

TŁO BADAŃ. Komórki rozrodcze ssaków (komórki jajowe i plemniki) charakteryzują się znacznie niższą częstością mutacji niż komórki innych tkanek ciała (komórki somatyczne). U myszy liczba mutacji na jedno pokolenie w komórkach rozrodczych wynosi ok. 5×10^{-9} , natomiast w komórkach somatycznych jest około 10 razy większa.

Powody niższej liczby mutacji, zwłaszcza w żeńskich komórkach rozrodczych, nie są znane. Można postulować istnienie kilku mechanizmów (i) brak replikacji DNA w żeńskich komórkach rozrodczych, (ii) większa ilość czynników naprawiających DNA, (iii) silna eliminacja komórek z uszkodzonym DNA, lub (iv) inne czynniki, jak dostępność chromatyny dla czynników naprawczych. Chociaż brak bezpośrednich danych na temat mechanizmów powstawania nowych mutacji, badania na myszach wskazują na duży wkład uszkodzeń oksydacyjnych. Takie uszkodzenia występują powszechnie i są powodowane zarówno czynnikami środowiskowymi, jak i własnym metabolizmem komórek. Naprawa utlenionych zasad azotowych w DNA jest bezpośrednio związana z naprawą przez wycięcie zasady (tzw. ścieżka naprawy BER), ponieważ wykorzystuje jej składniki.

CEL BADAŃ. Głównym celem planowanych badań jest pogłębienie wiedzy o mechanizmach odpowiedzialnych za niższy poziom mutacji w komórkach rozrodczych w porównaniu z komórkami somatycznymi.

Szczegółowe cele planowanych badań obejmują:

- (1) pomiary liczby jednoniciowych pęknięć DNA w oocytach i komórkach somatycznych oraz pomiary ilości i lokalizacji kluczowych czynników naprawczych w oocytach i komórkach somatycznych,
- (2) pomiary zdolności oocytów i zygot do naprawy jednoniciowych pęknięć DNA i porównanie z komórkami somatycznymi,
- (3) zweryfikowanie hipotezy, iż duża ilość czynników naprawczych jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za większą odporność oocytów na uszkodzenia DNA.

HIPOTEZA. Planowane badania są oparte na hipotezie, która zakłada, że oocyty zawierają dużą ilość czynników naprawczych (znacznie wyższą niż w komórkach somatycznych) zatem są zdolne do naprawiania uszkodzeń DNA z dużą wydajnością.

PLAN BADAŃ. Aby ocenić wpływ postulowanego wysokiego stężenia czynników naprawczych w oocytach na wydajność naprawy zostanie zbadana korelacja między ich ilością i zdolnością oocytów i komórek somatycznych do wykrywania i naprawy jednoniciowych pęknięć DNA.

WSTĘPNE BADANIA. Wstępne eksperymenty pokazały, że możliwe jest (i) mikroskopowe wykrywanie pojedynczych jednoniciowych pęknięć DNA w komórkach somatycznych metodą sSTRIDE, (ii) wykrywanie i rozróżnianie jednoniciowych pęknięć, które podlegają aktywnej naprawie oraz pęknięć, które nie są naprawiane z powodu wysycenia możliwości komórkowego układu naprawy, (iii) wykazanie, iż niewystarczająca ilość kluczowego czynnika naprawczego wpływa na wybór ścieżki naprawy i zmniejsza zdolność komórki do naprawy licznych uszkodzeń jednocześnie.

METODY. Proponowane jest wykorzystanie dwóch nowych metod – indukowania znanej liczby jednoniciowych uszkodzeń DNA wiązką laserową oraz bezpośredniego wykrywania końców (pęknięć) DNA metodą sSTRIDE. Ponadto wykorzystana zostanie technika transferu jąder komórkowych z komórek somatycznych do oocytów, aby zbadać, czy wysoka zawartość czynników naprawczych jest jedynym powodem wysokiej stabilności genomu oocytów.

ZNACZENIE. Po raz pierwszy zostanie zbadana zdolność oocytów i komórek potomnych do naprawy jednoniciowych pęknięć DNA i porównana ze zdolnością komórek somatycznych i komórek zarodka do naprawy tych uszkodzeń. Wzbogaci to dostępną wiedzę na temat fizjologii oocytów i wczesnych zarodków, mechanizmów indukcji chorób genetycznych i wrażliwości somatycznych komórek różnych tkanek na uszkodzenia DNA.