



Jacek Z. Kubiak
Directeur de Recherche au CNRS

Rennes, 26 maja 2021 r.

IGDR, UMR 6290 CNRS/Université Rennes 1

Rennes

Francja

Recenzja rozprawy doktorskiej zatytułowanej „Wpływ wybranych czynników genotoksycznych na oocyty myszy” autorstwa pana mgr Łukasza Gąsiora

W przedstawionej do mojej oceny rozprawie doktorskiej, autor zaprezentował i przedyskutował wyniki kompleksowych badań zmierzających do wyjaśnienia wpływu czynników genotoksycznych na oocyty myszy i do identyfikacji ewentualnych mechanizmów obronnych występujących w żeńskich komórkach rozrodczych przed i w trakcie procesu dojrzewania mejotycznego. Doktorant skupił swoją uwagę na działaniu dwóch czynników stresogennych, które różnią się mechanizmem działania: t-BHP i etopozydu.

Poznanie mechanizmów molekularnych powodujących obniżenie jakości komórek rozrodczych jest ogromnym wyzwaniem współczesności ze względu na ciągle obniżające się zdolności rozrodcze ludzi. Wynikają one między innymi z działania stresorów chemicznych, które człowiek sam wprowadza do środowiska. Z oczywistych względów badania tego typu muszą być prowadzone najpierw na modelach zwierzęcych. Trzeba również zaznaczyć w tym miejscu, że bezpośrednie przenoszenie wyników uzyskanych na tych modelach na ludzi nie jest możliwe. Po wykryciu i opisanu tych mechanizmów na przykład u myszy, co czyni w swoim doktoracie mgr Gąsior, trzeba będzie w przyszłości wykonać podobne obserwacje i doświadczenia na oocytach ludzkich. Tylko w ten sposób można będzie stwierdzić czy te same, czy też inne mechanizmy działają w ludzkich żeńskich komórkach rozrodczych. W mojej opinii, mgr Gąsior wykonał pierwszą część tej pracy z bardzo dobrymi skutkami.

Pierwsza część badań skupia się na opisie i doświadczalnym ustaleniu jakie skutki wywołują oba stresory działając na oocyty profazowe myszy następnie zaindukowane do rozpoczęcia dojrzewania mejotycznego *in vitro*. Ta część badań jest bardzo skrupulatnie i z prawdziwym zacięciem naukowym przedstawiona w niniejszej rozprawie. Opisano szczegółowo wpływ obu stresorów na przebieg dojrzewania mejotycznego oocytów. Stosując odpowiednie

inhibitory chemiczne wykazano udział punktów kontrolnych typu checkpoint w odpowiedzi oocytów na działanie stresorów. Przeprowadzono testy na żywotność oocytów poddanych stresowi. Zbadano wpływ samej hodowli *in vitro* jako czynnika przyczyniającego się do ogólnego stresu oocytów i możliwości usuwania jego skutków przez hodowane oocyty. Doktorant skupił się oddzielnie nad działaniem stresogennym na jądrowe i mitochondrialne DNA. Zbadał on również zależności między manipulowaniem poziomem transkrypcji i konfiguracji chromatyny na poziom uszkodzeń DNA i dynamikę ich napraw w oocytach. Przedstawione następnie w rozprawie badania stresogennego działania na genom mitochondrialny dotyczą zarówno morfologii jak i organizacji, liczby i właściwości tych organelli w badanych oocytach. Przeanalizowano rolę aktywnych form tlenu i poziom produkcji i akumulacji ATP. Liczby i organizację mitochondriów w oocytach ujawnione metodami cytologicznymi zestawiono z badaniem ilościowym mitochondrialnego DNA przy pomocy metod analizy molekularnej. Należy podkreślić zaletę takiego podejścia, które umożliwiło ujawnić w sposób bardzo rygorystyczny wpływ stosowanych stresorów na indukowane zmiany i ich naprawę. Następnie przeprowadzono badania morfologiczne jakości tworzonego w stresowanych oocytach aparatu podziałowego poprzez obserwacje immunofluorescencyjne chromosomów i mikrotubul wrzeciona podziałowego podczas dojrzewania mejotycznego stresowanych oocytów. Na podkreślenie zasługuje bardzo precyzyjna analiza statystyczna tych wyników. Zbadano również wpływ wywoływanego doświadczalnie stresu na ekspresję genów znanych z zaangażowania w procesy naprawcze DNA. Uwzględniono wpływ stresorów na krople lipidowe, które stanowią istotny element wskazujący na jakość oocytów.

Na szczególną uwagę zasługuje nowatorska koncepcja zastosowania transferu jąder komórkowych między oocytami poddawanyymi stresowi genotoksycznemu. Zastosowanie jej pozwoliło po raz pierwszy uzyskać układ doświadczalny, w którym w komórkach obecne są indukowane uszkodzenia genomu jądrowego przy nienaruszonym genomie mitochondrialnym i *vice versa*. Dzięki takiemu podejściu można było rozróżnić w jakim stopniu różne procesy składające się na odpowiedź oocytów na stres (m. in. aktywacja punktów kontrolnych cyklu komórkowego, czy wzrost liczby kopii mtDNA) wywoływane są uszkodzeniami genomu jądrowego, a w jakim uszkodzeniami genomu mitochondrialnego. Innymi słowy, można było ustalić jaki jest udział uszkodzeń genomu jądrowego, a jaki uszkodzeń genomu mitochondrialnego w procesach składających się na odpowiedź oocytu na stres genotoksyczny.

W związku z tą częścią rozprawy mam pytanie czy rozważane było wykonanie takiego wariantu doświadczalnego, w którym stresowany byłby sam cytoplazm, czyli część oocytu oddzielona od jądra komórkowego, a następnie łączony byłby on na drodze fuzji komórkowej z odpowiednim partnerem? Czy taki wariant eksperymentalny mógłby posłużyć do precyzyjniejszego rozdzielenia efektów mitochondrialnych od jądrowych?

Intrygujące i solidnie udokumentowane (m.in. przez obrazowanie barwnikami Mitotracker i przez zastosowanie analizy mtDNA z wykorzystaniem dwóch różnych wariantów techniki PCR) jest wykazanie wzrostu liczby kopii mtDNA w oocytach poddanych działaniu stresu. Doktorant proponuje interesującą koncepcję, w myśl której utrata jakości mtDNA (a być może także inne defekty oocytu?) stymulowałaby wzrost replikacji tegoż mtDNA. Jak pisze doktorant samo włączenie replikacji genomu mitochondrialnego, nawet bez udziału jego aktywnych napraw, skutkuje wzrostem proporcji kopii prawidłowych cząsteczek mtDNA w

stosunku do uszkodzonych. Mechanizm taki doprowadzałby zatem do poprawy jakości mitochondrialnego genomu, z ominięciem wymogu działania specyficznego mechanizmu naprawy mtDNA. Zwiększona replikacja mtDNA mogłaby więc okazać się głównym mechanizmem przywracającym jakość mtDNA lub mechanizmem równoległym w przypadku, gdyby oocyt był zdolny do prowadzenia aktywnych napraw. Czy takie naprawy zachodzą nie udało się niestety ustalić w trakcie tego doktoratu ze względu na ograniczenia stosowanych metod. Warto nadmienić, że takiego mechanizmu komórka nie może użyć do przywracania jakości genomu jądrowego, dla którego liczba cykli replikacyjnych jest ograniczona do jednego na cykl komórkowy. Nie wiadomo, czy indukowana stresem replikacja mtDNA występuje w innych typach komórek. Należy jednak pamiętać, że oocyt co najmniej z kilku powodów może dysponować wytworzonymi w trakcie ewolucji szczególnymi mechanizmami pozwalającymi na zachowanie wysokiej jakości genomu mitochondrialnego. Po pierwsze, mtDNA oocytu stanowi matrycę przekazywaną z pokolenia na pokolenie i stąd niezwykle istotna jest jego jakość. Po drugie, prawidłowa funkcja mitochondriów jest absolutnie kluczowa w przebiegu zapłodnienia i rozwoju preimplantacyjnego. Po trzecie, nakłady energetyczne ponoszone przez organizm do osiągnięcia dojrzałych stadiów oocytów są na tyle wysokie, że w przypadku wystąpienia mniej szkodliwych anomalii być może lepszym ewolucyjnie rozwiązaniem jest uruchomienie szczególnych mechanizmów utrzymujących taki genom w obrębie oocyta niż jego eliminacja, która wydaje się rozwiązaniem korzystnym dla wielu innych typów komórek. Z powyższych względów, hipoteza sformułowana przez doktoranta na temat wyewoluowania szczególnego mechanizmu ochrony genomu mitochondrialnego właśnie w oocytach jest bardzo ciekawa i wysoce prawdopodobna. Mam nadzieję, że doktorant będzie miał okazję w trakcie swojej dalszej kariery naukowej dogłębnie zbadać to niezwykle ciekawe zagadnienie.

Bardzo ważną zaletą recenzowanej tu rozprawy doktorskiej jest wysoka jakość i doskonała klarowność wywodu. Wstęp zawiera wszystkie podstawowe informacje, które musi posiadać czytelnik aby móc zrozumieć cele doświadczalne i docenić wyniki przedstawionych w rozprawie badań. Informacje te przedstawione są w czytelny sposób i z odniesieniem do najnowszych wyników badań dostępnych w postaci literatury przedmiotu w języku angielskim. Koncepcja badań i cele jakie postawił sobie doktorant też są przedstawione w sposób bardzo czytelny. Po zapoznaniu się z całością rozprawy doktorskiej trzeba stwierdzić, że wszystkie wymienione tu cele naukowe zostały osiągnięte.

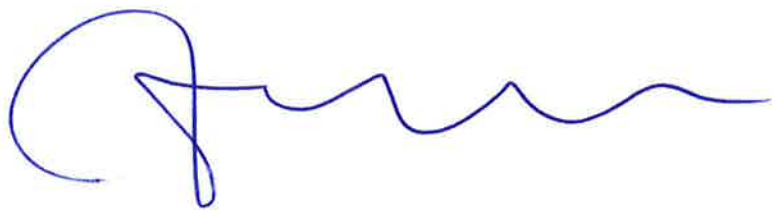
Na wyróżnienie zasługuje również opis rozdziału Materiały i Metody. Doktorant opisuje zastosowane metody z wielką dokładnością, tłumaczy sens użycia takich właśnie metod i analizuje ich przydatność jak i ograniczenia. To ostatnie jest szczególnie istotne, gdyż właśnie rozpoznanie limitów metodologicznych umożliwia prawidłową interpretację wyników i zabezpiecza przed ich nadinterpretacją. Doktorant udowadnia, iż w pełni zdaje sobie sprawę z tego, które z zastosowanych metod pozwalają na dokonanie dogłębnych interpretacji, a które dają jedynie wskazówki dotyczące możliwych interpretacji. Bardzo istotne są też wysiłki polegające na dostosowaniu istniejących metod do użytego materiału i wprowadzanie modyfikacji, które podniosły znacznie jakość uzyskanych wyników.

Ostania część rozprawy doktorskiej, czyli Dyskusja, jest również bardzo ciekawą lekturą i pokazuje umiejętność krytycznej analizy wyników przez doktoranta. Dyskusja wykazuje pełną znajomość tematu badawczego przez doktoranta, między innymi przez powoływanie się na ostatnio publikowane badania. Widać, zaangażowanie doktoranta i to, że śledzi z wielką

uwagą literaturę przedmiotu i swobodnie się nią posługuje w kontekście własnych dokonań. Te cechy świadczą o naukowej dojrzałości doktoranta i jego wstrzeźliwości w ocenie własnych wyników, jak również o krytycznym podejściu do danych bibliograficznych.

W przedstawionej tutaj ocenie skupiłem się na formalnej stronie rozprawy ze szczególnym uwzględnieniem merytorycznej i technicznej jakości przedstawionych badań, wykazaniem się umiejętnościami doświadczalnymi przez autora, jak również zdolnościami przekazania informacji naukowej w formie pisemnej. Wszystkie te aspekty są w rozprawie bez zarzutu.

Podsumowując, pracę przedstawioną do mojej oceny uważam za bardzo wartościową i w pełni spełniającą wymogi stawiane przed rozprawami doktorskimi. Jest ona na bardzo wysokim poziomie naukowym i z pewnością zasługuje na wyróżnienie, o które w tym miejscu jednoznacznie postuluje. Dlatego z przekonaniem wnioskuję o dopuszczenie mgr Łukasza Gąsiora do dalszych etapów przewodu doktorskiego i szczerze gratuluję mu doskonale wykonanej i zaprezentowanej pracy.



Jacek Kubiak

