprowadzonych badań udało mi się wykazać skuteczność heterologicznego importu białka do mitochondriów ameb oraz przedstawić wstępną charakterystykę przewodnictwa kanałowego poddanego rekonstrukcji w sztucznych błonach lipidowych (system BLM) izolowanego kompleksu TOM. Ponadto, wykorzystując technikę sieciowania, wskazałam na homologi podjednostek kompleksu oraz białka oddziałujące z kompleksem TOM. W tym czasie genom *A.*

*castellanii* nie został jeszcze zsekwencjonowany, dlatego identyfikacja podjednostek izolowanego kompleksu była niemożliwa i mogła dotyczyć tylko wskazania znajdujących się w bazach danych homologicznych białek. Wyniki otrzymane w ramach doktoratu zawarłam w pracy pt.: "An inception report of the TOM complex of the amoeba *Acanthamoeba castellanii*, a simple model of protozoa in mitochondria studies" opublikowanej w Journal of Bioenergetics and Biomembranes (JBB) w 2005 roku.

Po obronie pracy doktorskiej w roku 2004 (przedłużenie studiów doktoranckich z powodu urodzenia dwójki dzieci) rozpoczęłam pracę na etacie adiunkta w zespole dr hab. Hanny Kmity (Zakład Bioenergetyki), pozostając przy tematyce importu białka do mitochondriów. W 2007 i 2008 roku byłam stypendystką akcji 6 Programu Ramowego Badań, Rozwoju Technicznego Unii Europejskiej na podstawie kontraktu MTKD-CT-2004-517068, akronim: "FUNGEN", dzięki któremu odbyłam staż w laboratorium Prof. Waltera Neupert'a z Uniwersytetu Ludwika Maksymiliana (LMU) w Monachium, w zespole dr Marcela Deponta, zajmującego się analizą importu białka do mitochondriów, na przykładzie organizmów modelowych takich, jak *Neurospora crassa* i *S. cerevisiae* oraz *Plasmodium falciparum*. W tym czasie, miałam możliwość odbycia szkolenia dotyczącego prowadzenia hodowli śluzowca *D. discoideum* w zespole Prof. M. Schleicher'a (również LMU, Monachium), od którego otrzymałam szczep śluzowca *D. discoideum* AX2, na którym pracuję do dziś. W tym czasie rozpoczęłam również kierowanie projektem finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki "Charakterystyka kompleksów błony zewnętrznej mitochondriów modelowych mikroorganizmów eukariotycznych przy wykorzystaniu analizy filogenetycznej" (NN 303143937), który realizowałam w latach (2009 - 2013 – przedłużenie z tytułu urodzenia trzeciego dziecka), którego byłam kierownikiem i głównym wykonawcą.

W czasie mojego pobytu na Uniwersytecie w Monachium, pojawiły się fragmentaryczne dane dotyczące sekwencji genomu *A. castellanii*, dzięki czemu mogłam wykorzystać wyniki widm spektralnych otrzymane z sekwencjonowania białek mitochondrialnej błony zewnętrznej. **Wskazałam wówczas na obecność w zewnętrznej błonie mitochondrialnej *A. castellanii* trzech, kluczowych dla funkcjonowania mitochondriów białek o strukturze  $\beta$ -beczułki. Były to Tom40, Tob55/Sam50 oraz porównywalna mitochondrialna nazywana białkiem VDAC (z ang. voltage dependent anion selective channel) oraz w przypadku *D. discoideum* - Tob55/Sam50.** Sekwencje nukleotydowe kodujące białka *A. castellanii* o strukturze  $\beta$ -beczułki uzyskałam wykonując analizy bioinformatyczne, do których wykorzystywałam nieliczne wówczas, dostępne sekwencje ESTs (baza danych [www.estdb](http://www.estdb)) oraz fragmentaryczne dane z sekwencjonowanego genomu ameby. Wszystkie otrzymane sekwencje aminokwasowe zweryfikowałam w analizach spektrometrii mas (LC-MS/MS). W tamtym czasie adnotowałam sekwencję genu *TOM40*, którą, z udziałem dr Joanny Pieńkowskiej (Zakład Fizjologii Zwierząt Wydziału Biologii, UAM) potwierdziłam technikami PCR i 3'RACE. Sekwencje aminokwasowe Tom40, Sam50/Tob55 i VDAC śluzowca *D. discoideum* wskazałam wykonując podstawowe analizy BLASTp w odniesieniu do dostępnych danych pochodzących z projektu sekwencjonowania genomu *D. discoideum*, znajdujących się w bazie Dictybase (<http://dictybase.org>).

Następnie **zaplanowałam wykonanie analiz filogenetycznych z wykorzystaniem interesujących mnie białek o strukturze  $\beta$ -beczułki jako molekularnych markerów.** Moim celem było zweryfikowanie pozycji filogenetycznej modelowych organizmów *A. castellanii* i *D. discoideum* jako przedstawicieli Amoebozoa, w świetle wspomnianego najnowszego podziału Eukariota, wykorzystując do tego właśnie białka o strukturze  $\beta$ -beczułki pełniące niewątpliwie bardzo istotne funkcje. Część niezbędnych analiz bioinformatycznych w tym projekcie wykonał mgr Marcin Jąkałski, będący w tym czasie na studiach doktoranckich w Instytucie Bioinformatyki Uniwersytetu w Muenster w Niemczech, którego promotorem był współpracujący ze mną Prof. Wojciech Mąkałowski. Zebrane sekwencje białek Tom40, Sam50/Tob55 i VDAC pochodzących z różnych linii rozwojowych, zweryfikowałam wyróżniając poszczególne izoformy oraz eliminując sekwencje niepełne i pseudogeny. **Wykonane analizy filogenetyczne** (drzewa filogenetyczne otrzymane metodą

Maximum Likelihood), **wykazały, że Tom40, Tob55/Sam50 i VDAC przedstawiciele Archaeplastida i Opisthokonta grupują się zgodnie z najnowszym podziałem systematycznym Eukariota, ponieważ tworzą jasno zdefiniowane kłady o wysokiej wiarygodności statystycznej. Jednakże sekwencje przedstawiciele Amoebozoa, Chromaleolata i Excavata nie tworzyły odrębnych kładów.** Co więcej badane sekwencje Tom40, Sam50/Tob55, VDAC *A. castellanii* i *D. discoideum*, oraz innych przedstawiciele Amoebozoa grupowały się razem z sekwencjami Chromaleveolata, bliżej Archaeplastida (rośliny), tym samym odbiegając od aktualnie obowiązującego podziału systematycznego.

Po przestudiowaniu filogenetycznych relacji i ze szczególnym uwzględnieniem lokalizacji białek ameby *A. castellanii* i śluzowca *D. discoideum* w otrzymanych drzewach **po raz pierwszy wykazałam, że geny kodujące mitochondrialne białka o strukturze  $\beta$ -beczułki roślin, zwierząt i grzybów przeszły liczne duplikacje, przy czym w obrębie Amoebozoa nie stwierdziłam obecności izoformy dla żadnego z badanych białek. Wskazałam, natomiast na obecność izoform Tom40 u wszystkich kręgowców, a w przypadku Tob55/Sam50 tylko u ryb, a ich powstanie powiązałam z hipotetyczną duplikacją genomów, która towarzyszyła powstaniu kręgowców (Shoshan-Barmatz i in., 2010). Dowiodłam również, że mimo konserwatywności struktury i funkcji badanych białek, ich sekwencje aminokwasowe bardzo się od siebie różnią.**

Dysponując zbiorami sekwencji (alignments), które wykorzystano do budowy wspomnianych drzew filogenetycznych, w celu uwiarygodnienia kładów o niskiej istotności statystycznej w prezentowanych drzewach filogenetycznych, **wyzaczyłam tzw. markery kladystyczne**, które stanowiły powtarzające się reszty aminokwasowe w zestawionych zbiorach analizowanych sekwencji, charakterystyczne dla danego kladu. **Zaproponowałam wykorzystanie markerów kladystycznych do uwiarygodnienia wyników analiz filogenetycznych o niższej wiarygodności** (niskie wartości bootstrap). Ponadto, **liczbę wyznaczonych markerów skorelowałam ze stopniem specjalizacji białka i ich lokalizacją w przypuszczalnym segmencie badanego białka i pełnioną przez nie rolą.** I tak, białko Tob55/Sam50 zawiera najmniejszą liczbę markerów kladystycznych, ponieważ jest najbardziej wyspecjalizowanym kanałem, przeznaczonym do translokacji prawdopodobnie tylko wybranej grupy białek o strukturze  $\beta$ -beczułki i białek kotwiczących w błonie domeną  $\alpha$ -helikalną. Funkcja Tom40 jest bardziej złożona, ponieważ oprócz importu białka transportuje również metabolity (Antos i in., 2001), stąd liczba wskazanych markerów jest wyższa niż w przypadku Tob55/Sam50. Największą liczbę markerów kladystycznych wyznaczyłam dla VDAC, co tłumaczę występowaniem tego białka w trzech izoformach pełniących odmienne funkcje (Guardiani i in., 2018). Dla grup Chromalveolata, Excavata, Rhizaria i Amoebozoa nie znalazłam markerów kladystycznych, co powiązałam z wysokim zróżnicowaniem sekwencji organizmów reprezentujących te grupy i małą liczbą dostępnych sekwencji. Powyższe wyniki zostały przedstawione w pracy pt.: "Phylogenetic analysis of mitochondrial outer membrane  $\beta$ -barrel channels" opublikowanej w *Genome Biology and Evolution* (GBE) w 2012 roku [1].

W kolejnym etapie badań, postanowiłam zbadać pozostałe podjednostki kompleksów importowych analizując, poza *A. castellanii* i *D. discoideum*, również białka innych przedstawiciele Amoebozoa. Dzięki napływającym w tym czasie sekwencjom transkryptomów i genomów, postanowiłam skorzystać z dostępnych danych i włączyłam do analizy następujących przedstawiciele Amoebozoa: *Dictyostelium purpureum*, *Dictyostelium fasciculatum*, *Polysphondylium pallidum* należące do Conosa/Mycetozoa i beztlenowe, nie pasożytnicze ameby *Entamoeba dispar* i *Enatmoeba nuttallii*, należące do podgrupy Conosa/Archamoeba. Podjęłam współpracę z doktorantką Dorotą Buczek, w której przewodzie doktorskim pełniłam rolę promotora pomocniczego. Ponadto, kontynuowałam współpracę z prof. Hanną Kmitą, prof. Wojciechem Makałowskim oraz Prof. Yutaka Suzuki (Department of Medical Genome Science, Uniwersytet w Tokio), dzięki któremu wykonany został na potrzeby tych analiz transkryptom *A. castellanii* (AC\_RNAseq). Łącznie opublikowaliśmy trzy prace [2,3,5], w których przedstawiłam skład podjednostkowy kompleksów błony zewnętrznej TOM,

TOB/SAM; przestrzeni międzybłonowej: Tim9-Tim10-TIM12 i MIA oraz błony wewnętrznej: TIM22 TIM23, PAM i OXA.

W celu poznania składu podjednostkowego kompleksów importowych, w pierwszej kolejności zebrane zostały wszystkie znane sekwencje podjednostek poszczególnych kompleksów błony zewnętrznej: TOM, TOB/SAM, przestrzeni międzybłonowej: TIM9-TIM10-TIM12, MIA oraz błony wewnętrznej TIM22, TIM23, PAM i OXA, znajdujące się w bazach danych i zidentyfikowane u przedstawicieli wszystkich linii rozwojowych. Sekwencje te zostały wykorzystane jako pytanie do analiz typu tBLASTn wobec AC\_RNAseq. Dla białek niezidentyfikowanych przez tBLASTn, zastosowano program HMMER oparty na ukrytym modelu Markowa. Najdłuższe sekwencje otrzymanych transkryptów, zostały przepisane na sekwencje aminokwasowe (EXPASY) i porównane z dostępnymi sekwencjami *A. castellanii* w NCBI. Ponadto, przewidywane podjednostki dla *A. castellanii* wykorzystane zostały w programie BLASTp do przeszukania sekwencji białkowych śluzowców *D. discoideum*, *D. purpureum*, *D. fasciculatum*, *P. pallidum* i entameb *E. dispar* i *E. nuttalli*. W przypadku białek, dla których nie znaleziono kodujących je genów, wykorzystano algorytm tBLASTn wobec genomów *D. discoideum*, *D. purpureum*, *D. fasciculatum*, *P. pallidum*, *E. dispar* i *E. nuttalli*. Na końcu sekwencje referencyjne z różnych linii rozwojowych wykorzystano do identyfikacji wcześniej nie wskazanych sekwencji śluzowców i entameb.

#### Kompleksy importowe błony zewnętrznej

W wyniku przeprowadzonych analiz w pierwszej kolejności **podałam pełen skład podjednostkowy kompleksów błony zewnętrznej TOM dla *A. castellanii* i *D. discoideum*** (Tabela 1), **a uzyskane wyniki zweryfikowałam eksperymentalnie**. W tym celu, w przypadku ameby *A. castellanii* zaprojektowałam i wykonałam eksperymenty prowadzące do izolacji kompleksu TOM na złożu ze związanym przeciwciałem skierowanym przeciwko Tom40 (przeciwciało anti-Tom40 uzyskałam projektując peptyd, który posłużył do uzyskania odpowiedniego serum). Do izolacji kompleksu TOM z *A. castellanii* wykorzystywałam solubilizowaną frakcję pęcherzyków zewnętrznej błony mitochondrialnej oraz złożę typu Protein A. W przypadku śluzowca kompleks TOM wyizolowałam wykorzystując chromatografię powinowactwa do znakowanego białka receptorowego kompleksu TOM-Tom7 ze znacznikiem histydynowym, poddanego w komórkach śluzowca konstytutywnej ekspresji. Konstrukt oraz transformację komórek śluzowca wykonał współpracujący ze mną doktorant Andonis Karachitos. Uzyskane przeze mnie kompleksy po oczyszczeniu w gradiencie sacharozy oraz na kolumnie jonowymiennej typu MonoQ rozdzielałam w żelu natywnym typu blue native (BN), aby ocenić masę cząsteczkową kompleksów oraz w żelu denaturującym celem określenia pełnego składu podjednostkowego. W wyniku tego, **oszacowałam masę cząsteczkową kompleksu TOM ameby, która wynosi 450kD i śluzowca - 420kD**.

**W przypadku obu organizmów w analizie proteomicznej, zidentyfikowałam w izolowanym kompleksie TOM, 5 homologów podjednostek kompleksu (Tom70, Tom40, Tom20, Tom22, Tom7)**. Izolowane, natywne kompleksy TOM ameby i śluzowca poddane zostały następnie analizie funkcjonalnej, którą wykonał współpracujący ze mną wówczas dr Olgierd Stobienia. Wyniki te umożliwiły wyznaczenie wartości przewodnictwa kanałowego obu badanych kompleksów; dla ameby 2nS i dla śluzowca 1.8nS (1 M KCl przy 10 mV). Ponadto, kanały badanych kompleksów wykazywały porównywalne zmiany przewodnictwa w kierunku przewodnictw o niższych wartościach w obecności oddziałującego z kompleksem białka preSu9DHFR (prekursora sekwencji dla małej podjednostki ATP-azy). Opisane wyniki dotyczące charakterystyki kompleksów TOM ameby i śluzowca wykonane w układzie rekonstruowanym oraz wyniki analiz proteomicznych, zostały przedstawione w pracy o tytule "The TOM Complex of Amoebozoans: the Cases of the Amoeba *Acanthamoeba castellanii* and the Slime Mold *Dictyostelium discoideum*" opublikowanej w Protist w 2015 roku [2], której jestem pierwszym autorem i pełnię rolę autora korespondującego.

Następnie z wykorzystaniem wspomnianych analiz bioinformatycznych uzyskałam skład podjednostkowy kompleksów błony zewnętrznej (TOM i TOB/SAM) u pozostałych, wybranych do analizy przedstawicieli Amoebozoa (Tabela 1). Wyniki te zostały przedstawione w pracy pt.: "Protein import complexes in the mitochondrial outer membrane of Amoebozoa representatives" opublikowanej w BMC Genomics w 2016 roku [3]. W publikacji tej zawarte również zostały wyniki dotyczące analizy składu podjednostkowego kompleksów błony zewnętrznej *Amoeba proteus* oraz określenie składu podjednostkowego kompleksu ERMES. Zagadnienia te nie wchodzą w skład mojego osiągnięcia habilitacyjnego i zawierają się w rozprawie doktorskiej Doroty Buczek.

Na podstawie uzyskanych wyników, wskazałam na **wysokie zróżnicowanie składu podjednostkowego kompleksu TOM. Liczba wskazanych podjednostek kompleksu różni się dla analizowanych przedstawicieli Amoebozoa tak, że w tej samej grupie znajdują się organizmy, których kompleks TOM zbudowany jest z 5 podjednostek (*A. castellanii* i *D. discoideum*) przypominając tym samym pod względem budowy kompleksy TOM grzybów i zwierząt, oraz organizmy z bardzo zredukowanym (*E. nuttalli*), pod względem składu podjednostkowego kompleksem TOM, zawierającym wyłącznie główną podjednostkę, tj. Tom40. Kompleks TOM u *D. purpureum* i *D. fasciculatum* zbudowany jest z 3 podjednostek, zaś *P. pallidum* z 4. Co ciekawe, konserwatywne białko receptorowe Tom7, prawdopodobnie nie występuje u niektórych przedstawicieli śluzowców (*D. fasciculatum* i *D. purpureum*) oraz u *E. dispar* i *E. nuttalli*. Ponadto, u niemal wszystkich przedstawicieli Amoebozoa w składzie kompleksu TOM prawdopodobnie nie znajduje się Tom22, który u *A. castellanii* występuje w dwóch izoformach.**

**Stwierdziłam także, że pod względem składu podjednostkowego kompleks TOB/SAM wykazuje zdecydowanie mniejsze zróżnicowanie niż kompleks TOM.** W przypadku niemal każdego przedstawiciela Amoebozoa w skład badanego kompleksu wchodzi: Tob55/Sam50 oraz Metaksyna, uznawana za ortolog Sam37/Mas37 (Murcha i in., 2014), której genu nie wskazałam jedynie w przypadku entameb (*E. dispar* i *E. nuttalli*).

Jak wspomniałam powyżej, w **przypadku entameb, na podstawie wskazanych sekwencji podjednostek badanych kompleksów błony zewnętrznej, zauważyłam redukcję składu podjednostkowego badanych kompleksów w porównaniu do pozostałych przedstawicieli Amoebozoa.** Zjawisko redukcji aparatu importu wykazano w przypadku organizmów zawierających mitosomy, tj. zredukowaną formę mitochondriów powstałą na skutek odpowiedzi na warunki beztlenowe i/lub pasożytniczy tryb życia (Dolezal., 2010). Obecność mitosomów udowodniono w przypadku innych gatunków entameb tj. *E. invadens* blisko spokrewnionych z *E. histolytica* (Dolezal., 2010). Jednak w przypadku badanych entameb *E. nuttalli* i *E. dispar*, nie ma jednoznacznych dowodów na obecność w nich mitosomów.

Celem określenia podobieństwa sekwencji aminokwasowych przewidywanych podjednostek do białek przedstawicieli innych linii rozwojowych, wykonana została analiza filogenetyczna, która wskazała, że największe zróżnicowanie filogenetyczne charakteryzuje białka kompleksu TOM. W szczególności, białka Tom7, Tom22, Tom70 wykazują największe podobieństwo do Opisthokonta, podczas kiedy Tom20, Tom22 i Tom40 do Archaeplastida (glony i rośliny) (Tabela 1, zaznaczono kolorami) natomiast podjednostki przewidywane dla TOB/SAM wykazywały podobieństwo do tej samej linii rozwojowej (Opisthokonta). Co więcej, biorąc pod uwagę uzyskane wyniki analiz filogenetycznych, wskazałam, że podjednostki kompleksu TOM ze względu na ich duże zróżnicowanie filogenetyczne nie pozostają w zgodzie z najnowszym podziałem systematycznym, w którym Amoebozoa stanowi siostrzaną grupę Opisthokonta.

Ponieważ moje zainteresowania strukturą genów sięgają wykonanych przeze mnie analiz zwieńczonych poznaniem pełnej sekwencji genu *TOM40 A. castellanii* (Wojtkowska i in., 2012), również w przypadku przewidywanych podjednostek kompleksów TOM i TOB/SAM postanowiłam scharakteryzować strukturę kodujących je genów wskazując na liczbę egzonów i intronów. Biorąc pod



uwagę liczbę egzonów w sekwencjach badanych genów, wskazałam na lokalizację w drzewie filogenetycznym, Amoebozoa pomiędzy między grzybami i organizmami wielokomórkowymi, przy czym liczba egzonów wskazanych dla entamoeb jest zbliżona do *S. cerevisiae* natomiast w przypadku *A. castellanii* – do roślin i zwierząt. Uzyskane dane pozostają w zgodzie z wewnętrznym podziałem Amoebozoa na dwa subklady Conosa (Archamoebae (entamoeb) i Mycetozoa reprezentowane śluzowce i Lobosa (*A. castellanii*) (*Fiz-Palacios I in., 2013*). Powyższe wyniki zostały opublikowane w BMC Genomics w 2016 roku [3]

#### Kompleksy importowe błony wewnętrznej i przestrzeni międzybłonowej.

W kolejnym etapie badań zadałam pytanie o skład podjednostkowy kompleksów importowych zlokalizowanych w błonie wewnętrznej (kompleksy TIM22, TIM23, PAM, OXA) i przestrzeni międzybłonowej (kompleksy MIA, Tim9-Tim10-Tim12; Tim8-Tim13) u tych samych przedstawicieli Amoebozoa. Uzyskana odpowiedź została zawarta w pracy "The emerging picture of the mitochondrial protein import complexes of Amoebozoa supergroup", opublikowanej w BMC Genomics w grudniu 2017 roku [5]. W pracy tej wskazałam na obecność w większości niezidentyfikowanych dotąd genów kodujących podjednostki kompleksów importowych zlokalizowanych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej oraz mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej u *A. castellanii*, *D. discoideum*, *D. fasciculatum*, *D. purpureum*, *P. pallidum*, a także entameb *E. dispar* oraz *E. nuttalli* (Tabela 1).

W przypadku *A. castellanii* wskazałam na obecność 17 podjednostek badanych kompleksów (Tabela 1), spośród których 4 podjednostki mają izoformy (Tim9, Tim10, Pam16, i Pam18). Część wskazanych sekwencji aminokwasowych była zgodna z sekwencjami zdeponowanymi w GenBank, przy czym w kilku przypadkach zaznaczyliśmy różnice długości w sekwencji wskazujące na obecność dłuższych sekwencji kodujących w AC\_RNAseq (Tim9A, Tim10B, Tim22, Tim50, Mgr2, Pam16A). Cztery białka *A. castellanii* były wcześniej adnotowane, tj. Tim21, Tim44, Erv1 i Oxa1, natomiast adnotowane przez nas białka to: Tim9C, Tim10A, Sdh3, Tim17, Tim23, Tim15 i Pam18A. W przypadku izoform białek Tim9, Tim10, Pam16 i Pam18, wykonałam analizy filogenetyczne metodą Neighbor - Joining wskazując na ich występowanie jako ortologów. W przypadku *A. castellanii* wskazałam na wyraźne podobieństwo w organizacji kompleksu importowego TIM23 i PAM do organizmu modelowego *S. cerevisiae*. W przypadku Tim9-Tim10-Tim12 oraz kompleksów TIM22, OXA i MIA niektóre podjednostki nie zostały wskazane: Tim8, Tim13, Tim12, Tim54, Tim18, Pam17, Oxa2 oraz główny komponent kompleksu MIA tj. Mia40.

Dla wybranych śluzowców wskazałam na 18 podjednostek badanych kompleksów, przy czym Oxa1 u każdego śluzowca białko to występuje w dwóch izoformach (Tabela 1). Podobnie jak w przypadku wcześniej analizowanych izoform, wykonałam analizy filogenetyczne, które wskazują na obecność izoform Oxa jako paralogów. Co ciekawe, Oxa1 *A. castellanii* grupuje się z izoformą Oxa1B śluzowców, sugerując ich pokrewieństwo. Wykazałam ponadto, że organizacja kompleksów TIM23, PAM i MIA śluzowców jest bardzo zbliżona do organizacji tych kompleksów u organizmów modelowych takich jak *S. cerevisiae*. W przypadku śluzowców, nie wskazałam na następujące podjednostki: Tim8-Tim13, Tim12, Tim18, Tim54, Pam17.

Jak już wspomniałam wcześniej, u *A. castellanii* prawdopodobnie nie występuje Mia40, podczas kiedy u wszystkich śluzowców białko to występuje, prawdopodobnie jako białko rozpuszczalne, przypominając tym samym formę Mia40 zwierząt i roślin (Mia40 *S. cerevisiae* jest zakotwiczone w błonie) (Chacińska i in., 2009). Jednocześnie dla wszystkich śluzowców wskazałam na obecność genu kodującego białko AIF (z ang. apoptose inducing factor), sugerowane jako białko o funkcji receptora dla Mia40 (Hangen i in., 2015; Meyer i in., 2015; Modjtahedi i Kroamer, 2015). U *A. castellanii* prawdopodobnie brak AIF, za to w przestrzeni międzybłonowej znajduje się kompleks Tim9-Tim10, dający możliwość zachodzenia reakcji oksydo-redukcyjnych w przestrzeni międzybłonowej w mitochondriach *A. castellanii* pozbawionych Mia40. Uzyskane wyniki dotyczące

składu podjednostkowego kompleksów błony wewnętrznej i przestrzeni międzybłonowej dotyczące *E. dispar* i *E. nuttalii* wskazały na obecność tylko jednego białka spośród badanych kompleksów i było to białko opiekuńcze mtHsp70. **Dla entamoeb wskazałam na wyraźnie większy stopień redukcji aparatu importu błony wewnętrznej i przestrzeni międzybłonowej niż w obrębie błony zewnętrznej.**

Podobnie jak w przypadku analiz białek kompleksów błony zewnętrznej **wykonałam analizę filogenetyczną wskazującą na największe podobieństwo większości przewidywanych w tej analizie białek do grupy Opisthokonta (grzyby i zwierzęta), a także, w mniejszym stopniu do Archaeplastida (rośliny), Chromalveolata i Excavata** (Tabela 1). Pod wspomnianym względem, zróżnicowanie to jest w porównaniu z kompleksami błony zewnętrznej wyraźniejsze.

Za moje najważniejsze osiągnięcia naukowe uważam:

- Otrzymanie natywnych kompleksów TOM *A. castellanii* i *D. discoideum*, wyznaczenie ich masy cząsteczkowej i przeprowadzenie charakterystyki funkcjonalnej,
- Podanie składu podjednostkowego kompleksów błony zewnętrznej: TOM, TOB/SAM, przestrzeni międzybłonowej: MIA, TIM9-TIM10-TIM12, i błony wewnętrznej: TIM22, TIM23, PAM, OXA u przedstawicieli Amoebozoa (Tabela 1)  
Wykazałam, że:
- W błonie zewnętrznej większe zróżnicowanie pod względem składu podjednostkowego charakteryzuje kompleks TOM, a mniejsze TOB/SAM,
- W obrębie błony zewnętrznej kompleks TOM wykazuje większe zróżnicowanie pod względem filogenetycznym podczas kiedy TOB/SAM wykazuje podobieństwo do Opisthokonta.
- Organizacja aparatu importu błony wewnętrznej oraz przestrzeni międzybłonowej badanych przedstawicieli Amoebozoa charakteryzuje się niższym stopniem zróżnicowania niż kompleksy błony zewnętrznej.
- Zidentyfikowane podjednostki kompleksów błony wewnętrznej i przestrzeni międzybłonowej wykazują różny poziom zróżnicowania biorąc pod uwagę występowanie izoform oraz ich pozycję filogenetyczną.
- U analizowanych entameb, wyraźnie zarysowuje się większa redukcja aparatu importu w obszarze błony wewnętrznej i przestrzeni międzybłonowej niż w przypadku błony zewnętrznej.
- Większość przewidywanych podjednostek kompleksów importowych błony wewnętrznej i przestrzeni międzybłonowej Amoebozoa, z wyjątkiem kompleksów PAM i OXA, wykazuje podobieństwo do Opisthokonta (zwierzęta, grzyby).

Z powyższych badań zarysowuje się obraz zróżnicowania organizacji aparatu importu białka do mitochondriów bądź też hipotetycznych mitosomów w nowo-wyróżnionej supergrupie Amoebozoa. Co więcej, w świetle powyższych danych staje się jasne, że wiedza o organizacji aparatu importu zdobyta na podstawie organizmów modelowych nie może być łatwo przeniesiona na choćby przedstawicieli tej samej linii rozwojowej. Co więcej, w świetle najnowszego podziału systematycznego wyniki te tylko częściowo potwierdzają lokalizację Amoebozoa jako siostrzaną grupę Opisthokonta reprezentowaną przez zwierzęta i grzyby.

W składzie mojego dorobku habilitacyjnego znajduje się również artykuł przeglądowy napisany wspólnie z Prof. Hanną Kmitą, opublikowany zarówno w języku polskim jak i w języku angielskim w *Postęпах Biochemii* w roku 2017 pt.: "Organizacja aparatu importu białka do mitochondriów: perspektywa filogenetyczna" [4], w której pełnię rolę autora korespondującego. W pracy tej przedstawiłam najnowsze dostępne wyniki dotyczące organizacji aparatu importu u różnych organizmów należących do różnych linii rozwojowych. Praca ta stanowi podsumowanie moich zainteresowań badawczych związanych z kontekstem filogenetycznym w badaniach nad budową aparatu importu białka do mitochondriów u przedstawicieli różnych linii rozwojowych. Przedstawiony

w tym artykule obraz aparatu importu białka, mimo braku wielu danych, wskazuje na zróżnicowanie organizacji tych kompleksów, szczególnie widoczny w przypadku kompleksu TOM, co może mieć istotne implikacje natury ewolucyjnej, jak i aplikacyjnej. Przeglądowa praca została opublikowana w *Postęпах Biochemii*.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

W pierwszym roku, po uzyskaniu stopnia doktora i podjęcia przeze mnie pracy na etacie adiunkta w Zakładzie Bioenergetyki UAM, wspólnie z Prof. Kmitą, opublikowałam w Postęпах Biologii Komórki pracę przeglądową podsumowującą najnowsze doniesienia dotyczące odkrytego wówczas nowego kompleksu białkowego zlokalizowanego w zewnętrznej błonie mitochondrialnej tj. kompleksu TOB/SAM (Kmita i Wojtkowska, 2004).

Uczestniczyłam także w realizacji innych zadań badawczych, które w większości związane były z mitochondriami oraz białkami zaangażowanymi w proces importu i białkiem VDAC. Zaangażowana byłam w dwa projekty kierowane przez Prof. H. Kmitę, pt.: "Rola ROS w komunikacji między mitochondriami i jądrem w komórkach *Saccharomyces cerevisiae*" (nr 2 2006-2009; P04C 008 30) oraz "Kanał VDAC jako cel działania huntingtyny w rozwoju choroby Huntingtona" (2011/01/B/NZ3/00359, NCN). W wyniku tej współpracy jestem współautorem 4 prac eksperymentalnych i 1 pracy przeglądowej.

W ramach pierwszej z tych prac wykazaliśmy, że aktywność mitochondrialnej dysmutazy CuZnSOD w mitochondriach drożdży *S. cerevisiae* związana jest z obecnością izoform białka VDAC oraz fazą wzrostu badanych komórek drożdży. Stwierdziliśmy, że aktywność CuZnSOD, koreluje z uwalnianiem z mitochondriów anionorodnika ponadtlenkowego  $O_2^{\cdot-}$  i z cytozolowym stanem redoks, który z kolei ma wpływ na poziom ekspresji białek zewnętrznej błony mitochondrialnej takich, jak Tom40 i Tob55/Sam50. Zwiększenie poziomu ekspresji dotyczy fazy wzrostu logarytmicznego, kiedy cytozol szczepów  $\Delta por1$ ,  $\Delta por2$  jest bardziej utleniony w porównaniu ze szczepem kontrolnym. W ramach tych badań uczestniczyłam w eksperymentach mających na celu porównanie poziomu ekspresji Tom40 i Tob55/Sam50 w mitochondriach drożdży szczepów pozbawionych izoform białka VDAC ( $\Delta por1$  i  $\Delta por2$ ) i kontrolnym, dla różnych faz wzrostu metodą immunodetekcji. Powyższe wyniki zostały zawarte w pracy opublikowanej w Biochemica and Biophysical Research Communications (Budzińska i in., 2007).

W kolejnych badaniach wykorzystaliśmy szczepy drożdży  $\Delta por1$  i  $\Delta por2$  do określenia znaczenia cytoplazmatycznego i mitochondrialnego stanu redoks w regulacji poziomu ekspresji dysmutazy manganowej (MnSOD), Tom40, Tom70 i Tob55/Sam50. Wykazaliśmy, że cytozolowy i mitochondrialny stan redoks w komórkach drożdży *S. cerevisiae* zależy od obecności izoform VDAC1 i VDAC2. Cytozolowy stan redoks zależy od VDAC1, natomiast mitochondrialny od obu form VDAC. Wykazaliśmy ponadto, że cytozolowy, ale nie mitochondrialny stan redoks, ma wpływ na poziom ekspresji badanych białek mitochondrialnych i wskazaliśmy na istotną rolę VDAC w regulacji tego procesu. W tej pracy uczestniczyłam w prowadzeniu modyfikowanej hodowli komórek szczepu dzikiego drożdży oraz mutantów  $\Delta por1$  i  $\Delta por2$  polegającej na podaniu przeciwutleniacza (askorbinianu) lub utleniacza (menadionu) w trakcie wczesnej fazy wzrostu logarytmicznego w celu uzyskania fazy wzrostu logarytmicznego z cytozolowym stanem redoks obserwowanym w fazie wzrostu stacjonarnego. Dla  $\Delta por2$  modyfikacja ta prowadziła do utlenienia cytozolu natomiast w przypadku  $\Delta por1$  do redukcji cytozolu. Mój udział polegał również na wykonywaniu analizy poziomu ekspresji białek Tom40, Tom70 i Tob55/Sam50 w mitochondriach drożdży wybranych szczepów z wykorzystaniem immunodetekcji. Powyższe wyniki zostały zawarte w pracy opublikowanej w Archives of Biochemistry and Biophysics (Gałgańska i in., 2008).

Badaliśmy również protekcyjną rolę wspomnianej dysmutazy miedziowo-cynkowej (CuZnSOD) w komórkach drożdży *S. cerevisiae*. Wykazaliśmy, że CuZnSOD ma istotny wpływ na poziom i aktywność białka VDAC oraz na poziom białek mitochondrialnej błony zewnętrznej takich jak VDAC, Tom70 i Tom40. W powyższych badaniach moja rola polegała na uczestniczeniu w doświadczeniach związanych z immunodetekcją z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko białkom kompleksu TOM tj. Tom40, VDAC, Tob55/Sam50. Wyniki wskazały na następujące zależności; poziom VDAC maleje w szczepie  $\Delta sod1$  i kontrolnym przy przejściu z fazy wzrostu

logarytmicznego do stacjonarnego, przy czym poziom ekspresji VDAC dla komórek szczepu  $\Delta sod1$  był niższy. Podobny profil ekspresji wykazaliśmy w przypadku białka Tom40. Natomiast w przypadku Tob55/Sam50, poziom ekspresji był niższy w komórkach szczepu  $\Delta sod1$ , jednak w przeciwieństwie do pozostałych białek, w fazie wzrostu stacjonarnego poziom wzrastał w obu badanych szczepach. W powyższej publikacji uczestniczyłam również w izolacji białka VDAC szczepu dzikiego drożdży oraz w analizach funkcjonalnych w układzie rekonstruowanym dla preparatu VDAC szczepu dzikiego. Wyniki te zostały zawarte w publikacji wydanej w FEBS Letters (Karachitos i in., 2008).

W kolejnym roku zespołem Prof. Kmitę, wykazaliśmy (Budzińska i in., 2009), rolę kompleksu TOM w uwalnianiu anionorodnika ponadtlenkowego z mitochondriów drożdży. Celem badań było zbadanie wpływu blokowania kompleksu TOM na uwalnianie  $O_2^{2-}$  z mitochondriów  $\Delta por1$  i typu dzikiego *S. cerevisiae*. Stwierdziliśmy, że blokowanie zmniejsza uwalnianie  $O_2^{2-}$ , a efekt był bardziej wyraźny w przypadku mitochondriów  $\Delta por1$ . Pokazaliśmy również, że wpływ blokady kompleksu TOM na uwalnianie  $O_2^{2-}$  wiąże się z poziomem ekspresji białka Tom40. W związku z tym uwalnianie  $O_2^{2-}$  z mitochondriów może zachodzić z udziałem kompleksu TOM. Do blokowania kompleksu TOM zastosowaliśmy przygotowane przeze mnie białko fuzyjne pb2-DHFR, które poddałam ekspresji w bakteriach i następnie wyizolowałam z ciał inkluzyjnych. Ponadto uczestniczyłam w wykonaniu eksperymentów związanych z importem tego białka do mitochondriów i jego blokadą przy użyciu metotretksatu. Powyższe wyniki zostały zestawione w przeglądowej pracy opublikowanej w Journal of Bioenergetics and Biomembranes (Gałgańska i in., 2010), w powstaniu której moja rola polegała na udziale przedyskutowaniu zawartości, w tym głównie treści związanej z białkami tworzącymi kompleksy importowe TOM i TOB/SAM.

Ponadto, w ramach kolejnego wspomnianego projektu "Kanał VDAC jako cel działania huntingtyny w rozwoju choroby Huntingtona", podjęłam się wykonania zadania badawczego dotyczącego oddziaływań ludzkiego białka VDAC z białkiem huntingtyny (Htt) oraz jej zmutowaną wersją (mtHtt). W tym celu wykorzystywałam szczepy drożdży *S. cerevisiae* pozbawione izoform VDAC ( $\Delta por1$  i  $\Delta por2$ ), transformowane plazmidami do konstytutywnej ekspresji z wprowadzonymi cDNA trzech ludzkich izoform białka VDAC. Białko Htt i mtHtt znakowane GST, otrzymałam wykonując ekspresję w komórkach bakterii *E. coli*. Do zbadania ewentualnych oddziaływań Htt i mtHtt z białkami VDAC zastosowałam metodę pull-down. W wyniku tych analiz nie udało się jednoznacznie stwierdzić oddziaływań Htt i mtHtt z żadną z izoform ludzkiego białka VDAC. Z drugiej jednak strony otrzymałam wyniki wskazujące na oddziaływania drożdżowych białek błony zewnętrznej z Htt i mtHtt, w tym VDAC1, Tom40 oraz Tom70. Badania te wykonywane były w ramach dwóch prac dyplomowych, w których pełniłam rolę promotora.

Współpracowałam również z dr Joanną Pieńkowską, w badaniach nad identyfikacją akwaporyn, kanałów dla transportu glicerolu i wody u trzech ślimaków *Lymnaea stagnalis*, *Catascopia occulta*, and *Stagnicola palustris* (Mollusca; Gastropoda; Pulmonata; Lymnaeidae). Moja rola polegała na zaplanowaniu i udziale w wykonaniu testu komplementacji w mutancie drożdżowym  $\Delta AQP4$ . Wyniki te zostały przedstawione w pracy opublikowanej w Journal of Biomembrane Biology (Pieńkowska i in., 2014). Na końcowym etapie są prowadzone, zaplanowane przeze mnie badania nad otrzymaniem pełnej charakterystyki funkcjonalnej kompleksu TOB/SAM ameby *A. castellanii* i śluzowca *D. discoideum*, co stanowi przedmiot badań w przewodzie doktorskim mgr Moniki Mazur (w którym pełnię rolę promotora pomocniczego). Celem prowadzonych aktualnie badań jest skorelowanie ilości form kompleksu TOB/SAM i ich składu podjednostkowego z cyklem życiowym śluzowca *D. discoideum*. Na prośbę edytora, razem z prof. Kmitą podjęłam się również uaktualnienia rozdziału w elektronicznej bibliotece eLS, Wiley online Library, rozdziału dotyczącego metod. W artykule pt.: "Mitochondria Protein Import: Methods" (Stojanowsky i in., 2017) uaktualniłam wiedzę teoretyczną i metodologiczną na temat importu białka do mitochondriów. W pracy tej pełnię rolę autora korespondującego.

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

Moja praca na Wydziale Biologii wiąże również się z obowiązkami dydaktycznymi i organizacyjnymi. Poza obowiązkowymi zajęciami wynikającymi z zawsze wykonywanego pełnego pensum dydaktycznego, prowadziłam również działalność związaną z popularyzacją wiedzy wyrażającą się w organizacji takich przedsięwzięć jak Festiwal Nauki, Nocy Biologów oraz Noc Naukowców oraz wykłady i zajęcia laboratoryjne dla klas promocyjnych, w ramach, choć nie tylko, Dni Akademickich. Od 2014 roku angażuję się w organizację i przebieg alternatywnego dla Nocy Naukowców przedsięwzięcia organizowanego w Liceum w Śremie nazywanego Nocą Nauki. Z ramienia OKE, pełniłam rolę obserwatora matur. Dwukrotnie otrzymałam stypendium w ramach programu Unii Europejskiej Erasmus plus Staff mobility plus na wyjazd na Uniwersytet w Katanii i Paryżu. Ponadto, wzięłam udział w tłumaczeniu rozdziału "Glikoliza i glukoneogeneza" w VIII wydaniu Biochemii L. Stryera. Uczestniczyłam w realizacji grantu na kierunki zamawiane Biotechnologia i Ochrona Środowiska na Wydziale Biologii przeprowadzając i opracowując ankiety ewaluacyjne mające na celu weryfikowanie procesu kształcenia i przyznawania stypendium. Od 2016 roku jestem członkiem Rady Instytutu Biologii Molekularnej WB i pracuję w Wydziałowym Zespole do Spraw Jakości Kształcenia (WZOJK), w którym uczestniczę m.in. w opracowywaniu corocznych rekomendacji do Rady Wydziału.

#### **6. Dane bibliometryczne po doktoracie (na dzień 17.03.2018)**

*Sumaryczny impact factor (zgodnie z rokiem opublikowania) wszystkich publikacji stanowiących mój dorobek naukowy, łącznie z osiągnięciem habilitacyjnym wynosi **33,627** natomiast sumaryczna liczba punktów **MNiSW wynosi 322***

Liczba cytowań wg. Web of Science (WoS) **116**

Indeks Hirscha wg. Web of Science: **8**

**Tabela 1.** Przewidywany skład podjednostkowy kompleksów TOM,TOB/SAM,TIM9-TIM10-TIM12,MIA,TIM22,TIM23,PAM,OXA *A. castellanii*, *D. discoideum*, *D. fasciculatum*, *D. purpureum*, *P. pallidum*, *E. dispar*, *E. nuttalli*. Kolorami zaznaczono najbliższe pokrewieństwo do białek przedstawicieli innych supergrup (na podstawie; Buczek i in., 2016; Wojtkowska i in., 2017).

Subunit	TOM					TOB/SAM		TIM 9/10		TIM 22	TIM 23					PAM					MIA		O X A			
	Tom7	Tom20	Tom22	Tom40	Tom70	Tob55/Sam50	Metakasyrna	Tim9	Tim10	Tim22	Sdh3	Tim17	Tim21	Tim23	Tim50	Mgr2	Pam16	Pam18	Tim44	mHsp70	Tim15	Mge1	Mia40	AIF	Env1	Oxa1
<i>A. castellanii</i>	Yellow	Green	Purple	Green	Purple	Light Blue	Light Blue	A	A	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Purple	Purple	Green	Green	Purple	Orange	Green	Orange	White	White	Purple	Green
								B	B							B	B									
								C																		
<i>D. discoideum</i>	Purple	Green	White	Green	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Orange	Purple	Purple	Light Blue	Purple	Light Blue	Light Blue	Purple	Green	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Orange	White	Purple	Light Blue	Purple	Light Blue	A
																										B
<i>D. fasciculatum</i>	White	Green	White	Purple	Purple	Light Blue	Light Blue	Yellow	Purple	Purple	Orange	Purple	Light Blue	Light Blue	Purple	Green	Green	Light Blue	Light Blue	Light Blue	White	Purple	Green	Light Blue	Light Blue	A
																										B
<i>D. purpureum</i>	White	Green	White	Purple	Purple	Light Blue	Light Blue	Orange	Purple	Purple	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Purple	Green	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Orange	White	Yellow	Light Blue	Light Blue	Light Blue	A
																										B
<i>P. pallidum</i>	Purple	Green	White	Purple	Purple	Light Blue	Light Blue	Green	Purple	Purple	Light Blue	Light Blue	Green	Light Blue	Purple	Green	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Orange	White	Light Blue	Light Blue	Purple	Light Blue	A
																										B
<i>E. dispar</i>	White	Green	White	Yellow	Purple	Light Blue	Light Blue	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White	Orange	White	White	White	White	White	White
<i>E. nuttalli</i>	White	White	White	Yellow	Light Blue	Light Blue	Light Blue	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White	Orange	White	White	White	White	White	White

Rrhizaria (SAR)	Opisthokonta (grzyby)	Excavata	Archaeplastida (rośliny)
Chromalveolata (SAR)	Opisthokonta (zwierzęta)	Opisthokonta (nucleraria)	Bacteriacea

**Literatura uzupełniająca:**

- Antos N, Stobienia O, Budzińska M, Kmita H. 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.* 2001 Apr;33(2):119-26.
- Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukes J, Bass D, et al. The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol.* 2012;59(5):429–93.
- Backes S, Herrmann JM. Protein Translocation into the Intermembrane Space and Matrix of Mitochondria: Mechanisms and Driving Forces. *Front Mol Biosci.* 2017 Dec 7;4:83.
- Buczek D, Wojtkowska M, Suzuki Y, Sonobe S, Nishigami Y, Antoniewicz M, Kmita H, Makatowski W. Protein import complexes in the mitochondrial outer membrane of Amoebozoa representatives. *BMC Genomics.* 2016;6;17:99.
- Budzińska M., Gałgańska H., Wojtkowska M., Stobienia O., Kmita H. (2007) Effects of VDAC isoforms on CuZn-superoxide dismutase activity in the intermembrane space of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357, 1065-1070.
- Budzińska M., Gałgańska H., Karachitos A., Wojtkowska M., Kmita H. (2009) The TOM complex is involved in the release of superoxide anion from mitochondria. *J. Bioenerg Biomembr.* 41, 361-367.
- Chacińska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell.* 2009;138(4):628–44.
- Dolezal P, Dagley MJ, Kono M, Wolyneć P, Likic VA, Foo JH, et al. The essentials of protein import in the degenerate mitochondrion of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog.* 2010;6(3), e1000812.
- Fiz-Palacios O, Romeralo M, Ahmadzadeh A, Weststrand S, Ahlberg PE, Baldauf S. Did terrestrial diversification of amoebas (amoebzoa) occur in synchrony with land plants? *PLoS One.* 2013;8(9), e74374.
- Gałgańska H., Karachitos A., Wojtkowska M., Stobienia O., Budzińska M., Kmita H. (2010) Communication between mitochondria and nucleus: putative role for VDAC in reduction/oxidation mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 1276-1280.
- Guardiani C, Magri A, Karachitos A, Di Rosa MC, Reina S, Bodrenko I, Messina A, Kmita H, Ceccarelli M, De Pinto V.  $\gamma$ VDAC2, the second mitochondrial porin isoform of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 2018 Feb 2;1859(4):270-279.
- Hangen E, Féraud O, Lachkar S, Mou H, Doti N, Fimia GM et al. Interaction between AIF and CHCHD4 Regulates Respiratory Chain Biogenesis. *Mol Cell.* 2015 Jun 18;58(6):1001-14.
- Henriquez FL, McBride J, Campbell SJ, Ramos T, Ingram PR, Roberts F, Tinney S, Roberts CW. *Acanthamoeba* alternative oxidase genes: identification, characterisation and potential as antimicrobial targets. *Int J Parasitol.* 2009 Nov;39(13):1417-24.
- Jarmuskiewicz W, Woyda-Ploszczyca A, Antos-Krzeminska N, Sluse FE. Mitochondrial uncoupling proteins in unicellular eukaryotes. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Jun-Jul;1797(6-7):792-9.
- Jedelsky, PL., Dolezal, P, Rada, P, Pyrih, J, Smid, O, Hrdy, I, Ssedinova, M., Marcinkova, M, Voleman L, Perry, AJ, Beltran, NC, Lithgow T & Tachezy J 2011. The minimal proteome in the reduced mitochondrion of the parasitic protist *Giardia intestinalis*. *PLoS One*, 6, e17285.
- Kang Y, Fielden LF, Stojanovski D. Mitochondrial protein transport in health and disease. *Semin Cell Dev Biol.* 2017 Jul 29. pii: S1084-9521(17)30021-6.
- Karachitos A., Gałgańska H., Wojtkowska M., Budzińska M., Stobienia O., Bartosz G., Kmita H. (2008) Cu,Zn-superoxide dismutase is necessary for proper function of VDAC in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *FEBS Lett.* 583, 449-55.
- Kmita H., Wojtkowska M. (2007) Kompleks TOB/SAM: kluczowa rola w biogenezie mitochondriów. *Postępy Biologii Komórki* 34, 69-84.
- Leger MM, Gawryluk RMR, Gray MW, Roger AJ. Evidence for a hydrogenosomal-type anaerobic ATP generation pathway in *Acanthamoeba castellanii*. *PLoS ONE* 2013;8(9): e69532.
- Makiuchi T, Nozaki T. Highly divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa. *Biochimie.* 2014;100:3–17.



- Mani J, Meisinger C, Schneider A. Peeping at TOMs-diverse entry gates to mitochondria provide insights into the evolution of eukaryotes. *Mol Biol Evol.* 2016;33(2):337-51.
- Meyer K, Buettner S, Ghezzi D, Zeviani M, Bano D, Nicotera P. Loss of apoptosis-inducing factor critically affects MIA40 function. *Cell Death Dis.* 2015 Jul 9;6:e1814.
- Modjtahedi N, Kroemer G. CHCHD4 links AIF to the biogenesis of respiratory chain complex I. *Mol Cell Oncol.* 2015 Jul 29;3(2):e1074332.
- Murcha MW, Wang Y, Narsai R, Whelan J. The plant mitochondrial protein import apparatus - the differences make it interesting. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(4):1233-45.
- Neupert W. A perspective on transport of proteins into mitochondria: a myriad of open questions. *J Mol Biol.* 2015;427(6 Pt A):1135-58.
- Pieńkowska JR., Kosicka E., Wojtkowska M., Kmita H., Lesicki A. (2014) Molecular Identification of first putative aquaporins in snails. *J Membr Biol. Mar;*247(3):239-52.
- Santos HJ, Imai K, Makiuchi T, Tomii K, Horton P, Nozawa A, Ibrahim M, Tozawa Y, Nozaki T A novel mitochondrial  $\beta$ -barrel outer membrane protein in entamoeba. *Sci Rep.* 2015;25;5:8545
- Saheb E, Trzyzna W, Bush J. Caspase-like proteins: *Acanthamoeba castellanii* metacaspase and *Dictyostelium discoideum* paracaspase, what are their functions? *J Biosci.* 2014;39(5):909-16S
- Shoshan-Barmatz V, De Pinto V, Zweckstetter M, Raviv Z, Keinan N, Arbel N. 2010. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Mol Aspects Med.* 31: 227-285.
- Stiller BS, Höpker J, Oeljeklaus S, Schütze C, et.al Wiedemann N. Mitochondrial OXA Translocase Plays a Major Role in Biogenesis of Inner-Membrane Proteins. *Cell Metab.* 2016 May 10; 23(5): 901-908.
- Wojtkowska M, Szczech N, Stobienia O, Jarmuszkiewicz W, Budzinska M, Kmita H. An inception report on the TOM complex of the amoeba *Acanthamoeba castellanii*, a simple model protozoan in mitochondria studies. *J Bioenerg Biomembr.* 2005;37(4):261-8.
- Wojtkowska M, Buczek D, Stobienia O, Karachitos A, Antoniewicz M, Słocińska M, Makalowski M, Kmita H.(2015) The TOM Complex of Amoebozoans: the Cases of the Amoeba *Acanthamoeba castellanii* and the Slime Mold *Dictyostelium discoideum*. *Protist* 166, 349-362.
- Wojtkowska M, Buczek D, Suzuki Y, Shabardina V, Makalowski W, Kmita H. (2017) The emerging picture of the mitochondrial protein import complexes of Amoebozoa supergroup. *BMC Genomics,* 2017; 18:997.



Poznań 3 luty 2018