

Streszczenie (summary in Polish)

Przez całe życie organizmy mierzą się z różnymi czynnikami, które kształtują ich zachowanie, fizjologię, śmiertelność a także napędzają procesy ekologiczne i ewolucyjne w populacjach. W dużej mierze efekty te są kształtowane przez warunki klimatyczne, wliczając temperaturę i opady atmosferyczne. U ektotermów zmiana temperatury otoczenia wpływa bezpośrednio na tempo procesów fizjologicznych, a zatem może wpływać na funkcjonowanie tych zwierząt w środowisku. Gradient temperatury rozwoju prowadzi zwykle u ektotermów do plastycznych fenotypowo zmian wielkości ciała i wielkości komórek, ale zależność wielkości komórek od temperatury rozwoju jest znacznie słabiej zbadana. Wreszcie, globalne procesy klimatyczne są wskazywane jako główny czynnik napędzający ewolucję wielkości ciała i wielkości komórek ektotermów w geologicznej i geograficznej skali czasu.

Wielkość ciała ma wyraźne przełożenie na elementy dostosowania organizmu (np. konkurencję o zasoby, potencjał rozrodczy, właściwości antydrapieżnicze), ale wartość adaptacyjna wielkości komórek była rzadko badana, co wskazuje na niepełne rozumienie znacznej części różnorodności biologicznej. Zgodnie z kształtującą się teorią optymalnego rozmiaru komórek (z ang. theory of optimal cell size; TOCS), wielkość komórki jest cechą pozostającą w przyrodzie pod presją selekcyjną. Duże komórki mają niższy stosunek powierzchni do objętości w porównaniu z małymi komórkami, dlatego też wymagają relatywnie mniej energii na utrzymanie błon plazmatycznych. Z drugiej strony, komórki te mają mniejszą zdolność transportową z uwagi na większe do pokonania odległości podczas dyfuzji gazów i mniejszą powierzchnię błon plazmatycznych (na jednostkę objętości). Teoria przewiduje, że adaptacyjna wartość danej wielkości komórki zależy od bilansu pomiędzy kosztami związanymi z utrzymaniem błon plazmatycznych a korzyściami związanymi ze zdolnością do pozyskiwania i przetwarzania zasobów. Bilans ten powinien różnić się w zależności od środowiska, prowadząc do presji selekcyjnej, która optymalizuje różne wielkości komórek w różnych środowiskach. Niestety, dowody empiryczne na te przewidywane efekty fizjologiczne wielkości komórek są nieliczne. Dlatego testowanie tej teorii (TOCS) w celu ustalenia powiązań między wielkością komórek a wydolnością organizmu w różnych gradientach środowiskowych jest konieczne, aby pogłębić zrozumienie ekologii fizjologicznej i ewolucyjnej ektotermów.

Wśród zwierząt zmiennocieplnych, owady są najliczniejszą i najbardziej zróżnicowaną grupą organizmów, często odgrywającą kluczową rolę w ekosystemach. Dlatego też,

zidentyfikowanie czynników ograniczających wydolność fizjologiczną owadów ma szczególnie kluczowe znaczenie dla zrozumienia wpływu minionych i trwających zmian klimatycznych na systemy biologiczne. Podczas gdy zdolność niektórych owadów do latania (np. rzędu Diptera) może potencjalnie pomóc im w rozprzestrzenianiu się i przez to uniknąć niesprzyjających warunków, sam lot jest czynnością bardzo wymagającą fizjologicznie. Z tego powodu szczególnie ważne jest zidentyfikowanie jego ograniczeń, które wydają się ważne dla oceny zdolności owadów do reagowania na zmieniające się warunki. Koncentrując się na locie aktywnym u muchówek (dwuskrzydłych), wykorzystałam dogodny obiekt badawczy, wywilnię karłowatą (muszkę owocową) *Drosophila melanogaster*, aby zbadać u niej wpływ starzenia, dostępności tlenu, temperatury i wielkości komórek na ten rodzaj aktywności lokomotorycznej.

Rozpoczynam moją rozprawę doktorską od ogólnego wprowadzenia, w którym przedstawiam ekologię owadów lądowych, ich ograniczenia termiczne oraz czynniki mogące mieć wpływ na rozmieszczenie owadów w środowisku. Następnie przedstawiam główny cel mojej pracy doktorskiej, którym jest zbadanie jak starzenie, dostępność tlenu i wielkość komórek wpływają na wydolność fizjologiczną muszek *D. melanogaster* podczas aktywnego lotu. Niektóre z tych wyników konfrontuję z informacjami na temat zdolności do wspinania się badanych muszek po pionowych powierzchniach. Warto zauważyć, że wiele wcześniejszych badań *D. melanogaster* wykonywanych w warunkach laboratoryjnych sprawdzało wpływ podobnego rodzaju czynników na funkcjonowanie muszek, ale badania te skupiały się na znacznie mniej wymagających aktywnościach niż aktywny lot. W ramach projektu przeprowadziłam trzy rodzaje badań (**Badanie I-III**), które zostały opublikowane. **Badanie I** i **Badanie II** miały na celu sprawdzenie wpływu wielkości komórek, dostępności tlenu i różnic płciowych na tolerancję termiczną muszek *D. melanogaster* z mutacjami w wybranych elementach szlaków sygnalizacyjnych TOR/insuliny, odpowiedzialnych za kontrolowanie cyklu komórkowego. Celem **Badania I** jest określenie fenotypu (czy mutanty mają mniejsze czy większe komórki w porównaniu z grupą kontrolną) u genetycznie zmodyfikowanych muszek *D. melanogaster*. Informacje te są niezbędne dla **Badania II**, które ma na celu określenie powiązań między wielkością komórek i dostępnością tlenu a tolerancją wysokich temperatur u aktywnych muszek owocowych. **Badanie I** koncentruje się również na innym ważnym, ale słabo poznanym zjawisku rozwojowym i analizuje czy zaburzenia szlaków TOR/insuliny powodują spójne ogólnoustrojowe zmiany wielkości komórek czy też komórki reagują na te zaburzenia w sposób

specyficzny dla danej tkanki. **Badanie I** pozwoliło na ocenę wielkości komórek w czterech tkankach/organach (odnóża, skrzydła, oczy i mięśnie tułowia związanych z lotem) u genetycznie zmodyfikowanych linii *D. melanogaster* (*rictor^{d2}* and *Mnt¹*) i odpowiadającym im liniom kontrolnym. W **Badaniu II** wykorzystano te same muszki, pochodzące z tej samej puli osobników co w **Badaniu I** i oceniono ich fizjologiczne możliwości znoszenia podwyższonych temperatur. Aby sprawdzić, czy wielkość komórek, dostępność tlenu i płeć wpływają na tolerancję termiczną, zmierzyłam wydolność muszek (u obu płci), które mogły swobodnie latać, chodzić lub utrzymywać się na pionowej powierzchni, podczas gdy temperatura stale rosła. W ten sposób oszacowano temperatury, w których 50% muszek w badanej grupie uległo obezwładnieniu przez warunki. Testy te przeprowadzono w powietrzu o zmniejszonym lub normalnym stężeniu tlenu, dzięki czemu mogłam sprawdzić, czy tolerancja na ciepło zmniejsza się w wyniku zmniejszonej dostępności do tlenu. W **Badaniu III** użyto innego typu mutantów *D. melanogaster*; były to muszki o genotypach z mutacjami, które pojawiły się spontanicznie podczas eksperymentów ewolucyjnych przeprowadzanych przez innych badaczy na muszkach dzikich. Z udziałem muszek o tych genotypach, w **Badaniu III** dogłębniej zbadano sprawność lokomotoryczną muszek – ich zdolność do wspinania się po pionowych powierzchniach i utrzymywania wysokiej częstotliwości uderzeń skrzydłami podczas lotu „na uwięzi” – sprawdzając, czy oba typy sprawności wykazują podobne tendencje spadkowe wraz z wiekiem. Ponadto w badaniu tym zmierzono w jakim stopniu wydolność lotu unieruchomionych muszek *D. melanogaster* jest ograniczona dostępnością tlenu w powietrzu.

Badanie I ujawniło, że badane mutacje w szlakach metabolicznych zaangażowanych w kontrolę cyklu komórkowego powodowały ogólnoustrojowe zmiany w wielkości komórek w różnych typach tkanek, prowadząc do powstawania mniejszych lub większych komórek. Mutacje te nie zmieniły jednak wielkości komórek w mięśniach lotnych tułowia, ujawniając zdolność tych komórek do autonomicznych zmian rozmiaru, charakterystycznych dla tkanki. Mechanizm tego zjawiska jest dobrym punktem do dalszych badań. **Badanie II** wykazało, że generalnie zmniejszona dostępność tlenu w powietrzu negatywnie wpływa na górne granice termiczne *D. melanogaster*. Zgodnie z przewidywanym wpływem wielkości komórek na wydolność, płeć muszek z większymi komórkami (samice) miała niższą tolerancję na podwyższone temperatury niż płeć z małymi komórkami (samce). Zgodnie z tymi przewidywaniami także mutanty z większymi komórkami miały niższą tolerancję na ciepło niż ich grupa kontrolna. Jednak wbrew

przewidywaniom mutanty o mniejszych komórkach funkcjonowały gorzej niż ich grupa kontrolna, co wskazuje, że mutacje w szlakach kontroli cyklu komórkowego, niezależnie od ich wpływu na wielkość komórki, mogą być ważnym czynnikiem kształtującym tolerancję na ciepło. Wspierając wnioski z **Badania II**, **Badanie III** wykazało, że niski poziom tlenu upośledzał maksymalną częstotliwość uderzeń skrzydłami unieruchomionych *D. melanogaster*. Jednocześnie pomiary wydolności lokomotorycznej u starzejących się muszek pokazały różne wyniki w zależności od rodzaju aktywności lokomotorycznej. Zdolność do pionowej wspinaczki spadała szybko u starszych muszek, ale wydolność muszek w czasie lotu – aktywności wymagającej większej ilości tlenu niż wspinaczka – nie pogarszała się wraz z wiekiem. Podsumowując, wyniki te potwierdzają koncepcję, że ograniczenia w dostępie do tlenu odgrywają rolę w tolerancji termicznej muszek i ich wydolności w czasie lotu, ale ta wydolność może być mniej zależna od procesów starzenia w porównaniu do innych typów aktywności lokomotorycznej. Z uwagi na to, że ten ostatni wniosek jest zaskakujący, ta kwestia wymaga dalszych badań, być może z wykorzystaniem swobodnie latających owadów.

Moje badania z wykorzystaniem *D. melanogaster* pozwalają na pewne uogólnienia: (i) aktywność szlaków TOR/insulina determinuje ogólnoustrojową wielkość komórek, prowadząc do skoordynowanych zmian wielkości komórek w różnych tkankach i narządach całego organizmu, (ii) dodatkowo niesystemowe i tkankowo specyficzne mechanizmy mogą kształtować strukturę komórkową niektórych tkanek niezależnie od efektów mutacji w szlakach kontroli cyklu komórkowego, (iii) dostępność tlenu jest ważnym czynnikiem, który może wpływać na wydolność lotu i tolerancję na ciepło u owadów, (iv) wielkość komórek i mutacje w szlakach kontroli cyklu komórkowego mogą być ważnym czynnikiem kształtującym tolerancję termiczną, oraz (v) wśród różnych aspektów sprawności lokomotorycznej muszek, ich zdolność do generowania wysokich częstotliwości uderzeń skrzydeł może nie być pod znacznym wpływem starzenia.