

Streszczenie

Niniejsza rozprawa doktorska podejmuje temat wpływu na mysie oocyty stresu genotoksycznego indukowanego z wykorzystaniem dwóch czynników wodoronadtlenku tert-butyłu – t-BHP i etopozydu. Wykazano, że obydwa użyte stresory obniżały wydajność dojrzewania mejotycznego poprzez blokowanie oocytów w stadium profazy I lub metafazy I. Zastosowanie specyficznych inhibitorów wykazało, że zablokowanie dojrzewania było skutkiem aktywacji punktów kontrolnych mejotycznego cyklu komórkowego.

Barwienie immunofluorescencyjne markera (γ H2A.X) wykazało, że obydwa stresory wywoływały uszkodzenia genomu jądrowego. Obserwowano także anomalie aparatu podziałowego (zaburzenia morfologii wrzeciona oraz nieprawidłowości ułożenia chromosomów), jak i szereg efektów dotyczących statusu mitochondriów (indukowane stresem zmiany masy mitochondriów, potencjału błonowego mitochondriów, liczby kopii mtDNA, uszkodzeń mtDNA, poziomu ATP i poziomu reaktywnych form tlenu).

Ponieważ wykazano, że obydwa stresory wywołują uszkodzenia zarówno genomu jądrowego, jak i mitochondrialnego postanowiłem zbadać, jaki jest udział każdego z tych genomów w odpowiedzi oocyty na stres. Poprzez zastosowanie transferu jąder profazowych między oocytami poddanymi działaniu stresu i oocytami nienaruszonymi uzyskano zrekonstruowane oocyty złożone z uszkodzonego jądra oraz nietkniętej cytoplazmy i *vice versa*. Wykorzystanie takiego modelu pozwoliło po raz pierwszy przeprowadzić zbadanie izolowanego wpływu samych uszkodzeń mtDNA lub samych uszkodzeń jądrowego DNA na komórkę. Doświadczenia te wykazały, że zahamowanie dojrzewania mejotycznego oocytów w odpowiedzi na indukowany stres jest sumą reakcji mejotycznych punktów kontrolnych na uszkodzenia jądrowego i mitochondrialnego genomu, co szczególnie uwidoczniło się w oocytach poddawanych działaniu t-BHP.

Analiza immunofluorescencyjna wykorzystująca marker uszkodzeń γ H2A.X wykazała, że wprowadzone uszkodzenia jądrowego DNA ulegają z czasem stopniowym naprawom. W przypadku genomu mitochondrialnego opracowana w rozprawie metodyka służąca ocenie uszkodzeń mtDNA, nie dała możliwości ustalenia, czy również z czasem dochodziło do bezpośrednich napraw genomu mitochondrialnego. Wyniki badań wykazały natomiast jednoznacznie (analizy z wykorzystaniem Mitotracker Green oraz dwóch niezależnych metod opartych o techniki PCR), że w odpowiedzi na stres oocyty indukowały replikację mitochondrialnego genomu. Proces ten był niezależny od transkrypcji genów jądrowych, a doświadczenia przeprowadzone z wykorzystaniem cykloheksymidu sugerują, że nie wymaga także translacji. Indukowanie replikacji mtDNA w odpowiedzi na stres nie było wcześniej opisywane w oocytach. Bez względu na to, czy równocześnie zachodzą bezpośrednie naprawy mtDNA, sama indukcja replikacji genomu mitochondrialnego doprowadza z czasem do obniżenia się proporcji uszkodzonego mtDNA w oocycie. Jest to mechanizm niedostępny dla genomu jądrowego i mógłby być głównym (lub dodatkowym w przypadku występowania równoległe bezpośrednich napraw) sposobem przywracania jakości mitochondrialnego DNA.

Lukasz Gąsior

15

Potwini