

**"Podwójnie uniparentalny system dziedziczenia mitochondriów u małży.
Transkryptomika, mitogenomika oraz nadliczbowe ramki odczytu: analiza
funkcjonalna"
mgr inż. Marek Lubośny**

W przeciwieństwie do klasycznego, matczyne sposobu dziedziczenia mitochondriów opisanego dla większości gatunków zwierząt (w tym ludzi), omułki z rodzaju *Mytilus* dziedziczą mitochondria według modelu podwójnie uniparentalnego (DUI). W systemie DUI mitochondrialny DNA (mtDNA) dziedziczony jest w układzie „matka-córka” oraz „ojciec-syn”, gdzie samice przekazują swój mitochondrialny DNA (F mtDNA) zarówno synom jak i córkom, podczas gdy samce przekazują jeden ze swoich mtDNA (M mtDNA) wyłącznie synom. W rezultacie osobniki męskie wykazują heteroplazmię o dywergencji sięgającej nawet 50% (~24 % dla rodzaju *Mytilus*).

W ciągu ostatniej dekady w mtDNA omułka odkryto nową F-swoistą ramkę odczytu (ORF) o długości 375 par zasad, która prawdopodobnie ma znaczenie funkcjonalne. Podobną ramkę odczytu zidentyfikowano u kilku pokrewnych gatunków tworzących kompleks *Mytilus edulis*, a także u nieco odleglejszych ewolucyjnie *M. californianus* i *M. coruscus* co sugeruje, że jest ona utrzymywana w tej linii ewolucyjnej przez co najmniej 13 milionów lat. Co więcej, jest prawdopodobne, iż homologiczna ORF istnieje także w genomie *Musculista senhousia*, małża ze spokrewnionej z omułkiem podrodziny Crenellinae, również wykazującego DUI. Te dane sugerują, że istnieją nierozpoznane dotąd swoiste mitochondrialne geny, które mogą pełnić kluczowe funkcje biologiczne, takie jak regulacja transmisji mtDNA czy determinacja płci. Obecność dodatkowych otwartych ramek odczytu wskazuje, iż mitochondrialne genomy zwierząt mogą spełniać znacznie więcej funkcji niż się spodziewano.

Pierwsza część dysertacji skupia się na nowoczesnym podejściu do badań nad podwójnie uniparentalnym systemem dziedziczenia mitochondriów w oparciu o wysokoprzepustowe sekwencjonowanie nowej generacji RNA (NGS RNA-seq). Ze względu na pokrewieństwo z gatunkiem wykazującym DUI (*Venerupis philippinarium*; wspólna rodzina Veneridae) do badań pod kątem występowania DUI wytypowany został chilijski gatunek małży z rodzaju *Eurhomalea*. Bioinformatyczna analiza sekwencji transkryptomicznych wykazała obecność pojedynczego zestawu genów mitochondrialnych (w tym *atp8*) dowodząc braku tego fenomenu dla gatunku *E. rufa*.

Druga część dysertacji skupia się na dodatkowej czternastej otwartej ramce odczytu (*forf*) zlokalizowanej w rejonie kontrolnym (CR) mitochondrialnego DNA omułka.

Pod względem struktury sekwencja ta zawiera wszystkie niezbędne motywy do ekspresji białka: kodon startu, stopu oraz wysokie zakonserwowanie międzyosobnicze. Co więcej, naukowcy upatrują w tej i ramach homologicznych (zidentyfikowanych u innych małży z DUI) kandydata na kluczowy element zaangażowany w podwójnie uniparentalne dziedziczenie mitochondriów. Uzyskane wyniki oparte o wysokoprzepustowe techniki sekwencjonowania DNA (NGS DNA-seq), metodę western blot oraz spektrometrię mas zdają się wspierać hipotezę o aktywnej ekspresji tego białka, pozostawiając jednak pole do spekulacji. Detekcja badanej ramki *forf* ograniczała się do tkanek płaszczka, osobników męskich, w początkowym okresie dojrzewania gamet.

Trzecia część pracy doktorskiej podejmuje problem „brakującego” genu podjednostki 8 ATPazy w mitochondrialnym genomie małży z gatunku *Mytilus edulis*. Od czasu publikacji pierwszego mitogenomu małży (tj. *M. edulis*) w 1992 roku istnieje przeświadczenie, iż część małży może nie posiadać mitochondrialnego genu *atp8*. Przeprowadzone badania wykorzystujące technikę western blot oraz dwuwymiarową elektroforezę typu BN/SDS- PAGE połączoną z detekcją aktywności enzymatycznej kompleksu syntazy ATP pozwoliły na jednoznaczne potwierdzenie ekspresji podjednostki 8 ATPazy zarówno przez żeński (F) jak i męski (M) mitochondrialny genom małży *M. edulis*.