



UNIwersytet JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biologii
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych

**Morfogeneza i funkcja ciała Balbianiego w oocytach owadów
o przeobrażeniu niepełnym (Hemimetabola)**

Małgorzata Sekuła

Rozprawa doktorska
wykonana pod opieką
prof. dr hab. Szczepana Bilińskiego
w Zakładzie Biologii Rozwoju i Morfologii Bezkręgowców
Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych

Kraków 2023

*Składam wyrazy szacunku i serdeczne podziękowania
Panu **prof. dr hab. Szczepanowi Bilińskiemu**
za nieocenioną pomoc, cierpliwość, życzliwość i kierownictwo naukowe
podczas realizacji niniejszej pracy doktorskiej.*

*Serdecznie dziękuję
Panu **dr hab. Wacławowi Tworzydło, prof. UJ**
za wszystkie wskazówki, wsparcie naukowe i serdeczność.*

*Dziękuję
Kierownikowi Zakładu Biologii Rozwoju i Morfologii Bezkręgowców,
Pani **prof. dr hab. Teresie Szklarzewicz**
za współpracę i życzliwość.*

*Dziękuję
wszystkim **Pracownikom** oraz **Doktorantom**
Zakładu Biologii Rozwoju i Morfologii Bezkręgowców
za współpracę, wszystkie dobre rady i stworzenie wspaniałej atmosfery pracy.*

*Szczególne podziękowania pragnę złożyć moim **rodzicom, rodzinie i przyjaciołom**
za wiarę w moje możliwości, motywację, wszelką pomoc i cierpliwość
za wspólną radość z sukcesów i ogromne wsparcie w chwilach wątplenia.*

Źródła finansowania badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej

- 1) Projekt Preludium 20 nr 2021/41/N/NZ3/00360 pt. „*Ciało Balbianiego i dynamika mitochondrialna. Rola nuage, lizosomów i cytoszkieletu w namnażaniu/selekcji mitochondriów w żeńskich komórkach rozrodczych.*” finansowany przez Narodowe Centrum Nauki.



NARODOWE CENTRUM NAUKI

- 2) Dofinansowanie działalności naukowej doktorantów Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie w roku 2020 nr N18/MNS/000034 „*Rola ciała Balbianiego w selekcji i eliminacji wadliwych mitochondriów w oocytach owadów z rodziny Tettigoniidae*”.
- 3) Dofinansowanie działalności naukowej doktorantów Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie w roku 2019 nr N18/MNS/000028 „*Zaangażowanie białka Drp1 (Dynamin related protein 1) i białek z domeną prionopodobną w tworzeniu i dezintegracji sieci mitochondrialnych w oocytach *Metrioptera brachyptera**”.

Spis treści

Streszczenie	6
Abstract	9
Wykaz rysunków, tabel i wykresów	12
Rozdział I Wprowadzenie	13
I.1. Budowa jajników owadów	13
I.2. Klasyfikacja jajników owadów	14
I.3. Oogeneza owadów	16
I.4. Dynamika mitochondrialna	17
I.4.1. Budowa mitochondrium	17
I.4.2. Fuzja i podział mitochondriów	18
I.4.3. Makroautofagia mitochondriów	20
I.4.4. Selekcja i dziedziczenie mitochondrialnego DNA	22
I.5. Ciało Balbianiego – struktura i funkcje.....	23
I.5.1. Budowa ciała Balbianiego	23
I.5.2. Morfogeneza ciała Balbianiego	24
I.5.3. Funkcje ciała Balbianiego	25
I.6. Tettigoniidae (pasikonikowate) – krótka charakterystyka	26
I.7. Cele badań	27
Rozdział II Materiały i metody	28
II.1. Materiały	28
II.1.1. Zwierzęta	28
II.1.2. Powody wyboru modelu badawczego	29
II.1.3. Odczynniki	31
II.2. Metody	32
II.2.1. Mikroskopia świetlna i transmisyjna mikroskopia elektronowa.....	32
II.2.2. Trójwymiarowa rekonstrukcja organizacji ciała Balbianiego.....	33
II.2.3. Barwienia immunohistochemiczne	33
II.2.4. Detekcja agregatów proteinowych	34
II.2.5. Inkubacja z 1,6-hexanediolem	35
II.2.6. Hybrydocytochemia (fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i>).....	35
II.2.7. Analizy aktywności mitochondrialnej.....	36

II.2.8. Inkubacja z 2,5-bromo-2' deoksyurydyną	37
II.2.9. Ekstrakcja cytoszkieletu	37
II.2.10. Inkubacja z kolchicyną i cytochalazyną	38
II.2.11. Analizy ilościowe	38
Rozdział III Wyniki	40
III.1. Budowa jajnika i owarioli Tettigoniidae	40
III.2. Morfologia ciała Balbianiego wybranych gatunków Tettigoniidae	41
III.2.1. Budowa ciała Balbianiego	41
III.2.2. Mitochondria ciała Balbianiego Tettigoniidae – pomiary ilościowe na podstawie kryteriów morfologicznych	43
III.3. Morfogeneza ciała Balbianiego <i>Meconema meridionale</i>	45
III.4. Aktywność mitochondriów w oocytach <i>Meconema meridionale</i>	47
III.5. Udział białek nieuporządkowanych w formowaniu ciała Balbianiego <i>Meconema meridionale</i>	47
III.6. Rola mikrotubul w morfogenezie ciała Balbianiego <i>Meconema meridionale</i>	48
III.7. Replikacja mtDNA i wzrost liczby mitochondriów w czasie oogenezy <i>Meconema meridionale</i>	50
III.8. Rola białka Drp1 w podziałach mitochondriów ciała Balbianiego <i>Meconema meridionale</i>	50
III.9. Znaczenie mikrofilamentów w podziale mitochondriów ciała Balbianiego <i>Meconema meridionale</i>	52
III.10. Mitofagia a ciało Balbianiego <i>Meconema meridionale</i>	53
Rozdział IV Dyskusja	54
Rozdział V Podsumowanie i wnioski	63
Bibliografia	65
Dokumentacja fotograficzna	72
Wykaz rycin	73

Streszczenie

Ciało Balbianiego to nieoblony kompleks organelli zlokalizowany na jednym z biegunów jądra oocyta (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 albivittata*. 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.

Abstract

The Balbiani body is a non-membrane bound complex of organelles positioned at one side of the oocyte nucleus (germinal vesicle). It consists mostly of mitochondria and characteristic aggregates of fibrillo-granular nuage material but also Golgi complexes, cisternae and/or vesicles of endoplasmic reticulum and even cytoskeletal fibers. Despite the fact that the morphology as well as morphogenesis of the Balbiani body have been intensely studied in numerous animal species, the role of this organelle assemblage is still under debate. It has been suggested that the Balbiani body is involved in the delivery of macromolecules (localized mRNAs) and organelles (mitochondria, germinal granules) to the germ plasm, lipidogenesis, and selective elimination of defective mitochondria. Such functional variability raises an intriguing question: which of the suggested Balbiani body function is phylogenetically ancestral, and which are secondary and characteristic only for a given derived animal group? It is to the point to add here that the morphology and composition of the Balbiani bodies of analyzed invertebrate and vertebrate species (including model species such as *Xenopus laevis*, *Danio rerio* and *Drosophila melanogaster*) are highly variable and usually show features characteristic for a specific group (taxon). If so, the second question can be asked: are the functions of the Balbiani body described with the use of model organisms universal for the entire animal kingdom or rather specific for a certain animal group/s?

Therefore, the aim of the present doctoral dissertation was to determine the ultrastructure and mechanisms controlling morphogenesis (formation, gradual growth and break down) of the Balbiani body and the role of this complex in the multiplication and selective elimination of mitochondria during oogenesis. To achieve this goal, a series of analyses and experiments were performed. Female gonads of five bush cricket species (Tettigoniidae) were used in morphological and comparative studies: *Meconema meridionale*, *Metrioptera brachyptera*, *Pholidoptera griseoptera*, *Conocephalus fuscus* and *Leptophyes albivittata*. As the colony of *Meconema meridionale* has been maintained throughout the duration of the research, detailed studies and experimental analyses were carried out using this species only. Standard and recently developed methods of light, electron and confocal microscopy were employed in the studies. Functioning of the Balbiani body was analyzed with histochemical and immunohistochemical methods using variable molecular markers.

Analyses of serial semithin and ultrathin sections revealed that in Tettigoniidae, the Balbiani body is relatively large and morphologically complex. It arises as early as in the meiotic oocytes, in a stage referred to as the bouquet stage, intensively grows during previtellogenesis and disintegrates (breaks down) with the onset of the accumulation of reserve materials, i.e. vitellogenesis. Despite some morphological differences, the Balbiani bodies of all studied species are built of the same "set" of organelles: numerous mitochondria, short cisterns and small vesicles of the endoplasmic reticulum, Golgi complexes and irregular aggregates of nuage material. The Balbiani bodies of the studied species share also an important feature, i.e. close relationship of mitochondria and nuage aggregates. Mitochondria remaining in direct contact with the nuage or located in its vicinity are often elongated, bifurcated, dumbbell shaped or merged in characteristic pairs. These findings imply that nuage triggers biogenesis of mitochondria. Results of 1,6-hexanediol treatment and PROTEOSTAT staining jointly indicate that in *Meconema meridionale*, as in the model species *Xenopus* and *Danio*, the formation of the Balbiani body involves proteins with intrinsically disordered regions, and therefore, represents a typical biomolecular condensate.

Computer aided 3-dimensional reconstructions of the organization of *Meconema* Balbiani body showed that the mitochondria within this complex are interconnected constituting an intricate network. Analyses with a thymidine analogue BrdU showed that within this network intensive mtDNA replication and consequent mitochondrial multiplication take place. Furthermore, the analyses of mitochondrial membrane potential, as well as the immunohistochemical localization of proteins involved in mitochondrial division (Drp1) and autophagy (ATG5, LC3) indicated that non-functional mitochondria (with reduced membrane potential and/or abnormal morphology) are separated from the network and eliminated in the ooplasm *via* autophagy (mitophagy).

Immunolocalization of α -tubulin showed that the previtellogenic oocytes of *Meconema meridionale* contain a complex system of microtubules that penetrates the entire ooplasm. Ultrastructural analyses of colchicine treated oocytes indicated that this system is not involved in the formation of the Balbiani body, but participate in the positioning of the nuage aggregates in the immediate vicinity of the germinal vesicle. Finally, the hybridocytochemical localization of Drp1 mRNA, performed on control and colchicine treated oocytes sections, revealed that the above-mentioned system of microtubules is responsible for the uniform distribution of Drp1 mRNA throughout

the expanding ooplasm of quickly growing previtellogenic oocyte. It seems likely, that this process ensures the even distribution of Drp1 protein, and consequently the synchronization of mitochondrial divisions in the whole oocyte cytoplasm.

In conclusion, the results of the presented studies imply that the preferential transmission of wild-type mitochondria to the offspring represents an ancestral function of the Balbiani body. Other, previously proposed, functions of this organelle assemblage presumably evolved secondarily in certain derived vertebrate and invertebrate groups, such as fishes (*Danio*), frogs (*Xenopus*) and holometabolous insect (*Drosophila*). Therefore, the results obtained in the present dissertation support the previously voiced idea that the findings and conclusions drawn from studies conducted on the model species only, cannot be extended to all animal taxa.

Wykaz rysunków, tabel i wykresów

W rozdziale I Wprowadzenie:

Rysunek 1. Typy owariol owadów.

Rysunek 2. Dynamika mitochondrialna.

Rysunek 3. Przebieg makroautofagii.

W rozdziale II Materiały i metody:

Tabela 1. Gatunki pasikonikowatych (Tettigoniidae) wykorzystane w badaniach (w porządku alfabetycznym).

Tabela 2. Przeciwciała użyte w badaniach.

Tabela 3. Skład buforu do ekstrakcji cytoszkieletu.

W rozdziale III Wyniki:

Tabela 4. Średnica [nm] elektronowo gęstych granul (ziaren) zlokalizowanych w karioplazmie badanych gatunków Tettigoniidae.

Tabela 5. Mitochondria w sąsiedztwie nuage – wyniki analiz ilościowych.

Tabela 6. Długość przewężeń dzielących się mitochondriów ciała Balbianiego *Meconema meridionale*.

Wykres 1. Liczba mitochondriów w sąsiedztwie nuage.

Wykres 2. Mitochondria w sąsiedztwie nuage – dane procentowe.

Rozdział I Wprowadzenie

I.1. Budowa jajników owadów

Jajniki owadów to parzyste organy układu rozrodczego zlokalizowane w jamie ciała w pozycji brzuszno-bocznej względem układu pokarmowego [RUPPERT I WSP. 2004]. W ich wnętrzu niedojrzałe komórki linii płciowej dzielą się i różnicują w dojrzałe komórki rozrodcze (komórki jajowe). Podstawową jednostką strukturalną jajników owadów jest rurka (cewka) jajnikowa, tzw. owariola [BÜNING 1993]. Liczba owariol w pojedynczym jajniku jest charakterystyczna dla danego gatunku i może wynosić od 1 (np. u skorka *Marava arachidis*; RAMAMURTHI 1956) do kilkuset tysięcy (u królowych termitów; RICHARDS I DAVIES 1977). Wszystkie owariole danego jajnika otoczone są wspólną mezodermalną osłoną jajnikową, a poszczególne owariole objęte są dodatkowo blaszką podstawną oraz zbudowaną z komórek mięśniowych i tchawek osłonką owarialną [BÜNING 1994].

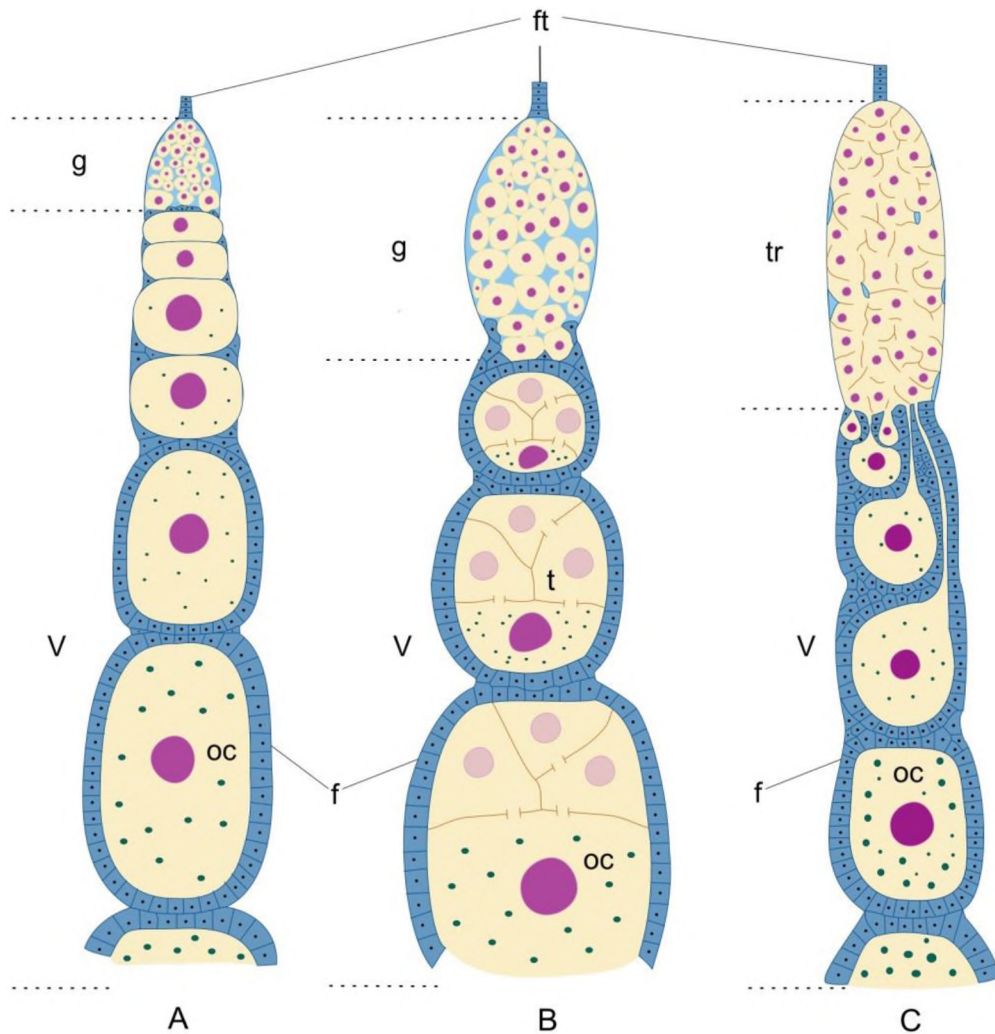
W budowie owarioli wyróżnia się kolejno cztery elementy: filament terminalny, germarium, witelarium oraz nóżkę owarialną [BILINSKI 1998A]. Filament terminalny (nić końcowa) stanowi przedni koniec owarioli i zbudowany jest z komórek somatycznych oraz włókien mięśniowych [BILINSKI I SZKLARZEWICZ 1992; LUPA I WSP. 1999; LUPA I BILINSKI 2002]. Filamenty terminalne sąsiadujących owarioli z reguły łączą się ze sobą tworząc więzadło (ligament), które utrzymuje gonadę w ciele tłuszczowym samicy. W germarium, nazywanym strefą twórczą owarioli, w osi przednio-tylnej ułożone są komórki linii płciowej: oogonia i wczesno-mejotyczne oocyty [BÜNING 1994; BILINSKI 1998A]. U podstawy germarium występuje warstwa somatycznych komórek prefolikularnych, które podlegają intensywnym podziałom mitotycznym i stopniowo otaczają przesuwające się do witelarium oocyty. W witelarium występują szeregowo ułożone, wzrastające pęcherzyki jajnikowe, w których zachodzą procesy prewitelogenezy, witelogenezy i choriogenezy (patrz podrozdział I.3. *Oogeneza owadów*). Nóżka owarialna (pedicel) jest elementem somatycznym, który łączy owariolę z jajowodem bocznym.

I.2. Klasyfikacja jajników owadów

Gonady żeńskie rozmaitych grup owadów są morfologicznie i fizjologicznie zróżnicowane. Z tego powodu już w 1874 r. A. Brandt wyróżnił dwa podstawowe typy jajników: panoistyczny i meroistyczny (Rys. 1). Podstawą powyższej klasyfikacji jest odpowiednio brak lub obecność w owarioli tzw. komórek odżywczych [za SZKLARZEWICZ 1999].

W jajnikach panoistycznych (gr. *pan* – wszystko, *oon* - jajo) wszystkie oogonia (z wyjątkiem degenerujących) po serii kompletnych podziałów mitotycznych różnicują się w oocyty. Jedyłą w tym typie jajnika tkanką wspomagającą komórkę płciową podczas rozwoju jest ciągły, jednowarstwowy nabłonek folikularny, który w pęcherzyku jajnikowym otacza centralnie ułożony oocyt (Rys. 1A). Jądro oocytu jest duże i aktywnie syntetyzuje różne rodzaje kwasu rybonukleinowego (RNA), które następnie transportowane są do ooplazmy. Jajnik panoistyczny uważany jest za bardziej pierwotny i wśród owadów występuje przykładowo u widłonogów (Diplura; BILINSKI I SZKLARZEWICZ 1992), ważek (Odonata; HALKKA I HALKKA 1968), widelnic (Plecoptera; ROSCISZEWSKA 1997), prostoskrzydłych (Orthoptera; MAZZINI I GIORGI 1985), karaczanów (Blattodea; KSIĄŻKIEWICZ-ILIJEWI 1977) czy termitów (Isoptera; BÜNING 1994).

W przypadku jajnika meroistycznego (gr. *meros* – część, *oon* – jajo) oogonia (cystoblasty) w germarium podlegają serii podziałów mitotycznych kończących się niekompletnymi cytokinezami [BILINSKI I KLAG 1994]. W rezultacie powstają grona komórek płciowych (cystocytów) połączonych mostkami cytoplazmatycznymi. W obrębie grona tylko jedna (jajnik politroficzny) lub kilka komórek (jajnik telotroficzny) różnicuje się w oocyt, zaś pozostałe cystocyty przekształcają się w komórki odżywcze (trofocyty), z których nigdy nie powstaną funkcjonalne gamety (Rys. 1B i C). Trofocyty syntetyzują RNA, które wraz z organellami (mitochondriami, elementami siateczki śródplazmatycznej) przekazywane są przez mostki cytoplazmatyczne do rozwijającego się oocytu. Jajniki meroistyczne występują u owadów uskrzydłych z przeobrażeniem zupełnym (Holometabola), np. motyli (Lepidoptera), błonkówek (Hymenoptera), pluskwiaków (Hemiptera) czy sieciarek (Neuroptera) [przeгляд: KING I BÜNING 1985; BÜNING 1994; BILINSKI 1998A, 1998B] oraz niektórych owadów bezskrzydłych, np. skoczogonków (Collembola) [KRZYSZTOFOWICZ 1971; JURA 1972].



Rysunek. 1. Typy owariol owadów. Owariola panoistyczna (A) – pęcherzyki jajnikowe w witelarium (v) zawierają centralnie ułożony oocyt (oc) otoczony jednowarstwowym nabłonkiem foliкулярnym (f). Na szczycie owarioli germarium (g). W owarioli meroistycznej politroficznej (B) w każdym pęcherzyku jajnikowym w witelarium znajduje się oocyt i towarzyszące mu trofocyty (t). W owarioli meroistycznej telotroficznej (C) trofocyty zostają zatrzymane w trofarium (tr). Przedni koniec każdej owarioli stanowi filament terminalny (ft). Przerwaną linią wyznaczono umowne granice germarium lub trofarium i witelarium.

I.3. Oogeneza owadów

Dojrzałe komórki jajowe owadów są zróżnicowane morfologicznie, niemniej jednak, w procesie ich powstawania (oogenezie) wyróżnić można pewne stałe fazy [BILINSKI 2005]. Pierwszą z nich jest wędrowanie pierwotnych komórek płciowych do zawiązków gonad, gdzie komórki te przekształcają się w oogonia. W germarium oogonia podlegają podziałom mitotycznym (proliferują), po czym rozpoczynają profazę pierwszego podziału mejotycznego w wyniku, którego wszystkie (jajnik panoistyczny) lub ich część (jajnik meroistyczny) stają się oocytami I rzędu. Po zawieszeniu podziału mejotycznego w fazie diktiotenu oocyty przesuwają się do witelarium, gdzie w procesach prewitelogenezy i witelogenezy gromadzą informację rozwojową, organelle komórkowe i substancje zapasowe, a w procesie choriogenezy otaczane są osłonami jajowymi [MARGARITIS 1985].

Prewitelogeneza rozpoczyna się tuż po zatrzymaniu podziału redukcyjnego i despiralizacji chromosomów, a kończy w momencie pojawienia się w cytoplazmie oocytu (ooplazmie) pierwszych kul żółtka [ROSCISZEWSKA 2003]. W tym czasie odbywa się synteza składników cytoplazmy podstawowej oocytu oraz organeli komórkowych, przede wszystkim licznych rybosomów i mitochondriów, cystern siateczki śródplazmatycznej oraz diktiosomów. Równocześnie intensywnie syntetyzowane są rozmaite rodzaje RNA (m. in. mRNA i tRNA), które akumulowane są w ooplazmie. W rezultacie tych procesów wyraźnie wzrasta objętość całego pęcherzyka jajnikowego. Wytworzone w czasie prewitelogenezy cząsteczki mRNA rozmieszczone są w ooplazmie względnie równomiernie. Wyjątek stanowią cząsteczki mRNA, nazywane determinantami komórek linii płciowej, które deponowane są w ściśle określonym rejonie oocytu tzw. plazmie płciowej (biegunowej) [KLOC I BILINSKI 2002]. Cząsteczki te odrywają istotną rolę w determinacji losu poszczególnych komórek zarodka podczas wstępnych etapów jego rozwoju. Prewitelogeneza jest również stadium przygotowania oocytu do masowego wchłaniania zawartych w hemolimfie prekursorów żółtka; na powierzchni oocytu wytwarzane są mikrokosmki, a we wnętrzu pojawiają się pęcherzyki mikropinocytotyczne [BILINSKI 1987; KAULENAS 1992].

W witelogenezie w cytoplazmie oocytu gromadzone są liczne kule żółtka oraz inne substancje zapasowe, takie jak lipidy czy węglowodany (głównie glikogen). Materiały te wykorzystane zostaną podczas rozwoju zarodkowego. Po zgromadzeniu

materiałów zapasowych rozpoczyna się proces formowania osłon (kapsuł) jajowych, które zapewnią zarodkowi prawidłowy i bezpieczny rozwój.

I.4. Dynamika mitochondrialna

Podczas oogenezy objętość oocyty rośnie wielokrotnie. Równocześnie ooplazma podlega poważnym przemianom strukturalnym oraz biochemicznym. Wraz z tymi, często energochłonnymi procesami, zmienia się liczba i jakość mitochondriów oraz ich rozkład w oocycie. Mitochondria są swoistymi fabrykami energii metabolicznej, jako że są miejscem syntezy adenozyntrifosforanu (ATP). Ponadto kontrolują wewnątrzkomórkową równowagę wapniową i odgrywają kluczową rolę w wielu podstawowych procesach komórkowych, m.in w regulacji programowanej śmierci komórki (apoptozy) i licznych szlaków sygnałowych, metabolizmie żelaza i steroidogenezie [SPINELLI I HAIGIS 2018; BOCK I TAIT 2020; BOYMAN I WSP. 2020].

I.4.1. Budowa mitochondrium

Mitochondria tradycyjnie opisywane są jako struktury o fasolowatym lub soczewkowatym kształcie. Obecnie uważa się jednak, że w komórkach somatycznych częściej niż w postaci indywidualnych organelli występują one w formie skomplikowanej i dynamicznej sieci, tzw. sieci mitochondrialnej [WESTERMANN 2010; FRIEDMAN I NUNNARI 2014; MATTIE I WSP. 2019]. Niezmienny pozostaje fakt, że mitochondria to organelle komórkowe otoczone dwiema błonami lipidowymi ograniczającymi ich wnętrze, zwane macierzą mitochondrialną. W zewnętrznej błonie mitochondrialnej zakotwiczone jest wiele białek pośredniczących w oddziaływaniach z czynnikami cytoplazmatycznymi, a w wewnętrznej, silnie pofałdowanej błonie mitochondrialnej zlokalizowane są białka łańcucha oddechowego [KÜHLBRANDT 2015]. Łańcuch oddechowy stanowi podłoże procesu fosforylacji oksydacyjnej, podczas której dochodzi do transformacji i zmagazynowania energii w formie wysokoenergetycznych wiązań chemicznych ATP. Łańcuch oddechowy jest źródłem reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *Reactive Oxygen Species*), które powstają, jako produkt uboczny fosforylacji oksydacyjnej i mają destrukcyjny wpływ na DNA. Pomiędzy zewnętrzną i wewnętrzną błoną mitochondrialną występuje przestrzeń

międzybłonowa. Reakcje zachodzące podczas fosforylacji oksydacyjnej generują potencjał elektryczny wewnętrznej błony mitochondrialnej, którego zaburzenia świadczą o wadliwym działaniu mitochondrium i konieczności jego naprawy lub usunięcia z komórki na drodze autofagii [FRIEDMAN I NUNNARI 2014]. W macierzy mitochondrialnej występują m.in. rybosomy oraz genom mitochondrialny (mtDNA), w postaci kolistej i dwuniciowej cząsteczki DNA [JOHN I WSP. 2010]. Sąsiedztwo łańcucha oddechowego generującego ROS powoduje, iż mtDNA jest podatne na mutacje i uszkodzenia, których efektem może być spadek potencjału błony mitochondrialnej i utrata funkcji przez mitochondrium [CHINNERY I HUDSON 2013; ZHANG I WU 2023].

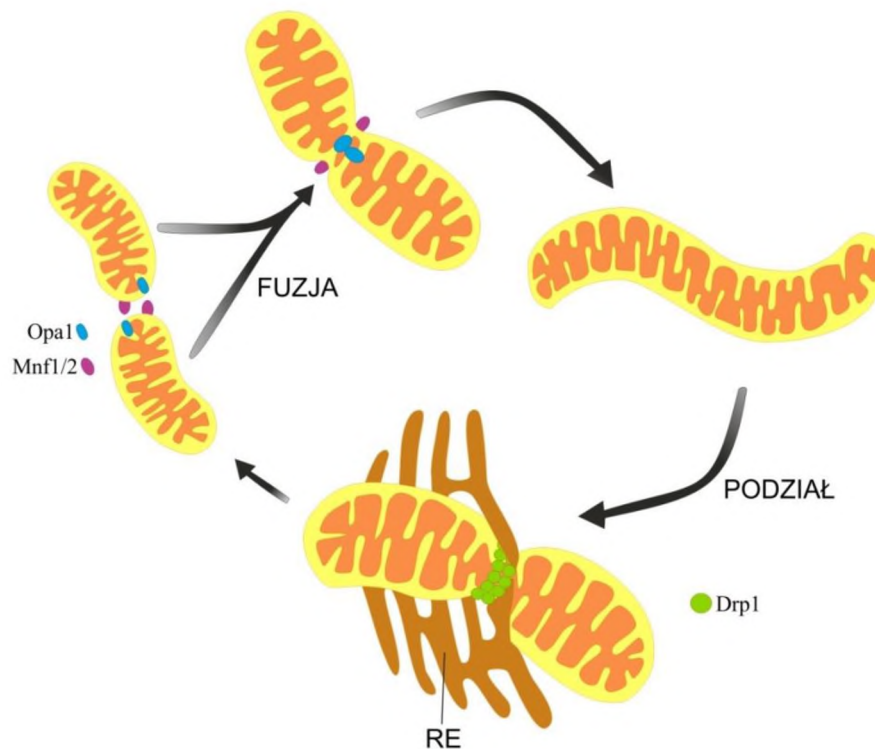
I.4.2. Fuzja i podział mitochondriów

Wielu informacji dotyczących przeciwdziałania skutkom wpływu ROS na mtDNA dostarczyły badania morfologii i homeostazy mitochondriów w komórkach somatycznych [WESTERMANN 2010; YOULE I VAN DER BLIEK 2012; MITRA 2013; FRIEDMAN I NUNNARI 2014; MATTIE I WSP. 2019]. W badaniach tych wykazano, że mitochondria są wysoce dynamicznymi organellami, które podlegają ciągłym procesom fuzji (ang. *fusion*) i podziału (ang. *fission*) (Rys. 2). Fuzja (łączenie) mitochondriów umożliwia wymianę zawartości macierzy mitochondrialnej (cząsteczek mtDNA, enzymów, lipidów i metabolitów), a jej zatrzymanie utrzymuje mitochondria w stanie fragmentacji, w postaci małych organelli fasolowatego kształtu. W wyniku podziału (fragmentacji) mitochondriów z sieci mitochondrialnej wyodrębniane są mniejsze organelle, które łatwiej mogą być transportowane wzdłuż cytoszkieletu. Fragmentacja mitochondriów ma, zatem istotne znaczenie dla dystrybucji mitochondriów w komórce i ich rozdziału do komórek potomnych podczas podziału komórkowego. Zahamowanie fragmentacji mitochondriów prowadzi do powstania rozległych sieci mitochondrialnych.

Dynamika mitochondrialna (procesy fuzji i podziału mitochondriów) odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu integralności mtDNA i jego dziedziczeniu. Mitochondria, które wykazują niewielki stopień uszkodzenia mtDNA mogą zostać „uratowane” poprzez włączenie do sieci mitochondrialnej w wyniku fuzji. Alternatywnie, mitochondria nefunkcjonalne po odłączeniu od sieci ulegają makroautofagii

(mitofagii). W procesy fuzji i podziału mitochondriów zaangażowanych jest wiele białek, z których najważniejszą grupę stanowią dynaminy, czyli wielodomenowe białka o aktywności GTP-azowej, uczestniczące w procesach przebudowy struktur błonowych [FRIEDMAN I NUNNARI 2014; RAMACHANDRAN I SCHMID 2018].

Fuzja mitochondriów jest procesem dwuetapowym, polegającym na połączeniu zewnętrznej, a następnie wewnętrznej błony mitochondrialnej (Rys. 2). U ssaków najważniejszą rolę w tym procesie odgrywają zlokalizowane w zewnętrznej błonie mitochondrialnej mitofuzyny (Mfn1, Mfn2) oraz białko wewnętrznej błony mitochondrialnej Opa1 (ang. *Optic atrophy 1*) [VAN DER BLIEK I WSP. 2013]. Fragmentacja sieci mitochondrialnych możliwa jest dzięki współdziałaniu struktur komórkowych (głównie siateczki śródplazmatycznej i mikrofilamentów) oraz dynamin, z których najważniejszą rolę pełni cytoplazmatyczne, wysoce konserwatywne białko Drp1 (ang. *Dynammin-related protein 1*) [SMIRNOVA I WSP. 2001; KLEELE I WSP. 2021]. Podział mitochondrium zainicjowany zostaje przez siateczkę śródplazmatyczną, która wraz z filamentami aktynowymi (mikrofilamentami) otacza zewnętrzną błonę mitochondrialną i zaciskając się wokół mitochondrium doprowadza do jego lokalnego zwężenia [FRIEDMAN I WSP. 2011; MOORE I WSP. 2016]. Do miejsca przewężenia rekrutowane jest białko Drp1, które w wyniku oligomeryzacji tworzy spiralną strukturę (pierścien) wokół błony mitochondrium (Rys. 2). Katalizowana przez Drp1 hydroliza guanozynotrifosforanu (GTP) jest źródłem energii mechanicznej, potrzebnej do zmian konformacyjnych i zaciskania pierścienia Drp1 wokół mitochondrium. Następnie do zewnętrznej błony mitochondrialnej rekrutowana jest dynamina 2 (Dyn2), która doprowadza do reorganizacji struktury błon mitochondrialnych i ich całkowitego podziału [LEE I WSP. 2016]. Rekrutacja dynamin do błony mitochondrialnej jest procesem odwracalnym, gdyż po fragmentacji mitochondrium ich oligomery ulegają rozpadowi na mniejsze podjednostki, co umożliwia ich ponowne wykorzystanie.



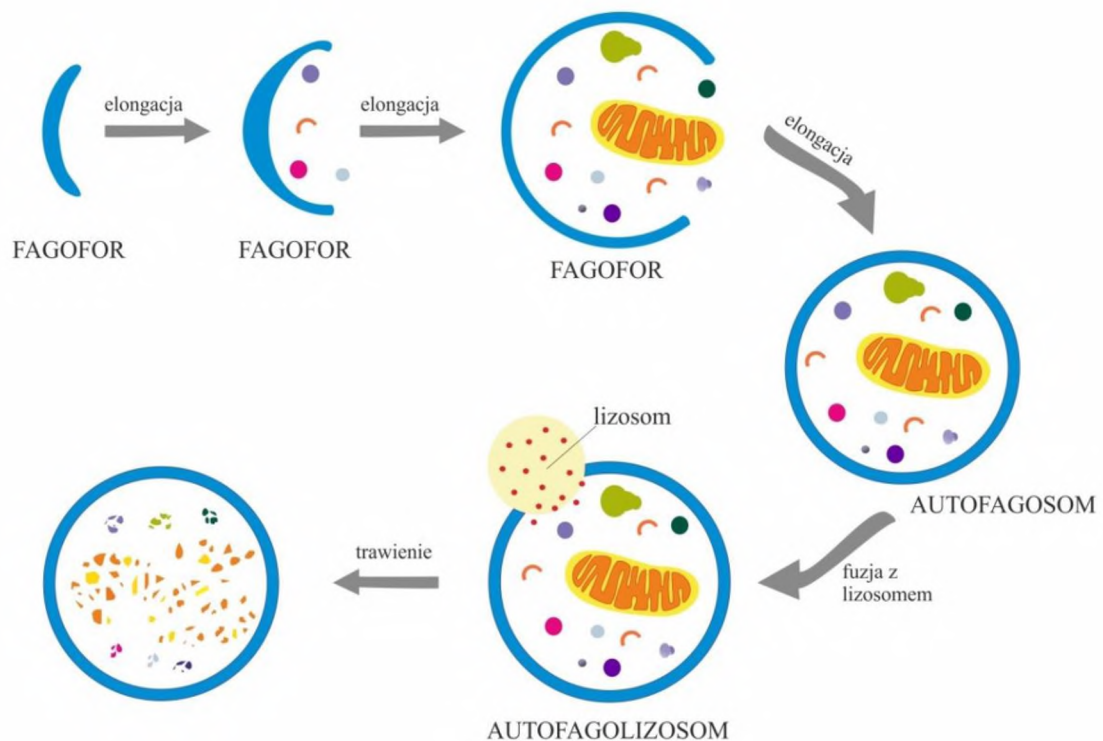
Rysunek. 2. Dynamika mitochondrialna. Fuzja mitochondriów sprzyja powstawaniu form wydłużonych (tj. sieci mitochondrialnych), a efektem podziału mitochondriów jest powstanie małych fasolowatych organelli. Proces fuzji kontrolowany jest przez zlokalizowane na zewnętrznej błonie mitochondrialnej białka Mfn1 i Mfn2 oraz zakotwiczone w wewnętrznej błonie mitochondrialnej białko Opa1. Warunkiem podziału mitochondriów jest rekrutacja do zewnętrznej błony mitochondrialnej białka Drp1, tworzącego strukturę przypominającą pierścień wokół miejsca zwężenia mitochondriów. W podziale mitochondriów uczestniczy siateczka śródplazmatyczna (RE).

I.4.3. Makroautofagia mitochondriów

Wadliwe mitochondria eliminowane są z komórki na drodze makroautofagii. Jest ona skomplikowanym, wieloetapowym procesem formowania, dojrzewania i degradacji przez lizosomy wakuol autofagicznych (tzw. autofagosomów) [RUBINSZTEIN I WSP. 2012; NAKATOGAWA 2020]. W procesie tym wyróżnić można kilka głównych etapów (Rys. 3):

- 1) wstępne odgrodzenie części cytoplazmy przez podwójną błonę izolującą, tzw. fagofor. Początkowo kształt fagoforu przypomina literę C;

- 2) całkowite otoczenie przez fagofor przeznaczonego do degradacji fragmentu komórki (ładunku autofagicznego, np. uszkodzonego mitochondrium) – tzw. elongacja fagoforu;
- 3) zamknięcie krawędzi fagoforu i utworzenie pęcherzyka - autofagosomu;
- 4) fuzja zewnętrznej błony autofagosomu z lizosomem - powstanie autofagolizosomu;
- 5) trawienie przez enzymy lizosomalne wewnętrznej błony autofagolizosomu i ładunku autofagicznego.



Rysunek. 3. Przebieg makroautofagii. Podwójna błona izolująca (fagofor) ulega elongacji i stopniowo otacza materiał cytoplazmatyczny, w tym białka i organelle (np. mitochondria) aż do momentu utworzenia pęcherzyka (autofagosomu). Autofagosom ostatecznie łączy się z lizosomem, tworząc autofagolizosom. Po fuzji ładunek autofagiczny zostaje strawiony przez proteazy lizosomalne.

I.4.4. Selekcja i dziedziczenie mitochondrialnego DNA

U większości zwierząt mtDNA dziedziczony jest aseksualnie, tzn. przekazywany jest wyłącznie przez żeńskie komórki rozrodcze i nie podlega rekombinacji podczas podziału mejotycznego [RAND 2001]. Genom mitochondrialny, w porównaniu do DNA jądrowego, charakteryzuje się wyższym tempem mutacji [KRISHNAN I TURNBULL 2010]; pozostaje ponadto pod wpływem destrukcyjnego działania ROS (por. I.4.1. *Budowa mitochondrium*). Podsumowując powyższe fakty i mając na uwadze, iż rozmnażanie aseksualne charakteryzuje się akumulacją (z pokolenia na pokolenie) niekorzystnych mutacji w genomie (proces zwany zapadką Müllera), należałoby spodziewać się, że matczyzna transmisja mitochondriów doprowadzi do szybkiego nagromadzenia niekorzystnych mutacji w genomie mitochondrialnym. Dane eksperymentalne wskazują jednak, że propagacja szkodliwych wariantów mtDNA jest ograniczona, zarówno u bezkręgowców jak i kręgowców [FAN I WSP. 2008; HILL I WSP. 2014; PALOZZI I WSP. 2018], co wskazuje, że genom mitochondrialny musi podlegać skutecznej ochronie i/lub selekcji.

Mechanizm ochrony genomu mitochondrialnego przed akumulacją szkodliwych mutacji nie został dotychczas w pełni poznany. Zaproponowano jednak [MILANI 2015; BILINSKI I WSP. 2017B; TWORZYDŁO I WSP. 2020], że mechanizm ten opiera się na trzech podstawowych procesach:

- 1) losowym przekazywaniu nielicznych mitochondriów, a więc cząsteczek mtDNA, do dzielących się pierwotnych komórek płciowych w czasie ich proliferacji w rozwijających się jajnikach. Proces ten to tzw. efekt mitochondrialnego wąskiego gardła (ang. *bottleneck phenomenon*) (selekcja na poziomie organizmu, tj. żeńskich narządów rozrodczych);
- 2) eliminacji mitochondriów zawierających zmutowany mtDNA oraz ekspansji mitochondriów funkcjonalnych („zdrowych”) w cytoplazmie rozwijającego się oocytu (selekcja na poziomie organelli);
- 3) eliminacji komórek rozrodczych zawierających liczne niefunkcjonalne mitochondria na drodze apoptozy (selekcja na poziomie komórki).

Szczegółowe badania [COX I SPRADLING 2003; ZHOU I WSP. 2010; TWORZYDŁO I WSP. 2016, 2020; BILINSKI I WSP. 2017B] i analizy modeli teoretycznych [COLNAGHI I WSP. 2021] wskazują, iż największe znaczenie w ochronie

genomu mitochondrialnego ma selekcja mitochondriów na poziomie organelli. Obecnie publikowane są coraz liczniejsze dowody wskazujące, iż proces ten związany jest z charakterystycznym dla oocyty kompleksem organelli, tzw. ciałem Balbianiego (ang. *Balbiani body*).

I.5. Ciało Balbianiego – struktura i funkcje

Ciało Balbianiego to specyficzny zespół (kompleks) organelli zlokalizowany na jednym z biegunów pęcherzyka zarodkowego (jądra oocyty) [KLOC I WSP. 2004]. Kompleks ten po raz pierwszy opisany został w oocytach pajaków w połowie XIX w. przez von Witticha, a swoją obecną nazwę zawdzięcza embriologowi E.G. Balbianiemu, który w latach 1864-93 badał tę strukturę w komórkach rozrodczych pajaków i wijów. Od tej pory występowanie ciała Balbianiego opisano (niekiedy pod innymi nazwami) w oocytach przedstawicieli wielu różnych grup zwierząt, m.in. owadów, płazów, ryb, ptaków i ssaków, w tym naczelnych i człowieka [przegląd: GURAYA 1979; KLOC I WSP. 2004].

I.5.1. Budowa ciała Balbianiego

Najwięcej informacji o strukturze, składzie molekularnym oraz kolejnych fazach rozwoju (morfogenezie) ciała Balbianiego dostarczyły analizy oocytów żaby szponiastej, *Xenopus laevis* [KLOC I WSP. 2004, 2014]. Ciało Balbianiego *Xenopus* to nieołoniony kompleks organelli, który powstaje w bezpośrednim sąsiedztwie jądra młodego prewitelogenicznego oocyty w wyniku stopniowej agregacji mitochondriów i włóknisto-ziarnistego materiału chmurkowego (materiału nuage) wokół pary centrioli. Liczba mitochondriów budujących dojrzałe ciało Balbianiego *Xenopus* może sięgać nawet 500,000 [MARINOS I BILLET 1981], dlatego u tego gatunku ciało Balbianiego nazywane jest często chmurą mitochondrialną (ang. *mitochondrial cloud*). Dodatkowo w skład ciała Balbianiego *Xenopus* wchodzi kompleksy Golgiego oraz elementy siateczki śródplazmatycznej.

Materiał nuage po raz pierwszy zidentyfikowany został za pomocą mikroskopii elektronowej, jako zbiór gęstych elektronowo, amorficznych „chmur” otaczających jądra komórek rozrodczych [EDDY 1975; VORONINA I WSP. 2011]. Współczesne

analizy wykazały, że nuage to zbiór układających się warstwowo nieobłonionych kondensatów bogatych w RNA i białka [KLOC I WSP. 2004; JAGLARZ I WSP. 2011; OUYANG I SEYDOUX 2022]. Według obecnych poglądów większość, jeżeli nie wszystkie transkrypty, które opuszczają jądro komórki płciowej, zanim trafią do miejsca docelowego w cytoplazmie podstawowej, współtworzą kondensaty nuage [OUYANG I SEYDOUX 2022].

I.5.2. Morfogeneza ciała Balbianiego

Ciało Balbianiego nie jest stałym elementem ooplazmy, ale występuje przejściowo, w określonych fazach oogenezy. U *Xenopus* jeszcze przed rozpoczęciem wzrostu prewitelogenicznego, w sąsiedztwie jądra oocytu rozpoczyna się agregacja składników ciała Balbianiego w formie regularnych sferycznych kompleksów lub agregatów o charakterystycznym kształcie czapeczki lub półksiężyca [KLOC I WSP. 2014]. Wraz z postępem prewitelogenezy ciało Balbianiego osiąga maksymalne rozmiary i stopniowo odsuwa się od jądra oocytu, aby finalnie (podczas witelogenezy) ulec fragmentacji na mniejsze kompleksy i całkowitemu rozproszeniu (dezintegracji) [JAMIESON-LUCY I MULLINS 2019]. Ostateczne losy mRNA, białek i organelli budujących ciało Balbianiego zależą od obecności specyficznego rejonu na biegunie wegetatywnym (lub tylnym) oocytu, tzw. plazmy płciowej [EXTAVOUR I AKAM 2003; BILINSKI I WSP. 2017A; YAMASHITA 2018]. Jeżeli oocyt nie posiada wspomnianego rejonu to elementy ciała Balbianiego rozpraszają się w cytoplazmie względnie równomiernie [BILINSKI I WSP. 2017B, 2019; SEKULA I WSP. 2020, 2022]. Jeżeli na biegunie wegetatywnym/tylnym oocytu występuje rejon identyfikowany z plazmą płciową, to znaczna część RNA, białek i organelli (głównie mitochondriów) transportowana jest właśnie do tego rejonu [COX I SPRADLING 2003; KLOC I WSP. 2004; BONTEMS I WSP. 2009].

Wiedza dotycząca mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie ciała Balbianiego i utrzymywanie jego integralności, pomimo braku ograniczającej go błony cytoplazmatycznej, systematycznie się poszerza. Wciąż jednak wiele aspektów pozostaje niewyjaśnionych i wymaga dalszych badań. Według najnowszej koncepcji ciało Balbianiego, podobnie jak inne organelle bezbłonowe (ang. *membraneless organelles*, MLOs), stanowi kondensat makromolekularny, powstający na drodze

spontanicznej separacji faz ciecz-ciecz (ang. *liquid-liquid phase separation*, LLPS) [SHIN I BRANGWYNNE 2017; CABRAL I MOWRY 2020; ZHAO I ZHANG 2020]. Proces ten inicjowany jest przez interakcję pomiędzy białkami posiadającymi regiony inherentnie nieuporządkowane (ang. *intrinsically disordered regions*, IDRs). Analizy molekularne ciała Balbianiego *Xenopus* wykazały, że w jego obrębie występuje inherentnie nieuporządkowane białko Xvelo, które na swoim N-końcu posiada domenę prionopodobną (ang. *prion-like domain*, PLD), a C-koniec jest dodatkowo naładowany i wiąże RNA [BOKE I WSP. 2016; BOKE I MITCHISON 2017; DHANDAPANI I WSP. 2022]. Według autorów badań białko Xvelo tworzy rodzaj amyloidowej klatki (sieci), w której zamykane są określone RNA, białka i organelle błoniaste (mitochondria, aparaty Golgiego i elementy siateczki śródplazmatycznej). Sieć taka powstaje w wyniku szybkiej i wysoce specyficznej samoagregacji białka Xvelo [WOODRUFF I WSP. 2018]. Dotychczas nie ma jednak silnych dowodów potwierdzających, że zaproponowany mechanizm jest ewolucyjnie konserwatywny i odpowiada za formowanie ciała Balbianiego w oocytach innych zwierząt, zwłaszcza bezkręgowych.

I.5.3. Funkcje ciała Balbianiego

Najlepiej zbadaną funkcją ciała Balbianiego jest transport i lokalizacja determinantów komórek linii płciowej (RNA i białek) oraz mitochondriów w rejonie plazmy płciowej, a w konsekwencji ich transfer do komórek organizmu potomnego [na przykładzie organizmów modelowych *Xenopus laevis* i *Danio rerio*; COX I SPRADLING 2003; KLOC I WSP. 2004; MARLOW I MULLINS 2008]. U *Xenopus* oraz niektórych owadów stwierdzono, że ciało Balbianiego uczestniczy w selektywnej eliminacji mitochondriów dysfunkcyjnych i/lub uszkodzonych i proliferacji mitochondriów funkcjonalnych [ZHOU I WSP. 2010; TWORZYDŁO I WSP. 2016; BILINSKI I WSP. 2017B; SEKULA I WSP. 2020, 2022]. W oocytach niektórych gatunków pająków ciało Balbianiego bierze udział w biogenezie kropli lipidowych (lipidogenezie) [JEDRZEJOWSKA I KUBRAKIEWICZ 2007, 2010]. Ostatnią funkcją ciała Balbianiego, wynikającą z jego lokalizacji na jednym z biegunów jądra oocytu, jest udział w asymetryzacji ooplazmy [JAGLARZ I WSP. 2003; TWORZYDŁO I WSP. 2017]. Bez odpowiedzi pozostaje pytanie, która z wyżej omówionych funkcji ciała Balbianiego

jest ewolucyjnie pierwotna, a które funkcje możemy potraktować, jako wtórne i charakterystyczne dla konkretnych grup zwierząt.

I.6. Tettigoniidae (pasikonikowate) – krótka charakterystyka

Tettigoniidae (pasikonikowate) to zróżnicowana i szeroko rozpowszechniona rodzina owadów prostoskrzydłych (Orthoptera) obejmująca ponad 7500 gatunków występujących na całym świecie [MUGLESTON I WSP. 2018]. Zaliczane są do owadów o przeobrażeniu niezupełnym (Hemimetabola). Charakteryzują się posiadaniem długich, nitkowatych czułków i spłaszczonego bocznie ciała, zazwyczaj o zielonym lub brązowym ubarwieniu [NASKRECKI 2013]. U samic występuje pokładełko, zwykle długie i szablówate. Owady te są głównie drapieżne, choć znane są również gatunki żywiące się pokarmem roślinnym i wszystkożerne. Pasikonikowate są przedmiotem licznych badań ekologicznych i fizjologicznych dotyczących przede wszystkim kamuflażu, sygnalizacji akustycznej i doboru płciowego. Do pasikonikowatych zalicza się kilka podrodzin, m.in. mieczniki (Conocephalinae), nadrzewki (Meconematinae), długoskrzydłaki (Phaneropterinae) oraz pasikoniki właściwe (Tettigoniinae).

I.7. Cele badań

Występowanie ciała Balbianiego w oocytach zwierząt stwierdzono ponad 150 lat temu. Od tego czasu struktura ta poddawana była licznym badaniom, ale wciąż pozostaje wiele do wyjaśnienia, szczególnie w kwestii morfogenezy ciała Balbianiego i jego funkcji. Mając na uwadze fakt, że ciało Balbianiego jest strukturą zróżnicowaną i posiada pewne cechy charakterystyczne dla danego gatunku / grupy zwierząt, należy rozważyć, czy procesy opisane w organizmach modelowych, takich jak *Xenopus laevis* czy *Danio rerio*, są uniwersalne dla całego królestwa zwierząt, czy unikalne tylko dla określonej grupy organizmów. Rodzi to potrzebę dalszych badań, w których analizie poddane zostaną oocyty zwierząt innych niż gatunki modelowe, zwłaszcza zwierząt bezkręgowych. Z tego powodu podjęto badania, których głównym celem było:

1. poznanie ultrastruktury oraz mechanizmów kontrolujących morfogenezę (formowanie, stopniowy wzrost i rozpraszanie) ciała Balbianiego w oocytach wybranych gatunków owadów;
2. wyjaśnienie roli ciała Balbianiego w selektywnym namnażaniu i eliminacji mitochondriów w oocytach wybranych gatunków owadów.

W ramach celów głównych sformułowano szczegółowe pytania badawcze:

- 1) Czy mitochondria ciała Balbianiego tworzą sieci podobne do opisanych w komórkach somatycznych?
- 2) Czy w obrębie ciała Balbianiego dochodzi do namnażania mitochondriów?
- 3) Czy białka regulujące dynamikę mitochondrialną (na przykładzie Drp1) zaangażowane są w formowanie i dezintegrację ciała Balbianiego?
- 4) Czy ciało Balbianiego uczestniczy w selektywnej eliminacji mitochondriów na drodze makroautofagii (mitofagii)?
- 5) Czy formowanie ciała Balbianiego związane jest z samoagregacją białek inherentnie nieuporządkowanych?
- 6) Jaki jest los komponentów ciała Balbianiego po jego rozproszeniu?
- 7) Jaką rolę w tworzeniu i rozpraszaniu ciała Balbianiego odgrywa cytoszkielet?

Rozdział II Materiały i metody

II.1. Materiały

II.1.1. Zwierzęta

Do badań morfologicznych wykorzystano oocyty samic reprezentujących pięć różnych gatunków zaliczanych do rodziny Tettigoniidae (pasikonikowatych): *Conocephalus fuscus* (miecznik ciemny), *Leptophyes albovittata* (wątlik charłaj), *Meconema meridionale* (nadrzewek południowy), *Metrioptera brachyptera* (podłęczyn krótkoskrzydły) i *Pholidoptera griseoptera* (podkrzewin szary). Wybrane gatunki są dość powszechne, nie są chronione ani zagrożone, a ich zbiór nie wymaga pozwoleń. Wykaz gatunków wraz z liczbą osobników użytych w badaniach przedstawiono w Tabeli 1. Samice zbierano od czerwca do sierpnia w okolicach Krakowa (Polska południowa; 50°03'41"N 19°56'14"E). Przeanalizowano od 5 do 10 oocytów każdej zebranej samicy. Samicę każdego z badanych gatunków sfotografowano w środowisku naturalnym aparatem Nikon d7200 (Ryc. 1).

Do szczegółowych badań histochemicznych wybrano tylko jeden gatunek, *Meconema meridionale*, gdyż udało się utworzyć rodzaj niewielkiego, naturalnego „ogrodu eksperymentalnego”, w którym kolonia *M. meridionale* utrzymywana była przez 3 lata, a samice przeżywały i pomyślnie rozmnażały się po każdym sezonie zimowym. W czerwcu i lipcu z kolonii odławiano kilkanaście samic: ostatnie stadium larwalne oraz młode samice. Przeanalizowano od 10 do 20 oocytów każdej samicy.

Tabela 1. Gatunki pasikonikowatych (Tettigoniidae) wykorzystane w badaniach (w porządku alfabetycznym).

Gatunek	Podrodzina	Liczba osobników
<i>Conocephalus fuscus</i> (miecznik ciemny)	Conocephalinae	5
<i>Leptophyes albovittata</i> (wątlik charłaj)	Phaneropterinae	5
<i>Meconema meridionale</i> (nadrzewek południowy)	Meconematinae	45
<i>Metrioptera brachyptera</i> (podłateczyn krótkoskrzydły)	Tettigoniinae	15
<i>Pholidoptera griseoptera</i> (podkrzewin szary)	Tettigoniinae	5

II.1.2. Powody wyboru modelu badawczego

Oogeneza jest procesem długotrwałym trwającym miesiące, a nawet lata, dlatego prześledzenie losów mitochondriów w rozwijających się oocytach oraz zbadanie udziału ciała Balbianiego w eliminacji wadliwych mitochondriów wymaga starannego doboru organizmu/ów modelowych. Należy wziąć pod uwagę dwie ważne cechy rozwijającego się oocyty: (1) obecność (lub brak) komórek odżywczych, tj. specyficznych komórek linii płciowej wspomagających oocyt w czasie rozwoju oraz (2) obecność (lub brak) wyodrębnionego regionu cytoplazmy oocyty, tzw. plazmy płciowej.

(1) Jajniki Tettigoniidae zbudowane są stosunkowo prosto. Są to jajniki typu panoistycznego, w których oocytom nie towarzyszą komórki odżywcze (por. wyżej w 1.2. *Klasyfikacja jajników owadów*). W konsekwencji, wszystkie mitochondria danego oocyty pochodzą tylko z jednej komórki płciowej. W przypadku owarioli meroistycznej mitochondria danego oocyty, a w konsekwencji także mitochondria tworzące ciało Balbianiego, pochodzą ze wszystkich siostrzanych komórek tworzących grono (cystę) komórek płciowych. Taki stan rzeczy w znacznym stopniu utrudnia śledzenie losów mitochondriów oraz analizę i interpretację uzyskanych wyników.

(2) Plazmę płciową opisano w kilku odległych ewolucyjnie (niespokrewnionych) taksonach bezkręgowców i kręgowców [EXTAVOUR I AKAM 2003; BILINSKI I WSP. 2017A]. Badania molekularne (przeprowadzone głównie na organizmach modelowych, np. *Xenopus* i *Danio*) pokazały, iż przynajmniej

u niektórych gatunków ciało Balbianiego odgrywa istotną rolę w formowaniu plazmy płciowej. W świetle przeprowadzonych analiz zaproponowano, że podstawową funkcją ciała Balbianiego jest dostarczanie RNA, białek i organelli do rejonu plazmy płciowej (por. wyżej w I.5.3. *Funkcje ciała Balbianiego*). Należy jednak podkreślić, że w oocytach większości gatunków zwierząt plazma płciowa nie powstaje, pomimo iż oocyty te zawierają ciało Balbianiego. Fakt ten rodzi pytanie o rolę ciała Balbianiego w oocytach pozbawionych plazmy płciowej. Aby odpowiedzieć na to pytanie, do analiz wybrano gatunki, u których oocyty zawierają stosunkowo duże i łatwo rozpoznawalne ciało Balbianiego, a ooplazma jest względnie jednolita i pozbawiona jakichkolwiek morfologicznie odrębnych regionów ooplazmy, w tym plazmy płciowej.

Ponadto, Tettigoniidae są przedstawicielami jednej z bazalnych grup (taksonów) owadów. Badania gatunków o takiej przynależności systematycznej mogą wnieść nowe argumenty do dyskusji na temat pochodzenia i pierwotnej funkcji ciała Balbianiego.

II.1.3. Odczynniki

Tabela 2. Przeciwciała użyte w badaniach.

Przeciwciało	Gospodarz	Stężenie	Producent	Nr katalogowy
<i>Przeciwciała pierwszorzędowe</i>				
Anty-Drp1	Królik	1:100	Sigma Aldrich	ABT155
Anty-ATG5	Królik	1:200	Covalab	pab50264
Anty-LC3	Królik	1:100	Sigma Aldrich	L8918
Anty-α-tubulina	Mysz	1:2000	Sigma-Aldrich	T5168
Anty-PolyG*	Mysz	1:200	AdipoGen Life Sciences	AG-20B-0020
Anty-BrdU/FITC	Mysz	1:50	EMD Millipore	MAB3262F
<i>Przeciwciała drugorzędowe</i>				
Alexa Fluor 488 anty-mysie	Koza	1:200	Invitrogen	A11001
Alexa Fluor 488 anty-królicze	Koza	1:200	Invitrogen	A11008
Cy3 anty-mysie	Koza	1:200	Invitrogen	A10521
Cy3 anty-królicze	Koza	1:200	Invitrogen	A10520

*PolyG – poliglutamylacja tubuliny

Tabela 3. Skład buforu do ekstrakcji cytoszkieletu.

Odczynnik	Stężenie [mM]	Producent	Nr katalogowy
NaCl	137	POCH	794121116
KCl	5	Sigma-Aldrich	P5405
Na₂HPO₄	1.1	Sigma-Aldrich	S0876
KH₂PO₄	0.4	Sigma-Aldrich	P0662
C₆H₁₂O₆	5.5	Sigma-Aldrich	G8270
NaHCO₃	4	Sigma-Aldrich	S6014
MgCl₂	12	Sigma-Aldrich	208337
EGTA	2	Sigma-Aldrich	E4378
MES	50	Sigma-Aldrich	69892

II.2. Metody

II.2.1. Mikroskopia świetlna i transmisyjna mikroskopia elektronowa

Wypreparowane jajniki utrwalano w mieszaninie 2% formaldehydu (Sigma-Aldrich) i 2,5% glutaraldehydu (Sigma-Aldrich) w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7.3 w temperaturze 4°C. Po kilku tygodniach gonady kilkakrotnie płukano w buforze fosforanowym z dodatkiem sacharozy (5,8 g w 100 ml buforu) i ponownie utrwalano w mieszaninie 1% czterotlenku osmu (Sigma-Aldrich) i 0,8% żelazocyjanku potasu (Chempur, Polska) w buforze fosforanowym (60 min, 4°C). Utrwalone jajniki płukano w wodzie i odwadniano w szeregu alkoholu etylowego o wzrastającym stężeniu, tzw. szeregu odwadniającego (etanol 30%, 50%, 70%, 90%, 96% i absolutny 99,8%), mieszaninie alkoholu absolutnego i acetonu oraz czystym acetonie. Następnie materiał przepajano w mieszaninie acetonu z żywicą epoksydową (Epoxy Embedding Medium kit; Sigma-Aldrich) w zamkniętych naczynkach wagowych w temperaturze pokojowej przez 60 min, po czym naczynka otwierano i pozostawiano do dalszego przepajania. Następnego dnia materiał umieszczano w suszarce próżniowej (VacuTherm, Thermo Fisher Scientific) na 2 godziny, po czym zatapiano w żywicy epoksydowej. Żywica polimeryzowała w temperaturze 60°C przez 72 godziny. Powstałe bloczki krojono na mikrotomie Leica RM2265 (Leica Biosystems) na skrawki półcienkie o grubości 0,7-1 µm lub mikrotomie Ultracut E Reichert Jung na skrawki ultracienkie o grubości 80 nm.

Skrawki półcienkie barwiono 1% roztworem błękitu metylenowego w 1% boraksie [DYKSTRA 1992], a następnie analizowano i fotografowano w mikroskopie świetlnym Leica DMR (Leica Biosystems) wyposażonym w kamerę OLYMPUS DP71.

Skrawki ultracienkie kontrastowano octanem uracylu i cytrynianem ołowiu [REYNOLDS 1963] i analizowano w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM) Jeol JEM 2100 (Jeol Ltd) przy napięciu przyspieszającym 80 kV.

Uzyskane mikrofotografie analizowano i dokonywano pomiarów w darmowym (open source) programie do przetwarzania obrazów ImageJ (National Institutes of Health, NIH). W wybranych przypadkach, za pomocą darmowego programu Image Composite Editor (Microsoft) kilka mikrofotografii łączono w jeden obraz przedstawiający większy fragment oocytu.

II.2.2. Trójwymiarowa rekonstrukcja organizacji ciała Balbianiego

Wnioski, które można wysnuć na podstawie pojedynczych (i często przypadkowych) skrawków, nie są wystarczające do przestrzennej wizualizacji tak skomplikowanego zespołu organelli, jakim jest ciało Balbianiego. Z tego powodu wykonano wspomagane komputerowo rekonstrukcje trójwymiarowe (3D) seryjnych skrawków półcienkich i ultracienkich. Do wykonania rekonstrukcji wykorzystano pakiet przetwarzania obrazu Fiji ImageJ (NIH). W zależności od rekonstrukcji wykorzystano 3-10 seryjnych skrawków. Po utworzeniu wirtualnych stosów, mikrofotografie dopasowano automatycznie i/lub manualnie. Konturowania i modelowania 3D wybranych struktury (m.in. jądra oocytu, chromosomów, agregatów nuage, mitochondriów, lizosomów i struktur Golgiego) dokonano dzięki wtyczkom TrakEM2 i 3D viewer.

II.2.3. Barwienia immunohistochemiczne

II.2.3.A. Utrwalanie i zatapianie tkanek

Jajniki utrwalano w roztworze 4% formaldehydu w buforze fosforanowym (60 min, temperatura pokojowa) i poddawano stopniowemu odwadnianiu przeprowadzając przez roztwory etanolu o wzrastającym stężeniu, począwszy od alkoholu 30% do etanolu bezwodnego (99,8%), mieszaninę etanol-HistoChoice Clearing Agent (Sigma-Aldrich) i czysty HistoChoice. Następnie gonady przepajano w mieszaninie parafiny z HistoChoice (60 min, temperatura 55°C) i ciekłej parafinie (24 godziny, 55°C). Bloczki parafinowe, krojono za pomocą mikrotomu obrotowego Leica RM2265 i ostrzy stalowych. Grubość skrawka wynosiła od 3 do 5 µm.

II.2.3.B. Przygotowanie tkanki do inkubacji z przeciwciałem – permeabilizacja i blokowanie

Skrawki jajników odparafinowywano poprzez umieszczenie w dwóch zmianach HistoChoice, a następnie nawadniano w szeregu roztworów alkoholu etylowego o malejącym stężeniu, począwszy od alkoholu absolutnego, aż do 50% i wody. Do permeabilizacji tkanek zastosowano roztwory detergentów: 0,05% Tween 20

(Sigma-Aldrich) i 0,1% Tritonu X-100 (Sigma-Aldrich) w buforze fosforanowym. Niespecyficzne miejsca wiązania przeciwciał blokowano inkubując tkanki przez 3 godziny w temperaturze pokojowej z buforem kazeinowym (Blocker Casein in PBS; Thermo Scientific) zawierającym 0,05% Tween 20.

II.2.3.C. Inkubacja z przeciwciałem i obrazowanie tkanki

Jajniki inkubowano przez noc w 4°C w obecności przeciwciał pierwszorzędowych skierowanych przeciwko wybranym antygenom. Przeciwciała użyte w badaniach wraz z rozcieńczeniami przedstawiono w Tabeli 2. Po wypłukaniu niezwiązanego przeciwciała pierwszorzędowego w buforze fosforanowym zawierającym 0,05% Tween 20, przeprowadzano inkubację z przeciwciałami drugorzędowymi (Tabela 2). Stosowano znakowane fluorescencyjnie kozie przeciwciała anty-królicze lub anty-mysie, każde rozcieńczone w stosunku 1:200. Nadmiar przeciwciał drugorzędowych odpłukiwano analogicznie jak przeciwciała pierwszorzędowe. Preparaty zamykano w medium zawierającym DAPI (ProLong Gold antifade reagent with DAPI; Invitrogen). W kontroli negatywnej podczas inkubacji pomijano przeciwciało pierwszorzędowe i w efekcie nie obserwowano znakowania fluorescencyjnego.

Do obrazowania wyników barwienia immunofluorescencyjnego wykorzystano mikroskop epifluorescencyjny Leica DMR (Leica Biosystems) oraz mikroskop konfokalny Zeiss LSM 900 (Zeiss). Sporządzone zdjęcia analizowano w programie ImageJ oraz ZEN 2.3 (blue edition). W przypadku analizy aktywności mitochondriów obliczano skorygowaną fluorescencję całkowitą emitowaną przez komórkę (CTCF, ang. *corrected total cell fluorescence*) zgodnie ze wzorem:

$$\text{CTCF} = \text{gęstość optyczna} - (\text{powierzchnia komórki} \times \text{średnia fluorescencja tła}).$$

II.2.4. Detekcja agregatów proteinowych

W celu sprawdzenia czy w obrębie ciała Balbianiego owadów powstają agregaty białek nieuporządkowanych, przeprowadzano barwienie fluorescencyjne wykorzystując PROTEOSTAT Protein Aggregation Assay (absorbpcja/emisja ~550/600 nm; ENZ-

51023- KP050). Jajniki *M. meridionale* utrwalano w 4% formaldehydzie, zatapiano w parafinie, krojono, odparafinowywano, nawadniano i permeabilizowano zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale *Barwienia immunohistochemiczne*. Tak przygotowaną tkankę barwiono zgodnie z zaleceniami producenta przez 30 min w temperaturze pokojowej w ciemności. Barwnik rozcieńczano w dołączonym do zestawu buforze w stosunku 1:2000. Po przepłukaniu w wodzie preparaty zamykano w medium z DAPI (ProLong Gold antifade reagent with DAPI) i obrazowano w mikroskopie konfokalnym Zeiss LSM 900. Podczas analizy zdjęć wykorzystywano program ZEN 2.3 (blue edition).

II.2.5. Inkubacja z 1,6-hexanediolem

1,6-hexanediol to alkohol alifatyczny, który w badaniach wykorzystywany jest do rozbijania nieobłonionych kondensatów makromolekularnych, przypuszczalnie poprzez rozrywanie słabych hydrofobowych oddziaływań białko-białko / białko-RNA [KROSCHWALD I WSP. 2017; DÜSTER I WSP. 2021].

Jajniki *M. meridionale* inkubowano w medium Grace'a do hodowli komórek owadzych (Grace's Insect Medium, Sigma-Aldrich) z dodatkiem 5% 1,6-hexanediolu (Sigma-Aldrich, 240117) przez 10 min w temperaturze pokojowej. Po inkubacji gonady utrwalano w mieszaninie 2% formaldehydu i 2,5% glutaraldehydu, zatapiano w żywicy epoksydowej i przygotowywano do obserwacji w mikroskopie świetlnym i elektronowym, jak opisano w podrozdziale *Mikroskopia świetlna i transmisyjna mikroskopia elektronowa*.

II.2.6. Hybrydocytochemia (fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*)

Fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* (ang. *fluorescence in situ hybridisation*, FISH) przeprowadzono w celu zbadania lokalizacji Drp1 mRNA w oocytach prewitelogenicznych *M. meridionale*. Do hybrydyzacji wykorzystano dwie specyficzne sondy oligonukleotydowe, syntetyzowane na zamówienie w firmie Genomed.

Sekwencje sond (5'-3'):

drp1_*Meconema*1: Cy5-**GGTktTCGTGGAAAATGTAGC**

drp1_*Meconema*2: Cy5-**CTGCTGCGGCTCTAGAGATG**.

Obie sondy znakowane były barwnikiem fluorescencyjnym Cy5 (cyjanina5; fluorescencja czerwona – wzbudzenie/emisja ~650/670 nm).

Jajniki *M. meridionale* utrwalano w 4% formaldehydzie, zatapiano w parafinie i krojono na skrawki półcienkie (3–5 µm) zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale *Barwienia immunohistochemiczne*. Po odparafinowaniu, skrawki inkubowano przez noc w temperaturze pokojowej w buforze do hybrydyzacji (1M Tris-HCl (pH 8.0) – 1 ml; 5M NaCl – 9 ml; 20% SDS – 20 µl; 30% formamid – 15 ml; H₂O – 15 ml) zawierającym specyficzne sondy w stężeniu końcowym 100 nM. Następnego dnia szkiełka przepłukiwano trzykrotnie w PBS, suszono, zamykano w medium z DAPI (ProLong Gold antifade reagent with DAPI), obrazowano w mikroskopie konfokalnym Zeiss LSM 900 i analizowano w programie ZEN 2.3 (blue edition).

II.2.7. Analizy aktywności mitochondrialnej

Do zbadania aktywności mitochondriów w oocytach *M. meridionale* wykorzystano MitoTracker Deep Red FM (Invitrogen, M22426). Jest to barwnik o czerwonej fluorescencji (absorbpcja/emisja ~644/665 nm) wykorzystywany do znakowania mitochondriów w żywych komórkach, który nie jest wypłukiwany z komórek podczas utrwalania czy permeabilizacji detergentami. MitoTracker Deep Red jest barwnikiem zależnym od potencjału mitochondrialnego i wykorzystany jest jako jego wskaźnik [m.in. ZHOU I WSP. 2011; GREENE I WSP. 2012; XIAO I WSP. 2016].

Roztwór wyjściowy (*stock solution*) przygotowano rozpuszczając 50 µg MitoTracker'a w 50 ml dimetylosulfotlenku (DMSO). Aby uzyskać roztwór roboczy (*working solution*) roztwór wyjściowy rozcieńczono w stosunku 1:200 w medium Grace'a. Jajniki inkubowano w roztworze roboczym MitoTrack'a przez 30 min w 37°C w ciemności. Po inkubacji jajniki dwukrotnie przepłukiwano, utrwalano w 4% formaldehydzie (60 min, temperatura pokojowa), zatapiano w parafinie i krojono na skrawki o grubości 3-5 µm zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale *Barwienia immunohistochemiczne*. Po odparafinowaniu i nawodnieniu preparaty zamykano w medium zawierającym DAPI (ProLong Gold antifade reagent with DAPI) i obrazowano w mikroskopie konfokalnym Zeiss LSM 900. Przy pomocy programu

ImageJ obliczano skorygowaną fluorescencję całkowitą (CTCF) mitochondriów zgrupowanych w sieci mitochondrialne oraz mitochondriów poza siecią.

II.2.8. Inkubacja z 2,5-bromo-2'deoksyurydyną

Aby sprawdzić, czy w oocytach owadów zachodzi synteza mtDNA i podziały mitochondriów jajniki *M. meridionale* inkubowano w obecności analogu tymidyny, 2,5-bromo-2'deoksyurydyny (BrdU; Sigma-Aldrich, B5002). Roztwór roboczy BrdU otrzymano poprzez rozcieńczenie roztworu wyjściowego (25 mg/ml) w medium Grace'a w stosunku 1:2. Gonady inkubowano w naczynkach szklanych przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Po inkubacji jajniki utrwalano w roztworze 4% formaldehydu w buforze fosforanowym (60 min, temperatura pokojowa), zatapiano w parafinie i krojono na skrawki o grubości 3-5 μm . Po odparafinowaniu, nawodnieniu i zablokowaniu miejsc niespecyficznego wiązania przeciwciał w buforze kazeinowym (patrz podrozdział *Barwienia immunohistochemiczne*), skrawki inkubowano przez noc w 4°C z mysim przeciwciałem anti-BrdU sprzężonym z izotiocyanianem fluoresceiny (FITC). Po wypłukaniu przeciwciał, które nie uległy związaniu z BrdU, preparaty zamykano w medium z DAPI (ProLong Gold antifade reagent with DAPI), obrazowano w mikroskopie konfokalnym Zeiss LSM 900 i analizowano w programie ZEN 2.3 (blue edition).

II.2.9. Ekstrakcja cytoszkieletu

Aby zbadać udział cytoszkieletu w tworzeniu ciała Balbianiego, jajniki *M. meridionale* poddano ekstrakcji z zastosowaniem niejonowego surfaktantu Tritonu X-100 (Sigma-Aldrich). Ekstrakcję przeprowadzano zgodnie z metodą opisaną przez BILINSKI I WSP. [1995] oraz BILINSKI I JAGLARZ [1999]. Bezpośrednio po wypreparowaniu jajniki inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej w roztworze 1% Tritonu X-100 w zmodyfikowanym buforze Hanksa (skład buforu do ekstrakcji przedstawiono w Tabeli 3). Po ekstrakcji tkanki utrwalano w mieszaninie 2% formaldehydu i 2,5% glutaraldehydu, płukano w buforze fosforanowym z sacharozą i ponownie utrwalano w mieszaninie 1% czterotlenku osmu i 0,8% żelazocyjanku

potasu w buforze fosforanowym (60 min, 4°C). Po odwodnieniu tkanki zatapiano w żywicy epoksydowej i krojono na skrawki półcienkie, jak opisano w podrozdziale *Mikroskopia świetlna i transmisyjna mikroskopia elektronowa*. Skrawki półcienkie jajników po ekstrakcji barwiono błękitem metylenowym i obrazowano w mikroskopie świetlnym Leica DMR.

II.2.10. Inkubacja z kolchicyną i cytochalazyną

W celu określenia roli cytoszkieletu w powstawaniu ciała Balbianiego oraz podziałach jego mitochondriów, jajniki *M. meridionale* inkubowano przez 24 godziny w obecności dwóch alkaloidów: (1) kolchicyny (Sigma-Aldrich, C9754), która wiąże wolną tubulinę doprowadzając do rozpadu mikrotubul lub (2) cytochalazyny B (Sigma-Aldrich, C2743), która hamuje polimeryzację aktyny wiążąc się z jej końcami (+). Roztwór roboczy kolchicyny otrzymano poprzez rozcieńczenie roztworu wyjściowego (10 mg/ml) w medium Grace'a w stosunku 1:20. Analogicznie, otrzymany od producenta roztwór wyjściowy cytochalazyny B rozcieńczono w medium Grace'a w stosunku 1:500. Część gonad traktowanych kolchicyną inkubowano dodatkowo z 1,6-hexanediolem (10 min, temperatura pokojowa). Po inkubacji gonady utrwalano w roztworze 2% formaldehydu i 2,5% glutaraldehydu lub 4% formaldehydu i zatapiano odpowiednio w żywicy epoksydowej lub parafinie. Skrawki (parafinowe, półcienkie oraz ultracienkie) przygotowywano do obrazowania w mikroskopie świetlnym i/lub elektronowym według procedur opisanych w poprzednich podrozdziałach.

II.2.11. Analizy ilościowe

Na podstawie obrazów z TEM oszacowano średnią liczbę mitochondriów znajdujących się w bezpośrednim sąsiedztwie materiału nuage, w tym liczbę mitochondriów o charakterystycznej (nietypowej) morfologii (wydłużonych, rozgałęzionych lub przewężonych). Dla każdego gatunku do analiz wykorzystano 5 obrazów powstałych po połączeniu w programie Image Composite Editor kilku (2-4) mniejszych mikrofotografii.

Obliczano odchylenie standardowe (SD) i błąd standardowy średniej (SEM). Analizę statystyczną przeprowadzono wykorzystując oprogramowanie Statistica 13 (StatSoft Inc). Założenia analizy weryfikowano wykonując test Shapiro-Wilka (rozkład normalny zmiennych) oraz test Levene'a (jednorodność wariancji w badanych próbach). Porównań pomiędzy grupami niezależnymi dokonano przy pomocy nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa. Zmienne uznawano za istotne statystycznie, jeżeli wartość $P < 0,05$.

W przypadku analiz aktywności mitochondrialnej rozkład normalny zmiennych weryfikowano testem Shapiro-Wilka, a do oceny istotności statystycznej wykorzystano test U Manna-Whitneya porównania dwóch grup niezależnych. Zmienne uznawano za istotne statystycznie, jeżeli wartość $P < 0,001$.

Rozdział III Wyniki

III.1. Budowa jajnika i owarioli Tettigoniidae

Jajniki badanych gatunków Tettigoniidae są morfologicznie bardzo podobne lub niemalże identyczne. Każdy z nich zbudowany jest z 20-30 synchronicznie rozwijających się owarioli panoistycznych (Ryc. 2). Owariole są stosunkowo długie i ułożone równolegle względem siebie. Cały jajnik otoczony jest wspólną osłoną jajnikową; ponadto każda owariola posiada własną osłonkę owarialną zbudowaną z komórek mięśniowych i tchawek. Owariole Tettigoniidae wykazują budowę typową (szczegóły klasyfikacji i budowy jajników owadów w *Rozdział 1 Wprowadzenie*). Na szczycie owarioli znajduje się filament terminalny, poniżej leży niewielkie germarium oraz silnie wydłużone witelarium (Ryc. 2A). Owariole połączone są z jajowodem bocznym za pośrednictwem dobrze wyodrębnionych i umięśnionych nóżek owarialnych, tzw. pediceli. Przedni odcinek jajowodu bocznego, tzw. kielich jest wyraźnie poszerzony.

Germarium wypełnione jest licznymi komórkami płciowymi (oogoniami) w kolejnych stadiach profazy I podziału mejotycznego. Oogoniom towarzyszą pojedyncze somatyczne (mezodermalne) komórki prefolikularne. Komórki te stopniowo otaczają oocyty przesuujące się w kierunku witelarium.

W witelarium znajduje się 6-8 wzrastających sekwencyjnie pęcherzyków jajnikowych (Ryc. 2B-D). Pęcherzyki te ułożone są w sposób uporządkowany, tj. biegun przedni każdego z nich zwrócony jest w stronę germarium, a biegun tylny w kierunku jajowodu bocznego. Każdy pęcherzyk jajnikowy zbudowany jest z centralnie leżącego oocytu oraz otaczającego go jednowarstwowego nabłonka folikularnego. Nabłonek ten powstaje z komórek prefolikularnych. Tuż pod germarium zlokalizowane są w przybliżeniu kuliste oocyty wczesno-prewitelogeniczne o średnicy około 80 μm i ekscentrycznie ułożonym jądrze oocytu (Ryc. 2B). Wraz z postępem prewitelogenezy, pęcherzyk jajnikowy powiększa się i wydłuża, a jądro oocytu zmienia swoją pozycję w ooplazmie z ekscentrycznej na centralną (Ryc. 2C i D). Najstarsze oocyty, zwane terminalnymi, wypełnione są żółtkiem i otoczone osłonami jajowymi.

III.2. Morfologia ciała Balbianiego wybranych gatunków Tettigoniidae

III.2.1. Budowa ciała Balbianiego

Badania z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej wykazały, że ciało Balbianiego wszystkich badanych gatunków Tettigoniidae zbudowane jest z podobnego „zestawu” organelli, a mianowicie: (1) agregatów ziarnisto-włóknistego, elektronowo gęstego materiału, tzw. materiału nuage, (2) różnokształtnych mitochondriów, (3) niewielkich pęcherzyków i krótkich cysterny siateczki śródplazmatycznej oraz (4) kompleksów Golgiego (Ryc. 3-7).

Różnice w budowie ciała Balbianiego badanych gatunków Tettigoniidae widoczne są głównie w kształcie i rozmieszczeniu agregatów materiału nuage. U *M. meridionale*, *M. brachyptera* oraz *P. griseoptera* agregaty te można bez trudu rozpoznać nawet na skrawkach półcienkich. „Współtworzą” one dobrze widoczny półksiężyc otaczający jeden z biegunów jądra oocytu (pęcherzyka zarodkowego) (*M. meridionale* i *M. brachyptera*; 3A, 4A) lub bardziej nieregularny zespół, przynajmniej częściowo zlokalizowany w wyraźnym zagłębieniu otoczki jądrowej (*P. griseoptera*; 5A). Inny rodzaj rozmieszczenia materiału nuage stwierdzono w oocytach *C. fuscus* oraz *L. albovittata*. U tych gatunków materiał ten formuje pierścień otaczający cały lub prawie cały pęcherzyk zarodkowy (6A i 7A). U żadnego z badanych gatunków nie wykazano korelacji pomiędzy lokalizacją agregatów materiału nuage a którąkolwiek (przednio-tylną lub grzbieto-brzuszną) osią oocytu.

Porównując ultrastrukturę ciała Balbianiego badanych gatunków stwierdzono, że wzajemne relacje pomiędzy budującymi go elementami nie są identyczne (porównaj Ryc. 3C, 4B, 5E, 6C i 7C), ale w każdym przypadku zaobserwowano bliski kontakt mitochondriów i materiału nuage (Ryc. 3B, 4B i C, 5B i C, 6B, 7B i C). W oocytach *M. meridionale*, *P. griseoptera* i *C. fuscus* mitochondria przylegają do powierzchni materiału nuage (Ryc. 3B, 5B i C, 6B), podczas gdy u *M. brachyptera* i *L. albovittata* mitochondria skupiają się wokół centralnie zlokalizowanych agregatów nuage (Ryc. 4C i 7B). Dokładna analiza mikrofotografii wykazała, że mitochondria pozostające w bezpośrednim kontakcie z nuage lub znajdujące się w jego pobliżu są często silnie wydłużone, rozgałęzione lub tworzą charakterystyczne pary (Ryc. 8).

Należy w tym miejscu zaznaczyć, że kolejne analizy, a zwłaszcza rekonstrukcje trójwymiarowej architektury młodych oocytów prewitelogenicznych pokazały,

iż w rzeczywistości ciało Balbianiego Tettigoniidae obejmuje prawie całą ooplazmę (por. rozdział III.3. *Morfogeneza ciała Balbianiego Meconema meridionale*).

Pod koniec prewitelogenezy ciało Balbianiego Tettigoniidae ulega stopniowej dezintegracji, a jego elementy rozpraszają się w ooplazmie, finalnie (w czasie witelogenezy) lokując się pomiędzy powstającymi materiałami zapasowymi (kulami żółtka i kroplami tłuszczu).

U wszystkich badanych gatunków Tettigoniidae, w karioplazmie, w pobliżu osłonki jądrowej występują akumulacje licznych, w przybliżeniu kulistych, elektronowo gęstych granul (ziaren) (Ryc. 3C, 4B, 5D i E, 6C i 7C). Pomiary wykazały, że średnia wielkość tych granul mieści się w przedziale od ~45 nm u *M. meridionale*, *P. griseoptera* i *M. brachyptera* do niespełna 91 nm u *L. albovittata* (szczegółowe pomiary przedstawiono w Tabeli 4 oraz na Ryc. 5D). Akumulacje opisanych granul występują zawsze przy tym fragmencie osłonki jądrowej w pobliżu, którego (od strony ooplazmy) występują cytoplazmatyczne agregaty materiału nuage.

Tabela 4. Średnica [nm] elektronowo gęstych granul (ziaren) zlokalizowanych w karioplazmie badanych gatunków Tettigoniidae.

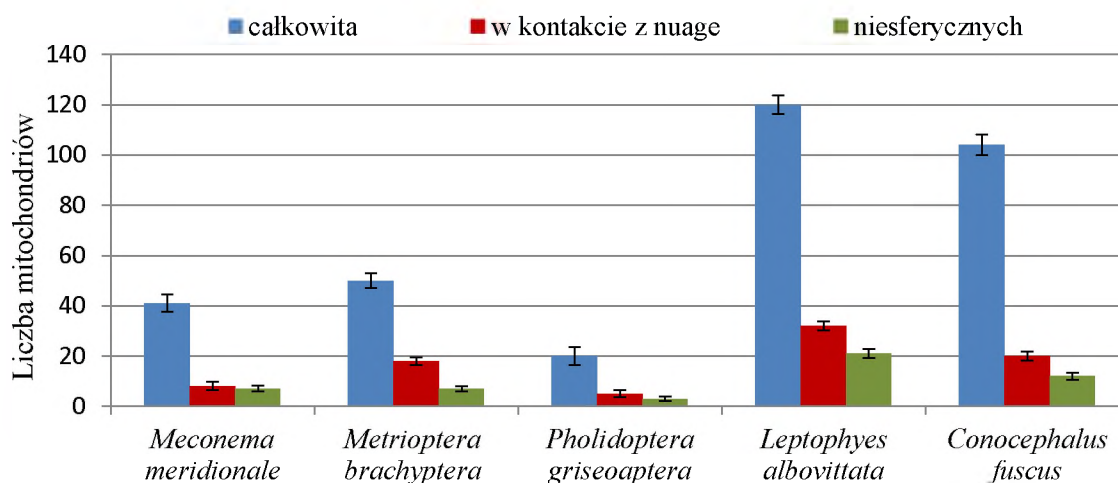
Gatunek	<i>M. meridionale</i>	<i>P. griseoptera</i>	<i>C. fuscus</i>	<i>L. albovittata</i>	<i>M. brachyptera</i>
Średnica [nm]	54,50	47,80	58,64	100,21	38,30
	41,99	38,11	48,71	93,70	44,02
	30,90	47,27	59,47	91,26	53,97
	52,13	40,18	47,99	77,33	42,59
	37,92	52,48	41,19	103,76	44,89
	37,92	52,85	44,32	82,97	50,61
	56,87	40,18	50,90	86,69	39,22
Średnia ± SD [nm]	44,60 ± 9,18	45,55 ± 5,64	50,17 ± 6,33	90,84 ± 8,66	44,80 ± 5,30

III.2.2. Mitochondria ciała Balbianiego Tettigoniidae – pomiary ilościowe na podstawie kryteriów morfologicznych

Dokładna analiza mikrofotografii wykazała, że u wszystkich przebadanych gatunków Tettigoniidae mitochondria występujące w bezpośrednim kontakcie lub bliskim sąsiedztwie materiału nuage są często wydłużone, przewężone, rozgałęzione lub łączą się tworząc charakterystyczne pary (Ryc. 8). W Tabeli 5 oraz na Wykresie 1 i 2 przedstawiono podstawowe parametry ilościowe: średnią liczbę wszystkich mitochondriów sąsiadujących z nuage, a w tym średnią liczbę i udział procentowy mitochondriów pozostających w bezpośrednim kontakcie z nuage (przylegających do powierzchni nuage lub otaczających jego agregaty) oraz mitochondriów o kształtach nietypowych (np. wydłużonych, przewężonych, rozgałęzionych). Liczbę mitochondriów oszacowano analizując „wieloelementowe mikrofotografie” dużych powierzchni skrawków ultracienkich uzyskane poprzez scalenie 2 – 4 standardowych mikrofotografii z TEM (patrz *Analizy ilościowe* w rozdziale II *Materiały i metody*). Chociaż średnia liczba mitochondriów nietypowych (niesferycznych) waha się w dość szerokim zakresie (od 3 u *P. griseoptera* do 21 u *L. albovittata*; Tabela 5 i Wykres 1), to ich udział procentowy w ogólnej liczbie mitochondriów sąsiadujących z materiałem nuage jest podobny (od 11,5% u *C. fuscus* do 17,5% u *L. albovittata*; Tabela 5 i Wykres 2). Większe różnice zaobserwowano analizując liczbę mitochondriów pozostających w bezpośrednim kontakcie z materiałem nuage. Średnia liczba takich mitochondriów mieściła się w przedziale od 5 u *P. griseoptera* do 32 u *L. albovittata*, a udział procentowy mitochondriów pozostających w bezpośrednim kontakcie w puli wszystkich mitochondriów sąsiadujących z materiałem nuage wynosił od 19,2% u *C. fuscus* do 36% u *M. brachyptera*. Analizy wykazały jednak, iż zaobserwowane różnice nie są istotne statystycznie ($P = 0,61$ dla mitochondriów w kontakcie z materiałem nuage i $P = 0,37$ dla mitochondriów o zmodyfikowanej morfologii/niesferycznych).

Tabela 5. Mitochondria w sąsiedztwie nuage – wyniki analiz ilościowych. Liczba mitochondriów występujących w sąsiedztwie materiału nuage, w tym odsetek organelli pozostających w bezpośrednim kontakcie z nuage oraz odsetek mitochondriów o kształtach nietypowych.

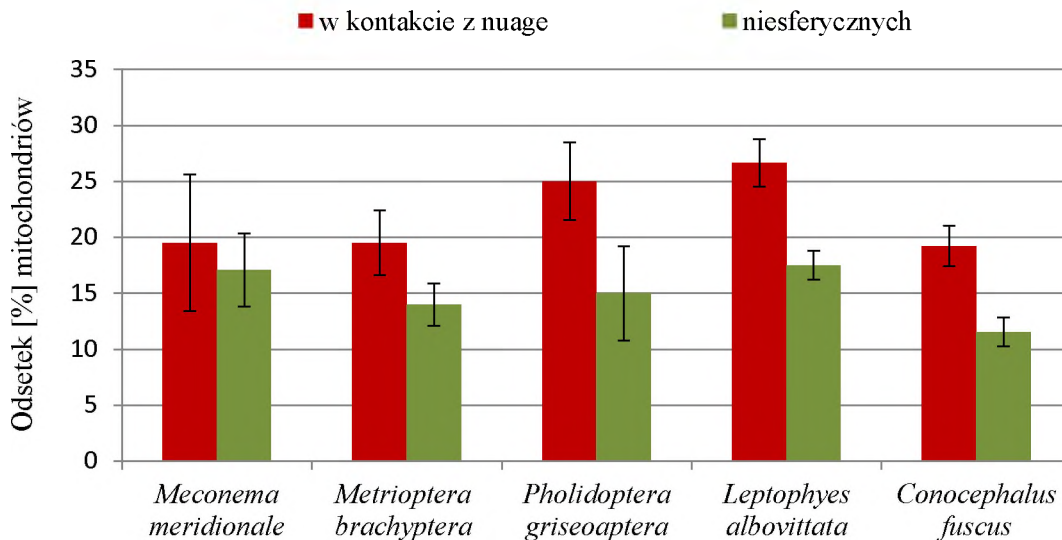
	Ogólna liczba mitochondriów w pobliżu nuage	Mitochondria w bezpośrednim kontakcie z nuage		Mitochondria niesferyczne	
		Średnia liczba	[%]	Średnia liczba	[%]
<i>M. meridionale</i>	41	8	19,5	7	17,1
<i>M. brachyptera</i>	50	18	36,0	7	14,0
<i>P. griseoptera</i>	20	5	25,0	3	15,0
<i>L. albovittata</i>	120	32	26,7	21	17,5
<i>C. fuscus</i>	104	20	19,2	12	11,5



Wykres 1. Liczba mitochondriów w sąsiedztwie nuage.

Ogólna liczba mitochondriów leżących w sąsiedztwie materiału nuage (słupki niebieskie), liczba mitochondriów pozostających w bezpośrednim kontakcie z nuage (słupki czerwone) oraz liczba mitochondriów niesferycznych (słupki zielone).

Wartości średnie \pm SEM.



Wykres 2. Mitochondriów w sąsiedztwie nuage – dane procentowe.

Odsetek mitochondriów pozostających w bezpośrednim kontakcie z materiałem nuage (słupki czerwone) i mitochondriów o kształtach nietypowych (słupki zielone) wśród wszystkich mitochondriów sąsiadujących z nuage. Wartości średnie \pm SEM.

Brak istotności statystycznej różnic pomiędzy gatunkami ($P > 0,05$).

III.3. Morfogenezę ciała Balbianiego *Meconema meridionale*

Szczegółowe badania morfologiczne ciała Balbianiego w oocytach *M. meridionale* wykazały, że powstaje ono stosunkowo wcześnie, bo już w profazie I podziału mejotycznego w tzw. stadium bukietowym. Oocyty te zlokalizowane są w bazalnej części germarium. W tej fazie oogenezy, ciało Balbianiego ma formę luźnego kompleksu organelli, utworzonego przez różnokształtne, często rozgałęzione mitochondria, agregaty materiału nuage, cysterny siateczki śródplazmatycznej i duże kompleksy Golgiego (Ryc. 9). Analiza trójwymiarowej organizacji ooplazmy i karioplazmy na poziomie TEM wykazała, że ciało Balbianiego *M. meridionale* powstaje zawsze w bezpośrednim sąsiedztwie tego fragmentu otoczki jądrowej, do którego (od strony karioplazmy) przytwierdzone są telomery chromosomów bukietowych (Ryc. 10). Trójwymiarowa rekonstrukcja pokazała również,

że mitochondria ciała Balbianiego oocytów w stadium bukietowym łączą się ze sobą tworząc nieregularną i dość luźną sieć (Ryc. 10).

Jak już wcześniej wspomniano, w czasie wczesnej prewitelogenezy analizowanych gatunków Tettigoniidae sieć mitochondrialna ciała Balbianiego „rozrasta się” i wypełnia niemal całą ooplazmę. Taki sam proces zaobserwowano w oocytach *M. meridionale*. Jest to szczególnie dobrze widoczne na komputerowych rekonstrukcjach organizacji oocytów prewitelogenicznych na poziomie mikroskopu świetlnego (Ryc. 11). W tym stadium, w porównaniu do oocytów mejotycznych, ciało Balbianiego ma znacznie bardziej złożoną strukturę i składa się z dużej liczby polimorficznych mitochondriów, zlokalizowanych tuż przy otoczce jądrowej (często w jej płytkim zagłębieniu) agregatów materiału nuage, pęcherzyków i krótkich cystern siateczki śródplazmatycznej, kompleksów Golgiego oraz struktur lizosomopodobnych (Ryc. 11 i 12). W nukleoplazmie oocytów *M. meridionale*, podobnie jak u pozostałych badanych Tettigoniidae, występują liczne, w przybliżeniu kuliste granule (ziarna) o średnicy około 45 nm (Ryc. 12). Ziarna te zawsze pozostają w kontakcie z tym fragmentem osłonki jądrowej, do którego (po stronie cytoplazmatycznej) przylegają agregaty materiału nuage i nie występują w pozostałych obszarach nukleoplazmy.

Analizy mikrofotografii oraz rekonstrukcje komputerowe na poziomie TEM ujawniły, iż mitochondria zlokalizowane w sąsiedztwie materiału nuage często mają bezpośredni kontakt z mniejszymi lub większymi agregatami tego materiału (Ryc. 13).

Tak rozbudowane ciało Balbianiego okalają dwie cienkie warstwy ooplazmy: okołojądrowa i obwodowa (Ryc. 12 i 14). Warstwa okołojądrowa, poza materiałem nuage, zawiera również krótkie profile siateczki śródplazmatycznej oraz izolowane mitochondria fasolowatego kształtu (Ryc. 12 i 14A). Z kolei warstwa obwodowa pozbawiona jest mitochondriów i zawiera głównie wolne rybosomy oraz wydłużone cysterny siateczki śródplazmatycznej (Ryc. 14B).

Rekonstrukcje trójwymiarowe na poziomie TEM potwierdziły, że podobnie jak w oocytach mejotycznych, również w oocytach wczesno-prewitelogenicznych mitochondria ciała Balbianiego łączą się tworząc skomplikowaną sieć (Ryc. 15). Co więcej, mitochondria oddalone od jądra oocytu, a co za tym idzie nie mające bezpośredniego kontaktu z materiałem nuage, często sąsiadują z organellami lizosomopodobnymi.

W późno-prewitelogenicznych oocytach sieć mitochondrialna rozpada się na mniejsze izolowane fragmenty (mikrosieci) (Ryc. 16). Ponadto, od sieci i/lub

mikrosieci mitochondrialnych oddzielają się pojedyncze jednostki mitochondrialne, które pozostają w ooplazmie w postaci indywidualnych organelli. W efekcie opisanych procesów, w czasie tworzenia pierwszych materiałów zapasowych (w początkowej fazie witelogenezy) ooplazma jest względnie równomiernie wypełniona pojedynczymi mitochondriami fasolowatego kształtu, zlokalizowanymi pomiędzy powstającymi kulami żółtka i kroplami tłuszczu. Równocześnie z fragmentacją sieci mitochondrialnej ciała Balbianiego, agregaty materiału nuage stopniowo rozpraszają się pokrywając coraz to większą powierzchnię jądra oocytu (Ryc. 17).

III.4. Aktywność mitochondriów w oocytach *Meconema meridionale*

Aktywność mitochondriów analizowano stosując MitoTracker Deep Red. Test ten ujawnił, iż w oocytach średnio- i późno-prewitelogenicznych aktywność (potencjał błonowy) mitochondriów współtworzących sieci/mikrosieci mitochondrialne jest wyraźnie wyższa od aktywności mitochondriów pojedynczych (odseparowanych od sieci) (Ryc. 16A i B). Z kolei w oocytach wczesno-witelogenicznych mitochondria wykazują porównywalną aktywność. W oocytach tych nie zaobserwowano grup mitochondriów (mikrosieci), które wykazywałyby wyższy potencjał błonowy (aktywności) w porównaniu do mitochondriów je otaczających (Ryc. 16C).

III.5. Udział białek nieuporządkowanych w formowaniu ciała Balbianiego *Meconema meridionale*

Według współczesnych poglądów, jednym z czynników inicjujących morfogenezę ciała Balbianiego gatunków modelowych, *Xenopus laevis* i *Danio rerio*, jest samoagregacja białek inherentnie nieuporządkowanych [BOKE I WSP. 2016]. Aby sprawdzić, czy podobny mechanizm odpowiada za tworzenia ciała Balbianiego w komórkach rozrodczych *M. meridionale*, wykonano test PROTEOSTAT stosowany do wykrywania agregatów takich białek. Zaobserwowano, że w zlokalizowanych tuż pod germarium oocytach wczesno-prewitelogenicznych cytoplazma w bezpośrednim sąsiedztwie jądra, a więc w miejscu powstawania wczesnego ciała Balbianiego, wykazuje wyraźnie intensywniejszą fluorescencję (Ryc. 18A). Wynik ten wskazuje, że w okołojądrowej ooplazmie oocytów wczesno-prewitelogenicznych dochodzi do

agregacji białek inherentnie nieuporządkowanych. W oocytach średnio-prewitelogenicznych obszar PROTEOSTAT-pozytywnej ooplazmy jest znacznie większy i nie ogranicza się tylko do warstwy okołojądrowej (Ryc. 18B). Analiza mikrofotografii na dużych powiększeniach wykazała, że PROTEOSTAT-pozytywne obszary ooplazmy zawierają liczne mitochondria (Ryc. 18C1-C3).

W kontekście powyższych wyników przeprowadzono inkubację jajników *M. meridionale* w medium Grace'a z dodatkiem 1,6-hexanodiolu. Związek ten jest obecnie stosowany do rozpraszania kondensatów biomolekularnych, powstających poprzez agregację białek inherentnie nieuporządkowanych [KROSCHWALD I WSP. 2017]. Eksperyment ten wykazał, że krótka inkubacja oocytów prewitelogenicznych z hexanediolem doprowadza do relokalizacji składników ciała Balbianiego, które (w porównaniu do oocytów kontrolnych) rozpraszają się w ooplazmie bardziej równomiernie. Ponadto, po inkubacji z hexanediolem zaobserwowano redukcję gęstości materiału nuage (porównaj Ryc. 12 i 21D i E) oraz fragmentację agregatów tego materiału na mniejsze w przybliżeniu sferyczne ziarna o średnicy niespełna 90 nm (Ryc. 21D i E). Dla porównania w prewitelogenicznych oocytach kontrolnych średnica najmniejszych agregatów materiału nuage to ~102 nm, a największych nawet około 336 nm.

III.6. Rola mikrotubul w morfogenezie ciała Balbianiego *Meconema meridionale*

W kolejnym etapie badań podjęto próbę wyjaśnienia roli mikrotubul w powstawaniu i morfogenezie ciała Balbianiego *M. meridionale*. Przy pomocy testów immunohistochemicznych, z użyciem przeciwciała skierowanego przeciwko α -tubulinie wykazano, że zarówno rozmieszczenie, jak i liczba mikrotubul podlegają istotnym przemianom w kolejnych fazach oogenezy (Ryc. 19). Początkowo, tj. w oocytach mejotycznych i wczesno-prewitelogenicznych mikrotubule są nieliczne i rozmieszczone mniej więcej równomiernie w całej ooplazmie (Ryc. 19A). Tylko sporadycznie, w oocytach wczesno-prewitelogenicznych, obserwowano zagęszczenie mikrotubul w ooplazmie okołojądrowej (Ryc. 19B). W oocytach średnio- i późno-prewitelogenicznych mikrotubul jest znacznie więcej. Tworzą one doskonale widoczny pierścień (sferę, kosz) wokół jądra oocytu (Ryc. 19C). Niektóre z mikrotubul

pierścienia wnikają do ooplazmy obwodowej. Te ostatnie mikrotubule przebiegają plus/minus promieniście w stosunku do jądra oocytu zmierzając głównie w kierunku obu biegunów oocytu (Ryc. 19C i D).

Wizualizacja (uwidocznienie) elementów cytoszkieletu oocytów *M. meridionale* przy pomocy anionowego środka powierzchniowo czynnego (Triton X-100) potwierdziła opisany na podstawie analiz immunohistochemicznych wzór rozmieszczenia mikrotubul w oocytach badanego gatunku (Ryc. 20A).

Wyniki testu immunohistochemicznego z użyciem przeciwciała anty-PolyG wskazują, że w oocytach *M. meridionale* poliglutamylacji podlegają głównie mikrotubule cytoplazmy okołojądrowej, tworzące wokół pęcherzyka zarodkowego charakterystyczny pierścień (kosz) (Ryc. 20B).

Następnie przeprowadzono inkubację oocytów *M. meridionale* w medium Grace'a z dodatkiem kolchicyny. Testy immunohistochemiczne potwierdziły, że 24 godzinna ekspozycja na kolchicynę prowadzi do całkowitego rozpadu mikrotubul w badanych oocytach. W oocytach traktowanych kolchicyną zaobserwowano jedynie nieco intensywniejszą fluorescencję wokół jądra oocytu – w rejonie, w którym w oocytach kontrolnych zlokalizowany jest pierścień (kosz) mikrotubularny (Ryc. 20C).

Analiza ultrastrukturalna (TEM) wykazała, że opisane powyżej eksperymentalne zniszczenie cytoszkieletu mikrotubularnego prowadzi do zaburzenia lokalizacji agregatów materiału nuage. W oocytach poddanych działaniu kolchicyny agregaty te tracą kontakt z otoczką jądrową i oddalają się od pęcherzyka zarodkowego (Ryc. 21A-C). Podwójna (sekwencyjna) inkubacja jajników *M. meridionale*, kolejno z kolchicyną i następnie z 1,6-hexanediolem (por. rozdział III.5.) spowodowała jeszcze lepiej widoczne zmiany w strukturze ciała Balbianiego (Ryc. 21D i E). Warto zauważyć, że w oocytach poddanych podwójnej inkubacji dochodzi do całkowitego zaniku okołojądrowej (pozbawionej mitochondriów) warstwy ooplazmy (por. rozdział III.3.). W rezultacie, mitochondria ciała Balbianiego lokalizują się w bezpośrednim sąsiedztwie otoczki jądrowej (por. Ryc. 14A i 21D i E).

III.7. Replikacja mtDNA i wzrost liczby mitochondriów w czasie oogenezy *Meconema meridionale*

Przeprowadzone badania ultrastrukturalne wskazują, że w czasie oogenezy *M. meridionale* liczba mitochondriów w rosnących prewitelogenicznych oocytach znacząco wzrasta. Na uzyskanych mikrofotografiach częste były mitochondria o nietypowych kształtach, np. mitochondria o kształcie hantli lub klepsydr (Ryc. 22), rozwidlone i tworzące pary. Takie obrazy reprezentują najprawdopodobniej mitochondria „uchwycone” w kolejnych etapach przewężania i podziału.

W tym kontekście, wypreparowane jajniki *M. meridionale* inkubowan były z analogiem tymidyny (2,5-bromo-2’deoksyurydyną, BrdU). Eksperyment ten wykazał, że w czasie prewitelogenezy BrdU jest intensywnie wbudowywana do mtDNA (Ryc. 23). Taki wynik dowodzi, że w oocytach prewitelogenicznych zachodzi replikacja mtDNA. Zaobserwowane „rozrastanie się” sieci mitochondrialnej ciała Balbianiego w oocytach prewitelogenicznych *M. meridionale* jest więc najprawdopodobniej rezultatem szybko powiększającej się liczby mitochondriów (jednostek mitochondrialnych). Warto też podkreślić, że w obrębie ooplazmy BrdU pozytywne punkty rozmieszczone były zawsze równomiernie. Taki wynik sugeruje, że w rozwijających się oocytach *M. meridionale* nie występuje żaden specyficzny rejon, w którym synteza mtDNA (a w konsekwencji namnażanie się mitochondriów) zachodziłaby intensywniej.

III.8. Rola białka Drp1 w podziałach mitochondriów ciała Balbianiego *Meconema meridionale*

Warunkiem podziału mitochondrium jest rekrutacja do zewnętrznej błony mitochondrialnej białka Drp1 i jego oligomeryzacja [SMIRNOVA I WSP. 2001]. Z tego powodu wykonano testy immunofluorescencyjne z zastosowaniem przeciwciał anti-Drp1. Uzyskane wyniki wskazują, że lokalizacja białka Drp1 zmienia się w kolejnych fazach oogenezy (Ryc. 24). Dyfuzyjne zabarwienie ooplazmy oocytów mejotycznych i wczesno-prewitelogenicznych sugeruje, że w tych stadiach monomery białka Drp1 pozostają głównie w cytozolu (Ryc. 24A). Z kolei w średnio- i późno-prewitelogenicznych oocytach zaobserwowano liczne wyraźnie zdefiniowane punkty

(„foci”) Drp1 pozytywne (Ryc. 24B). Punkty te są równomiernie rozmieszczone, nawet w największych oocytach prewitelogenicznych. Szczegółowa analiza mikrofotografii na dużych powiększeniach wykazała, że te liczne Drp1 pozytywne punkty („foci”) występują w sąsiedztwie punktów DAPI pozytywnych (Ryc. 25), co sugeruje, że odpowiadają one oligomerom białka Drp1 zakotwiczonym w błonach dzielących się mitochondriów.

W kolejnych fazach oogenezy, liczba punktów Drp1 pozytywnych (tj. liczba cząsteczek białka Drp1) w ooplazmie znacząco rośnie. W tym kontekście, przeprowadzono analizę rozmieszczenia mRNA kodującego białko Drp1 (Drp1 mRNA). Wykazano, że rozmieszczenie tego typu mRNA wyraźnie zmienia się wraz z przebiegiem oogenezy (Ryc. 26 i 27). Początkowo, w znajdujących się tuż pod germarium oocytach wczesno-prewitelogenicznych cząsteczki Drp1 mRNA lokalizują się głównie w pobliżu pęcherzyka zarodkowego (Ryc. 26A i B). W kolejnych fazach prewitelogenezy, cząsteczki te rozmieszczone są w ooplazmie prawie równomiernie (Ryc. 27A). Trzeba podkreślić, że w tych stadiach, cytoplazmatyczne (przyjądrowe) agregaty materiału nuage nie zawierają zwiększonej liczby cząsteczek Drp1 mRNA (w porównaniu z innymi rejonami ooplazmy). W analizowanych oocytach, poza cząsteczkami rozmieszczonymi w ooplazmie, Drp1 mRNA występuje również w nukleoplazmie – w akumulacjach gęstych elektronowo ziaren (granul) w pobliżu osłonki jądrowej (Ryc. 27A).

Ciekawych wyników dostarczyła analiza rozmieszczenia Drp1 mRNA w oocytach traktowanych kolchicyną. Testy te wykonano w celu sprawdzenia czy mikrotubule uczestniczą w transporcie i/lub lokalizacji tego typu mRNA. Eksperymentalne zniszczenie mikrotubul nie spowodowało zmian w lokalizacji Drp1 mRNA w oocytach wczesno-prewitelogenicznych (Ryc. 26C). Wyraźne zmiany w rozmieszczeniu analizowanego mRNA zaobserwowano natomiast w oocytach średnio- i późno-prewitelogenicznych. W tych stadiach, dezintegracja cytoszkieletu mikrotubularnego prowadzi do zgromadzenia dużej liczby cząsteczek Drp1 mRNA na jednym z biegunów pęcherzyka zarodkowego, najprawdopodobniej w rejonie, w którym występują agregaty materiału nuage (Ryc. 27B).

III.9. Znaczenie mikrofilamentów w podziale mitochondriów ciała

Balbianiego *Meconema meridionale*

Obecnie wiadomo, że w podziale mitochondriów poza dynaminami (m.in. białkiem Drp1) oraz siateczką śródplazmatyczną uczestniczą również filamenty aktywne [KLEELE I WSP. 2021]. Aby odpowiedzieć na pytanie czy mikrofilamenty biorą również udział w podziałach mitochondriów ciała Balbianiego Tettigoniidae, jajniki *M. meridionale* inkubowano w medium Grace'a z dodatkiem cytochalazyny B. Eksperyment ten ujawnił, że w oocytach, w których zahamowano polimeryzację aktywny mitochondria ciała Balbianiego są z reguły silnie wydłużone, tworzą nieregularne skupiska i są nietypowo przewężone (Ryc. 28). Szczegółowa analiza ilościowa wykazała, że przewężenia w mitochondriach oocytów prewitelogenicznych traktowanych cytochalazyną B są wyraźnie dłuższe od przewężeń obserwowanych w materiale kontrolnym (por. Ryc. 22 i 28). Średnia długość przewężeń analizowanych mitochondriów to 181 nm w oocytach kontrolnych i 621 nm w oocytach eksperymentalnych (przykładowe pomiary w Tabeli 6).

Tabela 6. Długość przewężeń dzielących się mitochondriów ciała Balbianiego *Meconema meridionale*. Oocyty prewitelogeniczne kontrolne i inkubowane z cytochalazyną B (24 godziny, temperatura pokojowa).

	Oocyty kontrolne	Oocyty inkubowane z cytochalazyną B
Długość przewężenia [nm]	259,85	367,49
	216,20	274,55
	255,22	753,60
	101,04	652,02
	127,21	843,19
	196,86	911,33
	168,52	728,89
	115,54	295,38
	186,97	636,27
	182,86	752,22
Średnia długość [nm]	181,03	621,49

III.10. Mitofagia a ciało Balbianiego *Meconema meridionale*

Analizy mikrofotografii TEM oraz rekonstrukcji trójwymiarowych wykazały, że w oocytach prewitelogenicznych *M. meridionale* w pobliżu / na obrzeżach sieci mitochondrialnej ciała Balbianiego często występują organelle związane z procesem autofagii – autofagosomy i lizosomy (Ryc. 15 i 29). Co więcej, część mitochondriów w sąsiedztwie, których występują struktury autofagiczne wykazuje ślady degeneracji i/lub zmienioną morfologię (przykładowo nieprawidłowości grzebieni mitochondrialnych) (Ryc. 29A). Sporadycznie zdeformowane mitochondria znajdowano wewnątrz sferycznych struktur błoniastych (Ryc. 29). Zaobserwowano również, iż część mitochondriów występuje w bezpośrednim kontakcie z wydłużonymi, często łukowato wygiętymi cysternami siateczki śródplazmatycznej (Ryc. 30).

W związku z powyższymi obserwacjami, wykonano testy immunofluorescencyjne stosując przeciwciała anty-ATG5 i anty-LC3. Analizy te pozwoliły stwierdzić, że białko ATG5 zlokalizowane jest w częściowo otwartych lub zamkniętych „profilach”, otaczających centralnie położone DAPI pozytywne punkty („foci”), tj. mitochondria (Ryc. 31). Lokalizacja drugiego badanego białka, tj. LC3 zależy od stadium oogenezy. W oocytach prewitelogenicznych białko to lokalizuje się w niewielkich sferycznych (ziarnistych) strukturach rozmieszczonych równomiernie w ooplazmie (Ryc. 32A). W oocytach wczesno-witelogenicznych obecność białka LC3 stwierdzono w komórkach somatycznych nabłonka folikularnego; w tym stadium w cytoplazmie oocytu LC3 pozytywne struktury nie występują (Ryc. 32B).

Rozdział IV Dyskusja

Znakomita większość współczesnej wiedzy z zakresu biologii komórki i biologii rozwoju została zgromadzona dzięki badaniom kilku organizmów modelowych, takich jak nicień, *Caenorhabditis elegans*, muszka owocowa, *Drosophila melanogaster*, danio pręgowany, *Danio rerio*, żaba szponiasta, *Xenopus laevis* oraz mysz. Z drugiej strony wiadomo, że nie na wszystkie pojawiające się pytania można odpowiedzieć, analizując wyłącznie takie gatunki [BOLKER 2012]. W wielu przypadkach pokazano, że porównanie morfologii czy ultrastruktury gatunków spokrewnionych, tj. należących do tej samej linii ewolucyjnej, oraz ich stadiów rozwojowych może dostarczyć istotnych informacji oraz ujawnić ewolucyjne aspekty badanych procesów.

Morfologia ciała Balbianiego

Dane literaturowe wskazują, że ciało Balbianiego owadów to zazwyczaj stosunkowo niewielkie i morfologicznie proste kompleksy organelli, których występowanie ograniczone jest do komórek mejotycznych zlokalizowanych w szczytowej części owarioli (germarium) oraz oocytów wczesno-prewitelogenicznych [BILINSKI I WSP. 2019; COX I SPRADLING 2003; JAGLARZ I WSP. 2003; KLOC I WSP. 2014; TWORZYDŁO I WSP. 2009; TWORZYDŁO I WSP. 2016]. Wyniki badań własnych wskazują, że u przedstawicieli Tettigoniidae sytuacja jest odmienna: ciała Balbianiego są proporcjonalnie duże, morfologicznie złożone i występują w ooplazmie aż do początku procesu formowania żółtka (witelogenezy). Jednym z podstawowych składników ciała Balbianiego badanych gatunków są agregaty materiału nuage. U *M. meridionale*, *M. brachyptera* oraz *P. griseoptera* agregaty te „współtworzą” na jednym z biegunów pęcherzyka zarodkowego łatwo rozpoznawalną (nawet na skrawkach półcienkich) gęstą strukturę. Ten typ ciała Balbianiego nazwano „kompaktowym”. Natomiast u *C. fuscus* i *L. albivittata* agregaty te są znacznie bardziej rozproszone i otaczają pęcherzyk zarodkowy na całym lub niemalże całym jego obwodzie. Ten typ ciała Balbianiego nazwano „rozproszonym”.

Pomimo wspomnianych różnic, ultrastruktura ciała Balbianiego badanych gatunków Tettigoniidae jest zaskakująco podobna. We wszystkich przypadkach ciało Balbianiego zbudowane jest z tego samego „zestawu” organelli: licznych polimorficznych mitochondriów, krótkich cystern i/lub niewielkich pęcherzyków

siateczki śródplazmatycznej, kompleksów Golgiego oraz wspomnianych wyżej agregatów materiału nuage. Cechą wspólną wszystkich analizowanych ciał Balbianiego jest również bezpośredni kontakt mitochondriów i agregatów materiału nuage. Analogiczny związek pomiędzy nuage i mitochondriami zaobserwowano w rozwijających się oocytach różnych gatunków kręgowców i bezkręgowców [szczegółowe informacje w VORONINA I WSP. 2011; KLOC I WSP. 2014]. Co więcej, u niektórych analizowanych wcześniej gatunków wzajemne relacje pomiędzy mitochondriami a materiałem nuage są zbliżone do tych zaobserwowanych w niniejszych badaniach u przedstawicieli Tettigoniidae [m.in. Ryc. 9 w BRINTON I OLIVER 1971; Ryc. 5 i 6 w DOHMEN 1985; Ryc. 4 w SMILEY 1990; Ryc. 5 w FALLENI 1993; Ryc. 2 i 4 w GONOBLEVA I EFREMOVA 2017; Ryc. 4b w REUNOV I WSP. 2019]. Obserwacje powyższe wskazują, że wzajemny kontakt mitochondriów i materiału nuage jest cechą (a także wyznacznikiem) wszystkich analizowanych dotychczas ciał Balbianiego. Jeśli tak, to wszystkie, nawet małe i rozproszone, kompleksy nuage-mitochondria, niejednokrotnie obserwowane w ooplazmie różnych gatunków zwierząt, mogą być interpretowane, jako fragmenty „rozproszonych” ciał Balbianiego, które nie zostały rozpoznane na pojedynczych i często przypadkowych przekrojach przez duże i zazwyczaj złożone komórki, jakimi są oocyty.

Znaczenie granul jądrowych

Wykonane analizy ujawniły, że nukleoplazma pęcherzyków zarodkowych wszystkich pięciu przebadanych gatunków Tettigoniidae zawiera charakterystyczne gęste elektronowo granule (ziarna). Znajdują się one wyłącznie w pobliżu tego fragmentu otoczki jądrowej, z którym, od strony cytoplazmatycznej, sąsiadują agregaty materiału nuage. Obserwacja ta sugeruje, że granule te zawierać mogą makrocząsteczki, które po translokacji przez kompleksy porów jądrowych uczestniczą w tworzeniu materiału nuage. Z tego powodu granule te nazwano „ziarnami prenuage”. Warto w tym miejscu dodać, że podobne ziarna o średnicy ~50 nm stwierdzono w oocytach *Xenopus laevis* [BILINSKI I WSP. 2004]. U *Xenopus* ziarnom tym przypisuje się właśnie udział w tworzeniu nuage.

Formowanie ciała Balbianiego

Szczegółowe analizy ultrastrukturalne a także rekonstrukcje trójwymiarowej organizacji ooplazmy wykazały, że w oocytach *M. meridionale* ciało Balbianiego powstaje w profazie I podziału mejotycznego, w tzw. stadium bukietowym. Kompleks ten lokalizuje się niezmiennie w sąsiedztwie tego segmentu otoczki jądrowej, do którego przyczepione są telomery chromosomów tzw. bukietu mejotycznego. Taka lokalizacja ciała Balbianiego prowadzi do wczesnej asymetryzacji ooplazmy. Asymetria ta jest jednak przejściowa i zanika wraz z dezintegracją bukietu chromosomów (asymetria nukleoplazmatyczna) i rozpraszaniem ciała Balbianiego (asymetria ooplazmatyczna). Asymetria ooplazmy wynikająca z pozycji ciała Balbianiego, choć krótkotrwała, warta jest jednak odnotowania, gdyż nawet pozornie nieistotne asymetryczne rozmieszczenie składników cytoplazmy oocytu może mieć (potencjalnie) wpływ nie tylko na funkcjonowanie komórki, ale również na właściwy przebieg wstępnych etapów rozwoju zarodkowego i determinację linii płciowej. Warto zauważyć, że podobny układ ciała Balbianiego i bukietu mejotycznego został również opisany u kręgowców [KLOC I WSP. 2004; ELKOUBY I WSP. 2016; MARLOW 2017], co sugeruje, że powiązanie wymienionych struktur jest starą i konserwatywną cechą oogenezy.

Wyniki testu agregacji białek PROTEOSTAT oraz inkubacji oocytów z 1,6-hexanediolem sugerują, że powstawanie ciała Balbianiego *M. meridionale* zainicjowane zostaje przez samoagregację białek inherentnie nieuporządkowanych (IDPs). Powyższe rezultaty wskazują, że ciała Balbianiego Tettigoniidae, podobnie jak ciało Balbianiego kręgowców, to kondensaty biomolekularne [BOKE I WSP. 2016; CABRAL I MOWRY 2020; WOODRUFF I WSP. 2018; ZHAO I ZHANG 2020]. To z kolei sugeruje, że samoorganizacja IDPs może stanowić ewolucyjnie konserwatywny mechanizm tworzenia ciała Balbianiego. Warto w tym miejscu dodać, że białka inherentnie nieuporządkowane oraz procesy prowadzące do ich samoagregacji były dotychczas badane w kontekście chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, stwardnienie zanikowe boczne lub choroby prionowe [m.in. HAASS I SELKOE 2007; KOO I WSP. 1999; POLYMENIDOU I CLEVELAND 2011]. Przeprowadzone w ostatnich latach analizy molekularne [BOKE I WSP. 2016; KRISHNAKUMAR I WSP. 2018, DHANDAPANI I WSP. 2022] sugerują, że wczesne fazy formowania ciała Balbianiego oraz powstawanie blaszek amyloidowych w mózgu osób

z chorobą Alzheimera mają istotną cechę wspólną - samoagregację IDPs. Należy podkreślić, że w przeciwieństwie do amyloidów patologicznych, które są stabilne i nierozpuszczalne, agregacja białek zachodząca podczas tworzenia ciała Balbianiego jest procesem odwracalnym, gdyż ciało Balbianiego po spełnieniu swojej funkcji rozprasza się w ooplazmie) [ELKOUBY 2017; JAMIESON-LUCY I MULLINS 2019; KLOC I WSP. 2004]. Tak więc, dalsza analiza morfogenezy ciała Balbianiego może pomóc w wyjaśnieniu mechanizmów zarówno agregacji jak i dysocjacji amyloidów oraz przyczynić się do opracowania nowych metod zwalczania skutków chorób neurodegeneracyjnych. W końcu, doniesienia literaturowe wskazują, iż jedną z przyczyn rozwoju choroby Alzheimera mogą być zaburzenia dynamiki mitochondrialnej [HU I WSP. 2017]. Ponieważ dynamika ta pozostaje w ścisłym związku z morfogenezą ciała Balbianiego, dalsze analizy tego kompleksu organelli w kontekście chorób neurodegeneracyjnych, wydają się wyjątkowo atrakcyjne.

Funkcja ciała Balbianiego – namnażanie i selektywna eliminacja mitochondriów

W ostatnich latach wykazano, iż sieci mitochondrialne, tak dobrze poznane w komórkach somatycznych, powstają również w komórkach płciowych. Przykładowo, u rybika piekarniczego, *Thermobia domestica* w młodych mejotycznych oocytach mitochondria ciała Balbianiego łączą się i tworzą gęstą sieć mitochondrialną [BILINSKI I WSP. 2017; TWORZYDŁO I WSP. 2016]. Na wysoką aktywność mitochondriów zgrupowanych w takiej sieci wskazuje ich wyższy potencjał błonowy w porównaniu z pojedynczymi mitochondriami obecnymi w ooplazmie otaczającej ciało Balbianiego [TWORZYDŁO I WSP. 2016; WILDING I WSP. 2001; ZHANG I WSP. 2008]. Ponadto, w sąsiedztwie sieci, a niekiedy również w jej wnętrzu, występują pojedyncze mitochondria wykazujące wyraźne cechy degeneracji [BILINSKI I WSP. 2017B; SEKULA I WSP. 2020; TWORZYDŁO I WSP. 2016]. Wyniki te, w świetle modeli zakładających udział fuzji i fragmentacji sieci mitochondrialnych w kontroli jakości mitochondriów doprowadziły do zaproponowania hipotezy, iż ciało Balbianiego pełni rolę lokalnej sieci mitochondrialnej i uczestniczy w selektywnej eliminacji wadliwych mitochondriów i propagacji mitochondriów funkcjonalnych.

Analizy ciała Balbianiego *M. meridionale* wykazały, że jest to struktura dynamiczna, która w kolejnych fazach oogenezy ulega znacznym modyfikacjom strukturalnym. Dotyczą one przede wszystkim kompleksów nuage-mitochondria.

Interpretacja uzyskanych obrazów sugeruje, że mitochondria, obserwowane w pobliżu materiału nuage, wydłużają się, rozgałęziają i stopniowo łączą, co prowadzi do powstania początkowo (w oocytach mejotycznych) luźnej i lokalnej, a z czasem (w oocytach prewitelogenicznych) rozległej, obejmującej niemalże całą ooplazmę sieci mitochondrialnej. Mitochondria obserwowane w ooplazmie obwodowej i pozbawione kontaktu z nuage są z reguły kuliste lub lekko wydłużone. Podobne wydłużone i rozgałęzione mitochondria w pobliżu materiału nuage zaobserwowali autorzy powyżej przytoczonych badań ciała Balbianiego *T. domestica* [TWORZYDŁO I WSP. 2016]. Obserwacje własne oraz dane literaturowe [BILINSKI I WSP. 2017; SEKULA I WSP. 2020; TWORZYDŁO I WSP. 2016] zdają się potwierdzać stary i zapomniany pogląd, iż nuage („cement mitochondrialny” w oryginalnych publikacjach) indukuje biogenezę mitochondriów [TOURTE I WSP. 1981, 1984]. Przeprowadzone w czasie wykonywania niniejszej dysertacji badania oocytów barwionych MitoTracker Deep Red potwierdziły, że mitochondria sieci ciała Balbianiego wykazują wyższy potencjał błonowy niż mitochondria zlokalizowane w ooplazmie poza siecią. Wyniki te, wraz z danymi prac wcześniej opublikowanych [HILL I WSP. 2014; MILANI 2015; ZHOU I WSP. 2010] sugerują, że tylko wysoce funkcjonalne mitochondria (zawierające niezmutowane mtDNA) są rekrutowane do ciała Balbianiego, gdzie ulegają proliferacji („namnażaniu”).

Kolejne badania morfologiczne wykazały, że w średnio- i późno-prewitelogenicznych oocytach *M. meridionale* sieć mitochondrialna ciała Balbianiego dzieli się na mniejsze fragmenty (mikrosieci) i/lub pojedyncze mitochondria. Analizy z użyciem BrdU ujawniły, że w tej fazie oogenezy dochodzi do intensywnej syntezy mtDNA, a więc wzrostu liczby (namnażania) mitochondriów. Obserwacja ta zgodna jest z wcześniejszymi wynikami klasycznych badań autoradiograficznych na poziomie mikroskopu elektronowego pokazujących, iż mtDNA mitochondriów ciała Balbianiego jest intensywnie i synchronicznie replikowany [TOURTE I WSP. 1981]. Analizy immunohistochemiczne wykazały z kolei, że w oocytach średnio- i późno-prewitelogenicznych białko Drp1 (główny regulator podziałów mitochondrialnych) wykazuje wyraźnie punktową lokalizację. Według aktualnych poglądów [m.in. SMIRNOVA I WSP. 2001; FRIEDMANN I WSP. 2011] zaobserwowane punkty to oligomery białka Drp1, które tworzą pierścienie wokół przewężeń mitochondriów podczas ich podziału. Powyższe wyniki jednoznacznie wskazują, że w oocytach

średnio- i późno-prewitelogenicznych mitochondria ciała Balbianiego podlegają intensywnym podziałom.

Według ostatnio zaproponowanego modelu dynamiki mitochondrialnej wyróżnić można dwa typy podziałów mitochondriów [KLEELE I WSP. 2021; CHAKRABARTI I HIGGS 2021]. Celem pierwszego z nich jest namnożenie w komórce „zdrowych” (funkcjonalnych) mitochondriów. W tym typie podziału, poza białkiem Drp1 (i innymi dynaminami), istotną rolę odgrywają m.in. filamety aktynowe (mikrofilamety). Drugi typ podziału umożliwia odseparowanie od sieci nieprawidłowych, przeznaczonych do degradacji jednostek mitochondrialnych. Dla przebiegu tego procesu kluczowe znaczenie mają dynaminy i struktury autofagiczne (autofagosomy i lizosomy).

Eksperymentalne zablokowanie polimeryzacji aktyny w oocytach *M. meridionale* prowadzi do zaburzenia morfologii mitochondriów. Na skrawkach ultracienkich obserwowano mitochondria morfologicznie zmienione – silnie wydłużone i nieprawidłowo przewężone. Co istotne, średnia długość przewężeń mitochondriów w oocytach poddanych eksperymentowi była istotnie większa od przewężeń mitochondriów w oocytach kontrolnych. Podobne nieprawidłowo przewężone mitochondria obserwowano w komórkach ssaków, w których zahamowano podziały mitochondrialne [LEE I WSP. 2016]. Dane te sugerują, iż przynajmniej niektóre podziały mitochondriów ciała Balbianiego *M. meridionale* zależą od mikrofilamentów.

Proces makroautofagii kontrolowany jest przez liczne białka, wśród których kluczową rolę odgrywają tzw. białka związane z autofagią (ATG, ang. *Autophagy related proteins*). Do białek tych zaliczane są m.in. zaangażowane w elongację fagoforu białko ATG5 oraz zlokalizowane w błonie autofagosomu i zapewniające jego stabilność białko LC3 (ang. *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) [HOLLENSTEIN I KRAFT 2020; KLIONSKY 2007; LAMARK I JOHANSEN 2021; YORIMITSU I KLIONSKY 2005]. Wyniki analiz immunohistochemicznych potwierdziły, że w ciele Balbianiego *M. meridionale* zachodzi proces autofagii angażujący oba wymienione wyżej białka - ATG5 oraz LC3. W tym kontekście, zaobserwowane podczas analiz ultrastrukturalnych łukowato wygięte cysterny siateczki śródplazmatycznej otaczające mitochondria zinterpretowano jako tworzące się autofagosomy. Co ciekawe, najnowsze badania sugerują, iż białko Drp1 wchodzi w bezpośrednie interakcje z białkami ATG i stanowi jeden z regulatorów procesu mitofagii [CHEN I WSP., 2022].

Podsumowując, wyniki przeprowadzonych badań wskazują, iż w obrębie sieci mitochondrialnej ciała Balbianiego *M. meridionale* zachodzą oba typy podziałów mitochondrialnych opisanych przez KLEELE I WSP. [2021]: (1) podziały prowadzące do namnożenia mitochondriów prawidłowych oraz (2) podziały prowadzące do odłączenia od sieci mitochondriów nieprawidłowych, które następnie usuwane są z oocytu na drodze autofagii (mitofagii).

Rozpraszanie ciała Balbianiego

W początkowej fazie witelogenezy, mitochondria powstające w rezultacie fragmentacji ciała Balbianiego rozpraszają się i lokują pomiędzy powstającymi kulami żółtka. Trzeba wyraźnie zaznaczyć, że w przypadku *M. meridionale* nie zaobserwowano żadnego specyficznego, uprzywilejowanego kierunku transportu mitochondriów. Pozwala to na stwierdzenie, że dezintegracja ciała Balbianiego ma u Tettigoniidae przebieg inny niż u *Xenopus* i *Danio*. U obu wymienionych gatunków modelowych mRNA, białka oraz organelle (głównie mitochondria) ciała Balbianiego transportowane są do ściśle określonego regionu oocytu tj. do bieguna wegetatywnego, gdzie współtworzą plazmę płciową [COX I SPRADLING 2003; KLOC I WSP. 2004; MARLOW I MULLINS 2008]. Ponadto, wyniki badań własnych pozwalają wykluczyć udział ciała Balbianiego Tettigoniidae w transporcie składników i/lub cząsteczek cytoplazmy do określonego regionu/ów oocytu z dwóch innych - dość oczywistych powodów:

(1) lokalizacja ciała Balbianiego w komórkach rozrodczych badanych owadów jest stochastyczna i niezwiązana z żadną osią oocytu;

(2) w oocytach Tettigoniidae nie występują wyspecjalizowane regiony ooplazmy, odpowiadające plazmie płciowej.

Znaczenie mikrotubul – lokalizacja nuage i mRNA białka Drp1

Potencjalna rola mikrotubul w powstawaniu i funkcjonowaniu ciała Balbianiego jest wciąż niejasna i wymaga dalszych badań. Dane literaturowe na ten temat są fragmentaryczne. Przykładowo badania oocytów *Xenopus* wykazały, że depolimeryzacja mikrotubul nie wpływa na strukturę dojrzałego ciała Balbianiego [BOKE I WSP. 2016]. Podobny wniosek wysnuto na podstawie analiz ciała Balbianiego w oocytach *Danio rerio* [ESCOBAR-AGUIRRE I WSP. 2017]. Nieco odmienne wyniki

zaprezentowano w najnowszym doniesieniu DEIS I ELKOUBY [2022, preprint]. Wyniki analiz przedstawionych w ostatniej z przytoczonych prac sugerują, że mikrotubule mogą regulować proces separacji faz prowadzący do powstawania ciała Balbianiego w młodych oocytach, a w późniejszych fazach oogenezy stanowią fizyczną barierę, która ogranicza rozmiar i przemieszczanie się dojrzałego ciała Balbianiego.

Badania przedstawione w niniejszej dysertacji sugerują, że mikrotubule nie uczestniczą w formowaniu ciała Balbianiego *M. meridionale* – w oocytach mejotycznych oraz wczesno-prewitelogenicznych (wtedy, gdy ciało Balbianiego powstaje) mikrotubule są nieliczne i rozmieszczone prawie równomiernie. Z kolei w oocytach średnio- i późno prewitelogenicznych występuje skomplikowany system mikrotubul złożony z pierścienia okołojądrowego oraz promieniście odchodzących od niego mikrotubul obwodowych. Wyniki przeprowadzonego eksperymentu (inkubacja z kolchicyną) sugerują, że okołojądrowy kosz mikrotubularny uczestniczy w pozycjonowaniu agregatów materiału nuage w bezpośrednim sąsiedztwie jądra oocytu. Dane literaturowe wskazują, iż stopień poliglutamylacji tubuliny, tj. liczba dołączonych do niej reszt kwasu glutaminowego może pośrednio wpływać na rozmieszczenie organelli komórkowych [ZHENG I WSP. 2022]. W oocytach *M. meridionale* mikrotubule pierścienia okołojądrowego podlegają poliglutamylacji częściej niż mikrotubule obwodowe. Zdaje się to potwierdzać słuszność założenia, iż mikrotubule strefy okołojądrowej uczestniczą w pozycjonowaniu materiału nuage.

Ciekawych wyników dostarczyły analizy rozmieszczenia Drp1 mRNA przy pomocy techniki FISH. Badania te wykazały, że lokalizacja tego typu mRNA zmienia się w czasie oogenezy. Początkowo, w oocytach wczesno-prewitelogenicznych, Drp1 mRNA zgromadzony jest w okolicy pęcherzyka zarodkowego, a w kolejnych fazach oogenezy rozprasza się równomiernie w całej ooplazmie. Poza ooplazmą Drp1 mRNA występuje też w nukleoplazmie – w rejonie, w którym zlokalizowane są ziarna (granule) „penuage”. Dość niespodziewanie, zwiększonej ilości Drp1 mRNA nie stwierdzono w cytoplazmatycznych agregatach materiału nuage. Z kolei porównanie rozmieszczenia Drp1 mRNA w oocytach kontrolnych (Drp1 mRNA rozmieszczone równomiernie w całej ooplazmie) i inkubowanych w medium zawierającym kolchicynę (Drp1 mRNA zlokalizowane w sąsiedztwie jądra oocytu) wskazują, że prawidłowa dystrybucja tego typu mRNA związana jest z integralnością cytoszkieletu mikrotubularnego.

Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowano następujący scenariusz transportu i lokalizacji cząsteczek Drp1 mRNA:

- (1) nowo zsyntetyzowane cząsteczki tego typu mRNA gromadzone są w ziarnach „penuage”;
- (2) po translokacji przez pory jądrowe przez bardzo krótki czas cząsteczki te pozostają w agregatach materiału nuage;
- (3) po opuszczeniu tych agregatów, cząsteczki Drp1 mRNA transportowane są wzdłuż mikrotubul pierścienia okołojądrowego, a dalej wzdłuż mikrotubul promienistych w kierunku ooplazmy obwodowej; prowadzi to do równomiernego rozmieszczenia Drp1 mRNA w ooplazmie szybko rosnących średnio- i późno-prewitelogenicznych oocytów i w konsekwencji do równomiernego rozmieszczenia białka Drp1.

Scenariusz ten wymaga, co oczywiste, potwierdzenia w dalszych badaniach.

Rozdział V Podsumowanie i wnioski

Przeprowadzone badania umożliwiły realizację celów badawczych niniejszej pracy doktorskiej oraz dostarczyły nowych informacji na temat morfogenezy oraz funkcji ciała Balbianiego w oocytach owadów pierwotnych (bazalnych) o przeobrażeniu niepełnym (Hemimetabola).

Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski:

- 1) Ciała Balbianiego blisko spokrewnionych gatunków pasikonikowatych nie są morfologicznie identyczne, zachowują jednak jedną cechę wspólną, tj. bliski kontakt mitochondriów i materiału nuage.
- 2) Mitochondria ciała Balbianiego badanych gatunków łączą się ze sobą tworząc dynamiczną sieć mitochondrialną. W obrębie tej sieci dochodzi do namnażania mitochondriów „zdrowych” (funkcjonalnych, o niezmutowanym mtDNA) oraz selektywnej eliminacji mitochondriów nieprawidłowych.
- 3) Mitochondria нефunkcjonalne (tj. o obniżonym potencjale błony mitochondrialnej i/lub nieprawidłowej morfologii) po oddzieleniu od sieci mitochondrialnej ciała Balbianiego ulegają autofagii (mitofagii).
- 4) W powstawanie ciała Balbianiego owadów zaangażowane są białka zawierające rejony inherentnie nieuporządkowane. Wskazuje to na homologię ciał Balbianiego kręgowców i bezkręgowców, a zatem wspólne ewolucyjne pochodzenie tego zespołu organelli.
- 5) Równomierne rozmieszczenie Drp1 mRNA w ooplazmie oocytów kontrolnych oraz nagromadzenie tego typu mRNA w sąsiedztwie jądra w oocytach traktowanych kolchicyną wskazuje, że za prawidłowe (równomierne) rozmieszczenie Drp1 mRNA odpowiada cytoszkielet mikrotubularny. Równomierne rozmieszczenie Drp1 mRNA zapewnia, z kolei, równomierne rozmieszczenie białka Drp1, a co za tym idzie względną synchronizację podziałów mitochondrialnych w rozmaitych rejonach ooplazmy, w tym także w rejonach oddalonych od pęcherzyka zarodkowego, tj. w ooplazmie podkorowej i polarnej.

6) Ewolucyjnie pierwotną funkcją ciała Balbianiego jest namnażanie mitochondriów prawidłowych oraz eliminacja mitochondriów o obniżonym potencjale błony, a więc udział w selektywnym przekazywaniu mitochondriów do komórek organizmów potomnych. Pozostałe funkcje przypisywane ciału Balbianiego, tj. ukierunkowany transport organelli (mitochondriów i ziaren płciowych) oraz makrocząsteczek (mRNA i białek) do określonych regionów ooplazmy i udział w lipidogenezie, są ewolucyjnie „młodsze”. Przepuszczalnie wyewoluowały one wtórnie w różnych zaawansowanych taksonach kręgowców i bezkręgowców, np. u żab (*Xenopus*), ryb (*Danio*), owadów o przeobrażeniu zupełnym (*Drosophila*) i niektórych pająków.

Bibliografia

1. **BALBIANI E.G.** (1864). Sur la constitution du germe dans l'oeuf animal avant la fecundation. CR Hebd. Seances Acad. Sci. 58: 584.
2. **BILINSKI S.M.** (1987). Heterocellular gap junctions in vitellogenic follicles of *Campodea sp.* (Diplura). W: Recent Advances of Insect Embryology in Japan and Poland. H. Ando, Cz. Jura (red.). Arthropod Embryol. Soc. Jap. ISSEBU Co Ltd. Tsukuba: 19-22.
3. **BILINSKI S.M.** (1998A). Ovaries, oogenesis and insect phylogeny. Introductory remarks. Folia Histochem. Cytobiol. 36: 143-145.
4. **BILINSKI S.M.** (1998B). Filogeneza owadów a struktura i ultrastruktura ich jajników. Przegl. Zool. 62: 33-48.
5. **BILINSKI S.M.** (2005). Oogeneza. W: Podstawy embriologii zwierząt i człowieka. Tom 1. Cz. Jura, J. Klag (red.). PWN, Warszawa: 38-60.
6. **BILINSKI S.M., JAGLARZ M.K.** (1999). Organization and possible functions of microtubule cytoskeleton in hymenopteran nurse cells. Cell Motil. Cytoskeleton. 43: 213-220.
7. **BILINSKI S.M., JAGLARZ M.K., TWORZYDŁO W.** (2017A). The pole (germ) plasm in insect oocytes, W: Kloc, M. (Ed.), Results & Problems in Cell Differentiation, vol 63. Oocytes. Springer International Publishing, pp. 103-126.
8. **BILINSKI S.M., JAGLARZ M.K., TWORZYDŁO W.** (2019). Organelle assemblages implicated in the transfer of oocyte components to the embryo: an insect perspective. Curr. Op. Insect Sci. 31: 1-7.
9. **BILINSKI S.M., KLAG J.** (1994). Budowa jajników i zarys przebiegu oogenezy owadów. W: Ultrastruktura i funkcja komórki, tom 6: Oogeneza. S. Biliński, Z. Bielańska-Osuchowska, J. Kawiak, A. Przełęcka (red.). PWN, Warszawa: 30-35.
10. **BILINSKI S.M., KLAG J., KUBRAKIEWICZ J.** (1995). Subcortical microtubule network separates the periplasm from the endoplasm and is responsible for maintaining the position of accessory nuclei in hymenopteran oocytes. Roux Arch. Dev. Biol. 205: 54-61.
11. **BILINSKI S.M., KLOC M., TWORZYDŁO W.** (2017B). Selection of mitochondria in female germline cells: is Balbiani body implicated in this process? J. Assist. Reprod. Gen. 34, 1405-1412.
12. **BILINSKI S.M., SZKLARZEWICZ T.** (1992). The ovary of *Catajapyx aquilonaris* (Insecta, Entognatha): ultrastructure of germarium and terminal filament. Zoomorphol. 112: 247-251.
13. **BOCK F.J., TAIT S.W.G.** (2020). Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 21: 85-100.
14. **BOKE E., RUER M., WÜHR M., COUGHLIN M., LEMAITRE R., GYGI S.P., ALBERTI S., DRECHSEL D., HYMAN A.A., MITCHISON T.J.** (2016). Amyloid-like self-assembly of a cellular compartment. Cell 166: 637-650.
15. **BOKE E., MITCHISON T.J.** (2017). The Balbiani body and the concept of physiological amyloids. Cell Cycle 16: 153-154.
16. **BONTEMS F., STEIN A., MARLOW F., LYAUTEY J., GUPTA T., MULLINS M.C., DOSCH R.** (2009). Bucky ball organizes germ plasm assembly in zebrafish. Curr. Biol. 19: 414-422.
17. **BOYMAN L., KARBOWSKI M., LEDERER W.J.** (2020). Regulation of mitochondrial ATP production: Ca²⁺ signaling and quality control. Trends Mol. Med. 26: 21-39.

18. **BRANDT A.** (1874). Über die Eirohren der *Blatta orientalis* (Periplaneta). Mem. Acad. Imp. Sci., VIIme Ser. 21: 1-30.
19. **BÜNING J.** (1993). Germ cell cluster formation in insect ovaries. International Journal of Insect Morphology and Embryology 22: 237-253.
20. **BÜNING J.** (1994). The ovary of Ectognatha, the Insecta s. str. W: The Insect Ovary. Ultrastructure, previtellogenic growth and evolution. J. Büning (red.). Chapman and Hall, London.
21. **CABRAL S.E., MOWRY K.L.** (2020). Organizing the oocyte: RNA localization meets phase separation. Curr. Top. Dev. Biol. 140: 87-118.
22. **CHEN Y., CULETTO E., LEGOUIS R.** (2022). The strange case of Drp1 in autophagy: Jekyll and Hyde? Bioessays 44:e2100271.
23. **CHINNERY P.F., HUDSON G.** (2013). Mitochondrial genetics. Br. Med. Bull. 106, 135-159.
24. **COLNAGHI M., POMIANKOWSKI A., LANE N.** (2021). The need for high-quality oocyte mitochondria at extreme ploidy dictates mammalian germline development. Elife 10:e69344.
25. **COX R.T., SPRADLING A.C.** (2003). A Balbiani body and the fusome mediate mitochondrial inheritance during *Drosophila* oogenesis. Development 130:1579-1590.
26. **DEIS R., ELKOUBY Y.M.** (2022). Microtubules control Buc phase separation and Balbiani body condensation in zebrafish oocyte polarity. bioRxiv; doi: 10.1101/2022.03.11.484019.
27. **DHANDAPANI L., SALZER M.C., DURAN J.M., ZAFFAGNINI G., DE GUIRIOR C., MARTÍNEZ-ZAMORA M.A., BOKE E.** (2022). Comparative analysis of vertebrates reveals that mouse primordial oocytes do not contain a Balbiani body. J. Cell Sci. 135: jcs259394.
28. **DÜSTER R., KALTHEUNER I.H., SCHMITZ M., GEYER M.** (2021). 1,6-Hexanediol, commonly used to dissolve liquid-liquid phase separated condensates, directly impairs kinase and phosphatase activities. J. Biol. Chem. 296: 100260.
29. **DYKSTRA M.** (1992). Biological electron microscopy. Theory, techniques and troubleshooting. Plenum Press, New York & London, 171.
30. **EDDY E.M.** (1975). Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. Int. Rev. Cytol. 43: 229-280.
31. **ELKOUBY Y.M., JAMIESON-LUCY A., MULLINS M.C.** (2016). Oocyte polarization is coupled to the chromosomal bouquet, a conserved polarized nuclear configuration in meiosis. PLoS Biol. 14(1): e1002335.
32. **ELKOUBY Y.M.** (2017). All in one - integrating cell polarity, meiosis, mitosis and mechanical forces in early oocyte differentiation in vertebrates. Int. J. Dev. Biol. 61:179-193.
33. **ESCOBAR-AGUIRRE M., ZHANG H., JAMIESON-LUCY A., MULLINS M.C.** (2017). Microtubule-actin crosslinking factor 1 (Macf1) domain function in Balbiani body dissociation and nuclear positioning. PLoS genetics 13(9): e1006983.
34. **EXTAVOUR C.G., AKAM M.** (2003). Mechanisms of germ cell specification across metazoans: epigenesis and performance. Development 130, 5869-5884.
35. **FAN W., WAYMIRE K.G., NARULA N., LI P., ROCHER C., COSKUN P.E., VANNAN M.A., NARULA J., MACGREGOR G., WALLACE D.C.** (2008). A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations. Science 319, 958-962.

36. **FRIEDMAN J.R., LACKNER L.L., WEST M., DIBENEDETTO J.R., NUNNARI J., VOELTZ G.K.** (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* 334: 358-362.
37. **FRIEDMAN J.R., NUNNARI J.** (2014). Mitochondrial form and function. *Nature* 505: 335-343.
38. **GURAYA S.S.** (1979). Recent advances in the morphology, cytochemistry, and function of Balbiani's vitelline body in animal oocytes. *Int. Rev. Cytol.* 59: 249-321.
39. **GREENE A.W., GRENIER K., AGUILETA M.A., MUISE S., FARAZIFARD R., HAQUE M. E., ET AL.** (2012). Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO Rep.* 13: 378-385.
40. **HALKKA L., HALKKA O.** (1968). RNA and protein in nucleolar structures of dragonfly oocytes. *Science* 162: 803-805.
41. **HILL J.H., CHEN Z., XU H.** (2014). Selective propagation of functional mitochondrial DNA during oogenesis restricts the transmission of a deleterious mitochondrial variant. *Nat. Genet.* 46: 389-392.
42. **HOLLENSTEIN D.M., KRAFT C.** (2020). Autophagosomes are formed at a distinct cellular structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* 65: 50-57.
43. **JAGLARZ M.K., NOWAK Z., BILINSKI S.M.** (2003). The Balbiani body and generation of early asymmetry in the oocyte of a tiger beetle. *Differentiation* 71: 142-151.
44. **JAGLARZ M.K., KLOC M., JANKOWSKA W., SZYMANSKA B., BILINSKI S.M.** (2011). Nuage morphogenesis becomes more complex: two translocation pathways and two forms of nuage coexist in *Drosophila* germline syncytia. *Cell Tiss. Res.* 344: 169-181.
45. **JAMIESON-LUCY A., MULLINS M.C.** (2019). The vertebrate Balbiani body, germ plasm, and oocyte polarity. *Curr. Top. Dev. Biol.* 135: 1-34.
46. **JEDRZEJOWSKA I., KUBRAKIEWICZ J.** (2007). The Balbiani body in the oocytes of a common cellar spider, *Pholcus phalangioides* (Araneae: Pholcidae). *Arthropod Struct. Dev.* 36: 317-326.
47. **JEDRZEJOWSKA I., KUBRAKIEWICZ J.** (2010). Yolk nucleus - the complex assemblage of cytoskeleton and ER is a site of lipid droplet formation in spider oocytes. *Arthropod Struct. Dev.* 39: 350-359.
48. **JOHN J.C., FACUCHO-OLIVEIRA J., JIANG Y., KELLY R., SALAH R.** (2010). Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: a journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells. *Hum. Reprod. Update* 16: 488-509.
49. **JURA CZ.** (1972). Development of apterygote insects. W: *Developmental Systems: Insects.* S.J. Counce, C.H. Addington (red.). Academic Press, London, Vol. 1: 49-94.
50. **KLIONSKY D.** (2007). Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 931-937.
51. **KAULENAS M.S.** (1992). Insect accessory reproductive structures. W: *Zoophysiology.* S.D. Bradshaw et al. (red.). Springer-Verlag, Berlin: 31: 38-75.
52. **KING R.C., BÜNING J.** (1985). The origin and functioning of insect oocytes and nurse cells. W: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology.* Vol. 1. G.A. Kerkut, L.I. Gilbert (red.). Pergamon Press, Oxford: 37-82.
53. **KLEELE T., REY T., WINTER J., ZAGANELLI S., MAHECIC D., PERRETEN H., RUBERTO F.P., NEMIR M., WAI T., PEDRAZZINI T.,**

- MANLEY S.** (2021). Distinct fission signatures predict mitochondrial degradation or biogenesis. *Nature* 593: 435-439.
54. **KLOC M., BILINSKI S.M.** (2002). Rola plazmy płciowej w specyfikacji komórek linii płciowej u bezkręgowców i kręgowców. *Postępy Biologii Komórki* 29: 301-317.
55. **KLOC M., BILINSKI S., DOUGHERTY M.T., BREY E.M., ETKIN L.D.** (2004). Formation, architecture and polarity of female germline cyst in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 266(1): 43-61.
56. **KLOC M., BILINSKI S., ETKIN L.D.** (2004). The Balbiani body and germ cell determinants: 150 years later. *Curr. Top. Dev. Biol.* 59: 1-36.
57. **KLOC M., JEDRZEJOWSKA I., TWORZYDŁO W., BILINSKI S.M.** (2014). Balbiani body, nuage and sponge bodies – The germ plasm pathway players. *Arthropod Struct. Dev.* 43: 341-348.
58. **KRISHNAN K.J., TURNBULL D.M.** (2010). Mitochondrial DNA and genetic disease. *Essays In Biochemistry* 47, 139-151.
59. **KROSCHWALD S., MAHARANA S., SIMON A.** (2017). Hexanediol: a chemical probe to investigate the material properties of membrane-less compartments. *Matters* 3: e201702000010.
60. **KRZYSZTOFOWICZ A.** (1971). Histochemical and autoradiographic analysis of RNA synthesis in trophic cells of the female gonad in *Tetrodontophora bielanensis* (Waga) (Collembola). *Acta Biol. Crac. Seria Zool.* 14: 299-305.
61. **KSIĄŻKIEWICZ-ILIJEWA M.** (1977). Ultrastructural study of the oocytes of *Gromphadorhina brauerii* (Shelf.) (Blattodea) with special reference to yolk formation. *Acta Biol. Crac. Seria Zool.* 20: 237-244.
62. **KÜHLBRANDT W.** (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol.* 13: 89.
63. **LAMARK T., JOHANSEN T.** (2021). Mechanisms of Selective Autophagy. *Annu Rev. Cell Dev. Biol.* 37: 143-169.
64. **LEE J.E., WESTRATE L.M., WU H., PAGE C., VOELTZ G.K.** (2016). Multiple dynamin family members collaborate to drive mitochondrial division. *Nature* 540: 139-143.
65. **LUPA B., BILINSKI S.M.** (2002). The ovaries of Cicadomorpha: distribution of microfilaments and microtubules in terminal filament cells. *Folia Histochem. Cytobiol.* 40: 134-135.
66. **LUPA B., KIM J.K., BILINSKI S.M.** (1999). The ovary of *Neotituria kongosana* (Hemiptera, Cicadomorpha: Ledridae). Ultrastructure of the tropharium and terminal filament. *Folia biol. (Kraków)* 47: 123-130.
67. **MARGARITIS L.H.** (1985). Structure and physiology of the egg shell. W: *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology. Vol. 1. Embryogenesis and Reproduction.* G.A. Kerkut, L.I. Gilbert (red.). Pergamon Press, Oxford: 153-226.
68. **MARINOS E., BILLET F.S.** (1981). Mitochondrial number, cytochrome oxidase and succinic dehydrogenase activity in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 62: 395-409.
69. **MARLOW F.L., MULLINS M.C.** (2008). Bucky ball functions in Balbiani body assembly and animal-vegetal polarity in the oocyte and follicle cell layer in zebrafish. *Dev. Biol.* 321: 40-50.
70. **MARLOW F.L.** (2017). Mitochondrial matters: Mitochondrial bottlenecks, self-assembling structures, and entrapment in the female germline. *Stem Cell Res.* 21: 178-186.

71. **MATTIE S., KROLS M., MCBRIDE H.M.** (2019). The enigma of an interconnected mitochondrial reticulum: new insights into mitochondrial fusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 59: 159-166.
72. **MAZZINI M., GIORGI F.** (1985). The follicle cell-oocyte interaction in ovarian follicles of the stick insect *Bacillus rossius* (Rossi) (Insecta: Phasmatodea). *J. Morphol.* 185: 37-49.
73. **MILANI L.** (2015). Mitochondrial membrane potential: A trait involved in organelle inheritance? *Biol. Lett.* 11: 20150732.
74. **MITRA K.** (2013). Mitochondrial fission-fusion as an emerging key regulator of cell proliferation and differentiation. *Bioessays* 35: 955-964.
75. **MOORE A.S., WONG Y.C., SIMPSON C.L., HOLZBAUR E.L.** (2016). Dynamic actin cycling through mitochondrial subpopulations locally regulates the fission-fusion balance within mitochondrial networks. *Nat. Commun.* 7: 12886.
76. **MUGLESTON J. D., NAEGLE M., SONG H., WHITING M. F.** (2018). A comprehensive phylogeny of Tettigoniidae (Orthoptera: Ensifera) reveals extensive ecomorph convergence and widespread taxonomic incongruence. *Insect Systematics and Diversity* 2(4), 5: 1-27.
77. **NAKATOGAWA H.** (2020). Mechanisms governing autophagosome biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21: 439-458.
78. **NASKRECKI P.** (2013). Grasshoppers and their relatives. W: *Encyclopedia of Biodiversity* (Second Ed.). Levin S.A. (red.). Academic Press: 722-736.
79. **OUYANG J.P.T., SEYDOUX G.** (2022). Nuage condensates: accelerators or circuit breakers for sRNA silencing pathways? *RNA* 28: 58-66.
80. **PALOZZI J.M., JEEDIGUNTA S.P., HURD T.R.** (2018) Mitochondrial DNA purifying selection in mammals and invertebrates. *J. Mol. Biol.* 430: 4834-4848.
81. **RAMACHANDRAN R., SCHMID S.L.** (2018). The dynamin superfamily. *Curr. Biol.* 28: 411-416.
82. **RAMAMURTHI B.M.** (1956). Notes on *Marava arachidis* (Yersin) (Labiidae: Dermaptera). *Indian Journal of Entomology* 18: 146-148.
83. **RAND D.M.** (2001). The units of selection on mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology and Systematics* 32: 415-448.
84. **REYNOLDS E.** (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17: 208-212.
85. **RICHARDS O.W., DAVIES R.G.** (1977). *Imms' General Textbook of Entomology: Structure, Physiology and Development.* Chapman and Hall, London: 293-298.
86. **ROSCISZEWSKA E.** (1997). Morphology of the larval ovary of stonefly *Perla marginata* (Panzer) (Plecoptera: Perlidae). *Ephemeroptera. Plecoptera. Biol. Ecol. Syst.* 343-347.
87. **ROSCISZEWSKA E.** (2002). Budowa i rozwój jajników oraz choriogenezy i ultrastruktura kapsuł jajowych widelnic (Insecta: Plecoptera). *Wyd. Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków:* 11-19.
88. **RUBINSZTEIN D.C., SHPILKA T., ELAZAR Z.** (2012). Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr. Biol.* 22: R29-34.
89. **RUPPERT E., FOX R., BARNES R.** (2004). Hexapoda. *General biology. W: Invertebrate Zoology: a functional evolutionary approach.* 7th ed. Thomson-Brooks/Cole, Belmont, CA: 723-740.
90. **SHIN Y., BRANGWYNNE C.P.** (2017). Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science* 357:eaaf4382.

91. **SEKULA M., TWORZYDŁO W., BILINSKI S.M.** (2020). Morphogenesis of the Balbiani body in developing oocytes of an orthopteran, *Metrioptera brachyptera*, and multiplication of female germline mitochondria. *J. Morphol.* 281: 1142-1151.
92. **SEKULA M., TWORZYDŁO W., BILINSKI S.M.** (2022). Morphology and ultrastructure of the Balbiani body in the oocytes of closely related bush cricket species. Shared features reveal important aspect of functioning. *Zoology* 155: 126051.
93. **SMIRNOVA E., GRIPARIC L., SHURLAND D.L., VAN DER BLIEK A.M.** (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 12: 2245-2256.
94. **SPINELLI J.B., HAIGIS M.C.** (2018). The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat. Cell Biol.* 20, 745-754.
95. **SZKLARZEWICZ T.** (1999). Struktura, rozwój i anageneza jajników czerwców (Insecta, Hemiptera, Coccinea). Wyd. Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków: 9-45.
96. **TOURTE M., MIGNOTTE F., MOUNOLOU J.C.** 1981. Organization and replication activity of the mitochondrial mass of oogonia and previtellogenic oocytes in *Xenopus laevis*. *Dev. Growth Differ.* 23, 9-21.
97. **TWORZYDŁO W., KISIEL E., JANKOWSKA W., WITWICKA A., BILINSKI S.M.** (2016). Exclusion of dysfunctional mitochondria from Balbiani body during early oogenesis of *Thermobia*. *Cell Tissue Res.* 366: 191-201.
98. **TWORZYDŁO W., MAREK M., KISIEL E., BILINSKI S.M.** (2017). Meiosis, Balbiani body and early asymmetry of *Thermobia* oocyte. *Protoplasma* 254: 649-655.
99. **TWORZYDŁO W., SEKULA M., BILINSKI S.M.** (2020). Transmission of functional, wild-type mitochondria and the fittest mtDNA to the next generation: bottleneck phenomenon, Balbiani body and mitophagy. *Genes* 11, 104.
100. **VAN DER BLIEK A.M., SHEN Q., KAWAJIRI S.** (2013). Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* 5: a011072.
101. **VORONINA E., SEYDOUX G., SASSONE-CORSI P., NAGAMORI I.** (2011). RNA granules in germ cells. W: Sassone-Corsi, P., Fuller, M.T., Braun, R. (red.) *Germ Cells*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York: 85-111.
102. **WESTERMANN B.** (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 872-884.
103. **WILDING M., CAROTENUTO R., INFANTE V., DALE B., MARINO M., DI MATTEO L., CAMPANELLA C.** (2001). Confocal microscopy analysis of the activity of mitochondria contained within the 'mitochondrial cloud' during oogenesis in *Xenopus laevis*. *Zygote* 9: 347-352.
104. **WITTICH W.** (1845). *De observationes quaedam de anearum ex ovo evolutione*. Halis Saxonum, Germany.
105. **WOODRUFF J.B., HYMAN A.A., BOKE E.** (2018). Organization and function of non-dynamic biomolecular condensates. *Trends Biochem. Sci.* 43: 81-94.
106. **XIAO B., DENG X., ZHOU W., TAN E.K.** (2016). Flow cytometry-based assessment of mitophagy using MitoTracker. *Front Cell Neurosci.* 10: 76.
107. **YAMASHITA Y.M.** (2018). Subcellular specialization and organelle behaviour in germ cells. *Genetics* 208: 19-51.
108. **YOULE R.J., VAN DER BLIEK A.M.** (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 337: 1062-1065.

109. **YORIMITSU T., KLIONSKY D.J.** (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ.* 12: 1542-1552.
110. **ZHANG W., WU F.** (2023). Effects of adverse fertility-related factors on mitochondrial DNA in the oocyte: a comprehensive review. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 21: 27.
111. **ZHANG Y.Z., OUYANG Y.C., HOU Y., SCHATTEN H., CHEN D.Y., SUN Q.Y.** (2008). Mitochondrial behaviour during oogenesis in zebrafish: a confocal microscopy analysis. *Dev. Growth Differ.* 50: 189-201.
112. **ZHAO Y.G., ZHANG H.** (2020). Phase separation in membrane biology: the interplay between membrane-bound organelles and membraneless condensates. *Dev. Cell* 55: 30-44.
113. **ZHOU R., WANG B., WANG J., SCHATTEN H., ZHANG Y.Z.** (2010). Is the mitochondrial cloud the selection machinery for preferentially transmitting wild-type mtDNA between generations? Rewinding Müller's ratchet efficiently. *Curr. Genet.* 56: 101-107.
114. **ZHOU R., YAZDI A.S., MENU P., TSCHOPP J.** (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469: 221-225.

Dokumentacja fotograficzna

Wykaz rycin

- Ryc. 1.** Dorosła samica *Meconema meridionale*; *Leptophyes albovittata*; *Metrioptera brachyptera*; *Pholidoptera griseoptera*; *Conocephalus fuscus* sfotografowana w środowisku naturalnym.
- Ryc. 2.** Gonada żeńska i pęcherzyki jajnikowe Tettigoniidae.
- Ryc. 3.** Ciało Balbianiego *Meconema meridionale*.
- Ryc. 4.** Ciało Balbianiego *Metrioptera brachyptera*.
- Ryc. 5.** Ciało Balbianiego *Pholidoptera griseoptera*.
- Ryc. 6.** Ciało Balbianiego *Conocephalus fuscus*.
- Ryc. 7.** Ciało Balbianiego *Leptophyes albovittata*.
- Ryc. 8.** Różnokształtne mitochondria ciała Balbianiego przedstawicieli Tettigoniidae.
- Ryc. 9.** *Meconema meridionale* – oocyt w profazie I podziału mejotycznego (stadium bukietowe).
- Ryc. 10.** *Meconema meridionale*. Trójwymiarowa rekonstrukcja organizacji ciała Balbianiego w profazie I podziału mejotycznego (stadium bukietowym).
- Ryc. 11.** *Meconema meridionale*. Sieć mitochondrialna w oocycie wczesno-prewitelogenicznym – rekonstrukcja trójwymiarowej organizacji.
- Ryc. 12.** *Meconema meridionale*. Ultrastruktura strefy przyjądrowej oocytu wczesno-prewitelogenicznego.
- Ryc. 13.** *Meconema meridionale*. Strefa kontaktu nuage i mitochondriów w oocycie średnio-prewitelogenicznym.
- Ryc. 14.** *Meconema meridionale*. Oocyt wczesno-prewitelogeniczny – ultrastruktura warstwy obwodowej i okołojądrowej ooplazmy.
- Ryc. 15.** *Meconema meridionale*. Sieć mitochondrialna w oocycie prewitelogenicznym – rekonstrukcja trójwymiarowej organizacji ooplazmy.

- Ryc. 16.** *Meconema meridionale*. Aktywność (potencjał błonowy) mitochondriów w oocytach. MitoTracker Deep Red.
- Ryc. 17.** *Meconema meridionale*. Oocyt późno-prewitelogeniczny.
- Ryc. 18.** *Meconema meridionale*. Białka inherentnie nieuporządkowane w oocytach prewitelogenicznych. Test PROTEOSTAT *Protein Aggregation Assay*.
- Ryc. 19.** *Meconema meridionale*. Rozmieszczenie mikrotubul w oocytach – immunofluorescencyjna lokalizacja α -tubuliny.
- Ryc. 20.** *Meconema meridionale*. Mikrotubule w oocytach prewitelogenicznych c.d.
- Ryc. 21.** *Meconema meridionale*. Organizacja ciała Balbianiego w oocytach prewitelogenicznych traktowanych kolchicyną i 1,6-hexanediolem.
- Ryc. 22.** *Meconema meridionale*. Reprezentatywne obrazy przewężonych (dzielących się) mitochondriów ciała Balbianiego.
- Ryc. 23.** *Meconema meridionale*. Immunofluorescencyjna lokalizacja analogu tymidyny: 2,5-bromo-2'-deoksyurydyny (BrdU) w oocycie prewitelogenicznym.
- Ryc. 24.** *Meconema meridionale*. Immunofluorescencyjna lokalizacja białka Drp1 w ooplazmie.
- Ryc. 25.** *Meconema meridionale*. Immunofluorescencyjna lokalizacja białka Drp1 w oocytach późno-prewitelogenicznych c.d. Kolokalizacja foci Drp1 pozytywnych i mitochondrialnego DNA (mtDNA).
- Ryc. 26.** *Meconema meridionale*. Rozmieszczenie Drp1 mRNA w oocytach wczesno-prewitelogenicznych. Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*.
- Ryc. 27.** *Meconema meridionale*. Rozmieszczenie Drp1 mRNA w oocytach późno-prewitelogenicznych. Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*.
- Ryc. 28.** *Meconema meridionale*. Mitochondria ciała Balbianiego w oocytach prewitelogenicznych inkubowanych w medium Grace'a dodatkiem cytochalazyny B.

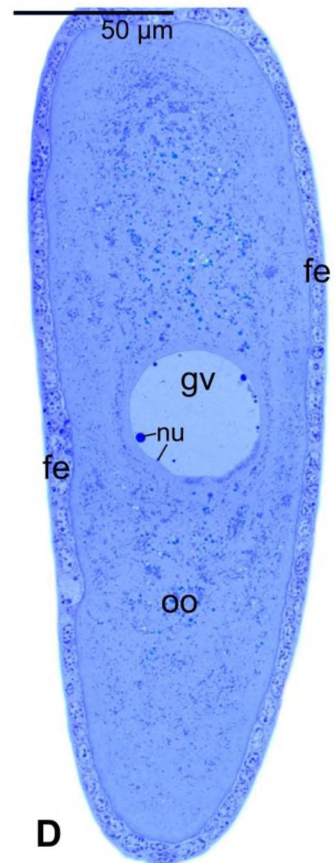
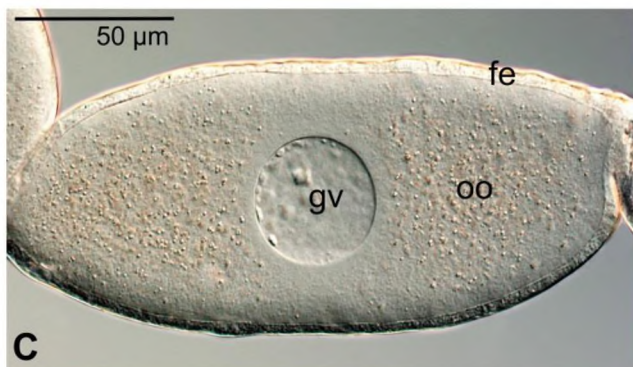
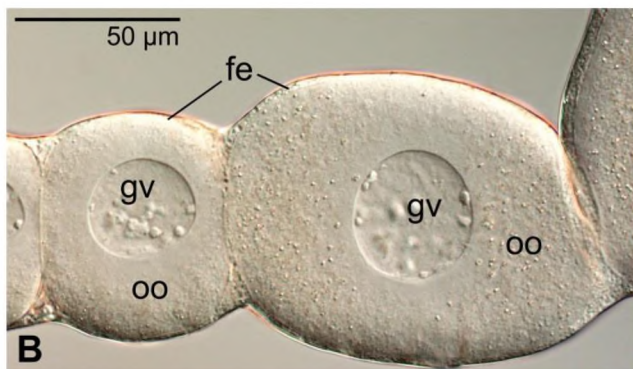
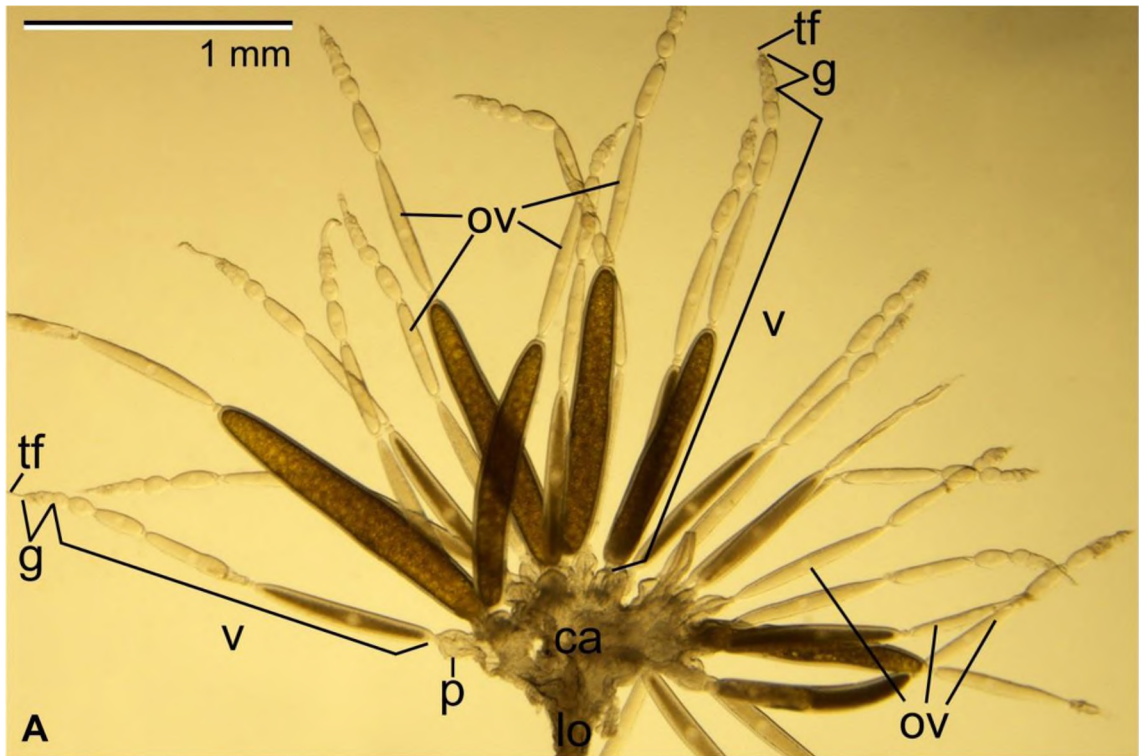
- Ryc. 29.** *Meconema meridionale*. Struktury autofagiczne w sąsiedztwie mitochondriów ciała Balbianiego w oocytach prewitelogenicznych.
- Ryc. 30.** *Meconema meridionale*. Mitochondria ciała Balbianiego otoczone przez wydłużone i charakterystycznie wygięte cysterny siateczki śródplazmatycznej.
- Ryc. 31.** *Meconema meridionale*. Immunofluorescencyjna lokalizacja białka ATG5 w oocytach prewitelogenicznych.
- Ryc. 32.** *Meconema meridionale*. Immunofluorescencyjna lokalizacja białka LC3 w oocytach.

Ryc. 1. Dorosła samica **(A)** *Meconema meridionale*; **(B)** *Leptophyes albovittata*; **(C)** *Metrioptera brachyptera*; **(D)** *Pholidoptera griseoptera*; **(E)** *Conocephalus fuscus* sfotografowana w środowisku naturalnym.



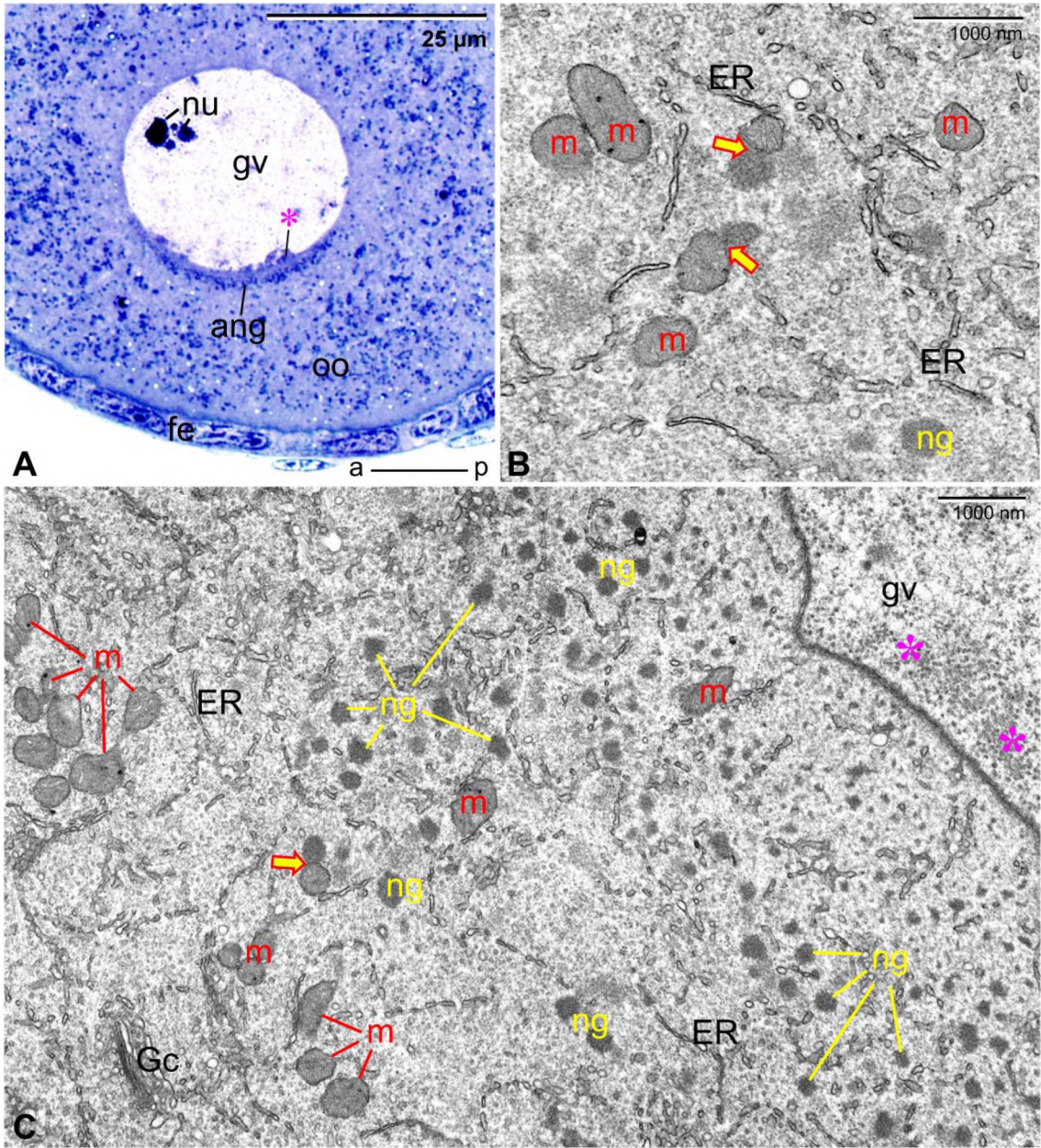
Ryc. 2. Gonada żeńska i pęcherzyki jajnikowe Tettigoniidae.

- (A)** Jajnik *Conocephalus fuscus* – widoczne liczne owariole (**ov**), które za pomocą nówek owarialnych (**p**) łączą się z rozszerzonym odcinkiem jajowodu bocznego (**lo**), tzw. kielichem jajowodu (**ca**). Na szczycie każdej owarioli filament terminalny (**tf**), dalej niewielkie germarium (**g**) i wydłużone witelarium (**v**) z szeregowo ułożonymi pęcherzykami jajnikowymi w kolejnych fazach oogenezy; tuż pod germarium pęcherzyki prewitelogeniczne, dalej witelogeniczne i choriogeniczne. Jajnik podczas preparowania pozbawiono osłony jajnikowej. Mikroskop stereoskopowy.
- (B)** Wczesno-prewitelogeniczny (pierwszy z lewej), średnio-prewitelogeniczny oraz
- (C)** późno-prewitelogeniczny pęcherzyk jajnikowy *Meconema meridionale*, zbudowany z nabłonka folikularnego (**fe**) otaczającego centralnie położony oocyt (**oo**). Wewnątrz oocytu widoczny pęcherzyk zarodkowy (**gv**). Mikroskop świetlny, kontrast Nomarskiego.
- (D)** Późno-prewitelogeniczny pęcherzyk jajnikowy *Metrioptera brachyptera*. Widoczny nabłonek folikularny (**fe**) otaczający oocyt (**oo**) z centralnie ułożonym pęcherzykiem zarodkowym (**gv**) z jąderkami (**nu**). Skrawek półcienki barwiony błękitem metylenu, mikroskop świetlny.



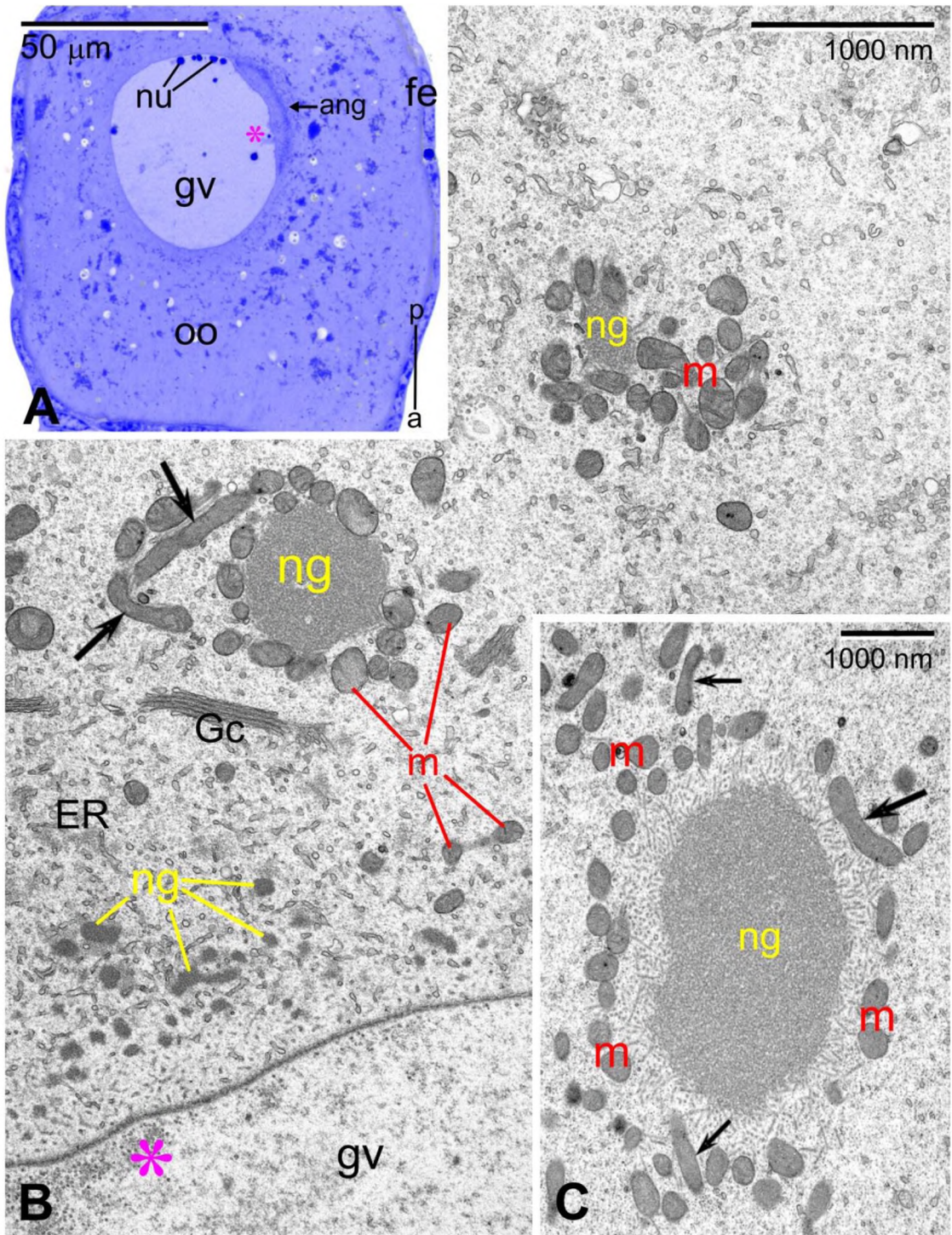
Ryc. 3. Ciało Balbianiego *Meconema meridionale*.

- (A)** Fragment oocyty prewitelogenicznego (**oo**). Na jednym z biegunów pęcherzyka zarodkowego (**gv**) widoczny wyraźny agregat materiału nuage (**ang**) kształtem przypominający półksiężyc. Wewnątrz pęcherzyka zarodkowego jąderka (**nu**) i materiał „penuage” (**gwiazdka w kolorze magenta**). Nabłonek folikularny (**fe**). Linia w prawym dolnym rogu wskazuje oś przednio-tylną (**a-p**) oocyty. Skrawek półcienki barwiony błękitem metylenu, mikroskop świetlny.
- (B i C)** Fragment ciała Balbianiego. W bezpośrednim sąsiedztwie pęcherzyka zarodkowego (**gv**) obecne liczne różnokształtne agregaty ziarnisto-włóknistego materiału nuage (**żółte ng**), pomiędzy którymi występują mitochondria (**czerwone m**). Część mitochondriów bezpośrednio przylega do materiału nuage; miejsca kontaktu mitochondriów i materiału nuage wskazują **żółto-czerwone strzałki**. Widoczne liczne cysterny i pęcherzyki siateczki śródplazmatycznej (**ER**) występujące pomiędzy agregatami materiału nuage i mitochondriami oraz kompleks Golgiego (**Gc**). W nukleoplazmie, w pobliżu fragmentu osłonki jądrowej, z którą sąsiadują cytoplazmatyczne agregaty nuage, widoczne sferyczne elektronowo gęste ziarna „penuage” o średnicy ~45 nm (**gwiazdki w kolorze magenta**). Skrawki ultracienkie, TEM.



Ryc. 4. Ciało Balbianiego *Metrioptera brachyptera*.

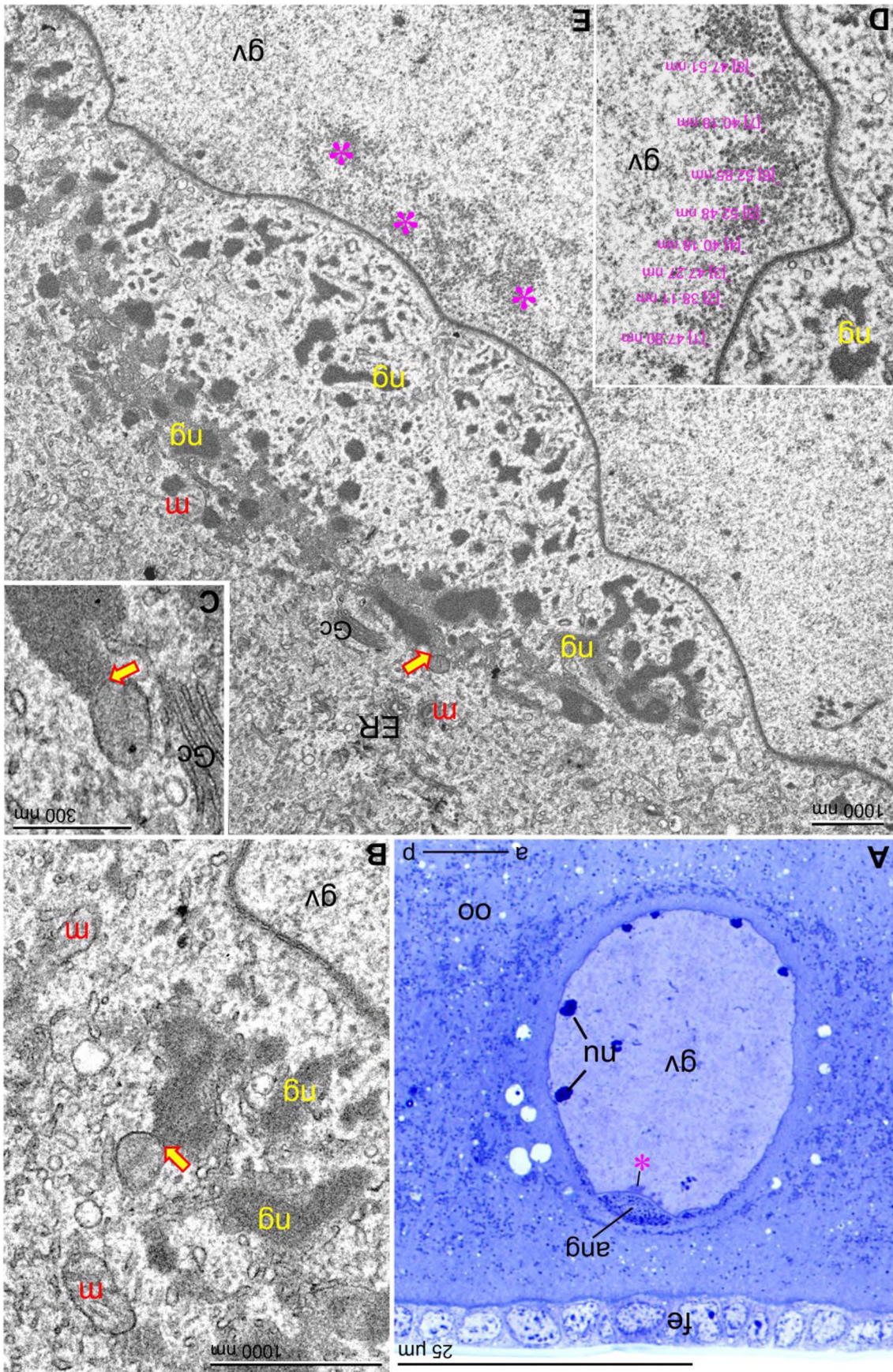
- (A) Fragment oocytu prewitelogenicznego (**oo**). Na jednym z biegunów pęcherzyka zarodkowego (**gv**) widoczny wyraźny agregat materiału nuage (**ang**) kształtem przypominający półksiężyc. Wewnątrz pęcherzyka zarodkowego jąderka (**nu**) i materiał „penuage” (**gwiazdka w kolorze magenta**). Nabłonek foliularny (**fe**). Linia w prawym dolnym rogu wskazuje oś przednio-tylną (**a-p**) oocytu. Skrawek półcienki barwiony błękitem metylenu, mikroskop świetlny.
- (B) Fragment ciała Balbianiego. W bezpośrednim sąsiedztwie pęcherzyka zarodkowego (**gv**) występują liczne agregaty ziarnisto-włóknistego materiału nuage (**żółte ng**) oraz mitochondria (**czerwone m**). Widoczne różnokształtne mitochondria skupione wokół materiału nuage; wydłużone mitochondria oznaczono **strzałką**. Pomiędzy mitochondriami i nuage występują cysterny siateczki śródplazmatycznej (**ER**) oraz kompleks Golgiego (**Gc**). W nukleoplazmie, w pobliżu fragmentu osłonki jądrowej, z którą sąsiadują cytoplazmatyczne agregaty nuage, widoczne sferyczne elektronowo gęste ziarna „penuage” o średnicy ~45 nm (**gwiazdka w kolorze magenta**). Skrawek ultracienki, TEM.
- (C) Duży agregat materiału nuage (**żółte ng**) otoczony przez różnokształtne mitochondria (**czerwone m**). **Strzałki** wskazują wydłużone mitochondria. Skrawek ultracienki, TEM.



Ryc. 5. Ciało Balbianiego *Pholidoptera griseoptera*.

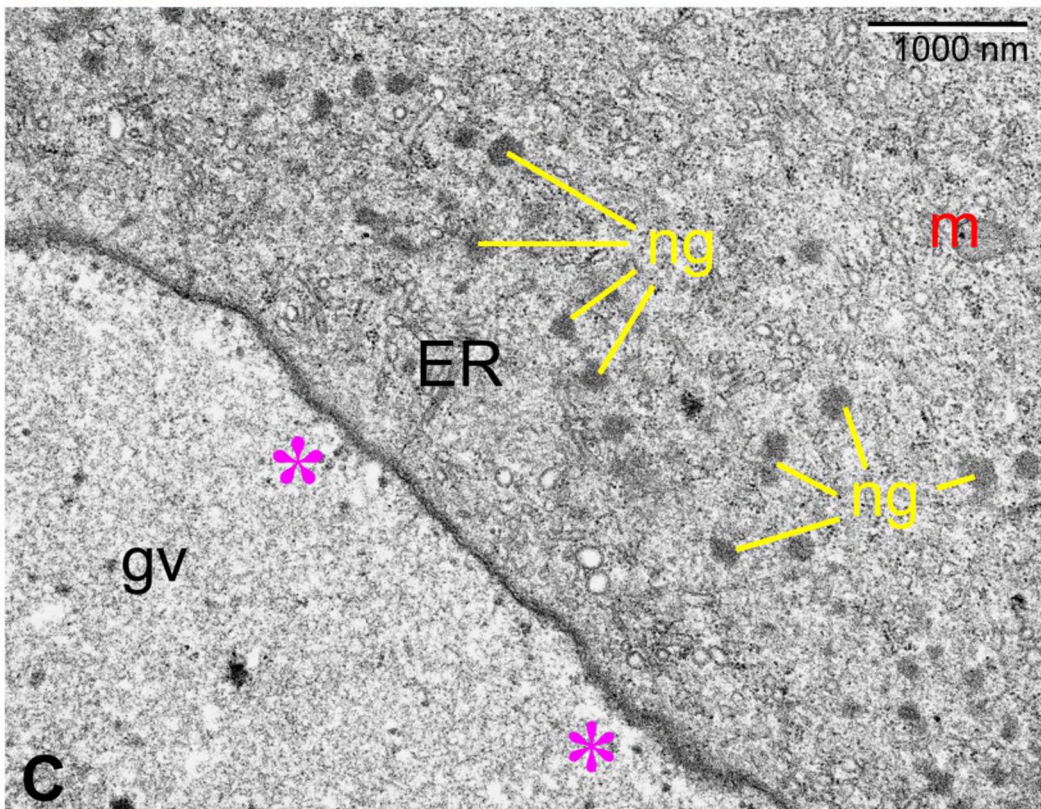
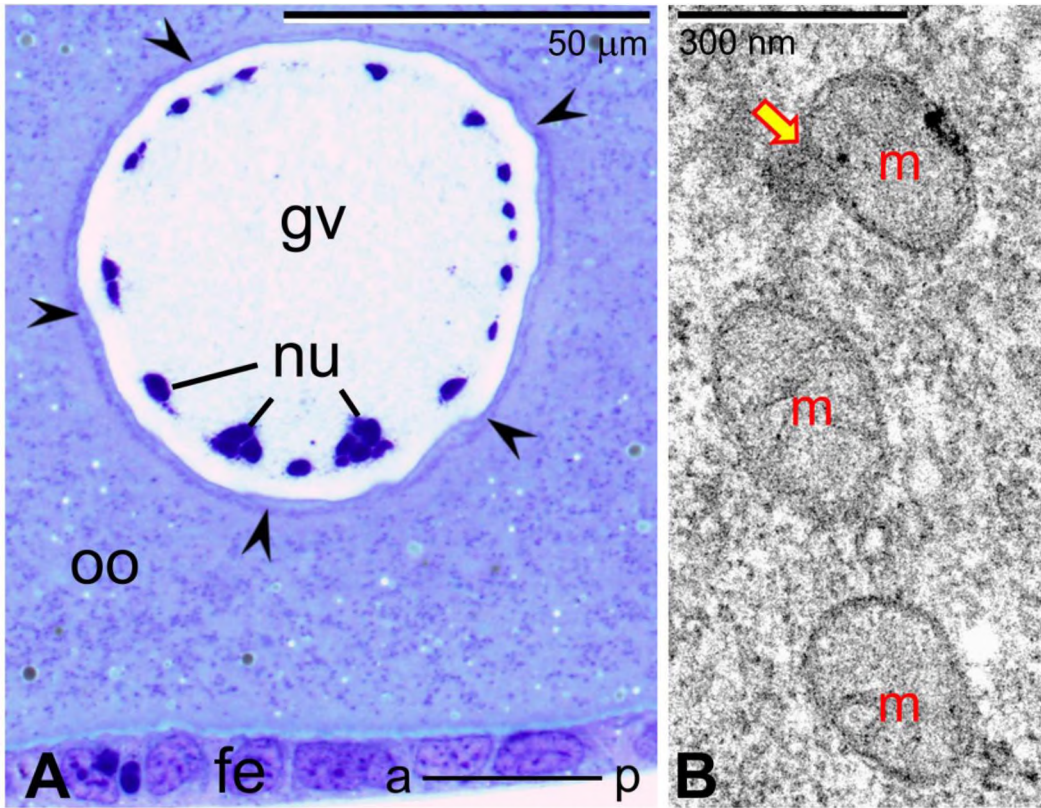
(A) Fragment oocyty prewitelogenicznego (**oo**). Na jednym z biegunów pęcherzyka zarodkowego (**gv**), w charakterystycznym zagłębieniu otoczki jądrowej, widoczny wyraźny agregat materiału nuage (**ang**) kształtem przypominający soczewkę. Wewnątrz pęcherzyka zarodkowego jąderka (**nu**) i materiał „prenuage” (**gwiazdka w kolorze magenta**). Nabłonek foliularny (**fe**). Linia w prawym dolnym rogu wskazuje oś przednio-tylną (**a-p**) oocyty. Skrawek półcienki barwiony błękitem metylenu, mikroskop świetlny.

(B-D) Fragment ciała Balbianiego. W bezpośrednim sąsiedztwie pęcherzyka zarodkowego (**gv**) obecne liczne różnokształtne agregaty ziarnisto-włóknistego materiału nuage (**żółte ng**) w pobliżu, których występują mitochondria (**czerwone m**). Część mitochondriów w bezpośrednim kontakcie z materiałem nuage – miejsca kontaktu mitochondriów i agregatów nuage wskazują **żółto-czerwone strzałki** (powiększone na B i C). Widoczne cysterny i pęcherzyki siateczki śródplazmatycznej (**ER**) oraz kompleks Golgiego (**Gc**). W nukleoplazmie, w pobliżu fragmentu osłonki jądrowej, z którą sąsiadują cytoplazmatyczne agregaty nuage, widoczne sferyczne elektronowo gęste ziarna „prenuage” o średnicy ~45 nm (**gwiazdki w kolorze magenta**); dokładne pomiary przedstawiono na (D). Skrawki ultracienkie, TEM.



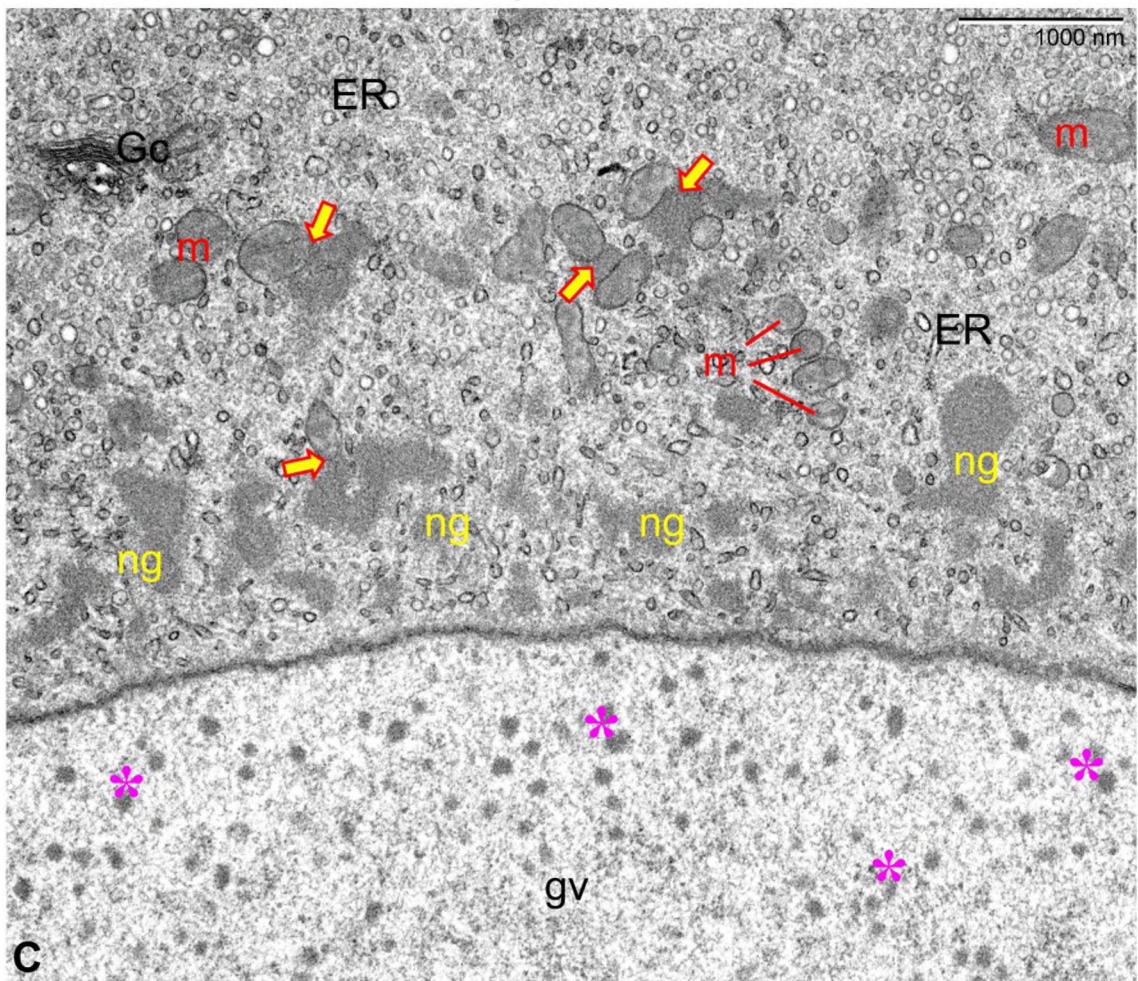
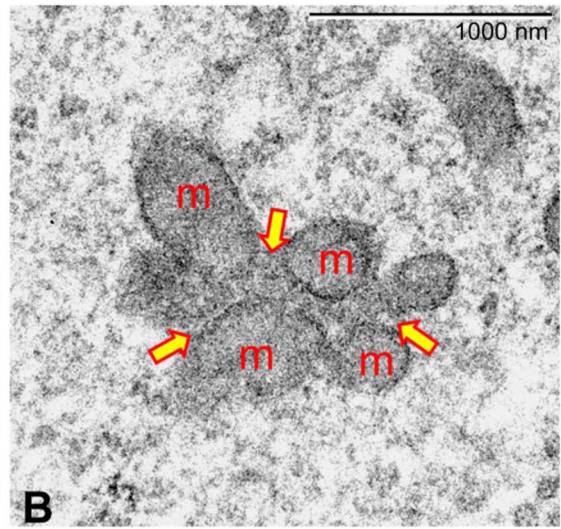
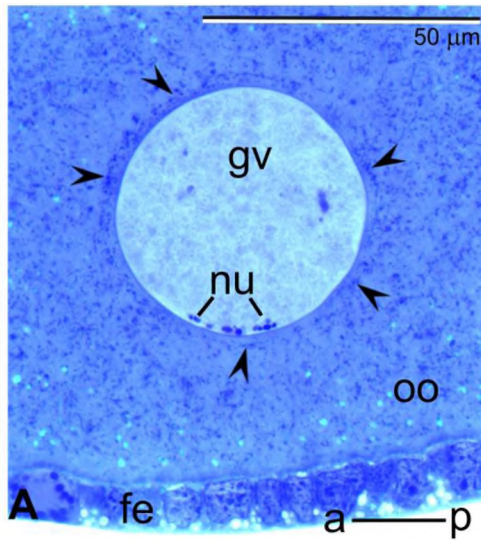
Ryc. 6. Ciało Balbianiego *Conocephalus fuscus*.

- (A)** Fragment oocyty prewitelogenicznego (**oo**). Widoczne agregaty materiału nuage (**groty strzałek**) otaczające pęcherzyk zarodkowy (**gv**) na całym jego obwodzie. Wewnątrz pęcherzyka zarodkowego jąderka (**nu**). Nabłonek foliularny (**fe**). Linia w prawym dolnym rogu wskazuje oś przednio-tylną (**a-p**) oocyty. Skrawek półcienki barwiony błękitem metylenu, mikroskop świetlny.
- (B)** Mitochondria ciała Balbianiego w bezpośrednim kontakcie z materiałem nuage; miejsce kontaktu wskazuje **żółto-czerwona strzałka**. Skrawek ultracienki, TEM.
- (C)** Fragment ciała Balbianiego. W sąsiedztwie pęcherzyka zarodkowego (**gv**) liczne agregaty ziarnisto-włóknistego materiału nuage (**żółte ng**) w pobliżu, których występuje mitochondrium (**czerwone m**). Widoczne pęcherzyki i cysterny siateczki śródplazmatycznej (**ER**). W nukleoplazmie obecne elektronowo gęste, w przybliżeniu sferyczne ziarna „penuage” o średnicy ~50 nm (**gwiazdki w kolorze magenta**). Skrawek ultracienki, TEM.



Ryc.7. Ciało Balbianiego *Leptophyes albovittata*.

- (A)** Fragment oocyty prewitelogenicznego (**oo**). Agregaty materiału nuage (**groty strzałek**) otaczają pęcherzyk zarodkowy (**gv**) na całym jego obwodzie. Wewnątrz pęcherzyka zarodkowego jąderka (**nu**). Nabłonek foliularny (**fe**). Linia w prawym dolnym rogu wskazuje oś przednio-tylną (**a-p**) oocyty. Skrawek półcienki barwiony błękitem metylenu, mikroskop świetlny.
- (B, C)** Fragment ciała Balbianiego. W sąsiedztwie pęcherzyka zarodkowego (**gv**) liczne duże agregaty ziarnisto-włóknistego materiału nuage (**żółte ng**), pomiędzy którymi występują mitochondria (**czerwone m**). Widoczne liczne bezpośrednie kontakty mitochondriów i materiału nuage (**żółto-czerwone strzałki**); mitochondria skupione wokół centralnie zlokalizowanego agregatu nuage (B). W nukleoplazmie obecne duże elektronowo gęste ziarna „prenuage” o średnicy ~90 nm (**gwiazdki w kolorze magenta**). Pęcherzyki siateczki śródplazmatycznej (**ER**); kompleks Golgiego (**Gc**). Skrawki ultracienkie, TEM.



Ryc. 8. Różnokształtne mitochondria ciała Balbianiego przedstawicieli Tettigoniidae.

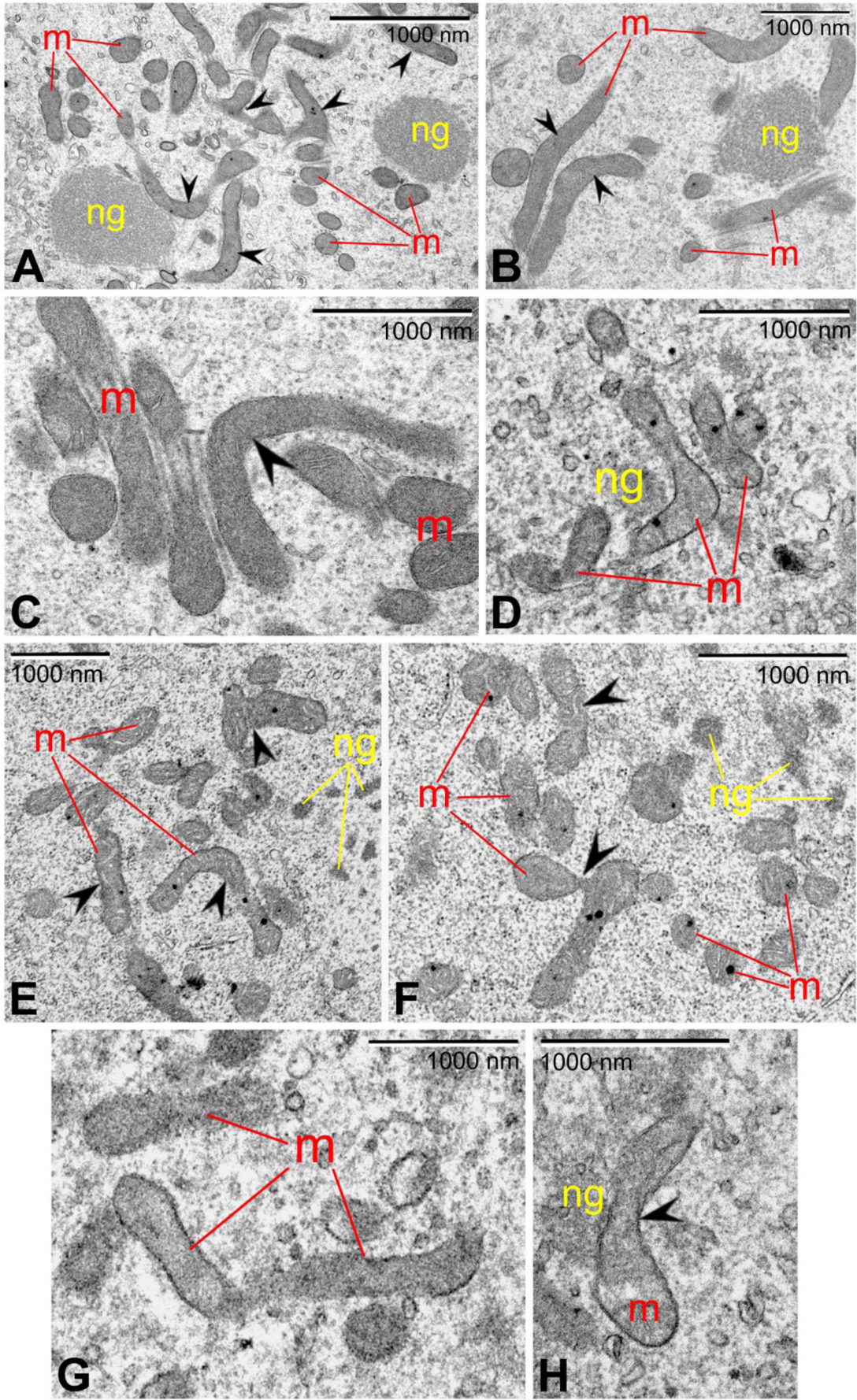
(A-C) *Metrioptera brachyptera*

(D i H) *Pholidoptera griseoptera*

(E i F) *Meconema meridionale*

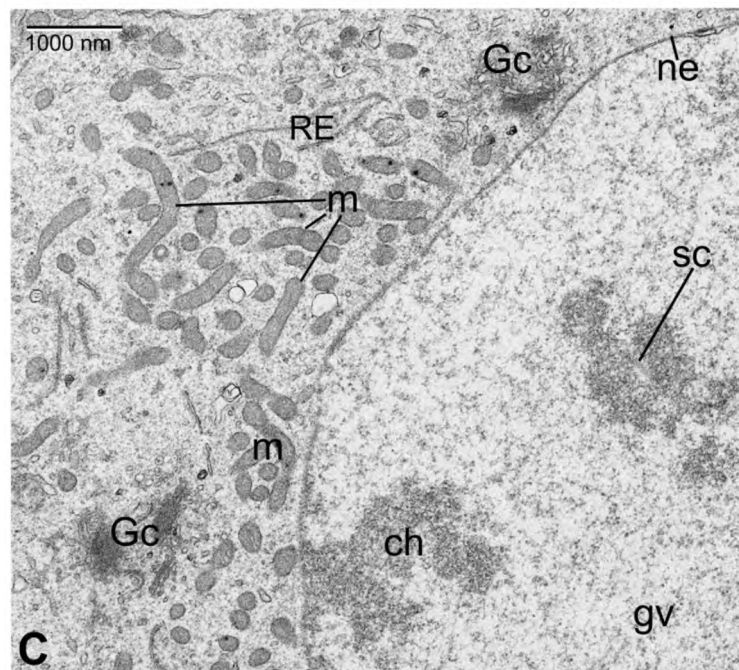
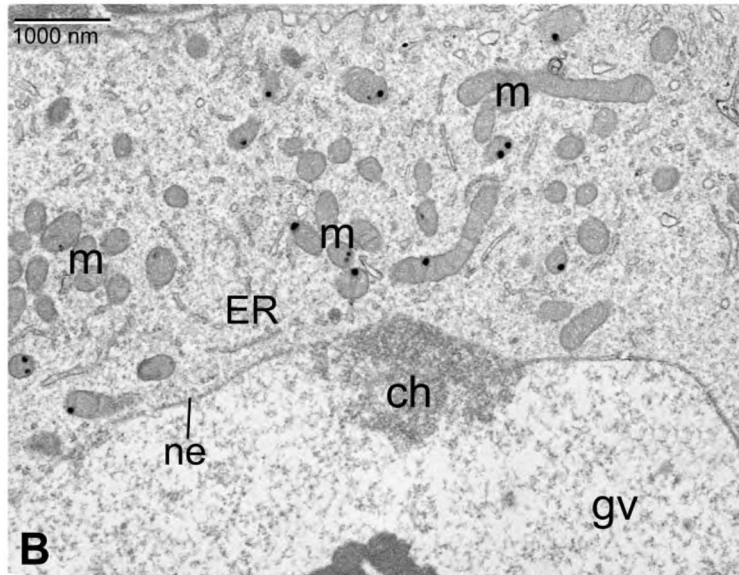
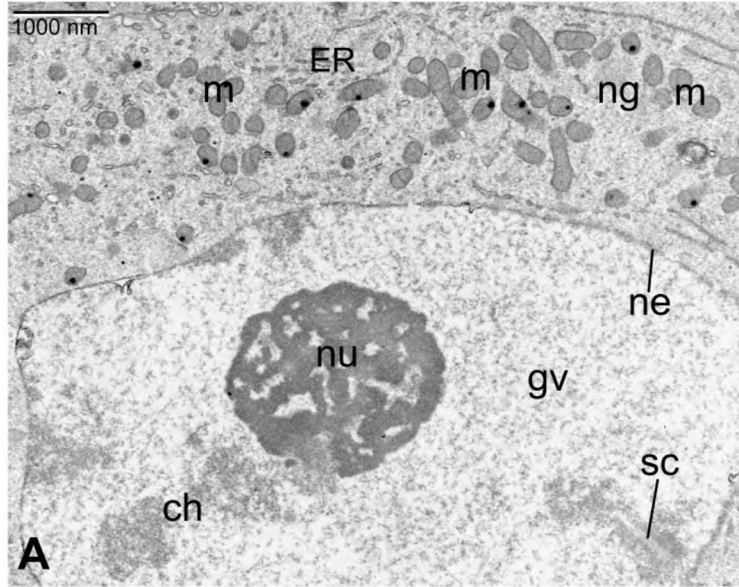
(G) *Leptophyes albovittata*

Wydłużone, rozgałęzione lub charakterystycznie przewężone (**groty strzałek**) mitochondria (**czerwone m**) zlokalizowane w bezpośrednim kontakcie lub w pobliżu materiału nuage (**żółte ng**). Skrawki ultracienkie, TEM.



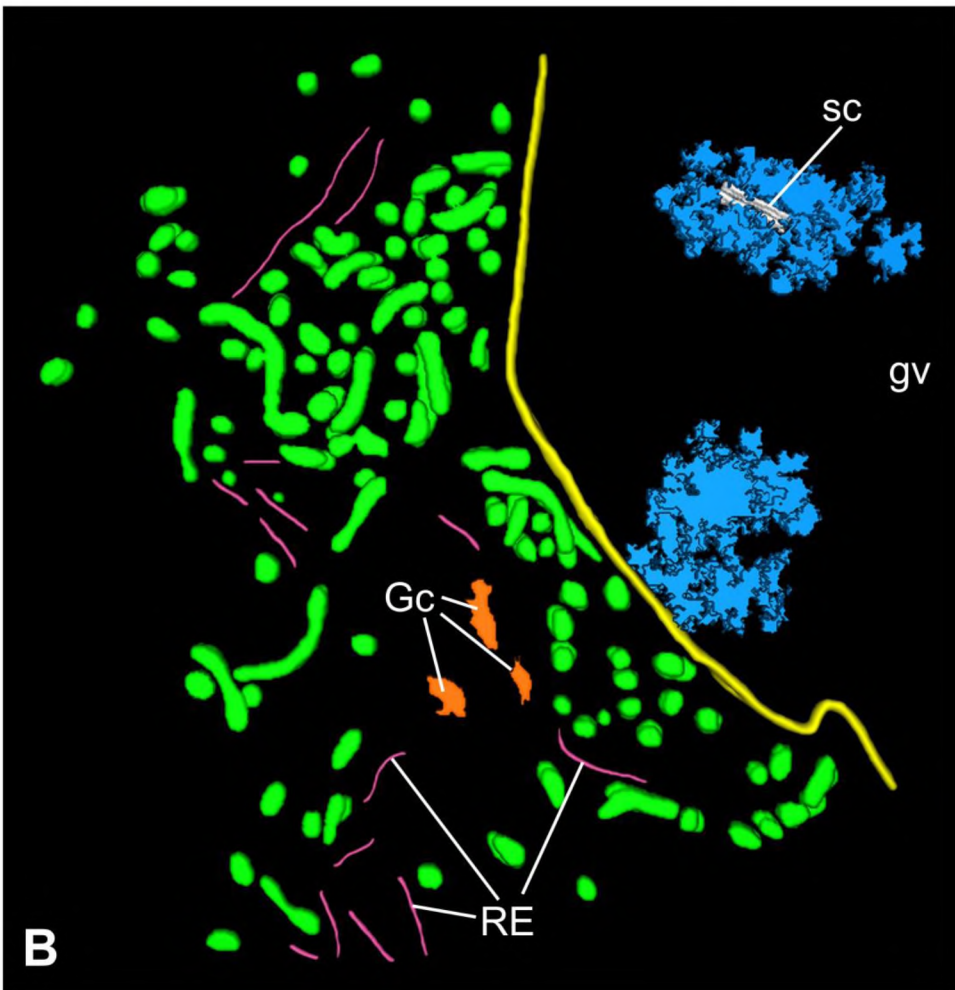
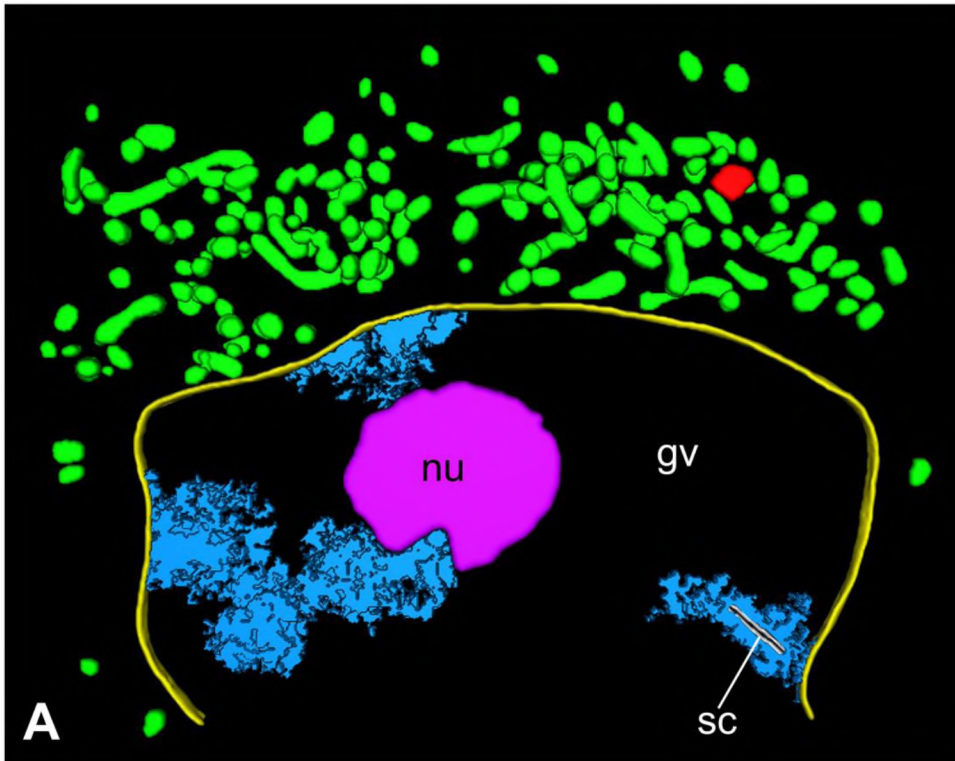
Ryc. 9. *Meconema meridionale* – oocyt w profazie I podziału mejotycznego (stadium bukietowe).

(A-C) Fragment pęcherzyka zarodkowego (**gv**) i ooplazmy. W karioplazmie jąderko (**nu**) i chromosomy stadium bukietowego (**ch**); kompleks synaptonemalny (**sc**); osłonka jądrowa (**ne**). W ooplazmie ciało Balbianiego zbudowane z różnokształtnych (w tym wydłużonych) mitochondriów (**m**), materiału nuage (**ng**), cystern siateczki śródplazmatycznej (**RE**) i kompleksów Golgiego (**Gc**). Skrawki ultracienkie, TEM.



Ryc. 10. *Meconema meridionale*. (A i B) Trójwymiarowa rekonstrukcja organizacji ciała Balbianiego w profazie I podziału mejotycznego (stadium bukietowym).

Ciało Balbianiego powstaje w bezpośrednim sąsiedztwie tego fragmentu osłonki jądrowej (**żółta**), do którego (od strony karioplazmy) przytwierdzone są chromosomy bukietowe (**niebieskie**). Mitochondria (**zielone**), materiał nuage (**czerwony**), cysterny siateczki śródplazmatycznej (**fioletowe, RE**), kompleksy Golgiego (**pomarańczowe, Gc**), kompleksy synaptonemalne (**białe, sc**), jąderko (**różowe, nu**), pęcherzyk zarodkowy (**gv**). Rekonstrukcje wykonano na podstawie 4 (A) i 3 (B) seryjnych skrawków ultracienkich (TEM), program Fiji ImageJ.

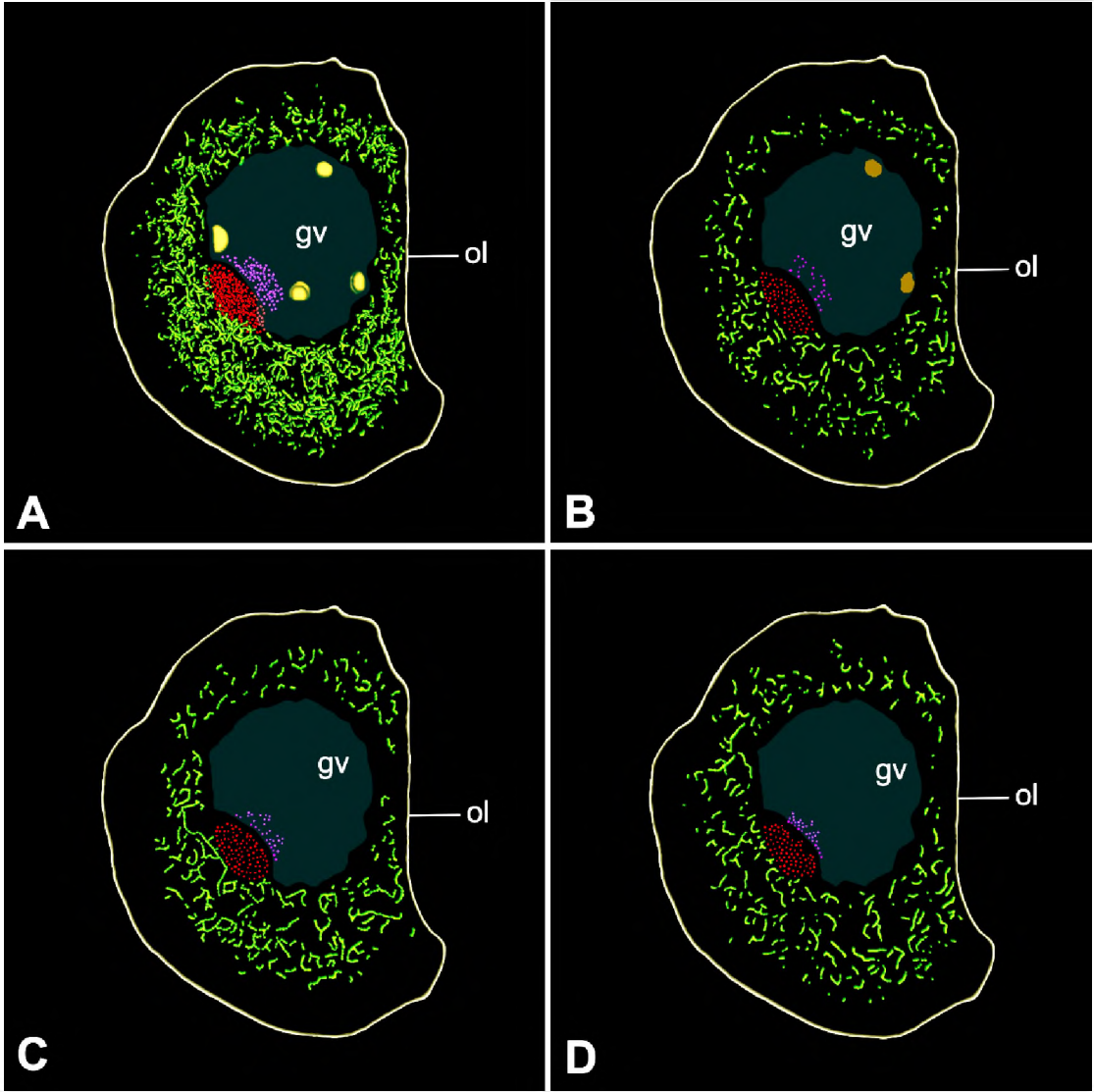


Ryc. 11. *Meconema meridionale*. Sieć mitochondrialna w oocyte wczesno-prewitelogenicznym – rekonstrukcja trójwymiarowej organizacji.

(A) Trójwymiarowa rekonstrukcja organizacji oocytu wczesno-prewitelogenicznego wykonana na podstawie 5 seryjnych skrawków półcienkich barwionych błękitem metylenu; program Fiji ImageJ.

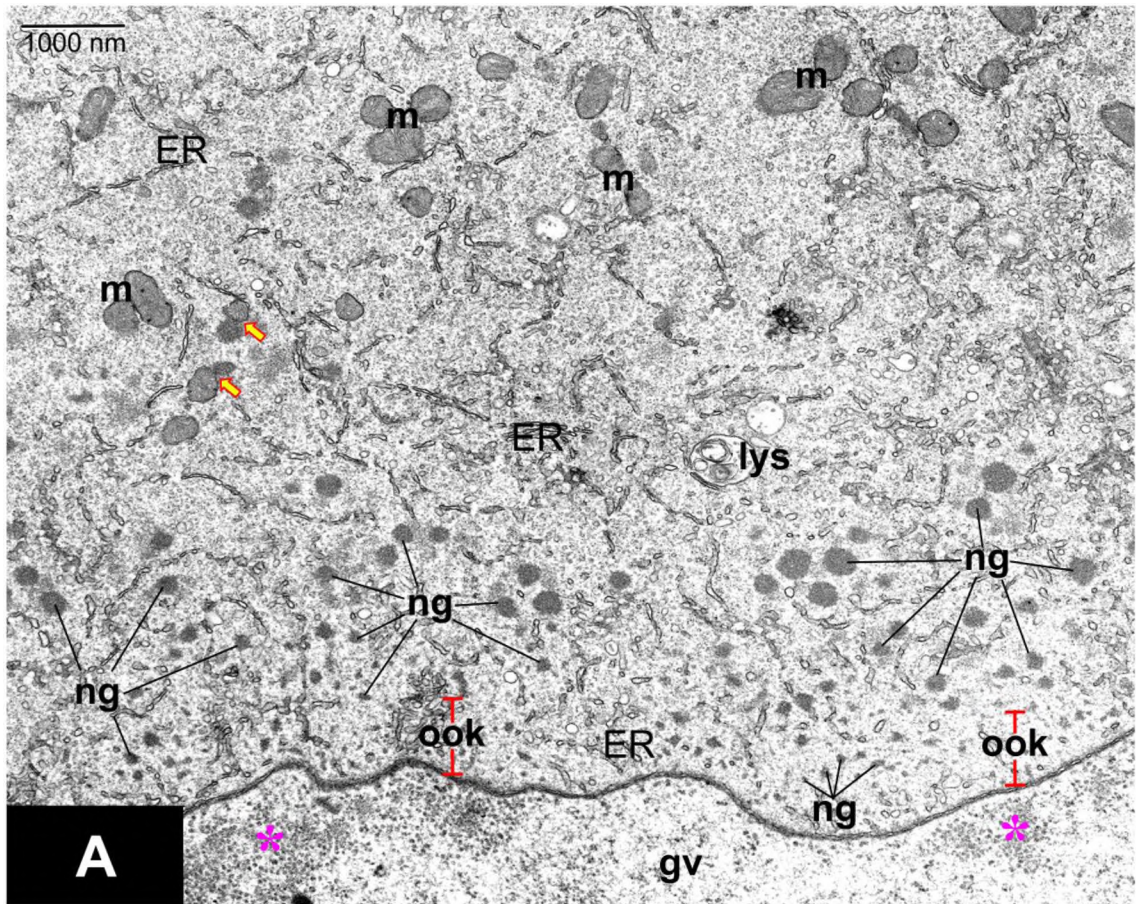
(B-D) Trzy kolejne obrazy wykorzystane do rekonstrukcji A.

Mitochondria (**zielone**) tworzą rozległą i skomplikowaną sieć wypełniającą niemal całą cytoplazmę. Widoczne 2 warstwy ooplazmy pozbawione mitochondriów: warstwa obwodowa (pod błoną cytoplazmatyczną oocytu/oolemmą, **ol**) oraz warstwa okołojądrowa (otaczająca pęcherzyk zarodkowy, **gv**). W zagłębieniu osłonki jądrowej materiał nuage (**czerwony**), wewnątrz pęcherzyka zarodkowego materiał „prenuage” (**kolor magenta**) i jąderka (**żółte**). Na rekonstrukcji A widoczny bezpośredni kontakt mitochondriów ciała Balbianiego i agregatu nuage.



Ryc. 12. *Meconema meridionale*. Ultrastruktura strefy przyjądrowej oocytu wczesno-prewitelogenicznego. Obraz złożony z 3 elektronogramów przy pomocy programu Image Composite Editor (Microsoft).

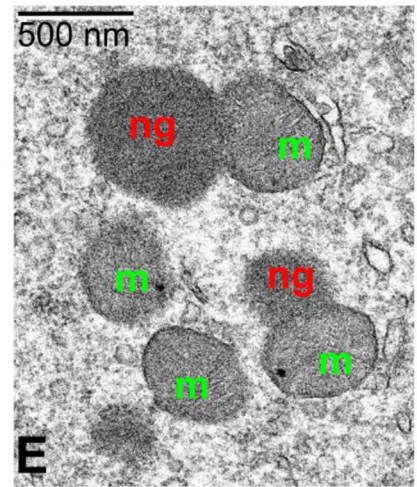
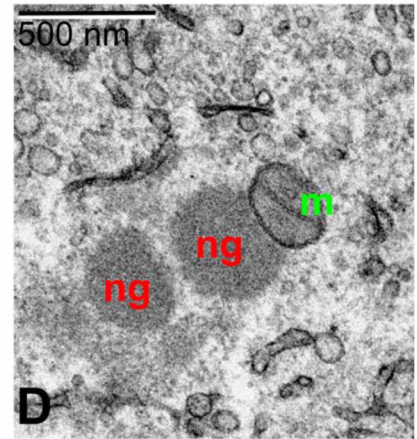
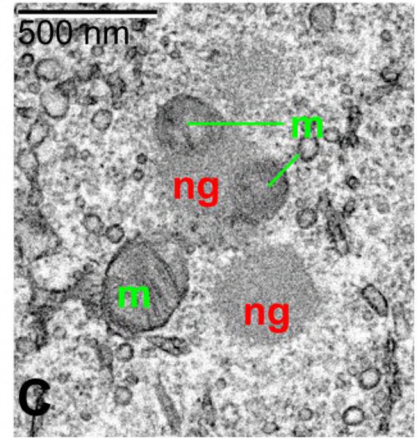
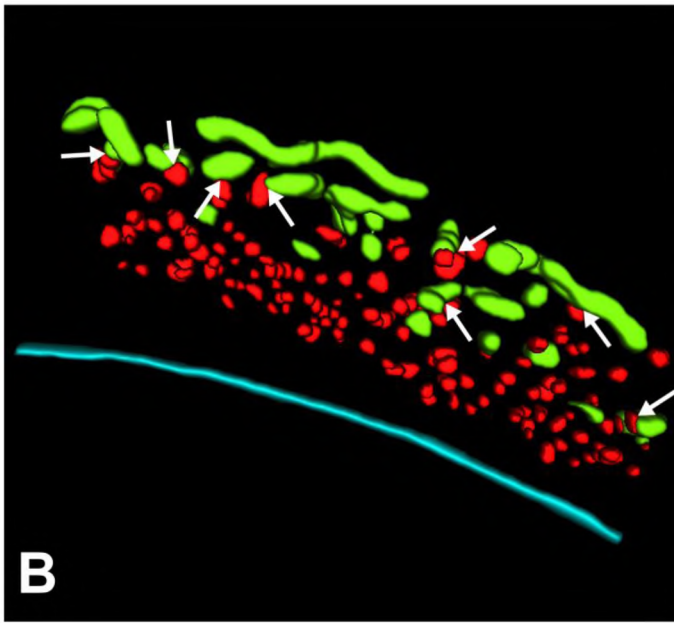
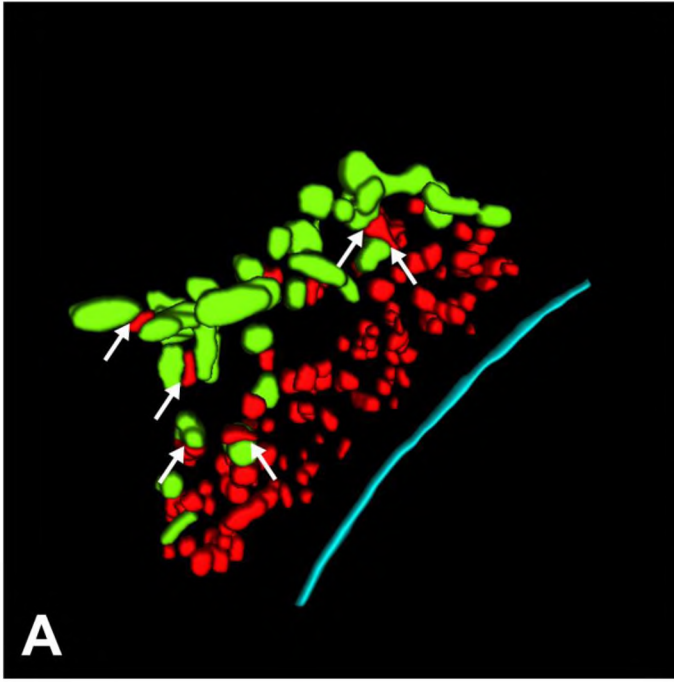
Wokół pęcherzyka zarodkowego (**gv**) widoczna cienka warstwa ooplazmy okołojądrowej (**ook**) zawierająca krótkie elementy siateczki śródplazmatycznej (**ER**) oraz materiał nuage (**ng**). Nieco dalej przyjądrowa strefa ciała Balbianiego zawierająca duże, elektronowo gęste agregaty materiału nuage (**ng**), liczne różnokształtne mitochondria (**m**), struktury lizosomopodobne (**lys**) oraz pęcherzyki i cysterny siateczki śródplazmatycznej (**ER**). Mitochondria w kontakcie z nuage (**żółto-czerwone strzałki**); W nukleoplazmie ziarna materiału „prenuage” (**gwiazdki w kolorze magenta**) o średnicy około 45 nm. Skrawek ultracienki, TEM.



Ryc. 13. *Meconema meridionale*. Strefa kontaktu nuage i mitochondriów w oocycie średnio-prewitelogenicznym.

(A, B) Rekonstrukcje trójwymiarowej organizacji strefy kontaktu wykonane na podstawie 7 (A) i 8 (B) seryjnych skrawków ultracienkich (TEM); program Fiji ImageJ. Nuage (**czerrwony**), mitochondria (**zielone**), osłonka jądrowa (**niebieska**). **Białe strzałki** wskazują mitochondria w bezpośrednim kontakcie z nuage.

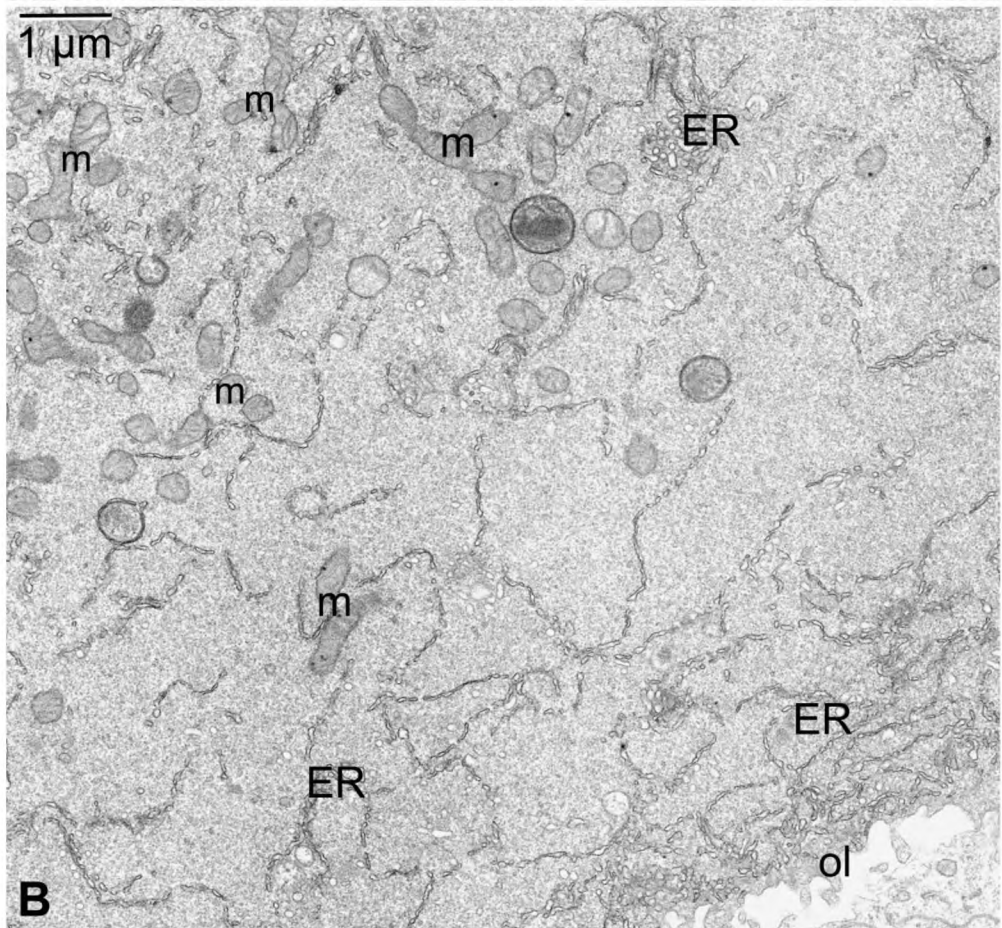
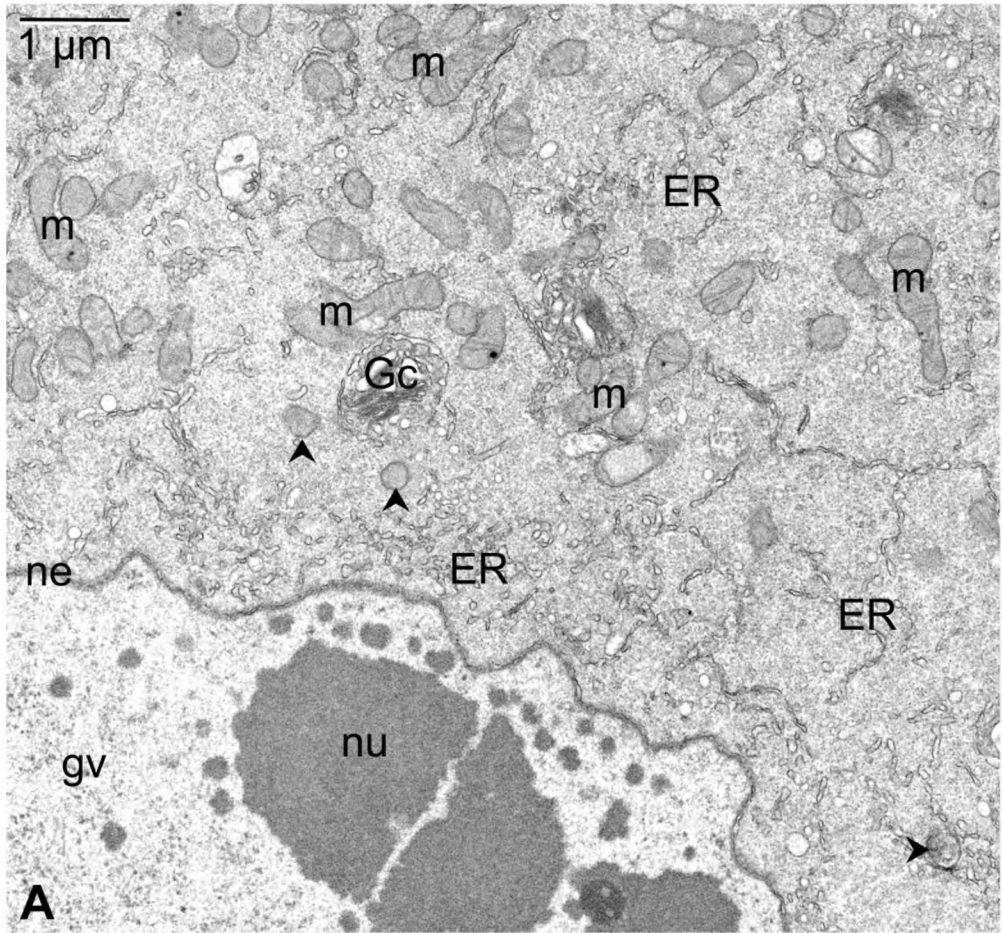
(C-E) Mitochondria (**zielone m**) w bezpośrednim kontakcie z materiałem nuage (**czerrwone ng**). Skrawki ultracienkie, TEM.



Ryc. 14. *Meconema meridionale*. Oocyt wczesno-prewitelogeniczny – ultrastruktura warstwy okołojądrowej i obwodowej ooplazmy.

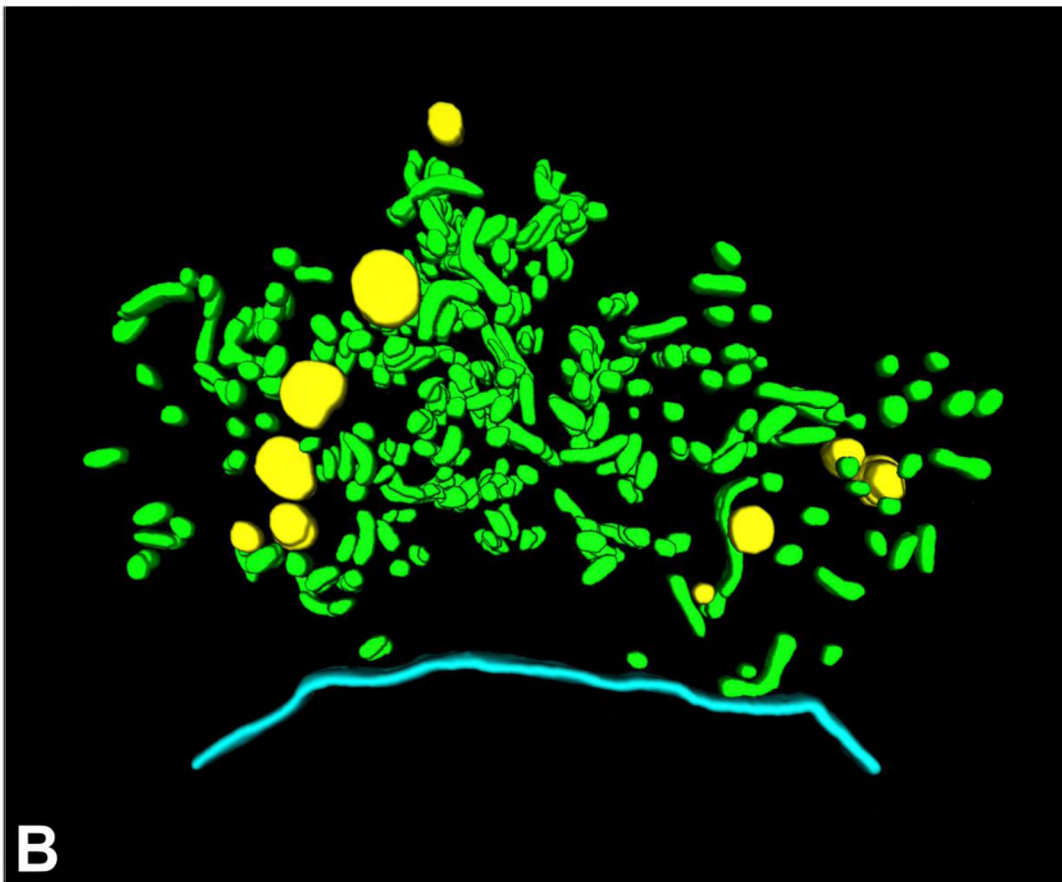
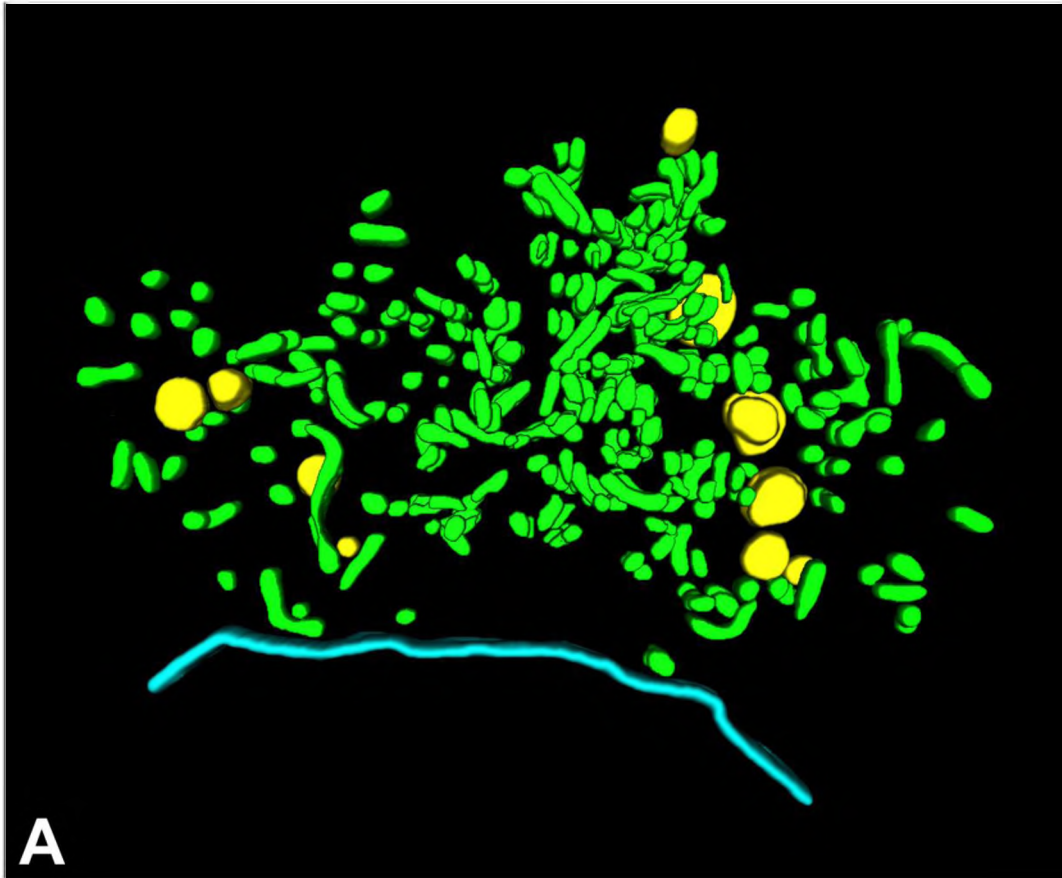
(A) W warstwie okołojądrowej widoczne krótkie cysterny i pęcherzyki siateczki śródplazmatycznej (**RE**) oraz pojedyncze małe mitochondria (**groty strzałek**). Mitochondria (**m**) ciała Balbianiego wyraźnie oddalone od osłonki jądrowej (**ne**); pomiędzy mitochondriami elementy siateczki śródplazmatycznej (**RE**) i kompleksy Golgiego (**Gc**). Wewnątrz pęcherzyka zarodkowego (**gv**) widoczne jąderko (**nu**). Skrawek ultracienki, TEM.

(B) W warstwie obwodowej widoczne wolne rybosomy i długie cysterny siateczki śródplazmatycznej (**RE**). Mitochondria (**m**) ciała Balbianiego wyraźnie oddalone od błony cytoplazmatycznej oocytu (oolemy, **ol**). Skrawek ultracienki, TEM.



Ryc. 15. *Meconema meridionale*. Sieć mitochondrialna w oocycie prewitelogenicznym – rekonstrukcja trójwymiarowej organizacji ooplazmy; „front wiew” (A), „back wiew” (B).

Mitochondria (**zielone**) łączą się tworząc sieć. W sąsiedztwie mitochondriów oddalonych od osłonki jądrowej (**niebieska**) widoczne struktury lizosomopodobne (**żółte**). Rekonstrukcja wykonana na podstawie 7 seryjnych skrawków ultracienkich (TEM), program Fiji ImageJ.



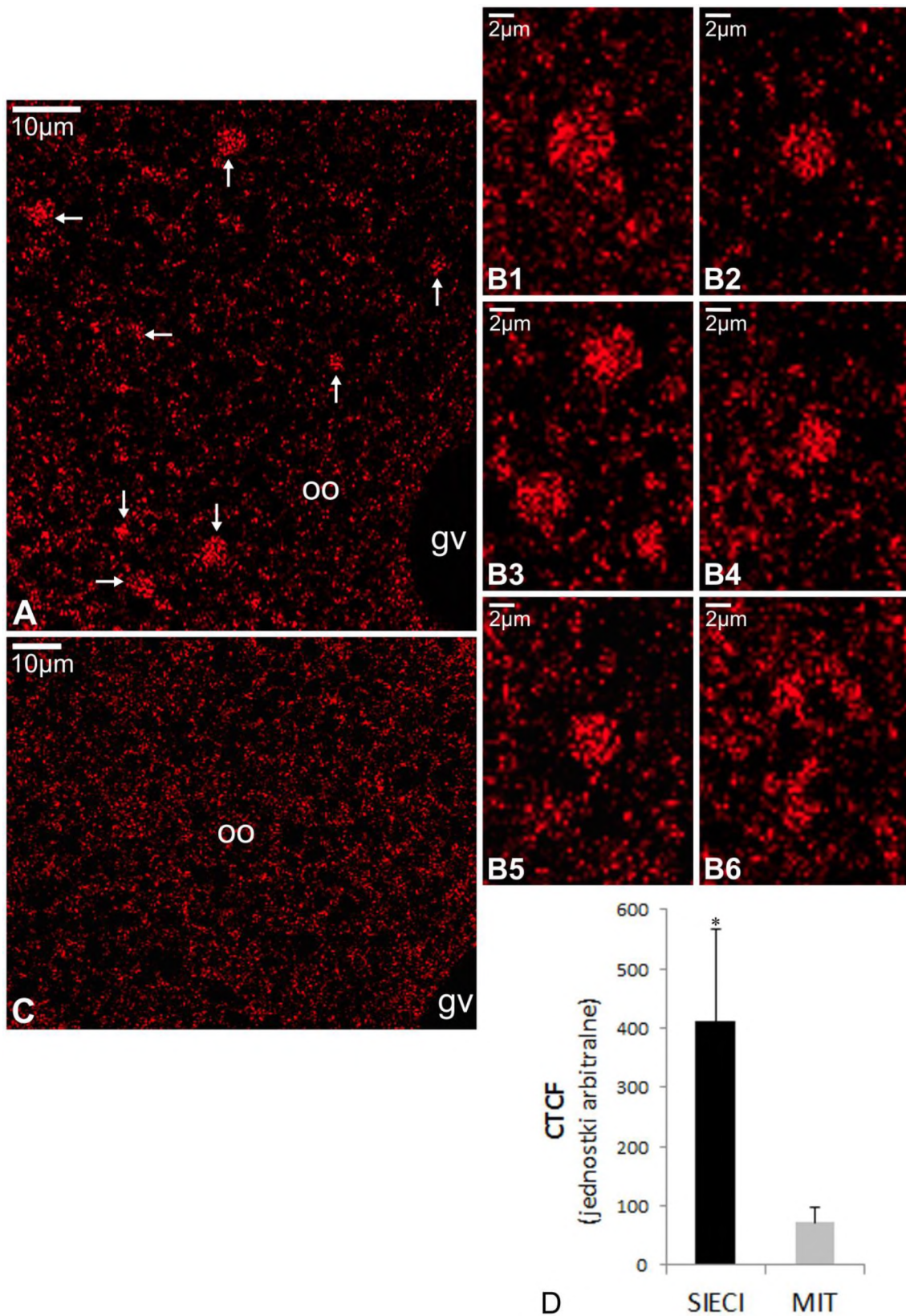
Ryc. 16. *Meconema meridionale*. Aktywność (potencjał błonowy) mitochondriów w oocytach. MitoTracker Deep Red. Mikroskop konfokalny. Oznaczenia: ooplazma (**oo**), pęcherzyk zarodkowy (**gv**).

(A) Oocyt późno-prewitelogeniczny. **Białe strzałki** wskazują niewielkie zgrupowania (mikrosieci) mitochondriów o wyraźnie wyższej aktywności w porównaniu do otaczających je mitochondriów pojedynczych.

(B1-B6) Fragmenty mikrosieci mitochondrialnych o potencjale błonowym wyraźnie wyższym w porównaniu do sąsiadujących mitochondriów pojedynczych (zoom x6).

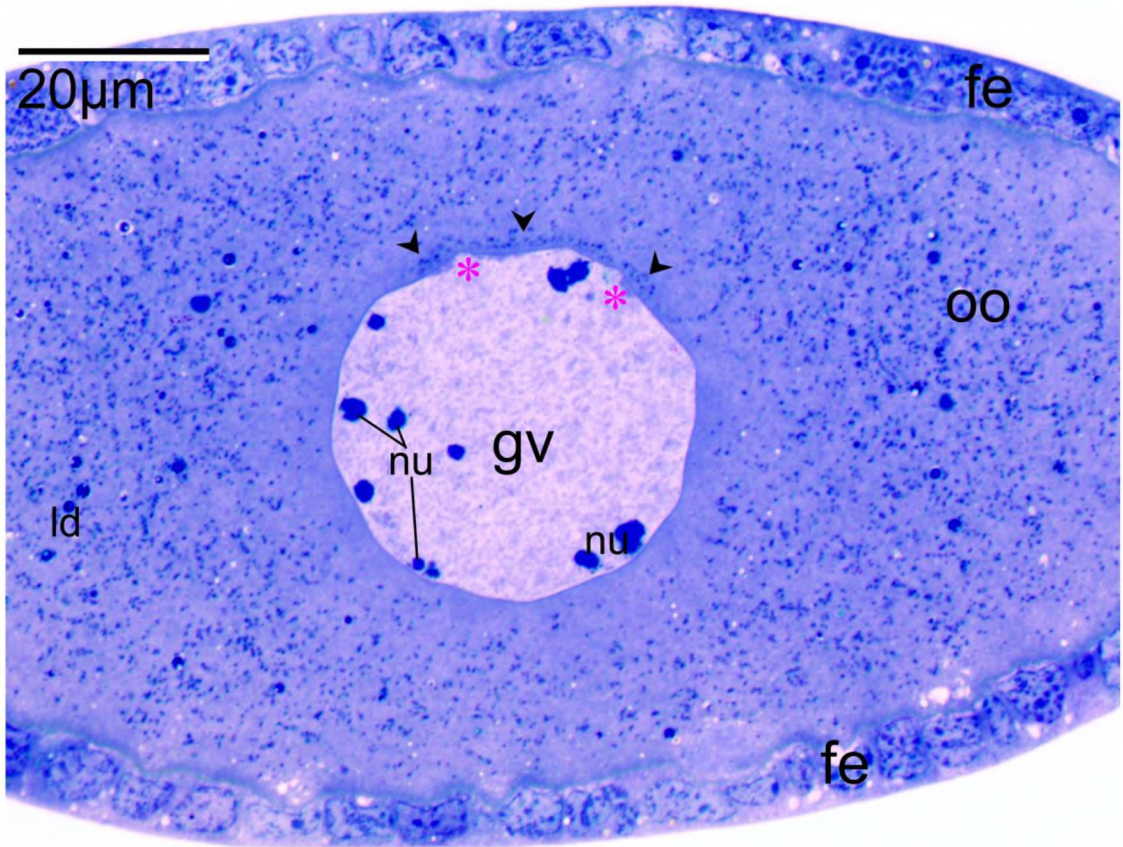
(C) Fragment oocytu wczesno-witelogenicznego. Wszystkie mitochondria wykazują zbliżoną aktywność, brak skupisk mitochondriów (mikrosieci) o wyraźnie wyższej aktywności.

(D) Wyniki ilościowej analizy wyrażone za pomocą skorygowanej fluorescencji całkowitej (CTCF). **SIECI** - mitochondria sieci/mikrosieci mitochondrialnych; **MIT** – pojedyncze mitochondria obserwowane w pobliżu mikrosieci. Poziom istotności statystycznej *P < 0,001. Analiza wykonana na podstawie 8 skrawków.



Ryc. 17. *Meconema meridionale*. Oocyt późno-prewitelogeniczny.

W sąsiedztwie pęcherzyka zarodkowego (**gv**) widoczny spłaszczony i rozciągnięty półksiężyc utworzony przez agregaty materiału nuage (**groty strzałek**). Wewnątrz pęcherzyka zarodkowego pozostałości materiału „penuage” (**gwiazdka w kolorze magenta**) oraz jąderka (**nu**). W ooplazmie (**oo**) względnie równomiernie rozmieszczone izolowane mitochondria (w tej fazie oogenezy sieć mitochondrialna jest już rozproszona) oraz niewielkie krople lipidowe (**ld**). Nabłonek folikularny (**fe**). Skrawek płóciarki barwiony błękitem metylenu, mikroskop świetlny.



Ryc. 18. *Meconema meridionale*. Białka inherentnie nieuporządkowane w oocytach prewitelogenicznych. Test PROTEOSTAT *Protein Aggregation Assay*. Mikroskop konfokalny.

(A) Oocyt wczesno-prewitelogeniczny. PROTEOSTAT pozytywna ooplazma widoczna w bezpośrednim sąsiedztwie pęcherzyka zarodkowego (**gv**).

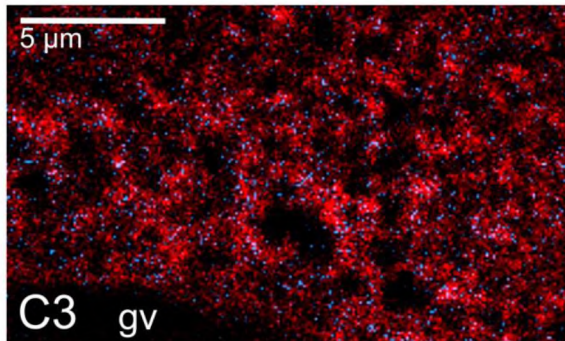
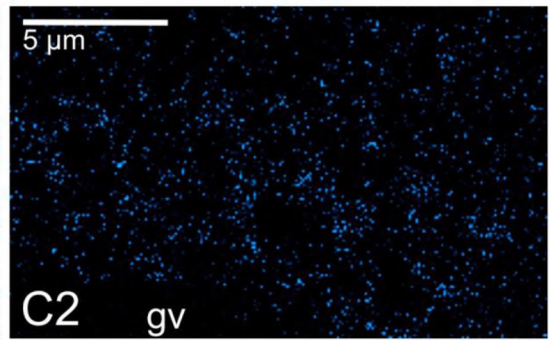
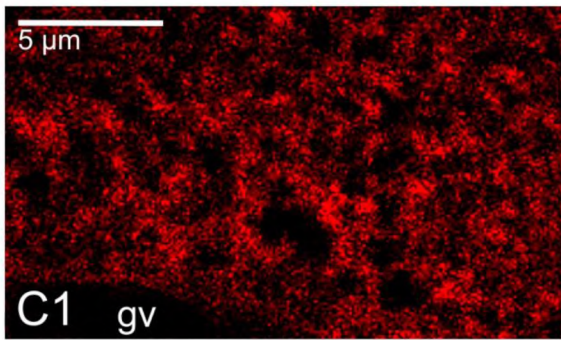
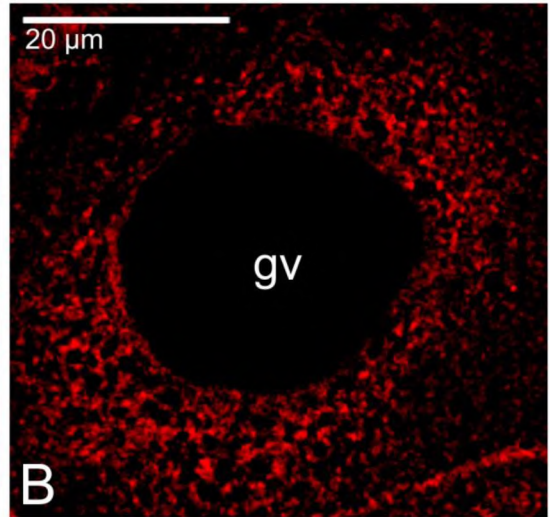
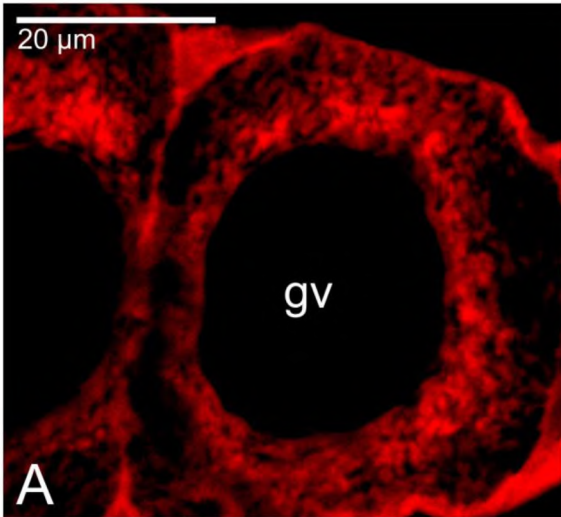
(B) Oocyt średnio-prewitelogeniczny. Obszar PROTEOSTAT pozytywnej ooplazmy większy w porównaniu do oocytu wczesno-prewitelogenicznego.

(C) Fragment oocytu średnio-prewitelogenicznego (zoom x5).

(C1) Test PROTEOSTAT (czerwony).

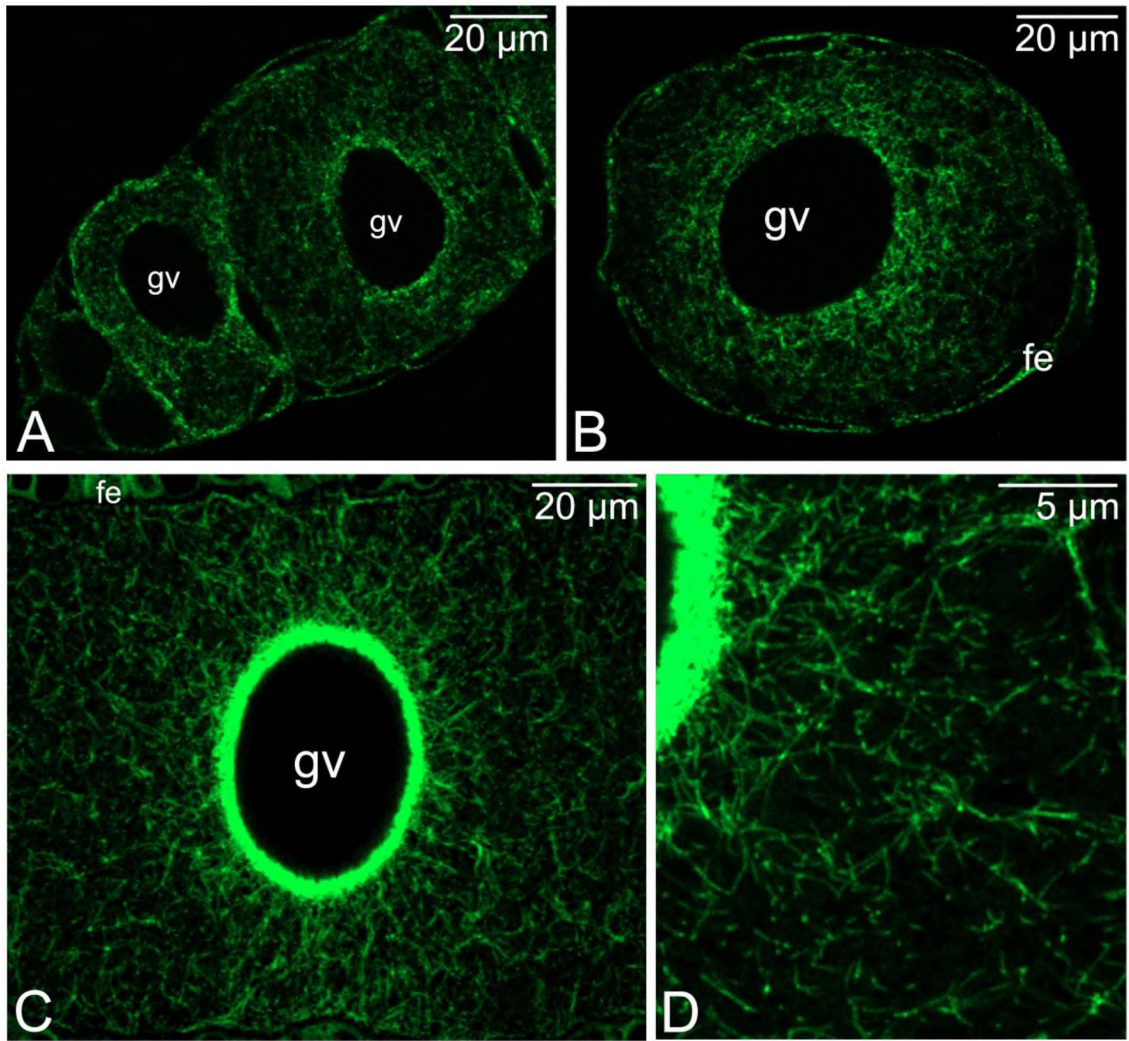
(C2) Znakowanie mtDNA (DAPI, niebieski).

(C3) Kolokalizacja rejonów PROTEOSTAT pozytywnych (obszary czerwone) i mtDNA (niebieskie foci).



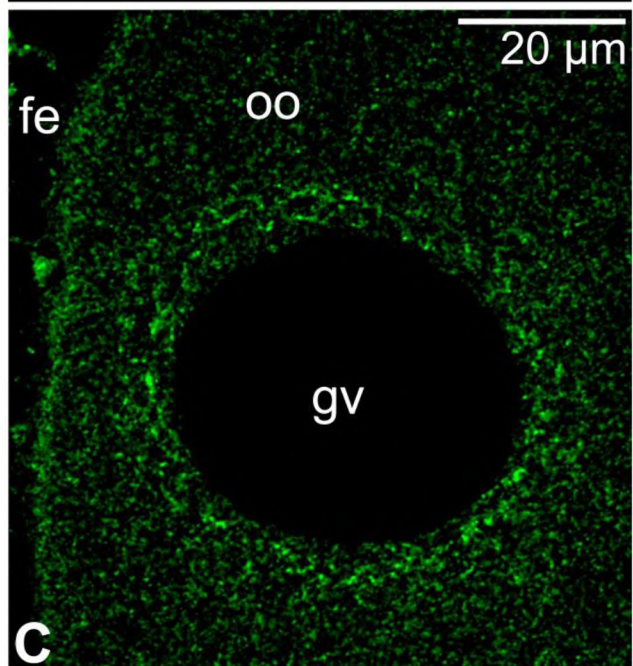
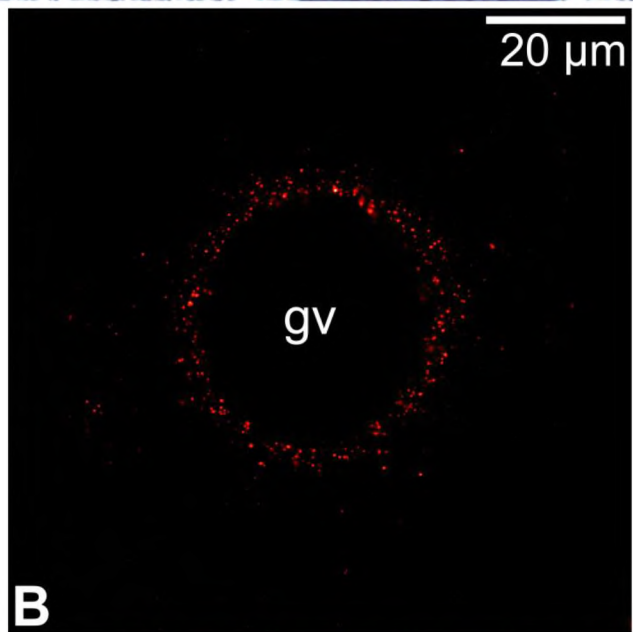
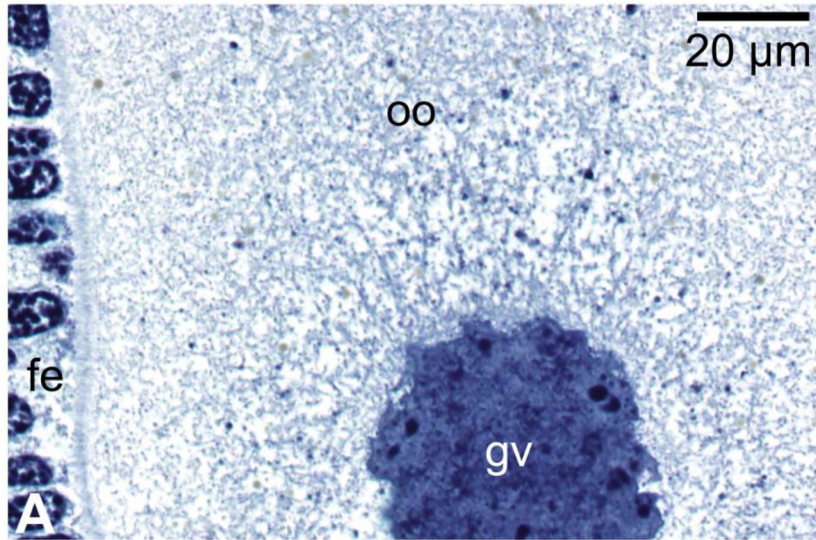
Ryc. 19. *Meconema meridionale*. Rozmieszczenie mikrotubul w oocytach – immunofluorescencyjna lokalizacja α -tubuliny (Alexa Fluor, kolor zielony). Mikroskop konfokalny. Oznaczenia: nabłonek foliularny (**fe**) pęcherzyk zarodkowy (**gv**).

- (A) W oocytach mejotycznych i zlokalizowanych tuż pod germarium oocytach wczesno-prewitelogenicznych nieliczne mikrotubule rozmieszczone są w ooplazmie względnie równomiernie.
- (B) Oocyt wczesno-prewitelogeniczny; wstępna faza tworzenia pierścienia mikrotubul wokół pęcherzyka zarodkowego.
- (C) Oocyt późno-prewitelogeniczny. Widoczny pierścień mikrotubul otaczający pęcherzyk zarodkowy oraz promieniście (w stosunku do pęcherzyka zarodkowego) przebiegające mikrotubule cytoplazmy obwodowej.
- (D) Fragment pierścienia okołojądrowego oraz mikrotubule cytoplazmy obwodowej w oocycie późno-prewitelogenicznym (zoom x3).



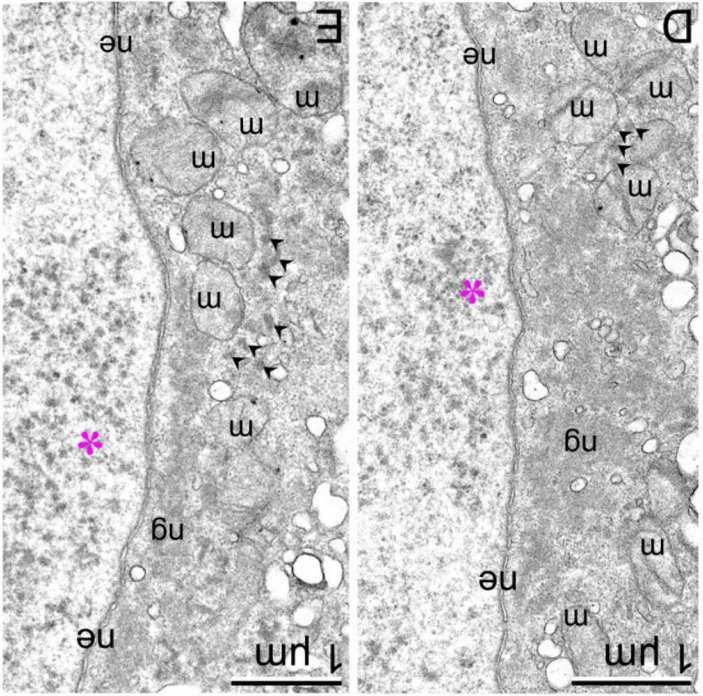
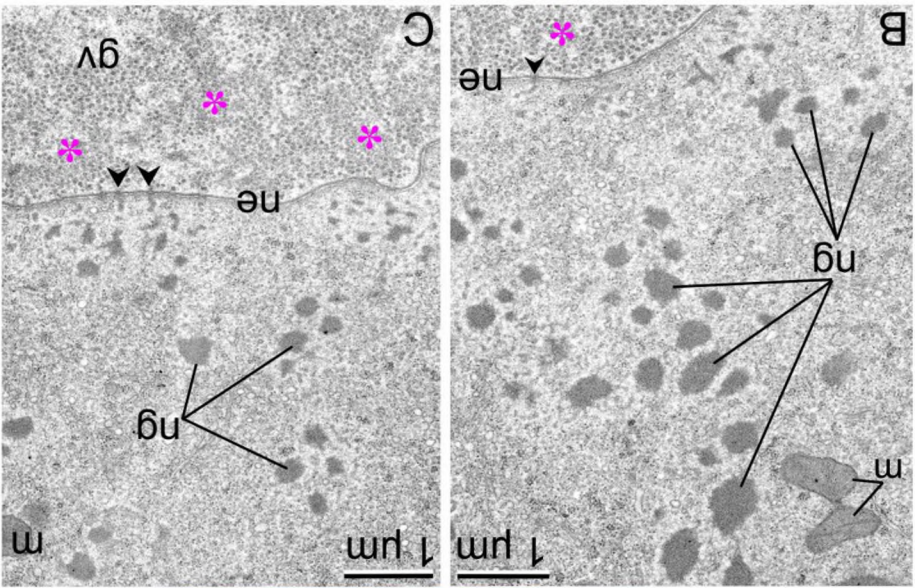
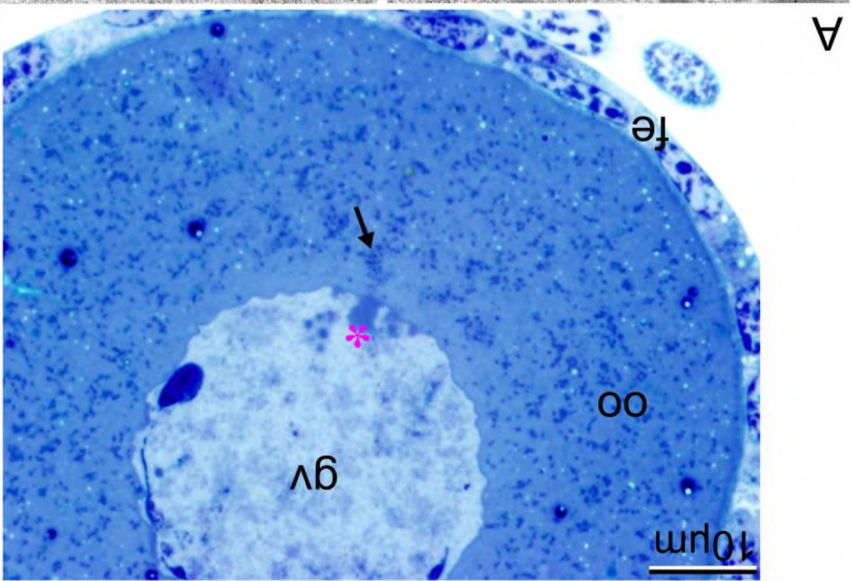
Ryc. 20. *Meconema meridionale*. Mikrotubule w oocytach prewitelogenicznych c.d.
Oznaczenia: nabłonek folikularny (**fe**), pęcherzyk zarodkowy (**gv**), ooplazma (**oo**).

- (A)** Ekstrakcja cytoplazmy za pomocą Tritonu X-100. Widoczne zagęszczenie elementów cytoszkieletu wokół pęcherzyka zarodkowego oraz promieniście (w stosunku do pęcherzyka zarodkowego) przebiegające mikrotubule cytoplazmy obwodowej. Skrawek półcienki barwiony błękitem metylenu, mikroskop świetlny.
- (B)** Immunofluorescencyjna lokalizacja miejsc poliglutamylacji tubuliny w oocycie prewitelogenicznym. Poliglutamylacji (Cy3, kolor czerwony) podlegają głównie mikrotubule pierścienia otaczającego pęcherzyk zarodkowy i w niewielkim stopniu mikrotubule obwodowe. Mikroskop konfokalny.
- (C)** Immunofluorescencyjna lokalizacja α -tubuliny (Alexa Fluor, kolor zielony) w oocycie prewitelogenicznym po 24 godzinnej inkubacji z kolchicyną. Widoczne pozostałości pierścienia mikrotubularnego otaczającego pęcherzyk zarodkowy, mikrotubule ooplazmy obwodowej niewidoczne. Mikroskop konfokalny.



Ryc. 21. *Meconema meridionale*. Organizacja ciała Balbianiego w oocytach prewitelogenicznych traktowanych kolchicyną i 1,6-hexanediolem.

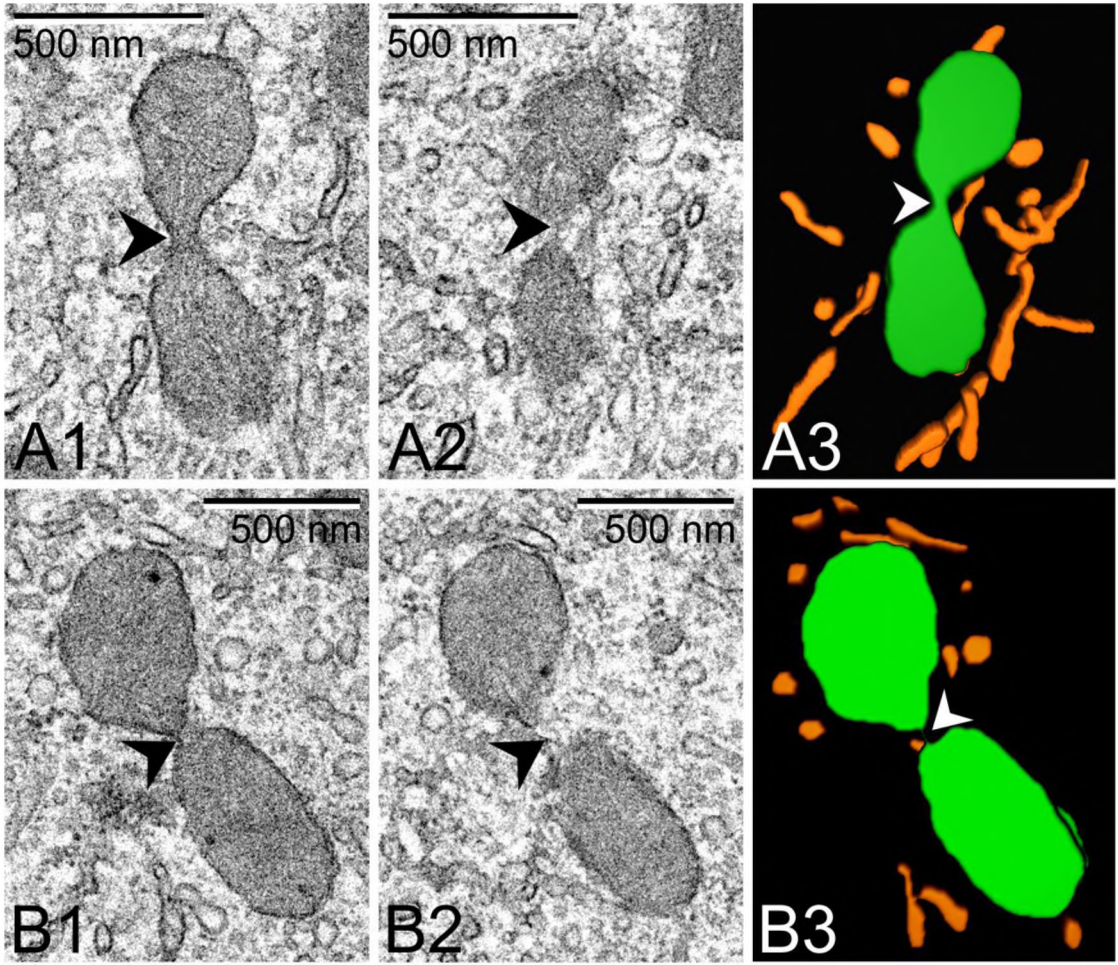
- (A)** Oocyt prewitelogeniczny inkubowany w medium Grace'e z dodatkiem kolchicyny. Wewnątrz pęcherzyka zarodkowego (**gv**) widoczny materiał „penuage” (**gwiazdka w kolorze magenta**). Cytoplazmatyczne agregaty materiału nuage nie przylegają do otoczki jądrowej – można je dostrzec w pewnej odległości od tej otoczki (**strzałka**). Nabłonek foliularny (**fe**), ooplazma (**oo**). Skrawek półcienki barwiony błękitem metylenu, mikroskop świetlny.
- (B i C)** Oocyt prewitelogeniczny inkubowany w medium Grace'e z dodatkiem kolchicyny. Różnokształtne agregaty elektronowo gęstego materiału nuage (**ng**) oddalone od pęcherzyka zarodkowego (**gv**). W ooplazmie pojedyncze mitochondria (**m**), w nukleoplazmie liczne sferyczne ziarna „penuage” (**gwiazdki w kolorze magenta**) o średnicy 45-50 nm. **Groty strzałek** wskazują miejsca translokacji materiału „penuage” przez kompleksy porów osłonki jądrowej (**ne**). Skrawki ultracienkie, TEM.
- (D i E)** Oocyt prewitelogeniczny traktowany kolejno kolchicyną i 1,6-hexanediolem. Agregaty materiału nuage o zredukowanej gęstości (**ng**) przy osłonce jądrowej (**ne**), w pobliżu mitochondriów (**m**) niewielkie w przybliżeniu sferyczne ziarna nuage (**groty strzałek**). Widoczne też mitochondria zlokalizowane w bezpośrednim sąsiedztwie otoczki jądrowej, brak okołojądrowej warstwy ooplazmy pozbawionej mitochondriów. W nukleoplazmie ziarna penuage (**gwiazdka w kolorze magenta**). Skrawki ultracienkie, TEM.



Ryc. 22. *Meconema meridionale*. Reprezentatywne obrazy przewężonych (dzielących się) mitochondriów ciała Balbianiego.

(A1-A2 i B1-B2) Przewężone mitochondria na dwóch kolejnych skrawkach seryjnych. **Groty strzałek** wskazują przewężenie mitochondrium. W pobliżu mitochondriów liczne pęcherzyki/cysterny siateczki śródplazmatycznej. Skrawki ultracienkie, TEM.

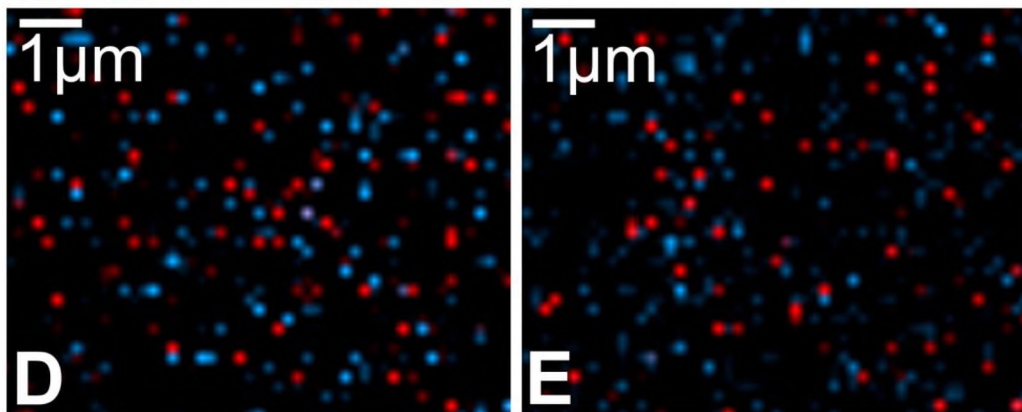
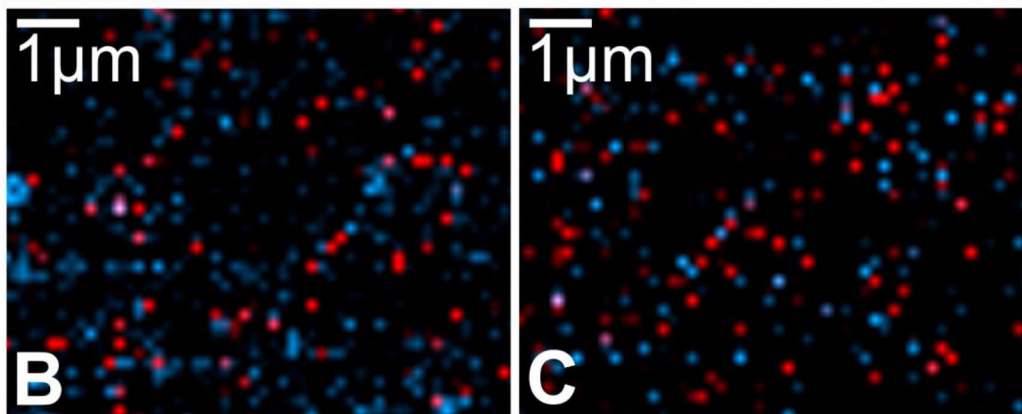
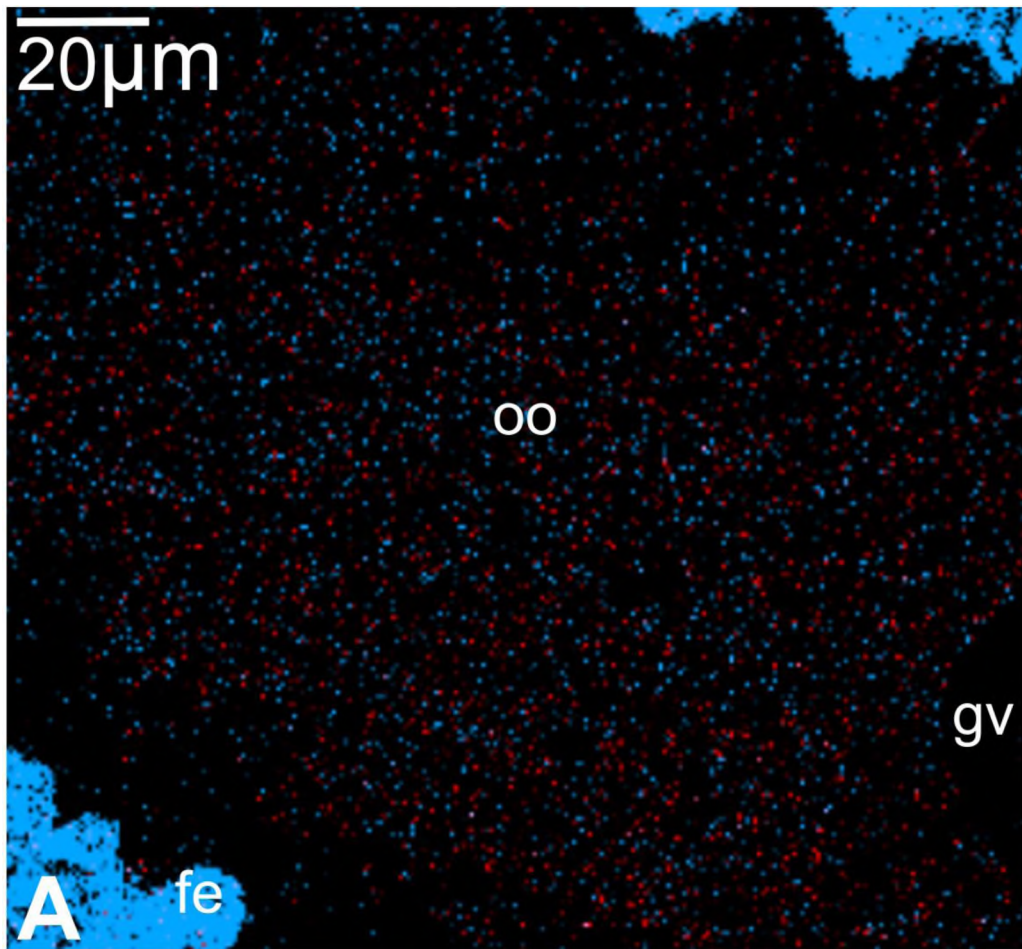
(A3 i B3) Rekonstrukcje trójwymiarowe dzielących się mitochondriów (**zielone**) wykonane na podstawie mikrofotografii (A1-2) i (B1-2). **Groty strzałek** wskazują przewężenie mitochondrium. W sąsiedztwie dzielących się mitochondriów cysterny i/lub pęcherzyki siateczki śródplazmatycznej (**pomarańczowe**). Program Fiji ImageJ.



Ryc. 23. *Meconema meridionale*. Immunofluorescencyjna lokalizacja analogu tymidyny: 2,5-bromo-2'-deoksyurydyny (BrdU) w oocyte prewitelogenicznym. Mikroskop konfokalny. Oznaczenia: nabłonek foliularny (**fe**), ooplazma (**oo**), pęcherzyk zarodkowy (**gv**).

(A) Fragment oocytu – kolokalizacja miejsc wbudowania BrdU (FITC, czerwony/pseudokolor) i DNA mitochondrialnego (mtDNA) (DAPI, niebieski) potwierdza inkorporację BrdU do mtDNA.

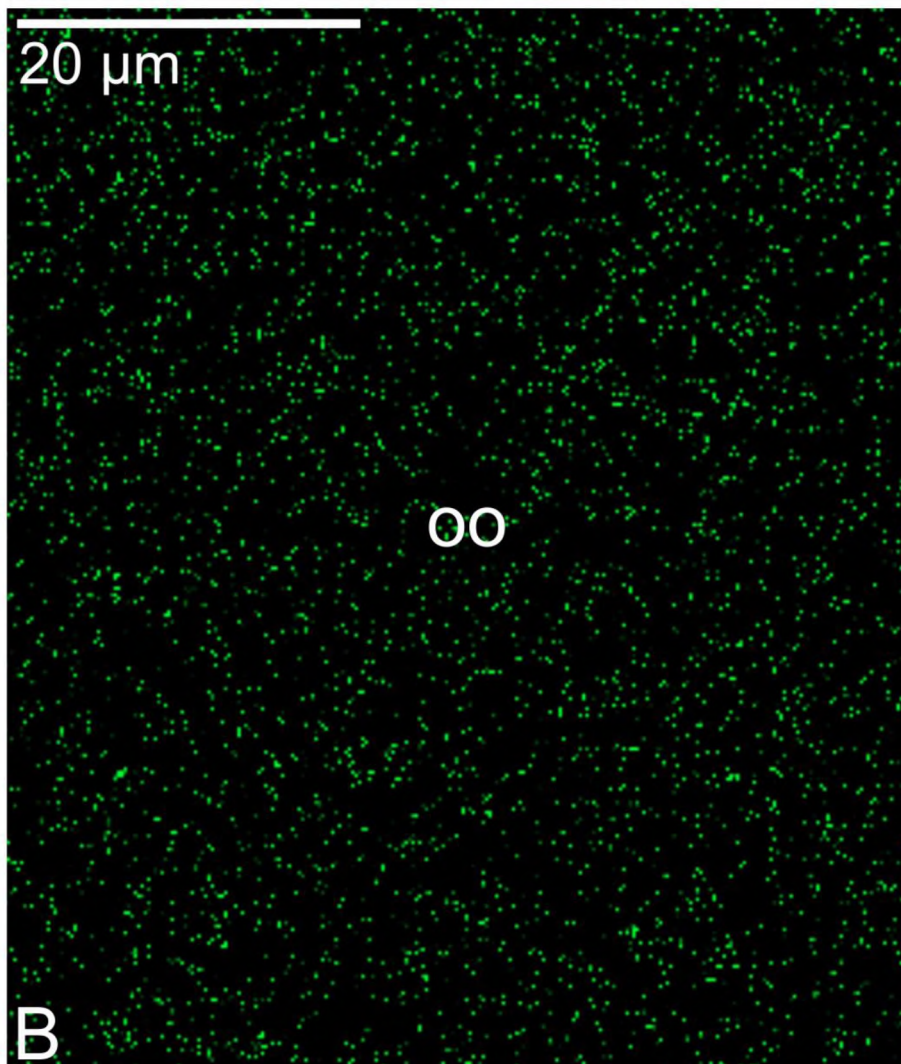
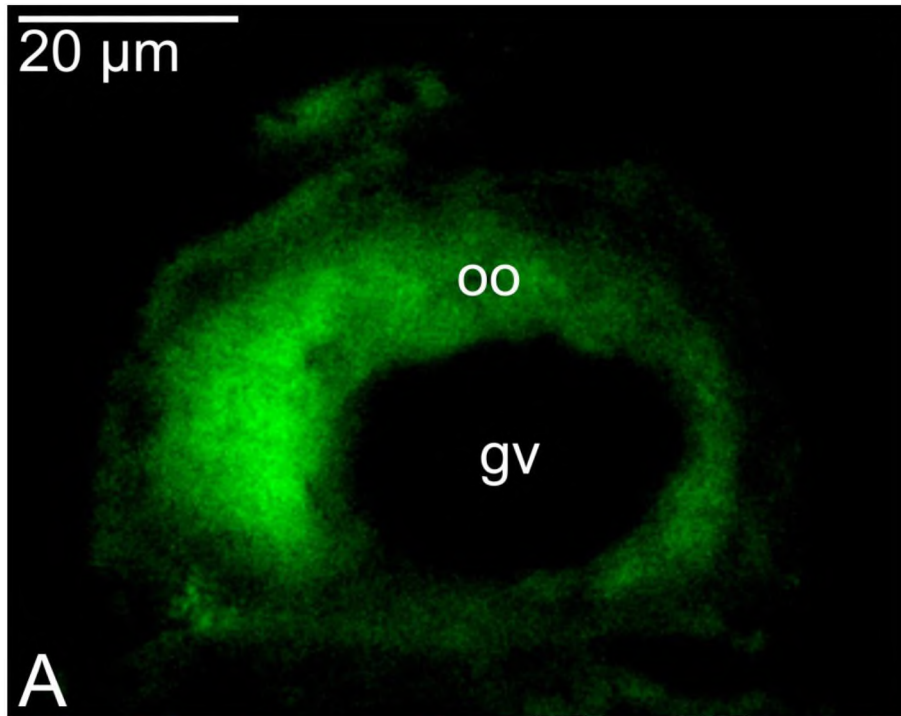
(B-E) Kolokalizacja foci BrdU pozytywnych i mtDNA (zoom x6). Widoczne „łańcuszki” na przemian ułożonych lub sąsiadujących ze sobą foci BrdU pozytywnych (czerwony) i DAPI pozytywnych (niebieski). Mikroskop konfokalny.



Ryc. 24. *Meconema meridionale*. Immunofluorescencyjna lokalizacja białka Drp1 w ooplazmie (Alexa Fluor, zielony). Oznaczenia: pęcherzyk zarodkowy (**gv**), ooplazma (**oo**).

(A) Lokalizacja Drp1 w oocycie wczesno-prewitelogenicznym. Widoczne dyfuzyjne zabarwienie całej ooplazmy. Mikroskop epifluorescencyjny.

(B) Lokalizacja Drp1 w oocycie późno-prewitelogenicznym – Drp1 pozytywne foci rozmieszczone równomiernie w całej ooplazmie. Mikroskop konfokalny.

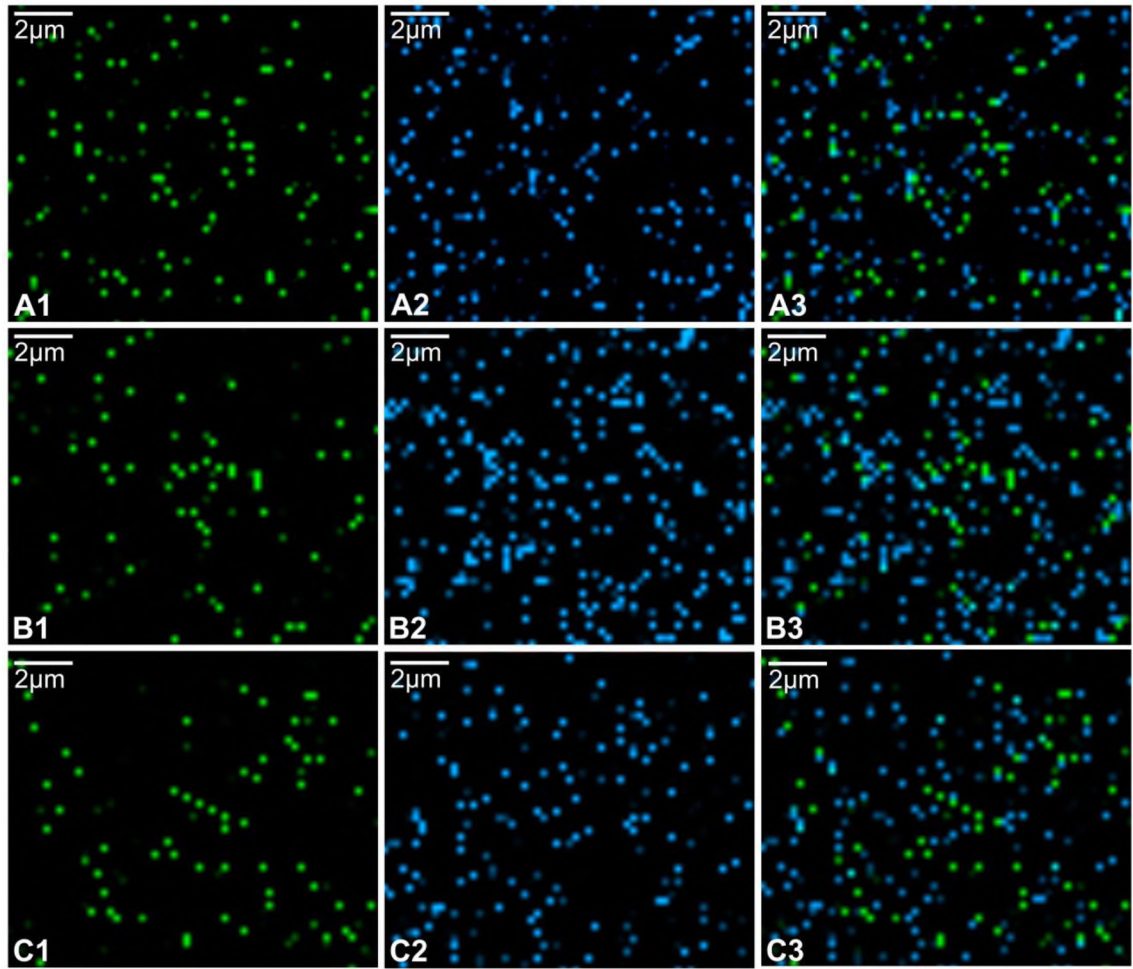


Ryc. 25. *Meconema meridionale*. Immunofluorescencyjna lokalizacja białka Drp1 w oocytach późno-prewitelogenicznych c.d. Kolokalizacja foci Drp1 pozytywnych i mitochondrialnego DNA (mtDNA) (zoom x6). Mikroskop konfokalny.

(A1-C1) Immunolokalizacja białka Drp1 (Alexa Fluor, zielony).

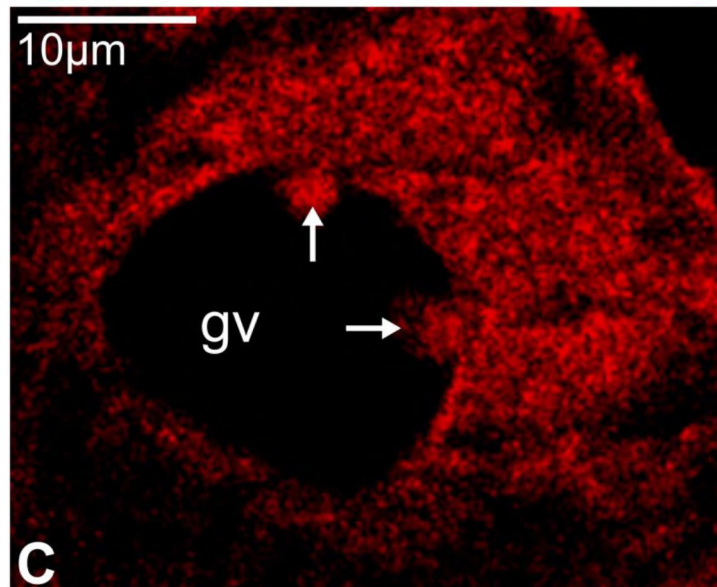
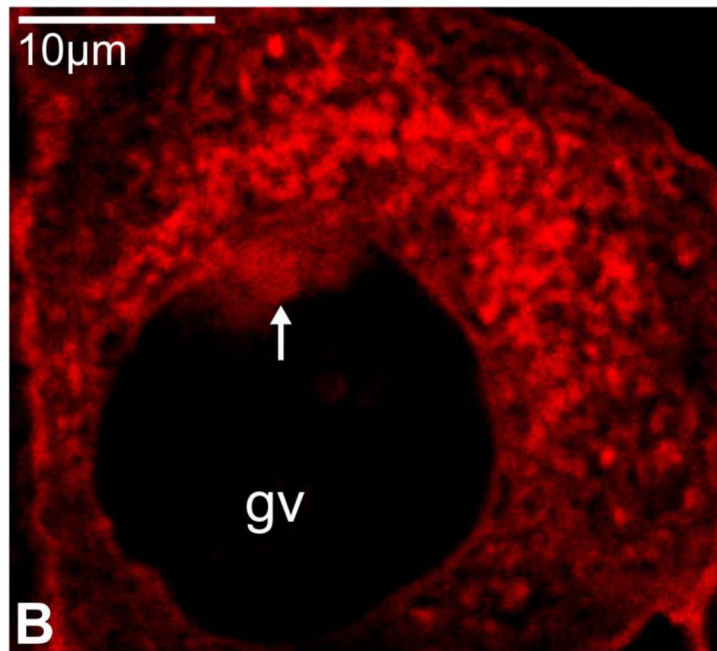
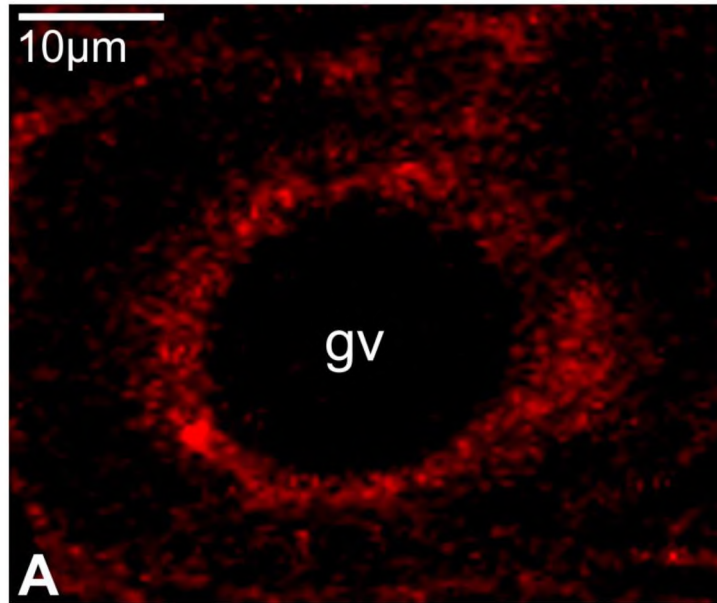
(A2-C2) Znakowanie mtDNA (DAPI, niebieski).

(A3-C3) Kolokalizacja białka Drp1 (Alexa Fluor, zielony) i mtDNA (DAPI, niebieski).



Ryc. 26. *Meconema meridionale*. Rozmieszczenie Drp1 mRNA (Cy5, czerwony) w oocytach wczesno-prewitelogenicznych. Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*. Mikroskop konfokalny.

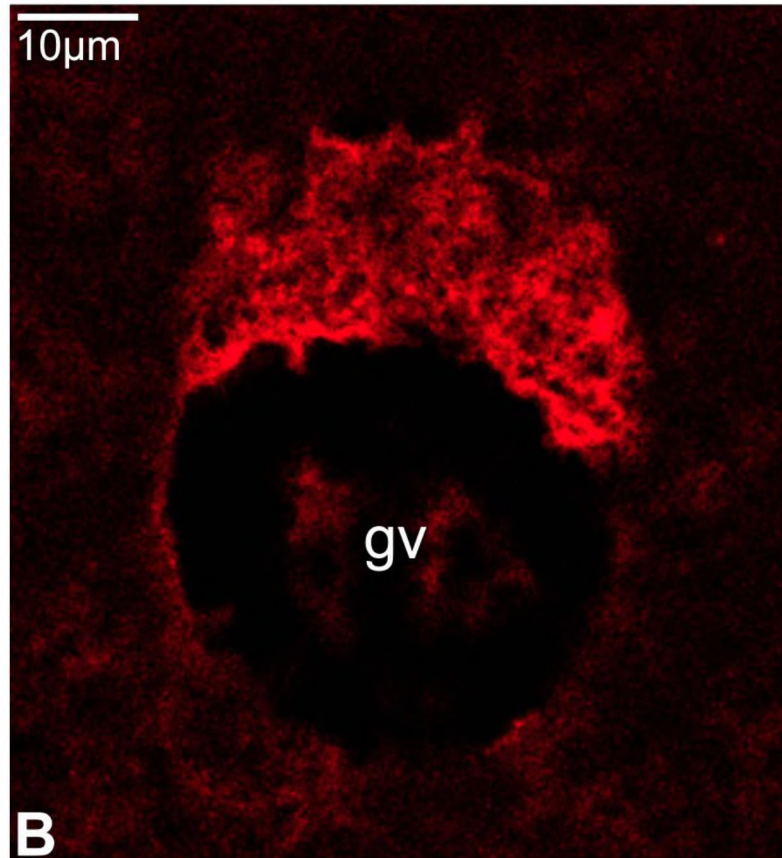
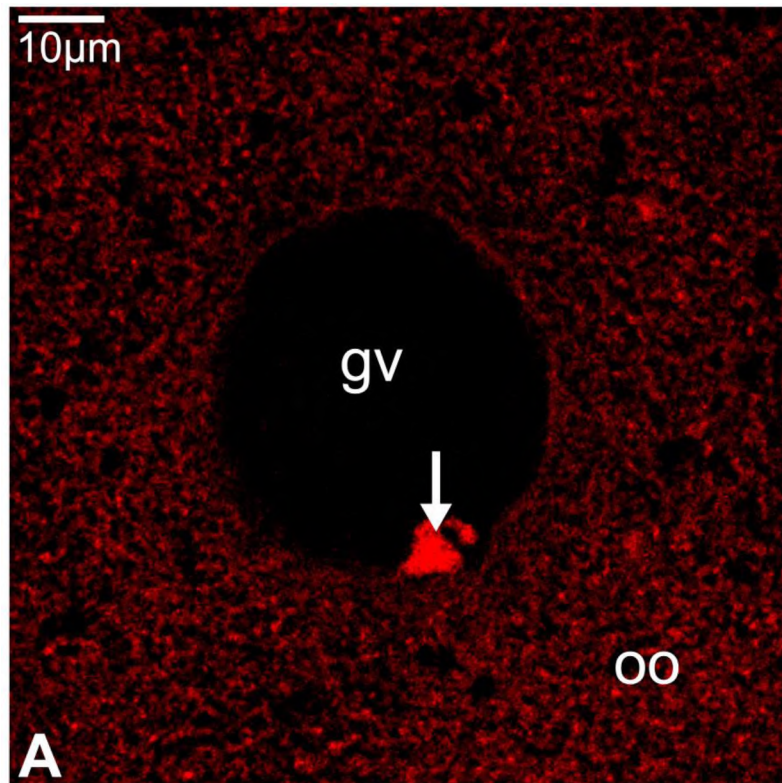
- (A) Oocyt kontrolny (początkowe stadium wczesnej prewitelogenezy). Drp1 mRNA gromadzi się w ooplazmie wokół całego obwodu pęcherzyka zarodkowego (**gv**).
- (B) W nieco starszych oocytach prewitelogenicznych, cząsteczki Drp1 mRNA zlokalizowane są asymetrycznie – na jednym z biegunów pęcherzyka zarodkowego. Badany typ mRNA występuje również w nukleoplazmie – w akumulacji ziaren „prenuage” (**strzałka**) w pobliżu osłonki jądrowej.
- (C) Inkubacja z kolchicyną nie wpływa na rozmieszczenie Drp1 mRNA w oocycie wczesno-prewitelogenicznym. Podobnie jak w oocycie kontrolnym (B) cząsteczki Drp1 mRNA zlokalizowane są asymetrycznie na jednym z biegunów pęcherzyka zarodkowego oraz w nukleoplazmie w obrębie akumulacji materiału „prenuage” (**strzałki**).



Ryc. 27. *Meconema meridionale*. Rozmieszczenie Drp1 mRNA (Cy5, czerwony) w oocytach późno-prewitelogenicznych. Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*. Mikroskop konfokalny. Ooplazma (**oo**), pęcherzyk zarodkowy (**gv**).

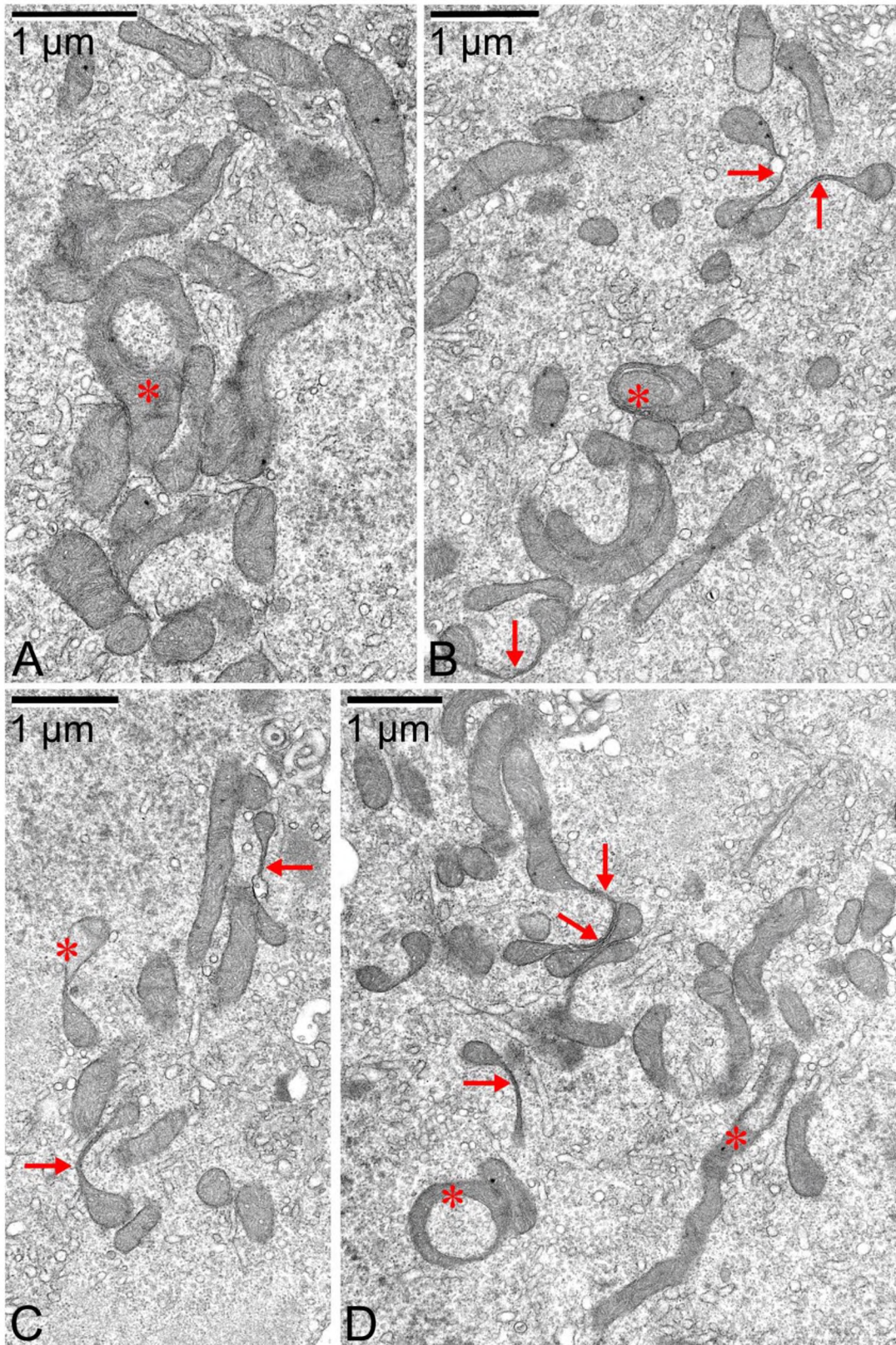
(A) Oocyt kontrolny. Cząsteczki Drp1 mRNA rozmieszczone są w całej ooplazmie względnie równomiernie. Badany typ mRNA występuje również w nukleoplazmie – w akumulacji ziaren „penuage” (**strzałka**) w pobliżu osłonki jądrowej. Nie zaobserwowano zwiększonej liczby cząsteczek Drp1 mRNA w rejonie przyjądrowym, w którym występują cytoplazmatyczne agregaty materiału nuage.

(B) Oocyt po inkubacji z kolchicyną. W rezultacie wywołanego przez kolchicynę rozpadu mikrotubul, cząsteczki Drp1 mRNA gromadzą się na jednym z biegunów pęcherzyka zarodkowego, prawdopodobnie w rejonie występowania agregatu materiału nuage.



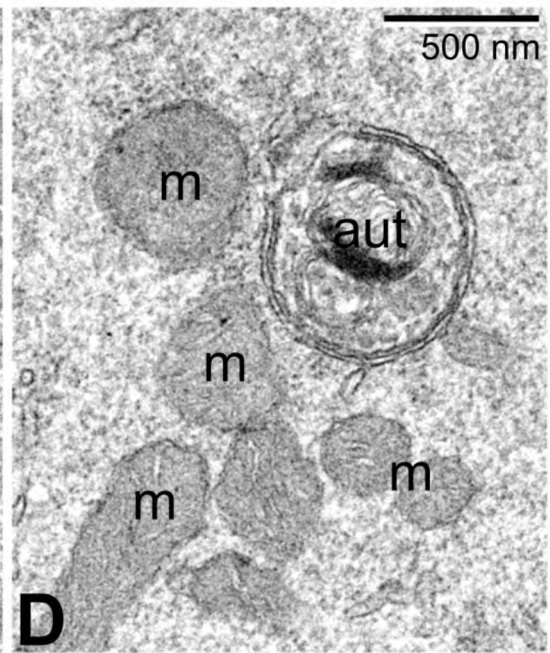
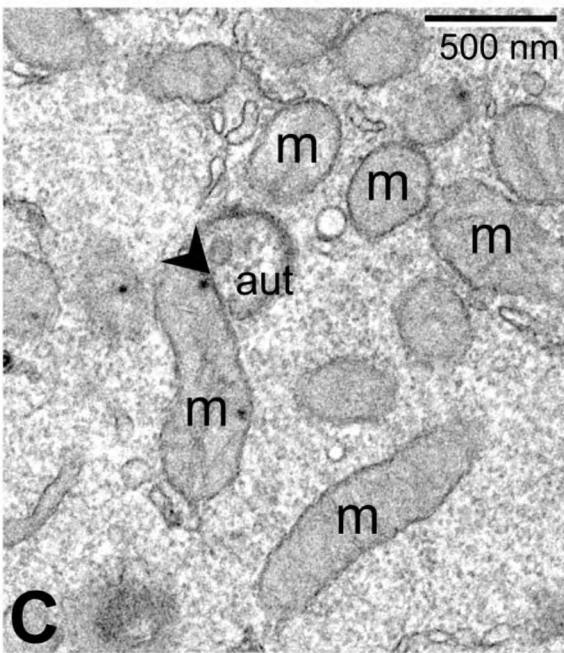
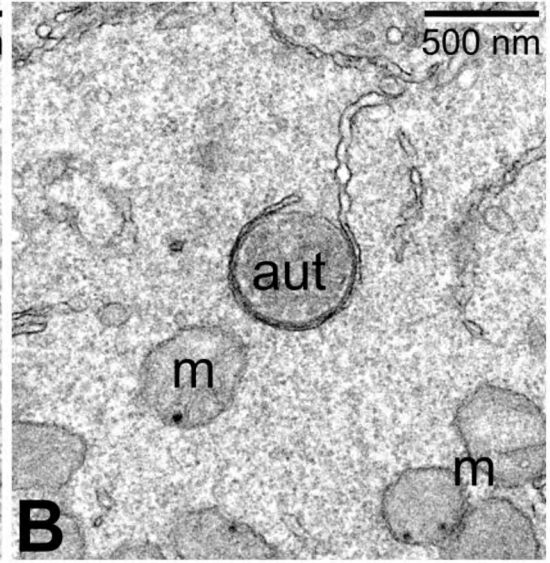
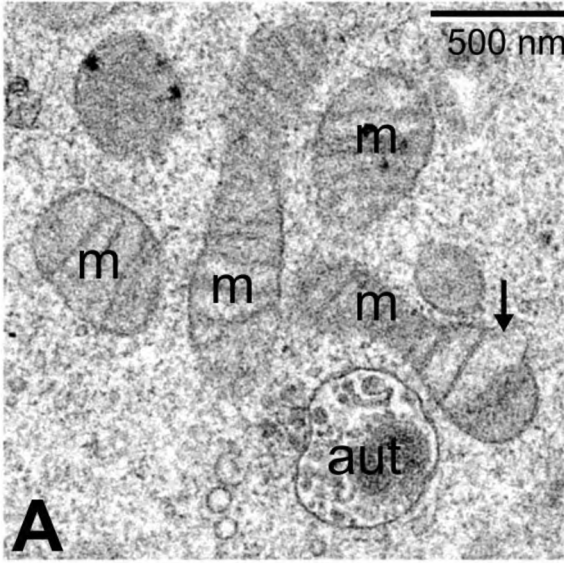
Ryc. 28. *Meconema meridionale*. Mitochondria ciała Balbianiego w oocytach prewitelogenicznych inkubowanych w medium Grace'a dodatkiem cytochalazyny B. Skrawki ultracienkie, TEM.

(**A-D**)Eksperyment z cytochalazyną B ujawnił, że w oocytach, w których zahamowano polimeryzację aktyny wiele mitochondriów jest zmienionych morfologicznie (**gwiazdki**) a także nietypowo przewężonych (**czerwone strzałki**) i wydłużonych. Przewężenia mitochondriów w oocytach poddanych działaniu cytochalazyny B są znacznie dłuższe niż te obserwowane w oocytach kontrolnych (por. z Ryc. 22).



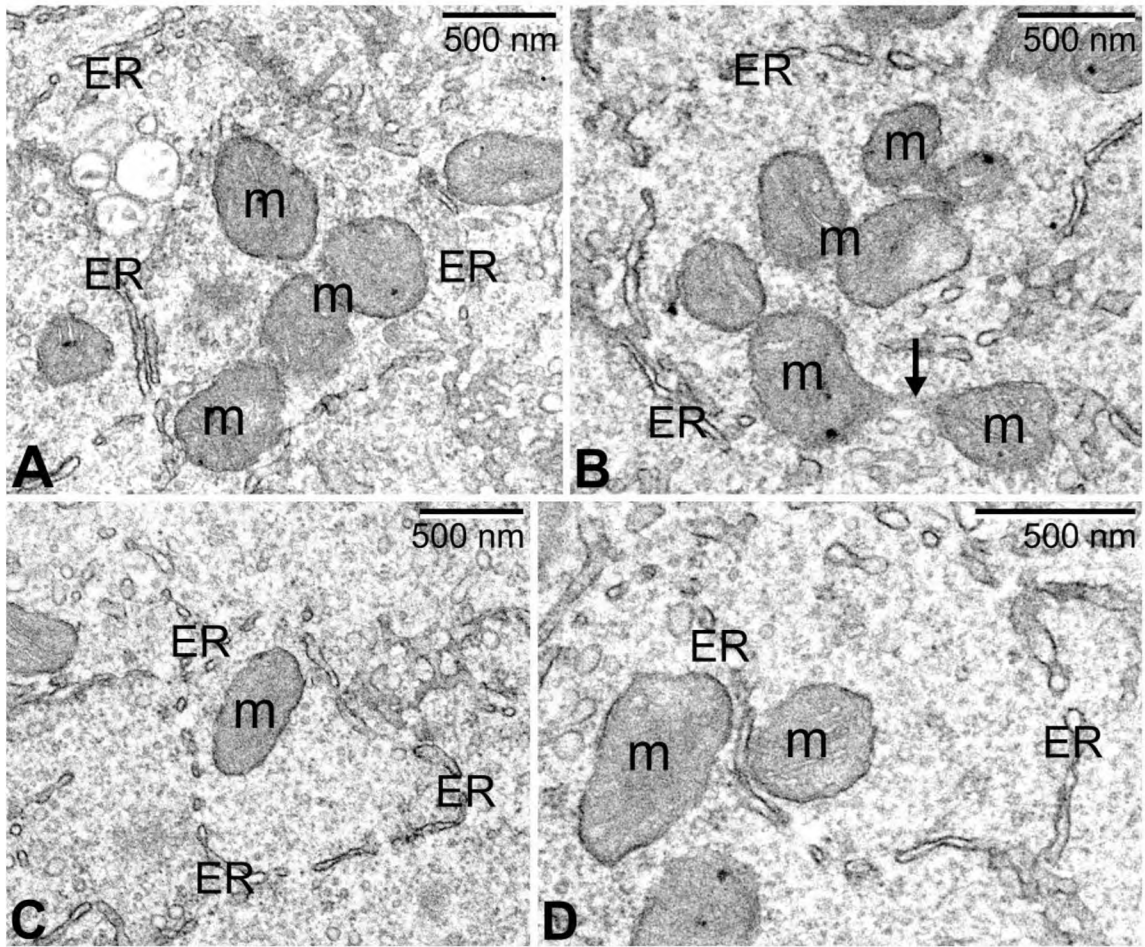
Ryc. 29. *Meconema meridionale*. Struktury autofagiczne (**aut**) w sąsiedztwie mitochondriów ciała Balbianiego w oocytach prewitelogenicznych (**A-D**). Skrawki ultracienkie, TEM.

Mitochondria (**m**), mitochondrium o zmienionej morfologii oznaczono **strzałką**, bezpośredni kontakt mitochondrium i lizosomu wskazuje **grot strzałki**.



Ryc. 30. *Meconema meridionale*. Mitochondria (**m**) ciała Balbianiego otoczone przez wydłużone i charakterystycznie wygięte cysterny siateczki śródplazmatycznej. Skrawki ultracienkie, TEM.

Grupy mitochondriów (**A-B**) lub pojedyncze mitochondria (**C-D**) otoczone przez elementy siateczki śródplazmatycznej (**ER**). **Strzałka** na zdjęciu B wskazuje przewężone (dzielące się) mitochondrium.

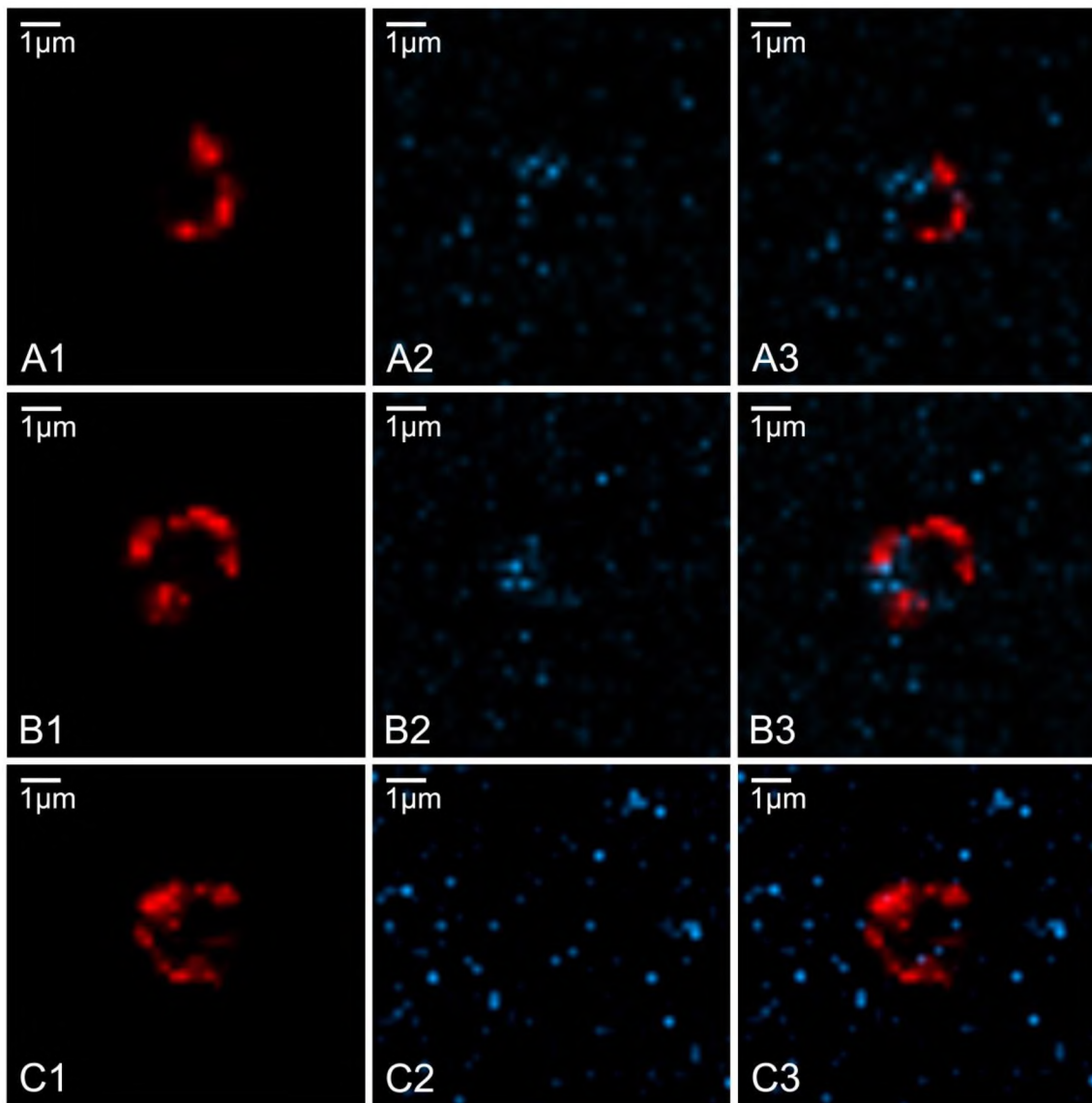


Ryc. 31. *Meconema meridionale*. Immunofluorescencyjna lokalizacja białka ATG5 w oocytach prewitelogenicznych. Widoczne ATG5 pozytywne struktury (częściowo otwarte lub zamknięte fagofory) otaczające DAPI pozytywne punkty (mitochondrialne DNA, mtDNA). Mikroskop konfokalny.

(A1-C1) Immunolokalizacja białka ATG5 (Cy3, czerwony).

(A2-C2) Znakowanie mtDNA (DAPI, niebieski).

(A3-C3) Kolokalizacja białka ATG5 (Cy3, czerwony) i mtDNA (DAPI, niebieski).



Ryc. 32. *Meconema meridionale*. Immunofluorescencyjna lokalizacja białka LC3 w oocytach. Mikroskop epifluorescencyjny. Nabłonek folikularny (**fe**), ooplazma (**oo**), pęcherzyk zarodkowy (**gv**).

(A) Oocyt prewitelogeniczny – białko LC3 wykazuje lokalizację cytoplazmatyczną.

(B) Oocyt wczesno-witelogeniczny – białko LC3 zlokalizowane wyłącznie w somatycznych komórkach nabłonka folikularnego, brak LC3 pozytywnych struktur w ooplazmie.

