

**Najważniejszym pytaniem, jakie stawiają sobie badacze zajmujący się tematyką hormonów steroidowych u mięczaków jest – skąd biorą się steroidy w tkankach tych zwierząt? Czy bezkręgowce na równi z kręgowcami prowadzą syntezę steroidów, angażując wiele szlaków metabolicznych i aktywności enzymatycznych w tych procesach? Czy raczej akumulują potrzebne steroidy ze środowiska zewnętrznego, w przypadku bezkręgowców morskich – z mórz i oceanów? Jaki jest udział płciowych hormonów steroidowych w rozwoju mięczaków i czy produkują one estrogeny na drodze aromatyzacji androgenów?**

Aromataza to kluczowy enzym biosyntezy estrogenów u kręgowców. Należy do białek z rodziny cytochromów P450 (CYP19) i występuje powszechnie w retikulum endoplazmatycznym (mikrosomy) tkanek takich jak gonady żeńskie, męskie, tkanka tłuszczowa, czy mózg. Najbardziej powszechną metodą pomiaru aktywności aromatazy jest wprowadzenie do układu badawczego znakowanego izotopowo substratu jakim jest [ $1\beta$ - $^3\text{H}$ ] androstendion. Aby ocenić aktywność aromatazy mierzy się ilość wody  $^3\text{H}_2\text{O}$  powstałej po zajściu reakcji. We wszystkich gromadach kręgowców wykazano obecność aromatazy oraz ekspresję genu *cyp19* kodującego to białko. U bezkręgowców nie znaleziono dotychczas genu kodującego aromatazę, ortolog tego genu opisano natomiast u lancetnika (strunowce). Aktywność aromatazy u bezkręgowców, mierzona metodą izotopową, jest oznaczana na bardzo niskim poziomie (konwersja androgenów do estrogenów wynosi od 0,01% u małży do 3% u ślimaków morskich). Natomiast nasze wieloletnie badania na aktywności aromatazy u mięczaków wykazały, że małże morskie równie sprawnie jak kręgowce prowadzą aromatyzację androgenów. Proces ten jest zależny od temperatury i zachodzi zarówno w tkankach steroidogenicznych (gonady) jak i w niesteroidogenicznych (skrzela) małży.

Celem naszego projektu jest zbadanie wydajności aromatyzacji androgenów przez bałtyckie małże w modelu środowiskowym i eksperymentalnym. Ocenimy, czy aromatyzacja steroidów zachodzi równie wydajnie u małży żyjących w strefie zagrożonej zanieczyszczeniami (okolice ujścia wody z oczyszczalni ścieków) jak i w strefie wolnej od zanieczyszczeń. Podczas pobierania próbek materiału biologicznego planuje się zebranie wody dennej w celu wykrycia środowiskowych związków endokrynnie czynnych o właściwościach estrogennych i androgennych. EDs (ang. Endocrine Disruptors) stanowią poważne zagrożenie dla organizmów morskich; mogą prowadzić do zaburzeń w rozmnażaniu, zmian rozwojowych, a w konsekwencji do bezpłodności i wymierania gatunków. Badania pokazują, że związki EDs, które mogą zaburzać fizjologię rozrodu mięczaków, działają za pośrednictwem receptorów (głównie estrogenowych). My stawiamy hipotezę, że związki EDs mogą również oddziaływać bezpośrednio na proces biosyntezy estrogenów stymulując ich syntezę lub hamując (wzrasta wtedy ilości androgenów w tkankach). Regulacja musi więc odbywać się na poziomie aktywowania lub hamowania białka funkcjonującego jako „aromataza”. Aby potwierdzić udział związków EDs w regulacji procesu aromatyzacji u małży planuje się przeprowadzić eksperyment ekspozycyjny, w którym modelowy gatunek małża *Mytilus trossulus* (omulek jadalny) będzie inkubowany ze związkami typu  $17\alpha$ -etynyloestradiol (syntetyczny estrogen) czy testosteron (ma efekt maskulinizujący). Uzyskane wyniki porównamy z badaniami *in vitro*, gdzie frakcje subkomórkowe będą inkubowane również w obecności związków EDs. Kolejnym celem naszego projektu jest przeprowadzenie analizy wpływu związków EDs na zmienność transkryptomyczną w różnych tkankach małży metodą RNA-seq. Ocena uzyskanych profili transkryptomicznych umożliwi zawężenie obszaru do poszukiwania genów odpowiedzialnych za proces aromatyzacji u *M. trossulus*. W naszym grancie planujemy również scharakteryzowanie mikrobiomu obecnego w tkankach małży, w osadach, czy też w wodzie, stosując metody sekwencjonowania metagenomowego (opartego o gen kodujący 16S rRNA) jak również metatranskryptomikę (RNA-seq). Celem tych analiz jest znalezienie populacji bakterii, które biorą udział w metabolizmie hormonów steroidowych, w tym w procesie aromatyzacji.

**Naszym głównym celem jest zatem określenie w jaki sposób zachodzi aromatyzacja androgenów u małży i czy mogą na ten proces wpływać związki EDs obecne w środowisku morskim. Istotnym aspektem prowadzonych badań będzie dokładne scharakteryzowanie białka małży o właściwościach aromatazy zarówno na poziomie enzymatycznym jak i genetycznym. Podjęte przez nas badania wniosą również nowe informacje dotyczące wydajności procesu aromatyzacji w tkankach małży niezdeterminowanych i zdeterminowanych płciowo oraz na różnych etapach gametogenezy.**