

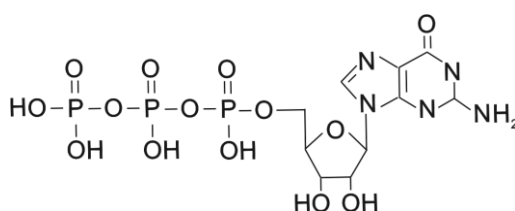


AUTOREFERAT

dotyczący postępowania habilitacyjnego

Regulacja aktywności łańcucha oddechowego przez wybrane nośniki wewnętrznej błony mitochondrialnej

dr Andrzej Marek Woyda-Płoszczyca



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

Spis treści

1. Dane osobowe	3
2. Posiadane tytuły i stopnie naukowe	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	3
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. 2017 r. poz. 1789)	3
4.1. Wprowadzenie	5
4.2. Poziom redukcji mitochondrialnego koenzymu Q reguluje wielkość indukowanego przecieku H^+ katalizowanego przez UCP, niezależnie od typu aktywatora UCP	7
4.3. Mitochondrialna izoforma kinazy difosforanów nukleozydów (mtNDPK) reguluje aktywność AAC i UCP poprzez dynamiczne zmiany lokalnych stężeń określonych nukleotydów purynowych	10
4.4. Czy poziom redukcji mitochondrialnego koenzymu Q wpływa na rozprężającą aktywność AAC?	13
4.5. Regulacja aktywności UCP jest dość silnie zachowana w mitochondriach różnych przedstawicieli eukariontów	14
4.6. Potencjalne praktyczne wykorzystanie wyników badań osiągnięcia naukowego	15
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.....	17
5.1. Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora.....	17
5.1.1. Oksydaza alternatywna (AOX) w mitochondriach mikroorganizmów eukariotycznych ..	17
5.1.2. UCP1 i jego homologii.....	17
5.1.3. Funkcja AOX i UCP podczas stresu oksydacyjnego.....	18
5.2. Inne osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora	20
5.2.1. Wpływ hiperglikemii na bioenergetykę mitochondriów komórek śródbłonna człowieka	20
5.2.2. Wpływ zmian temperatury i treningu wytrzymałościowego na bioenergetykę mitochondriów mięśni szczura	21
5.2.3. Wpływ stresu temperatury na biogenezę mitochondriów kalafiora w ujęciu zmian aktywności składników łańcucha oddechowego.....	21
6. Podsumowanie dorobku naukowego	22
7. Projekty naukowe w realizacji i plany badawcze	22
Bibliografia	23

1. Dane osobowe

Imię i nazwisko: Andrzej Marek WOYDA-PŁOSZCZYCA

2. Posiadane tytuły i stopnie naukowe

- 2004** tytuł licencjata
(studia na kierunku biologia w zakresie biologii molekularnej)
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza (UAM) w Poznaniu, Wydział Biologii
- 2006** tytuł zawodowy magistra
(studia na kierunku biologia w zakresie biologii molekularnej)
UAM w Poznaniu, Wydział Biologii
- 2011** **17 czerwca – stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii –
biologii molekularnej**
Praca doktorska pt. *Regulacja aktywności systemów rozpraszających energię,
oksydazy alternatywnej i białka rozprzegającego, w mitochondriach ameby
Acanthamoeba castellanii*,
Promotor: Prof. dr hab. Wiesława Jarmuszkiewicz,
UAM w Poznaniu, Wydział Biologii, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii,
Zakład Bioenergetyki,
Rada Wydziału Biologii UAM podjęła uchwałę w dniu 17 czerwca 2011 r. o
wyróżnieniu rozprawy doktorskiej.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 2006-2011** Studia doktoranckie, UAM w Poznaniu, Wydział Biologii
- 2011-10-01** do chwili obecnej na stanowisku adiunkta, UAM w Poznaniu, Wydział Biologii,
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Zakład Bioenergetyki

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. 2017 r. poz. 1789)**a) tytuł osiągnięcia naukowego:**

**Regulacja aktywności łańcucha oddechowego przez wybrane nośniki
wewnętrznej błony mitochondrialnej**

b) publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

Wyłącznie dwuautorskie prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, z sumaryczną wartością **IF** około **14 (Tab. 1)**, powstały m.in. dzięki finansowemu wsparciu kierowanych i samodzielnie wykonywanych przeze mnie dwóch projektów:

Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego IP2012 059172 (Iuventus Plus, 2013-2015) oraz **Narodowego Centrum Nauki 2015/19/D/NZ3/00087 (Sonata 10, 2016-2020).**

Tabela. 1. Zestawienie parametrów naukometrycznych czterech prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego habilitanta.

<u>Parametry naukometryczne osiągnięcia naukowego</u>	wartość
publikacje oryginalne (3) i przeglądowe (1) indeksowane w bazie <i>Journal Citation Reports (JCR)</i>	4
sumaryczny IF publikacji wg. bazy <i>JCR</i> zgodnie z rokiem opublikowania	12,959
sumaryczny IF 5-letni (2018)	14,356
sumaryczna liczba punktów za publikacje wg. listy <i>MNiSW</i> (2017)	140
sumaryczna liczba cytowań publikacji wg. bazy <i>Web of Science (WoS)</i>	31

Prace doświadczalne

1. Woyda-Płoszczyca AM, Jarmuszkiewicz W (2013) Hydroxynonenal-stimulated activity of the uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii* mitochondria under phosphorylating conditions. *Biological Chemistry* 394: 649-658

IF 2,689 (IF 5-letni 3,002); 25 pkt. MNiSW; liczba cytowań: 7

2. Woyda-Płoszczyca AM, Jarmuszkiewicz W (2014) Sensitivity of the aldehyde-induced and free fatty acid-induced activities of plant uncoupling protein to GTP is regulated by the ubiquinone reduction level. *Plant Physiology and Biochemistry* 79: 109-116

IF 2,756 (IF 5-letni 3,217); 35 pkt. MNiSW; liczba cytowań: 3

3. Woyda-Płoszczyca AM, Jarmuszkiewicz W (2014) Different effects of guanine nucleotides (GDP and GTP) on protein-mediated mitochondrial proton leak. *PLoS One* 9(6): e98969

IF 3,234 (IF 5-letni 3,352); 40 pkt. MNiSW; liczba cytowań: 10

Praca przeglądowa

4. Woyda-Płoszczyca AM, Jarmuszkiewicz W (2017) The conserved regulation of mitochondrial uncoupling proteins: From unicellular eukaryotes to mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* 1858: 21-33

IF 4,28 (IF 5-letni **4,785**); **40 pkt. MNiSW**; **liczba cytowań: 11**

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania^{*}:

4.1. Wprowadzenie

Nieodłączną cechą mitochondriów są systemy rozpraszające energię (ang. *energy-dissipating systems*), które obniżają efektywność odnawiania puli ATP na drodze fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS), a więc procesu zachowywania energii (ang. *energy conservation*) (Jarmuszkiewicz et al., 2010). Skutkiem ubocznym rozpraszania energii pochodzącej z utleniania substratów oddechowych łańcucha oddechowego (np. NADH) jest uwalnianie energii cieplnej, choć nie oznacza to, że zawsze wzrasta temperatura komórki lub tkanki, czyli zachodzi proces termogenezy. Wśród czynników zmniejszających wydajność OXPHOS olbrzymie znaczenie mają określone białka wewnętrznej błony mitochondrialnej o funkcji nośnika, należące do rodziny MCF (ang. *mitochondrial carrier family*). Jej dwóch przedstawicieli, tj. nośnik ADP/ATP (AAC, ang. *ADP/ATP carrier*), nazywany również translokazą ADP/ATP lub translokazą nukleotydów adeninowych (ANT, ang. *adenine nucleotide translocase*), oraz białko rozprzegające (UCP, ang. *uncoupling protein*) uważa się za dwa główne "katalizatory" przecieku protonów [ang. *proton (H^+) leak*] w mitochondriach (**Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2014a, 2017**). Przeciek ten istotnie wpływa na aktywność łańcucha oddechowego, w tym szybkość zużywania tlenu (V_O), potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej ($\Delta\Psi$) oraz poziom redukcji koenzymu Q (QH_2/Q). Podobnie jak F_0F_1 syntaza ATP, AAC i UCP również wykorzystują elektrochemiczny gradient protonowy wytwarzany przez pompy H^+ mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów. Jednakże, zależna od AAC i UCP translokacja H^+ z przestrzeni międzybłonowej do macierzy mitochondrialnej nie prowadzi do syntezy ATP. Należy podkreślić, że UCP jest białkiem typowo wyspecjalizowanym w przecieku H^+ . Natomiast w przypadku AAC sytuacja jest bardziej skomplikowana, ponieważ w zależności od warunków fizjologicznych, translokaza ta zapewnia transport ADP i ATP w

^{*} cytowania w tekście: **pogrubione** (prace wchodzące w skład osiągnięcia habilitanta), podkreślone (inne prace stanowiące dorobek habilitanta), bez podkreślenia (inne cytowania)

odpowiednich kierunkach, i tym samym podtrzymuje ciągłość OXPHOS, lub nabiera cech UCP (ang. *UCP-like protein*), tj. pośredniczy w przecieku H^+ . Zatem, AAC może również osłabiać sprzężenie w mitochondriach pomiędzy utlenianiem np. NADH, prowadzącym do transportu elektronów przez łańcuch oddechowy, a fosforylacją ADP katalizowaną przez F_0F_1 syntazę ATP. W związku z tym, że aktywność rozprzegająca AAC i UCP w dużym stopniu podlega regulacji z udziałem określonych efektorów (oba białka mogą być odwracalnie aktywowane i hamowane), skutkiem kontrolowanego działania tych nośników jest tzw. indukowany przeciek H^+ (ang. *inducible protein-mediated H^+ leak*). W mitochondriach ma miejsce również tzw. podstawowy przeciek H^+ (ang. *basal H^+ leak*), nie podlegający regulacji, który głównie zależy od obecności, a nie aktywności, białkowych nośników błony wewnętrznej oraz w dużo mniejszym stopniu od przechodzenia H^+ wprost (bez udziału białek) przez dwuwarstwę lipidową. Skoro AAC i UCP współistnieją w przypadku większości mitochondriów [wyjątek stanowią np. pewne gatunki drożdży, u których brak UCP (Brand et al., 1999)], pojawia się pytanie, czy oba te nośniki zaangażowane w zjawisko przecieku H^+ są regulowane w podobny sposób? Niestety w tej kwestii istnieje pewien chaos informacyjny, ponieważ w opublikowanych pracach prezentowane są często sprzeczne wyniki dotyczące specyficzności danych efektorów, zwłaszcza inhibitorów AAC i UCP. Białka umożliwiające przeciek H^+ muszą podlegać ścisłej kontroli (zwłaszcza hamowaniu), tak aby ich aktywność nie prowadziła do szkodliwego spadku stężenia ATP w komórce. **Istotę mojego osiągnięcia naukowego stanowi zatem przedstawienie zależności pomiędzy wielkością mitochondrialnego przecieku H^+ a rekrutacją endogennych efektorów niebiałkowych stymulujących, hamujących, modulujących lub nie wpływających na rozprzegającą aktywność AAC i UCP w ujęciu określonego czynnika białkowego (kinazy) przejściowo wykluczającego (osłabiającego) udział AAC i UCP w translokacji H^+ .** Naturalne rozpręganie mitochondriów może wydawać się marnowaniem zasobów energii, jednak zjawisko to ma prawdopodobnie olbrzymie znaczenie dla skutecznego ograniczania uszkodzeń oksydacyjnych komórki (Jarmuszkiewicz i Woyda-Płoszczyca, 2008; Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2017). Pojęcie tzw. "łagodnego (częściowego) rozpręgania" (ang. *mild uncoupling*), odnoszące się do mitochondriów komórek/tkanek z obniżoną ekspresją i aktywnością białka UCP, oznacza rodzaj bardzo ważnego zabezpieczenia przed uwalnianiem zbyt dużych ilości reaktywnych form tlenu (RFT), jako niepożądanego skutku hiperpolaryzacji błony wewnętrznej (wynikającej z zaburzonej równowagi oksydoredukcyjnej łańcucha oddechowego). Dlatego też, kontrolowany przeciek H^+ zalicza się do elementów systemu

pierwszej linii obrony antyoksydacyjnej. Co istotne, nadmiar RFT intensyfikuje procesy nieenzymatycznej peroksydacji lipidów błonowych i tym samym prowadzi do zwielokrotnienia wytwarzania cząsteczek różnych nienasyconych aldehydów. Takie produkty końcowe utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych fosfolipidów są bardzo reaktywne i dlatego mogą m.in. chemicznie modyfikować DNA (Grimsrud et al., 2008; Gueraud, 2017; Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2008; Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2012). Wiele badań dowodzi, że reaktywne aldehydy inaktywują geny i białka, co stanowi podłoże licznych stanów patologicznych, takich jak nowotwory czy choroby neurodegeneracyjne, oraz główną przyczynę przyspieszonego starzenia się.

Wyniki mojej pracy doświadczalnej przede wszystkim dotyczą badań funkcjonalnych prowadzonych na oczyszczonej frakcji izolowanych mitochondriów różnych przedstawicieli eukariontów, w tym mikroorganizmu, tj. ameby (*Acanthamoeba castellanii*), rośliny naczyniowej, tj. ziemniaka (*Solanum tuberosum*), a także ssaków, tj. szczura (*Rattus norvegicus*) oraz człowieka (na przykładzie linii komórkowej ludzkiego śródbłónka). Podejście takie umożliwia wyciągnięcie wniosków ogólnych, dotyczących wszystkich organizmów oddychających tlenowo z udziałem mitochondriów. Ponadto, w przypadku mitochondriów izolowanych z nerek szczura stosowałem również technikę przygotowywania odwróconych cząstek submitochondrialnych (i-o SMP, ang. *inside-out submitochondrial particles*). Natomiast spośród technik rejestrujących określone parametry bioenergetyczne *in vitro* stosowałem: (i) polarograficzny pomiar V_O (elektrodą tlenową Clarka), (ii) pomiar zmian $\Delta\Psi$ przy użyciu elektrody specyficznej wobec jonów tetrafenylofosfoniowych (TPP^+) oraz (iii) ekstrakcję mitochondrialnego koenzymu Q i pomiar poziomu jego redukcji, a także stężenia formy utlenionej i zredukowanej, wykorzystując wysokociśnieniową chromatografię cieczową (HPLC).

4.2. Poziom redukcji mitochondrialnego koenzymu Q reguluje wielkość indukowanego przecieku H^+ katalizowanego przez UCP, niezależnie od typu aktywatora UCP

Koenzym Q to niebiałkowy składnik mitochondrialnego łańcucha oddechowego, który pośredniczy w przekazywaniu elektronów z dehydrogenaz, będących miejscami wprowadzania elektronów, czyli ścieżkami redukującymi utlenioną formę koenzymu Q (ang. *Q-reducing pathways*) do szlaku(ów) utleniającego(ych) zredukowaną formę tej cząsteczki, tj. ubichinol [ang. *QH₂-oxidizing pathway(s)*] (**Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2017**). Dotychczas wykazano, że

stymulacja aktywności zarówno AAC, jak i UCP, zachodzi pod wpływem wolnych (długołańcuchowych) kwasów tłuszczowych (FFA, ang. *free fatty acid*), np. kwasu linolowego, produktu końcowego peroksydacji lipidów błonowych, tj. reaktywnego aldehydu 4-hydroksy-2-nonenalu (HNE), związków strukturalnie podobnych do HNE, takich jak retinoidy (różne formy witaminy A, w tym *trans*-retinal i kwas *trans*-retinowy) oraz innych 2-alkenali (Echtay et al., 2003; **Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2017**). Pomiędzy mitochondrialną pulą Q/QH₂ i aktywnością UCP istnieje bardzo znacząca zależność, gdyż u przedstawicieli różnych grup systematycznych eukariontów wykazano, że poziom redukcji koenzymu Q moduluje wiązanie się nukleotydu purynowego (PN, ang. *purine nucleotide*), adeninowego lub guaninowego, z UCP (**Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2017**). Według licznych badań, prowadzonych już od początku lat 70-tych XX w., to właśnie nukleotydy purynowe, w tym przede wszystkim GDP i GTP, pełnią funkcję fizjologicznych oraz silnych inhibitorów mitochondrialnego przecieku H⁺ (Nicholls i Lindberg, 1973; **Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2017**). Jako reprezentacyjny inhibitor UCP najczęściej stosuje się GDP, gdyż uznano, że ten PN nie jest transportowany przez AAC i tym samym nie jest szybko metabolizowany w mitochondriach. Jednakże, prowadzone przeze mnie badania wykazały, że silniejszym i bardziej specyficznym inhibitorem homologów UCP jest GTP, dlatego ten PN traktuję jako "diagnostyczny" dla oznaczania hamowania przecieku H⁺ zależnego od UCP (Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2011; **Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2014a**). Poza tym, moje badania pokazały również, że GDP (nawet w wysokim stężeniu) jest bardzo szybko metabolizowany w izolowanych mitochondriach w warunkach zbliżonych do warunków fizjologicznych (**podrozdział 4.3**).

Na przykładzie mitochondriów izolowanych z trofozoitów ameby A. castellanii po raz pierwszy wykazałem, że:

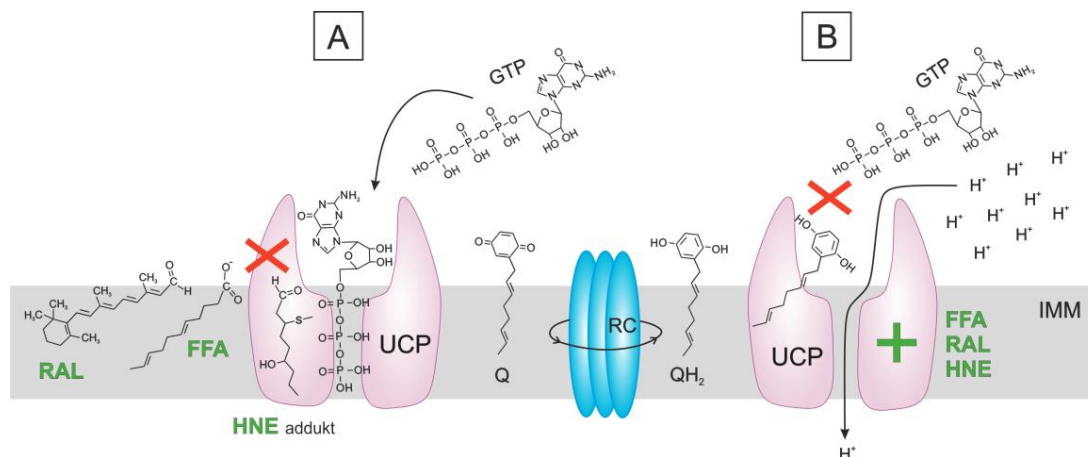
- ***podczas oddechowego stanu 3 (fosforylującego, tj. w warunkach zachodzącej OXPHOS) wrażliwość aktywowanego przez 4-hydroksy-2-nonenal AcUCP (białka rozprzegającego ameby A. castellanii) na hamowanie przez GTP jest pod kontrolą poziomu redukcji mitochondrialnej puli koenzymu Q (Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2013).*** Im wyższy jest poziom redukcji błonowego koenzymu Q, tym AcUCP stymulowane przez HNE jest mniej podatne na hamowanie przez GTP;

Na przykładzie mitochondriów izolowanych z bulw ziemniaka po raz pierwszy wykazałem, że:

- **poziom redukcji mitochondrialnej puli koenzymu Q reguluje podatność aktywowanego przez 4-hydroksy-2-nonenal i trans-retinal StUCP (białka rozprzegającego ziemniaka) na hamowanie przez GTP podczas oddechowego stanu 4 (niefosforylującego, tj. w obecności inhibitorów OXPHOS, oligomycyny i karboksyatraktyloydu) (Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2014b).**

Wyniki te wraz z wcześniejszymi pracami sugerują, że **efektywność działania trzech znanych typów aktywatorów UCP, tj. wolnego (długołańcuchowego) kwasu tłuszczowego (np. kwasu linolowego) (Jarmuszkiewicz et al., 2005; Navet et al., 2005; Swida et al., 2008; Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2014b), reaktywnego aldehydu (4-hydroksy-2-nonenalu) (Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2012); (Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2013; Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2014b) oraz retinoidu (trans-retinalu) (Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2014b) jest pod kontrolą poziomu redukcji błonowego koenzymu Q w mitochondriach różnych organizmów, niezależnie od stanu oddechowego (Ryc. 1).** Zwiększona aktywność UCP przy zwiększonym stężeniu QH_2 prawdopodobnie oznacza, że poziom redukcji mitochondrialnej puli koenzymu Q funkcjonuje jako uniwersalny wskaźnik stanu metabolicznego całej komórki, który moduluje aktywację/hamowanie UCP w zależności od zapotrzebowania na ATP (Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2017).

Niestety, nadal nie zidentyfikowano miejsca wiążącego QH_2 w strukturze UCP (Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2017). Jako zespół kierowany przez prof. dr hab. Wiesławę Jarmuszkiewicz zaproponowaliśmy, że związanie się jednej cząsteczki QH_2 z UCP zakłóca oddziaływanie tego nośnika z PN (bezpośrednio wyklucza hamowanie UCP przez PN) wskutek podobieństw strukturalnych obu efektorów (zarówno cząsteczka QH_2 , jak i PN, zawiera pierścień aromatyczny). Prawdopodobnie miejsca wiązania QH_2 i PN zlokalizowane są w różnych rejonach UCP, jednak przynajmniej częściowo mogą się pokrywać (Ryc. 1). Jest to tylko jedna z propozycji wyjaśniających wpływ koenzymu Q na aktywność UCP.



Ryc. 1. Poziom redukcji mitochondrialnej puli koenzymu Q reguluje wrażliwość stymulowanego UCP na hamowanie przez GTP, niezależnie od typu aktywatora UCP. A) Wysokie stężenie Q sprzyja hamowaniu UCP przez PN (GTP) i tym samym osłabia aktywację z udziałem FFA, RAL lub HNE (czerwony X). W przypadku HNE, jeden z modeli aktywacji UCP przez reaktywne aldehydy zakłada powstawanie trwałych adduktów, wskutek kowalencyjnej modyfikacji tego nośnika (np. grup -SH cysteiny), co powoduje przyjęcie konformacji niezbędnej do translokacji H⁺. **B)** Z kolei wysokie stężenie QH₂ zapobiega wiązaniu się GTP (czerwony X) i tym samym aktywatory (FFA, RAL lub HNE) umożliwiają transport H⁺ zależny od UCP (zielony +). Model ten zakłada wzajemne wykluczanie się wiązania jednej cząsteczki QH₂ i PN z UCP. **RAL** - *trans*-retinal, **FFA** - wolny (długolącuchowy) kwas tłuszczowy, **Q** - cząsteczka utlenionego koenzymu Q (ubichinon), **QH₂** - cząsteczka zredukowanego koenzymu Q (ubichinol), **RC** - łańcuch oddechowy, **UCP** - białko rozprzegające, **IMM** - wewnętrzna błona mitochondrialna (ang. *inner mitochondrial membrane*). Zmodyfikowane z **Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2017**.

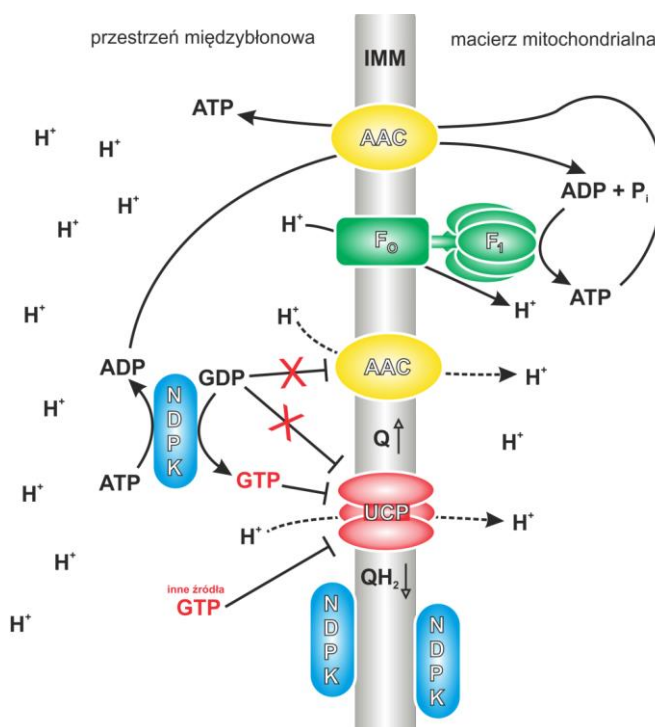
4.3. Mitochondrialna izoforma kinazy difosforanów nukleozydów (mtNDPK) reguluje aktywność AAC i UCP poprzez dynamiczne zmiany lokalnych stężeń określonych nukleotydów purynowych

W badaniach bioenergetycznych jednym z najpopularniejszych i najciekawszych inhibitorów jest karboksyatraktylozyd (CATR), glikozyd pochodzenia roślinnego (syntetyzowany np. przez gatunki z rodzaju *Xanthium*) (**Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2014a, 2017**). Związek ten, oprócz standardowego zastosowania do blokowania OXPHOS (transportu ADP/ATP z udziałem AAC) podaje się również jako inhibitor przecieku H⁺ zależnego od AAC. Intrygujący jest fakt, że efekt CATR i GDP może być zbieżny, ale niekoniecznie addytywny (zwłaszcza w obecności oligomycyny hamującej F₀F₁ syntazę ATP), w kontekście hamowania mitochondrialnego przecieku H⁺. Dlatego też, w niektórych opracowaniach naukowych, zarówno GDP jak i CATR, rozpatruje się jako potencjalne inhibitory przecieku H⁺ katalizowanego przez AAC oraz UCP. Ponieważ CATR nie może być uznany za fizjologiczny czynnik hamujący rozprzegającą aktywność AAC i UCP u większości organizmów, to właśnie GDP stał się głównym kandydatem do tej roli. Bardzo istotną konsekwencją opisaną powyżej obserwacji jest stwierdzony brak specyficzności GDP i CATR w

stosunku do ich klasycznych celów, tj. wiązania się GDP z UCP i CATR z AAC (potencjalny dualizm działania GDP i CATR w odniesieniu do hamowania "katalizatorów" przecieku H^+). Z tej przyczyny zatem, nie powinno wykonywać się pomiarów dotyczących rozróżniania udziału AAC i UCP w mitochondrialnym przecieku H^+ poprzez podawanie egzogennych GDP i CATR. Ponadto, zaskakujące wyniki moich badań ujawniły kolejny powód, dla którego nie należy używać GDP w rozumieniu fizjologicznie istotnego inhibitora rozprzegającej aktywności AAC/UCP. **W warunkach zbliżonych do warunków fizjologicznych (bez inhibitorów OXPHOS oraz w obecności wysycającego stężenia ATP) po raz pierwszy wykazałem, że podanie egzogennej GDP w wysokim stężeniu (1 mM) zwiększa V_o oraz obniża $\Delta\Psi$ izolowanych mitochondriów ssaków (nerek szczura oraz komórek ludzkiego śródbłónka), zarówno w obecności, jak i przy braku aktywatora AAC/UCP (kwasu linolowego) (Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2014a).** Wynik taki jest całkowitym przeciwieństwem oczekiwanego hamowania przecieku H^+ (typowego działania inhibitora tego zjawiska, tj. PN), dla którego powinno obserwować się spadek V_o wraz z odbudową $\Delta\Psi$. Stymulujący efekt GDP jest zatem podobny do fosforylacji ADP (przechodzenia stanu 4 w stan 3) i z pewnością dotyczy OXPHOS, gdyż zanika pod wpływem oligomycyny lub CATR. Jako wyjaśnienie tego zjawiska zaproponowałem zaangażowanie jednej z kinaz, a mianowicie mitochondrialnej izoformy kinazy difosforanów nukleozydów (mtNDPK). Enzym ten, katalizując reakcję transfosforylacji, tj. przeniesienia γ -fosforanu z trifosforanu nukleozydu na difosforan nukleozydu (np. $ATP + GDP \rightarrow ADP + GTP$), bardzo szybko metabolizuje pulę GDP w mitochondriach. W konsekwencji, natychmiastowym skutkiem aktywności mtNDPK jest: (i) wywoływanie OXPHOS w wyniku wzrostu stężenia ADP; oraz (ii) znaczne zmniejszenie prawdopodobieństwa wiązania się GDP z AAC/UCP w wyniku nagłego spadku stężenia GDP. U ssaków jedynie izoforma NDPK-D (NM23-H4, ang. *non-metastatic clone 23 human isoform 4*) posiada sekwencję sygnałową kierującą do mitochondriów (Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2017). Kinaza ta jest białkiem peryferycznym, związanym z wewnętrzną błoną mitochondrialną poprzez oddziaływania elektrostatyczne (głównie z kardioliipiną), i znajduje się zarówno w przestrzeni międzybłonowej, jak i w macierzy mitochondriów. **Nowo opisaną przeze mnie funkcją mtNDPK może być zatem przejściowe (w warunkach podwyższonej ekspresji i aktywności tej kinazy) wykluczanie (osłabianie), lub wręcz całkowita eliminacja działania GDP jako inhibitora mitochondrialnego przecieku H^+ zależnego od AAC i UCP (Ryc. 2).** Ponieważ aktywność mtNDPK sprzyja OXPHOS, oznacza to również, że wielkość mitochondrialnego przecieku H^+ wskutek efektu

reakcji transfosforylacji przeprowadzanej przez tę kinazę może bardzo poważnie obniżyć się ze względu na: **(i)** zaangażowanie AAC głównie w transport ADP/ATP; oraz **(ii)** istotne przyhamowanie UCP pod wpływem wzrostu stężenia GTP oraz spadku poziomu redukcji puli koenzymu Q (UCP staje się wówczas bardziej wrażliwe na PN) (**Ryc. 2** - przerywana linia).

Wpływ mtNDPK na wielkość przecieku H^+ ma prawdopodobnie wymiar uniwersalny, a regulacja ta mogła powstać już na wczesnych etapach ewolucji, o czym świadczą uzyskane przeze mnie wyniki na izolowanych mitochondriach ameby oraz bulw ziemniaka (Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2017). Dlatego też, **jako bardziej specyficzny ("diagnostyczny") inhibitor przecieku H^+ katalizowanego przez UCP możemy rozpatrywać GTP, ponieważ nukleotyd ten nie jest szybko metabolizowany w mitochondriach. Natomiast pełnienie przez GDP funkcji naturalnego inhibitora rozprężającej aktywności AAC/UCP jest silnie ograniczone, gdyż z kolei ten nukleotyd jest zbyt szybko metabolizowany w większości mitochondriów (mtNDPK w pierwszej kolejności efektywnie wychwytuje cząsteczki GDP), podobnie jak ADP (w wyniku OXPHOS).**



Ryc. 2. Proponowany model udziału mtNDPK w regulacji wielkości mitochondrialnego przecieku H^+ . Prawdopodobnie brak hamowania (czerwony X) AAC/UCP przez GDP następuje wskutek aktywności mtNDPK wywołującej OXPHOS. Kinaza ta jest związana elektrostatycznie ze stroną cytoplazmatyczną i macierzową IMM, jednak dla przejrzystości ryciny schematyczną reakcję transfosforylacji przedstawiono poza IMM. IMM - wewnętrzna błona mitochondrialna, $Q\uparrow$ - wzrost stężenia utlenionej formy koenzymu Q (ubichinonu), $QH_2\downarrow$ - spadek stężenia zredukowanej formy koenzymu Q (ubichinolu). Zmodyfikowane z Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2014a.

4.4. Czy poziom redukcji mitochondrialnego koenzymu Q wpływa na rozprzegającą aktywność AAC?

Niestety, na podstawie przeprowadzonych przeze mnie pomiarów, nie można jednoznacznie rozstrzygnąć w jakim stopniu elektrochemiczny gradient H^+ jest wykorzystywany wskutek stymulacji rozprzegającej aktywności AAC (jaki udział ma AAC w całkowitym zjawisku indukowanego przecieku H^+), zwłaszcza podczas intensywnej OXPHOS, i czy AAC koegzystujący z UCP jest wrażliwy na QH_2 . W izolowanych mitochondriach ameby, podczas oddechowego stanu 3, przeciek H^+ wywoływany przez dodawanie egzogennej HNE mogłem całkowicie zahamować stosując wyłącznie GTP (oczywiście przy dość silnym utlenieniu puli koenzymu Q) (Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2013). Podobną prawidłowość zaobserwowałem w przypadku zmniejszania (pod wpływem GTP) wielkości przecieku H^+ indukowanego egzogennym kwasem linolowym w mitochondriach izolowanych z nerek szczura (Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2014a). Mimo, że GTP wydaje się być bardziej "diagnostycznym" inhibitorem UCP niż GDP, nie można z całkowitą pewnością wykluczyć oddziaływania tego PN z AAC (Klingenberg, 2008). Jednakże, wyniki moich oryginalnych badań, w warunkach zbliżonych do warunków fizjologicznych (bez inhibitorów OXPHOS, ale z wysycającymi stężeniami określonych nukleotydów), wyraźnie wskazują, że prawdopodobnie *in vivo* AAC, nawet w obecności aktywatorów przecieku H^+ , efektywnie transportuje ADP/ATP i tym samym spełnia swoją podstawową funkcję (Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2014a). Mianowicie, podanie egzogennej GDP, w obecności egzogennej ATP i kwasu linolowego (lub przy braku tego aktywatora rozprzegania), do zawiesiny oddychających mitochondriów nie skutkowało przyhamowaniem V_o oraz odbudową $\Delta\Psi$, mimo że reakcja transfosforylacji katalizowana przez mtNDPK prowadzi do powstania puli GTP. Wręcz odwrotnie, obserwowane przeze mnie przyspieszenie V_o i spadek $\Delta\Psi$ (wskutek wywoływania OXPHOS) dowodzi, że AAC ma największe powinowactwo do ADP (pierwszego produktu reakcji typu *ping-pong* przeprowadzanej przez mtNDPK) w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów, zatem ten PN priorytetowo i efektywnie AAC transportuje do macierzy. W związku z tym GTP nie wpływa zbyt istotnie na aktywność AAC zarówno w przypadku transportu ADP/ATP, jak i translokacji H^+ (rozprzegania). Zatem **GTP raczej nie pełni funkcji fizjologicznego inhibitora przecieku H^+ zależnego od AAC i tym samym AAC prawdopodobnie nie jest wrażliwa na QH_2 .**

4.5. Regulacja aktywności UCP jest dość silnie zachowana w mitochondriach różnych przedstawicieli eukariontów

W obszernej pracy przeglądowej **podsumowałem aktualny stan wiedzy na temat różnych endogennych czynników wpływających na aktywność homologów/izoforn UCP** (Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2017). Wyczerpująco opisałem takie efekторы regulowanego przecieku H^+ w mitochondriach jak wolne (długołańcuchowe) kwasy tłuszczowe, reaktywne aldehydy, retinoidy czy nukleotydy purynowe, które stosowano podczas badań bioenergetycznych różnych przedstawicieli eukariontów (Tab. 2).

Tabela 2. Zestawienie rozpoznanych efektorów regulujących homologi/izoforny UCP u wybranych przedstawicieli eukariontów z różnych grup systematycznych. Zielony plus oznacza wykazanie danego typu mechanizmu, natomiast czerwony znak zapytania brak informacji na ten temat. **UCP1** - pierwsze opisane w historii UCP z termogennej brunatnej tkanki tłuszczowej ssaków (BAT, ang. *brown adipose tissue*). Zmodyfikowane z Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2017.

Organizm \ Efektor	FFA	Reaktywny aldehyd (ścieżka aktywacji z udziałem RFT)/ Retinoid	PN	Poziom redukcji koenzymu Q
ZWIERZĘTA <i>Kręgowce</i>				
Ssaki UCP1-3	+	+	+	+
UCP4-5	?	?	+	?
Ptaki	+	+	+	+
Gady	?	?	+	?
Płazy	?	?	?	?
Ryby	+	+	+	?
<i>Bezkręgowce</i> Owady	+	?	+	?
ROŚLINY <i>naczyniowe</i>	+	+	+	+
GRZYBY <i>w tym jednokomórkowe</i>	+	?	+	?
<i>inne</i> JEDNOKOMÓRKOWE eukarionty (<i>ameba</i>)	+	+	+	+

W pracy tej odniosłem się również do innych białek z rodziny mitochondrialnych nośników, w tym do AAC, w stosunku do których istnieją przesłanki świadczące o uczestnictwie (przynajmniej

częściowym) w całkowitym zjawisku naturalnego rozprężania mitochondriów. Mimo, że zidentyfikowane homologii/izoformy UCP różnią się znacznie sekwencjami kodującymi w ich genach, i tym samym sekwencjami aminokwasowymi, to jednak badania funkcjonalne na izolowanych mitochondriach jednokomórkowych i wielokomórkowych organizmów (począwszy od ameby a skończywszy na ssakach) sugerują, że **mechanizmy regulacji aktywności poznanych UCP w dużym stopniu zachowały się w toku ewolucji (Tab. 2).**

4.6. Potencjalne praktyczne wykorzystanie wyników badań osiągnięcia naukowego

Szczegółowa charakterystyka mechanizmów regulacji naturalnego zjawiska rozprężania mitochondriów stanowi klucz do zrozumienia zasadniczej funkcji przecieku H^+ w utrzymywaniu homeostazy energetycznej komórek o zróżnicowanym zapotrzebowaniu na ATP. Zaburzenia OXPHOS mogą prowadzić do licznych patofizjologii, jak np. cukrzycy typu II zaliczanej do poważnych chorób cywilizacyjnych (Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2008). Być może już w niedalekiej przyszłości, **opracowanie bezpiecznych dla zdrowia środków farmakologicznych stabilizujących pożądaną wielkość mitochondrialnego przecieku H^+ spowoduje pojawienie się zupełnie nowych metod leczenia wielu stanów chorobowych człowieka, w tym zmian nowotworowych. W przypadku chorób układu krążenia modulacja wielkości przecieku H^+ z udziałem AAC i UCP może stanowić jeden z endogennych mechanizmów kardioprotekcyjnych** (Nadtochiy et al., 2006). Z kolei **powiązanie aktywności mtNDPK z "katalizatorami" indukowanego przecieku H^+ może przyczynić się do szczegółowego wyjaśnienia etiologii niektórych chorób neurodegeneracyjnych.** Obniżona ekspresja i aktywność białek ludzkich izoform UCP (UCP2 i UCP4-5) w mózgu prawdopodobnie zwiększa ryzyko przyspieszonego rozwoju m.in. choroby Parkinsona i Alzheimera (Andrews et al., 2005; Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2008). Z kolei spadek aktywności różnych białek mitochondrialnych z centrami żelazo-siarkowymi (Fe-S), w tym akonitazy, m.in. w ośrodkowym układzie nerwowym, dotyczy pacjentów cierpiących na inne schorzenie neurodegeneracyjne, tj. ataksję Frیدreicha (Amutha et al., 2008). Co ciekawe, wykazano, że mtNDPK może wspomagać prawidłową biogenezę centrów Fe-S akonitazy poprzez generowanie puli GTP (Amutha et al., 2008), jednak dokładna funkcja GTP w tym procesie nadal nie jest poznana (dotychczas nie zidentyfikowano konkretnej GTPazy) (Pandey et al., 2015).

Akumulacja metali ciężkich w glebach jest poważnym problemem w produkcji warzyw i owoców, gdyż stanowi bezpośrednie zagrożenie zatrucia dla wielu organizmów. Co ciekawe, w

mitochondriach izolowanych z bulw ziemniaka wykazano zwiększanie się mitochondrialnego przecieku H^+ pod wpływem jonów kadmu, tj. im wyższe stężenie Cd^{2+} tym wielokrotnie większa stymulacja przecieku H^+ (Kessler i Brand, 1994). Ponadto, zrównoważona aktywność UCP w zielonych częściach roślin przyczynia się do optymalnej asymilacji CO_2 i tym samym odpowiedniej wydajności fotosyntezy (Sweetlove et al., 2006). Dlatego też, **badania abiotycznych czynników wpływających na wydajność OXPHOS, biorące pod uwagę endogenne regulatory indukowanego przecieku H^+ w mitochondriach, mogą dać bardzo wymierne korzyści w kontekście wszystkich konsumentów roślin.**

Należy pamiętać, że ameba *A. castellanii* jest oportunistycznym pasożytem człowieka powodującym różne choroby, jak np. amebowe zapalenie rogówki (*Acanthamoeba keratitis*), najczęściej spotykane u osób noszących soczewki kontaktowe (Omana-Molina et al., 2010). W związku z tym, **badania szczegółów procesu transdukcji energii w mitochondriach ameby (w ujęciu przecieku H^+) mogą przyczynić się do opracowania nowych strategii leczenia pewnych chorób odwierwotniakowych.**

Za moje najważniejsze osiągnięcie naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora uważam **wykazanie związku pomiędzy mtNDPK a regulacją mitochondrialnego przecieku H^+ zależnego od białek wiążących nukleotydy purynowe (AAC i UCP) (Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2014a).** Fakt, że GDP może wywoływać OXPHOS stawia pod dużym znakiem zapytania rolę tego nukleotydu jako naturalnego negatywnego efektora rozprzegającej aktywności AAC i UCP. Moja interpretacja, stanowczo podważająca zasadność stosowania GDP jako "diagnostycznego" inhibitora przecieku H^+ zależnego od AAC i homologów/izoform UCP, jest o tyle ważna, że zmienia pewien "paradygmat" w bioenergetyce. Od ponad 45 lat, tj. początków odkrywania UCP, GDP nadal powszechnie stosuje się jako "diagnostyczny" inhibitor UCP. Nigdy wcześniej nie brano pod uwagę metabolizmu GDP z udziałem mtNDPK jako fizjologicznej przeszkody silnie ograniczającej skuteczność działania GDP w regulacji (hamowaniu) białek umożliwiających mitochondrialny przeciek H^+ . Dlatego też, wyłącznie GTP, w zastępstwie GDP, należy standardowo stosować jako "specyficzny" inhibitor UCP. Wyjaśnienie to istotnie zmienia dotychczasowy pogląd odnośnie wpływu nukleotydów guaninowych na całokształt przemian energetycznych zachodzących w mitochondriach, w kontekście rozprzegającej aktywności AAC/UCP. Wyznacza również nowy trend w badaniach przecieku H^+ , w którym ważnym elementem analizy tego zjawiska są określone kinazy mitochondriów.

Największym wyróżnieniem Mojej dotychczasowej działalności naukowo-badawczej było przyznanie
w roku **2015** przez **Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego**
trzyletniego **stypendium naukowego dla wybitnego młodego naukowca**

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

5.1. Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora

5.1.1. Oksydaza alternatywna (AOX) w mitochondriach mikroorganizmów eukariotycznych

U części eukariontów, w tym przede wszystkim u jednokomórkowych organizmów oraz roślin, mitochondrialny łańcuch oddechowy jest rozbudowany i zawiera dodatkową oksydazę terminalną, tj. oksydazę alternatywną (AOX, ang. *alternative oxidase*), będącą oksydazą ubichinolu (Woyda-Płoszczyca et al., 2009). W przeciwieństwie do oksydazy cytochromu c (COX, ang. *cytochrom c oxidase*), zwanej również kompleksem IV łańcucha transportu elektronów, AOX nie jest wrażliwa na cyjanki, mimo, że prowadzi tożsamą reakcję redukcji O₂. Zakłada się, że w nietermogennych komórkach/tkankach enzym ten, podobnie jak homologi/izoformy UCP, pełni ważną funkcję antyoksydacyjną w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska (Jarmuszkiewicz et al., 2010). Mianowicie, AOX utleniając QH₂ obniża poziom redukcji puli błonowego koenzymu Q i tym samym skutecznie ogranicza uwalnianie RFT. Odbywa się to jednak kosztem siły redukcyjnej (np. NADH), a w konsekwencji syntezy ATP, gdyż AOX nie jest pompą protonową. Dlatego AOX również zalicza się do systemów rozpraszających energię.

Badając izolowane mitochondria trzech różnych jednokomórkowych eukariontów, tj. ameby *A. castellanii*, drożdży *Candida maltosa*, a także śluzowca *Dictyostelium discoideum*, po raz pierwszy wykazałem, że inhibitorem AOX mikroorganizmów (i tym samym zjawiska cyjanoodpornego oddychania) jest ATP. Ponadto, analiza kinetyczna wykazała, że wiązanie się GMP (pozytywnego allosterycznego efektora) oraz ATP (negatywnego allosterycznego efektora) z AOX podlega mechanizmowi wzajemnego wykluczania się (ang. *mutual exclusion*).

5.1.2. UCP1 i jego homologii

Badając mitochondrialny przeciek H⁺ przede wszystkim przyczyniłem się do zgłębienia zagadnienia wpływu poziomu redukcji endogennej puli koenzymu Q na aktywność różnych

homologów/izoform UCP. Dwoma najważniejszymi wynikami dotyczącymi tego zagadnienia było ustalenie, że:

- aktywność UCP1 z adipocytów brunatnej tkanki tłuszczowej szczura podlega tej kontroli (Swida-Barteczka et al., 2009);
- prawdopodobnie QH₂ wiąże się z monomerem AcUCP i tym samym uniemożliwia oddziaływanie tego nośnika z PN. Częsteczką zredukowanego koenzymu Q (ubichinol) pełni zatem funkcję negatywnego regulatora hamowania UCP przez PN, niezależnie od typu zasady azotowej (adeniny lub guaniny) oraz stopnia fosforylacji (mono-, di- lub trifosforanu) nukleotydu (Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2011).

Napisałem również dwie prace przeglądowe w języku polskim, które są pierwszymi na krajowym rynku wydawniczym pozycjami opisującymi homologi/izoformy UCP (ich ekspresję, strukturę, aktywność, regulację oraz znaczenie dla zdrowia człowieka) (Jarmuszkiewicz i Woyda-Płoszczyca, 2008; Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2008).

Pozostałe wyniki badań nad UCP (Swida et al., 2007; Swida et al., 2008), a także nad AOX (Woyda-Płoszczyca et al., 2009), zostały również opisane w pracy przeglądowej poświęconej mitochondrialnym systemom rozpraszającym energię u jednokomórkowych eukariontów (Jarmuszkiewicz et al., 2010).

5.1.3. Funkcja AOX i UCP podczas stresu oksydacyjnego

W przypadku zagadnień związanych z RFT, prowadzone przez mnie badania m.in. przyczyniły się do ustalenia, że:

- krótkotrwałe (5 min) traktowanie izolowanych mitochondriów *A. castellanii* H₂O₂ (0,5-25 mM) w obecności Fe²⁺ (0,2 mM) nie zmienia istotnie większości parametrów bioenergetycznych, jednak stres ten może osłabić aktywność AcAOX (oksydazy alternatywnej ameby *A. castellanii*) (Jarmuszkiewicz et al., 2008);
- traktowanie trofozoitów *A. castellanii* H₂O₂ (1,4 mM), w różnych fazach wzrostu hodowli komórkowej, daje odmienne odpowiedzi na poziomie funkcjonowania mitochondriów. W przypadku wczesnego podania H₂O₂ (na etapie intensywnych podziałów komórkowych fazy wzrostu wykładniczego) zarejestrowałem np. zwiększoną aktywność AcAOX oraz AcUCP w izolowanych mitochondriach (Woyda-Płoszczyca et al., 2011). Z kolei wymuszony stres oksydacyjny na hodowli o spowolnionym wzroście (zbliżającej się do fazy stacjonarnej)

skutkowało istotnym zwiększeniem ilości błonowego koenzymu Q w mitochondriach, co wykazałem po raz pierwszy. Udowodniłem również znaczny wzrost poziomu karbonylacji (markera oksydacyjnych uszkodzeń) białek mitochondrialnych w przypadku późnego podania H_2O_2 , które generalnie wywoływało pogarszanie się wielu parametrów oddechowych izolowanych mitochondriów, w tym wydajności OXPHOS;

- podawanie egzogennej HNE, pierwotnie opisanego jako istotny aktywator izoform UCP ssaków (UCP1-3), również silnie aktywuje AcUCP (Woyda-Płoszczyca i Jarmuszkiewicz, 2012). Po raz pierwszy zatem wykazałem, że reaktywny aldehyd (4-hydroksy-2-nonenal) pełni funkcję pozytywnego efektora indukowanego przecieku H^+ (przede wszystkim zależnego od aktywności AcUCP) w mitochondriach jednokomórkowego organizmu i tym samym potwierdziłem uniwersalność działania tego aktywatora UCP wśród eukariontów. Obserwacja ta może oznaczać, że już na wczesnych etapach ewolucji HNE stanowił ważny element określonej ścieżki stymulacji UCP, prawdopodobnie w następstwie stresu oksydacyjnego. Dowiodłem również, że hamowanie zaktywowanego przez HNE AcUCP z udziałem GTP jest nieefektywne w warunkach wysokiego stężenia endogennej QH_2 . Biorąc pod uwagę zmienny poziom redukcji mitochondrialnej puli koenzymu Q interesująca wydaje się hipoteza, że: (i) potencjalna interakcja cząsteczki QH_2 z UCP (sprzyjająca transportowi H^+ z uwagi na blokowanie oddziaływania UCP z inhibitorem, np. GTP, tak jak to przedstawiłem na **Ryc. 1**) stanowi aktywującą odpowiedź szybką (ang. *activating rapid response*), natomiast (ii) interakcja HNE z UCP jest aktywującą odpowiedzią późną (ang. *activating late response*), które wspólnie wpływają na wielkość mitochondrialnego przecieku H^+ . Obie odpowiedzi zależą od czasu i są ze sobą wzajemnie powiązane, ponieważ zwiększony poziom redukcji koenzymu Q sprzyja uwalnianiu RFT, które zapoczątkowują peroksydację kwasów tłuszczowych fosfolipidów błonowych. Jednak z powodu konieczności nagromadzenia się endogennych reaktywnych aldehydów (produktów końcowych peroksydacji lipidów), mniej specyficznie oddziałujących z UCP w porównaniu do FFA, odpowiedź zależna od HNE zachodzi z opóźnieniem w porównaniu do odpowiedzi z udziałem samego QH_2 . Ostatecznie, silne pobudzenie przecieku H^+ przeciwdziała dalszemu powstawaniu zwiększonych ilości RFT i HNE (oraz toksycznym efektom tych cząsteczek) wskutek mechanizmu negatywnego sprzężenia zwrotnego (ang. *negative feedback loop*), gdyż aktywacja UCP (ścieżką zależną właśnie od RFT i HNE) odpowiednio obniża $\Delta\Psi$, tj. powoduje również spadek poziomu redukcji koenzymu Q.

Idea działania swoistej pętli regulacyjnej wspiera zaproponowaną antyoksydacyjną funkcję UCP w nietermogennych komórkach/tkankach, która prawdopodobnie jest pierwotnym zadaniem i zarazem pierwszą ewolucyjną korzyścią (nadal utrzymywaną) naturalnie zachodzącego procesu częściowego rozprzęgania mitochondriów. Dlatego UCP może zapewniać optymalną wydajność OXPHOS przy minimalnym uwalnianiu RFT w mitochondriach.

Za moje najważniejsze osiągnięcie naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora uważam wykazanie, że wśród nukleotydów purynowych, adeninowych (AMP, ADP, ATP) i guaninowych (GMP, GDP, GTP), które wcześniej opisywano wyłącznie jako potencjalne aktywatory niewrażliwej na cyjanek oksydazy alternatywnej (AOX) mikroorganizmów eukariotycznych, nukleotyd ATP może pełnić funkcję inhibitora tego enzymu. Wynik ten bardzo istotnie zweryfikował stan wiedzy na temat allosterycznej regulacji określonych homologów/izoform AOX ([Woyda-Płoszczyca et al., 2009](#)).

Największym wyróżnieniem Mojej działalności naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora było przyznanie w roku 2009 przez Prezydenta Miasta Poznania Stypendium Naukowego Miasta Poznania dla młodych badaczy z poznańskiego środowiska naukowego

5.2. Inne osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora

5.2.1. Wpływ hiperglikemii na bioenergetykę mitochondriów komórek śródbłónka człowieka

Badając komórki ludzkiego śródbłónka, hodowane w warunkach podwyższonego stężenia glukozy (25 mM), m.in. wykazałem, że hiperglikemia zwiększa stężenie błonowego koenzymu Q₁₀ oraz powoduje dwukrotny wzrost indukowanej FFA aktywności UCP2 w izolowanych mitochondriach, w porównaniu do warunków kontrolnych (5,5 mM glukoza) ([Koziel et al., 2012](#)).

5.2.2. Wpływ zmian temperatury i treningu wytrzymałościowego na bioenergetykę mitochondriów mięśni szczura

Prowadziłem również badania we współpracy z naukowcami z Akademii Wychowania Fizycznego im. Bronisława Czecha w Krakowie oraz Akademii Wychowania Fizycznego im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu. Wykonując pomiary określonych parametrów bioenergetycznych mitochondriów izolowanych z mięśni szczura m.in. wykazałem, że:

- skokowy wzrost temperatury, tj. od 25°C (hipotermii), poprzez 35°C (fizjologiczną temperaturę mięśni w stanie spoczynku) do 42°C (hipertermii), w przypadku oddechowego stanu 4, prowadzi do spadku $\Delta\Psi$ oraz poziomu redukcji błonowego koenzymu Q_9 , przy czym około 4-krotnie wzrasta wielkość indukowanego FFA przecieku H^+ z udziałem UCP2/UCP3 (Jarmuszkiewicz et al., 2015);
- trening wytrzymałościowy (dotyczący szczurów trenowanych przez osiem tygodni) zwiększa zawartość koenzymu Q_9 oraz niezależnie od temperatury (25°C, 35°C lub 42°C) obniża wielkość indukowanego FFA przecieku H^+ katalizowanego przez UCP2/UCP3 (przy czym istotnie zwiększa poziom redukcji błonowego koenzymu Q_9) w mitochondriach podczas oddechowego stanu 4 w porównaniu do kontroli (mitochondriów szczurów nie poddanych treningowi) (Zoladz et al., 2016). Natomiast podczas oddechowego stanu 3 obserwowałem nieznaczne zmniejszenie się poziomu redukcji mitochondrialnego koenzymu Q_9 (niezależnie od temperatury) pod wpływem treningu w porównaniu do kontroli.

Udowodniłem również, że trening wytrzymałościowy zwiększa ekspresję markera biogenezy mitochondriów, tj. czynnika transkrypcyjnego Nrf2 [ang. *nuclear factor erythroid 2 (NFE2)-related factor 2*] (Zoladz et al., 2017).

5.2.3. Wpływ stresu temperatury na biogenezę mitochondriów kalafiora w ujęciu zmian aktywności składników łańcucha oddechowego

Współpracując z dr. Michałem Rurkiem (obecnie dr. hab.), z Zakładu Biologii Molekularnej i Komórkowej Wydziału Biologii UAM, zajmowałem się wpływem stresu temperatury na funkcjonowanie mitochondriów roślin, na przykładzie kalafiora (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) (Rurek et al., 2015). Hodowlę tej rośliny poddawano stresowi podwyższonej (40°C przez 4 godziny) lub obniżonej temperatury (8°C przez 10 dni), a następnie przywracano warunki standardowe (23/19°C w cyklu dzień/noc), które utrzymywano przez 48 godzin. Wykorzystując izolowane

mitochondria z części kwiatowej m.in. wykazałem, że stres wywołany podwyższeniem temperatury prowadzi do obniżenia efektywności OXPHOS, wskutek zwiększonej aktywności AOX, przy czym powrót do warunków standardowych przywraca podstawową aktywność tej oksydazy oraz podwyższoną wydajność OXPHOS (zgodnie z kontrolą). Z kolei stres spowodowany obniżeniem temperatury ujawniał spadek aktywności AOX (powrót do warunków standardowych niwelował tę tendencję) oraz nie wpływał negatywnie na OXPHOS.

6. Podsumowanie dorobku naukowego

Tabela 3. Zestawienie wybranych parametrów naukometrycznych przed i po uzyskaniu stopnia doktora. Szczegółowy wykaz danych pozycji znajduje się w załączniku nr 4 i 5.

<u>Parametry naukometryczne</u>	<i>przed uzyskaniem stopnia doktora</i>	<i>po uzyskaniu stopnia doktora</i>	suma
publikacje oryginalne i przeglądowe indeksowane w bazie JCR	8	10	18
publikacje oryginalne i przeglądowe spoza bazy JCR	2	0	2
publikacje w materiałach konferencyjnych:			
• abstrakty indeksowane w bazie WoS	5	4	9
• inne abstrakty o zasięgu międzynarodowym	4	11	15
• abstrakty o zasięgu ogólnopolskim/międzynarodowym	9	15	24
sumaryczny IF publikacji wg. bazy JCR zgodnie z rokiem opublikowania	30,084	35,999	66,083
sumaryczny IF 5-letni (2018)			66,144
sumaryczna liczba punktów za publikacje wg. listy MNiSW (2017)	271	360	631
indeks h wg. bazy WoS			10
sumaryczna liczba cytowań publikacji wg. bazy WoS bez autocytowań			227 166

7. Projekty naukowe w realizacji i plany badawcze

Obecnie kieruję projektem **NCN 2015/19/D/NZ3/00087 (Sonata 10, 2016-2020)**, którego jestem jedynym wykonawcą. Moim najbliższym celem naukowym jest wykazanie silnego związku mtNDPK z wielkością mitochondrialnego przecieku H^+ , również u takich organizmów, u których

brak oczywistego homologu UCP1, jak np. u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. W ramach tego projektu zaplanowałem również staż u prof. Richarda Portera z Trinity Biomedical Sciences Institute, Trinity College Dublin (Irlandia), gdzie będę zajmował się mitochondriami ssaków pozbawionych określonej izoformy UCP, np. izolowanych z tkanek osobników mysiej linii hodowlanej bez UCP3 (*knockout* UCP3).

Andrzej Woyda-Płoszczyca

dr Andrzej M. Woyda-Płoszczyca

Bibliografia

- Amutha, B., D. M. Gordon, Y. Gu, E. R. Lyver, A. Dancis, and D. Pain, 2008, GTP is required for iron-sulfur cluster biogenesis in mitochondria: *J Biol Chem*, v. 283, p. 1362-71.
- Andrews, Z. B., S. Diano, and T. L. Horvath, 2005, Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: in support of function and survival: *Nat Rev Neurosci*, v. 6, p. 829-40.
- Brand, M. D., K. M. Brindle, J. A. Buckingham, J. A. Harper, D. F. Rolfe, and J. A. Stuart, 1999, The significance and mechanism of mitochondrial proton conductance: *Int J Obes Relat Metab Disord*, v. 23 Suppl 6, p. S4-11.
- Echtay, K. S., T. C. Esteves, J. L. Pakay, M. B. Jekabsons, A. J. Lambert, M. Portero-Otin, R. Pamplona, A. J. Vidal-Puig, S. Wang, S. J. Roebuck, and M. D. Brand, 2003, A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling: *Embo j*, v. 22, p. 4103-10.
- Grimsrud, P. A., H. Xie, T. J. Griffin, and D. A. Bernlohr, 2008, Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes: *J Biol Chem*, v. 283, p. 21837-41.
- Gueraud, F., 2017, 4-Hydroxynonenal metabolites and adducts in pre-carcinogenic conditions and cancer: *Free Radic Biol Med*, v. 111, p. 196-208.
- Jarmuszkiewicz, W., N. Antos-Krzeminska, D. Drachal-Chrul, K. Matkovic, W. Nobik, J. Pienkowska, A. Swida, A. Woyda-Ploszczyca, and M. Budzinska, 2008, Basic energetic parameters of *Acanthamoeba castellanii* mitochondria and their resistance to oxidative stress: *Acta Biochim Pol*, v. 55, p. 349-55.
- Jarmuszkiewicz, W., A. Swida, M. Czarna, N. Antos, C. M. Sluse-Goffart, and F. E. Sluse, 2005, In phosphorylating *Acanthamoeba castellanii* mitochondria the sensitivity of uncoupling protein activity to GTP depends on the redox state of quinone: *J Bioenerg Biomembr*, v. 37, p. 97-107.
- Jarmuszkiewicz, W., and A. Woyda-Ploszczyca, 2008, [Mitochondrial uncoupling proteins: regulation and physiological role]: *Postepy Biochem*, v. 54, p. 179-87.
- Jarmuszkiewicz, W., A. Woyda-Ploszczyca, N. Antos-Krzeminska, and F. E. Sluse, 2010, Mitochondrial uncoupling proteins in unicellular eukaryotes: *Biochim Biophys Acta*, v. 1797, p. 792-9.
- Jarmuszkiewicz, W., A. Woyda-Ploszczyca, A. Koziel, J. Majerczak, and J. A. Zoladz, 2015, Temperature controls oxidative phosphorylation and reactive oxygen species production through uncoupling in rat skeletal muscle mitochondria: *Free Radic Biol Med*, v. 83, p. 12-20.
- Kessler, A., and M. D. Brand, 1994, Localisation of the sites of action of cadmium on oxidative phosphorylation in potato tuber mitochondria using top-down elasticity analysis: *Eur J Biochem*, v. 225, p. 897-906.
- Klingenberg, M., 2008, The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier: *Biochim Biophys Acta*, v. 1778, p. 1978-2021.

- Koziel, A., A. Woyda-Płoszczyca, A. Kicińska, and W. Jarmuszkiewicz, 2012, The influence of high glucose on the aerobic metabolism of endothelial EA.hy926 cells: *Pflugers Arch*, v. 464, p. 657-69.
- Nadtochiy, S. M., A. J. Tompkins, and P. S. Brookes, 2006, Different mechanisms of mitochondrial proton leak in ischaemia/reperfusion injury and preconditioning: implications for pathology and cardioprotection: *Biochem J*, v. 395, p. 611-8.
- Navet, R., P. Douette, F. Puttine-Marique, C. M. Sluse-Goffart, W. Jarmuszkiewicz, and F. E. Sluse, 2005, Regulation of uncoupling protein activity in phosphorylating potato tuber mitochondria: *FEBS Lett*, v. 579, p. 4437-42.
- Nicholls, D. G., and O. Lindberg, 1973, Brown-adipose-tissue mitochondria. The influence of albumin and nucleotides on passive ion permeabilities: *Eur J Biochem*, v. 37, p. 523-30.
- Omana-Molina, M., A. Gonzalez-Robles, L. I. Salazar-Villatoro, A. R. Cristobal-Ramos, M. Gonzalez-Lazaro, E. Salinas-Moreno, R. Mendez-Cruz, M. Sanchez-Cornejo, E. De la Torre-Gonzalez, and A. Martinez-Palomo, 2010, *Acanthamoeba castellanii*: morphological analysis of the interaction with human cornea: *Exp Parasitol*, v. 126, p. 73-8.
- Pandey, A., J. Pain, A. K. Ghosh, A. Dancis, and D. Pain, 2015, Fe-S cluster biogenesis in isolated mammalian mitochondria: coordinated use of persulfide sulfur and iron and requirements for GTP, NADH, and ATP: *J Biol Chem*, v. 290, p. 640-57.
- Rurek, M., A. M. Woyda-Płoszczyca, and W. Jarmuszkiewicz, 2015, Biogenesis of mitochondria in cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis) curds subjected to temperature stress and recovery involves regulation of the complexome, respiratory chain activity, organellar translation and ultrastructure: *Biochim Biophys Acta*, v. 1847, p. 399-417.
- Sweetlove, L. J., A. Lytovchenko, M. Morgan, A. Nunes-Nesi, N. L. Taylor, C. J. Baxter, I. Eickmeier, and A. R. Fernie, 2006, Mitochondrial uncoupling protein is required for efficient photosynthesis: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, p. 19587-92.
- Swida, A., M. Czarna, A. Woyda-Płoszczyca, A. Kicińska, F. E. Sluse, and W. Jarmuszkiewicz, 2007, Fatty acid efficiency profile in uncoupling of *Acanthamoeba castellanii* mitochondria: *J Bioenerg Biomembr*, v. 39, p. 109-15.
- Swida, A., A. Woyda-Płoszczyca, and W. Jarmuszkiewicz, 2008, Redox state of quinone affects sensitivity of *Acanthamoeba castellanii* mitochondrial uncoupling protein to purine nucleotides: *Biochem J*, v. 413, p. 359-67.
- Swida-Barteczka, A., A. Woyda-Płoszczyca, F. E. Sluse, and W. Jarmuszkiewicz, 2009, Uncoupling protein 1 inhibition by purine nucleotides is under the control of the endogenous ubiquinone redox state: *Biochem J*, v. 424, p. 297-306.
- Woyda-Płoszczyca, A., and W. Jarmuszkiewicz, 2008, [Uncoupling proteins in modulation of mitochondrial functions--therapeutic prospects]: *Postepy Biochem*, v. 54, p. 188-97.
- Woyda-Płoszczyca, A., and W. Jarmuszkiewicz, 2011, Ubiquinol (QH₂) functions as a negative regulator of purine nucleotide inhibition of *Acanthamoeba castellanii* mitochondrial uncoupling protein: *Biochim Biophys Acta*, v. 1807, p. 42-52.
- Woyda-Płoszczyca, A., and W. Jarmuszkiewicz, 2013, Hydroxynonenal-stimulated activity of the uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii* mitochondria under phosphorylating conditions: *Biol Chem*, v. 394, p. 649-58.
- Woyda-Płoszczyca, A., A. Koziel, N. Antos-Krzeminska, and W. Jarmuszkiewicz, 2011, Impact of oxidative stress on *Acanthamoeba castellanii* mitochondrial bioenergetics depends on cell growth stage: *J Bioenerg Biomembr*, v. 43, p. 217-25.
- Woyda-Płoszczyca, A. M., and W. Jarmuszkiewicz, 2012, Hydroxynonenal, a lipid peroxidation end product, stimulates uncoupling protein activity in *Acanthamoeba castellanii* mitochondria; the sensitivity of the inducible activity to purine nucleotides depends on the membranous ubiquinone redox state: *J Bioenerg Biomembr*, v. 44, p. 525-38.
- Woyda-Płoszczyca, A. M., and W. Jarmuszkiewicz, 2014a, Different effects of guanine nucleotides (GDP and GTP) on protein-mediated mitochondrial proton leak: *PLoS One*, v. 9, p. e98969.
- Woyda-Płoszczyca, A. M., and W. Jarmuszkiewicz, 2014b, Sensitivity of the aldehyde-induced and free fatty acid-induced activities of plant uncoupling protein to GTP is regulated by the ubiquinone reduction level: *Plant Physiol Biochem*, v. 79, p. 109-16.
- Woyda-Płoszczyca, A. M., and W. Jarmuszkiewicz, 2017, The conserved regulation of mitochondrial uncoupling proteins: From unicellular eukaryotes to mammals: *Biochim Biophys Acta*, v. 1858, p. 21-33.
- Woyda-Płoszczyca, A. M., F. E. Sluse, and W. Jarmuszkiewicz, 2009, Regulation of *Acanthamoeba castellanii* alternative oxidase activity by mutual exclusion of purine nucleotides; ATP's inhibitory effect: *Biochim Biophys Acta*, v. 1787, p. 264-71.
- Zoladz, J. A., A. Koziel, I. Broniarek, A. M. Woyda-Płoszczyca, K. Ogrodna, J. Majerczak, J. Celichowski, Z. Szkutnik, and W. Jarmuszkiewicz, 2017, Effect of temperature on fatty acid metabolism in skeletal muscle mitochondria of untrained and endurance-trained rats: *PLoS One*, v. 12, p. e0189456.
- Zoladz, J. A., A. Koziel, A. Woyda-Płoszczyca, J. Celichowski, and W. Jarmuszkiewicz, 2016, Endurance training increases the efficiency of rat skeletal muscle mitochondria: *Pflugers Arch*, v. 468, p. 1709-24.