

Ciało Balbianiego to nieobłoniony kompleks organelli zlokalizowany na jednym z biegunów jądra oocytu (pęcherzyka zarodkowego). Zazwyczaj, kompleks ten zbudowany jest z licznych mitochondriów, agregatów charakterystycznego materiału włóknisto-ziarnistego, tzw. materiału nuage, aparatów Golgiego, cystern i/lub pęcherzyków siateczki śródplazmatycznej oraz elementów cytoszkieletu, m.in. mikrotubul. Choć morfologia i morfogeneza ciała Balbianiego analizowane były u wielu gatunków kręgowców i bezkręgowców, to rola tego kompleksu organelli pozostaje wciąż niewyjaśniona. Wyniki dotychczasowych badań sugerują, że ciało Balbianiego uczestniczy w rozmaitych procesach toczących się na poziomie komórkowym, m.in. w lokalizacji determinantów linii płciowej oraz organelli w rejonie tzw. plazmy płciowej (biegunowej), lipidogenezie, a także w selekcji mitochondriów. Taki stan rzeczy nasuwa pytanie: która z dotychczas sugerowanych funkcji ciała Balbianiego jest ewolucyjnie pierwotna, a które są wtórne i charakterystyczne dla wyspecjalizowanych grup systematycznych? Należy w tym miejscu podkreślić, że ciała Balbianiego analizowanych gatunków bezkręgowców i kręgowców (w tym gatunków modelowych takich jak *Xenopus laevis*, *Danio rerio* i *Drosophila melanogaster*) są silnie morfologicznie zróżnicowane i zazwyczaj wykazują cechy charakterystyczne dla konkretnej grupy (taksonu) zwierząt. W tym kontekście pojawia się drugie pytanie: czy funkcje ciała Balbianiego opisane z wykorzystaniem organizmów modelowych są uniwersalne dla całego królestwa zwierząt, czy specyficzne tylko dla określonej grupy organizmów?

W niniejszej rozprawie opisano wyniki analiz i eksperymentów, których celem było poznanie ultrastruktury i mechanizmów kontrolujących morfogenezę (formowanie, stopniowy wzrost i rozpraszanie) ciała Balbianiego oraz wyjaśnienie roli tego kompleksu w namnażaniu i selektywnej eliminacji mitochondriów w czasie oogenezy. Do analiz morfologicznych i porównawczych wykorzystano gonady samic pięciu gatunków pasikoników (Tettigoniidae): *Meconema meridionale*, *Metrioptera brachyptera*, *Pholidoptera griseoptera*, *Conocephalus fuscus* oraz *Leptophyes albobittata*. Badania szczegółowe i analizy eksperymentalne przeprowadzono wykorzystując tylko jeden gatunek – *Meconema meridionale*. W czasie wykonywania rozprawy doktorskiej, osobniki tego gatunku hodowane były w „ogrodzie eksperymentalnym”. W badaniach wykorzystano standardowe oraz najnowsze metody mikroskopii świetlnej, elektronowej i konfokalnej. Morfologię i funkcje ciała Balbianiego analizowano przy użyciu różnorodnych metod histochemicznych i immunohistochemicznych z zastosowaniem specyficznych markerów molekularnych.

Analizy seryjnych skrawków półcienkich barwionych błękitem metylenu oraz ultracienkich w mikroskopie elektronowym wykazały, że u przedstawicieli Tettigoniidae

ciało Balbianiego to wyjątkowo duży, morfologicznie złożony kompleks organelli. Kompleks ten pojawia się w cytoplazmie oocytów (ooplazmie) stosunkowo wcześnie, bo już w tzw. stadium bukietowym pierwszego podziału mejotycznego, intensywnie rośnie w czasie prewitelogenezy i rozpada się wraz z inicjacją procesu witelogenezy (formowania materiałów zapasowych – żółtka). Pomimo pewnych różnic morfologicznych, ciało Balbianiego wszystkich badanych gatunków zbudowane jest z tego samego „zestawu” organelli: licznych mitochondriów, krótkich cystern i niewielkich pęcherzyków siateczki śródplazmatycznej, kompleksów Golgiego oraz nieregularnych agregatów materiału nuage. Ciała Balbianiego badanych gatunków posiadają ponadto istotną cechę wspólną, tj. bliski związek (sąsiedztwo) mitochondriów i agregatów nuage. Mitochondria pozostające w bezpośrednim kontakcie z tym materiałem są często wydłużone, przewężone, rozgałęziają się lub tworzą pary, co wydaje się sugerować, iż materiał nuage indukuje biogenezę tych organelli. Wyniki analiz oocytów traktowanych 1,6-hexanediolem oraz barwienia z użyciem odczynnika PROTEOSTAT wskazują, iż ciało Balbianiego Tettigoniidae to kondensat biomolekularny, którego powstawanie, podobnie jak u gatunków modelowych *Xenopus* i *Danio*, zależy od białek zawierających rejony inherentnie nieuporządkowane.

Komputerowe rekonstrukcje trójwymiarowe organizacji ciała Balbianiego *Meconema meridionale* wykazały, że mitochondria tego kompleksu łączą się tworząc skomplikowaną i rozległą sieć mitochondrialną. Analizy z wykorzystaniem analogu tymidyny BrdU wykazały, że w obrębie tej sieci dochodzi do intensywnej replikacji mitochondrialnego DNA, a więc namnażania mitochondriów. Z kolei analiza aktywności mitochondriów przy pomocy odczynnika MitoTracker Deep Red, a także immunohistochemiczna lokalizacja białek zaangażowanych w podziały mitochondrialne (Drp1) oraz białek powiązanych z procesem autofagii (ATG5, LC3) wykazała, iż mitochondria niefunkcjonalne (o obniżonym potencjale błony mitochondrialnej i/lub nieprawidłowej morfologii) są odizolowywane od sieci mitochondrialnej ciała Balbianiego i ulegają autofagii (mitofagii) w ooplazmie.

Immunolokalizacja α -tubuliny wykazała, że w prewitelogenicznych oocytach *Meconema meridionale* występuje złożony, penetrujący całą ooplazmę cytoszkielet mikrotubularny. Ultrastrukturalna analiza oocytów traktowanych kolchicyną wskazuje, że cytoszkielet ten nie bierze udziału w formowaniu ciała Balbianiego, uczestniczy jedynie w pozycjonowaniu agregatów materiału nuage w bezpośrednim sąsiedztwie pęcherzyka zarodkowego. W końcu, hybrydocytochemiczna lokalizacja Drp1 mRNA, przeprowadzona na skrawkach oocytów kontrolnych i inkubowanych z kolchicyną, wskazuje, że wspomniany cytoszkielet mikrotubularny odpowiada za względnie równomierne rozmieszczenie tego typu

mRNA w ooplazmie szybko rosnących oocytów prewitelogenicznych, co najprawdopodobniej prowadzi do synchronizacji podziałów mitochondrialnych w całej ooplazmie.

Podsumowując, wyniki opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej wskazują, iż ewolucyjnie pierwotną funkcją ciała Balbianiego jest namnażanie oraz eliminacja mitochondriów, a więc udział w selektywnym przekazywaniu tych organelli do komórek organizmów potomnych. Pozostałe funkcje przypisywane ciału Balbianiego prawdopodobnie wyewoluowały wtórnie, w zaawansowanych i niespokrewnionych taksonach kręgowców i bezkręgowców, takich jak ryby, płazy bezogonowe (Anura) oraz owady o przeobrażeniu zupełnym (Holometabola). Tak, więc generalizowanie wyników uzyskanych z wykorzystaniem gatunków modelowych, przynajmniej w przypadku morfogenezy i funkcji ciała Balbianiego, jest z pewnością nieuprawnione.

Margareta Sekuta

S. Bilal