

***A *Drosophila melanogaster* poszt-meiotikus
spermatogenezisében szerepet játszó gének vizsgálata***

Ph.D. értekezés

Vedelek Viktor

Témavezető: Dr. Sinka Rita

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Genetikai Tanszék

Szeged

2016

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés.....	5
1.1 A <i>Drosophila melanogaster</i> alkalmazása, mint genetikai modellszervezet	5
1.2 A <i>Drosophila</i> spermatogenezise	6
1.2.1 A spermatogenezis korai szakasza	9
1.2.2 A meiotikus ciszták, kerek spermatidák	9
1.2.3 A poszt-meiotikus fejlődés első szakasza, a megnyúlás	10
1.2.4 A poszt-meiotikus fejlődés későbbi szakasza, az individualizáció	11
1.3 A mitokondriumok szerepe a spermatogenezis során	12
1.3.1 A mitokondriumok szerkezeti változásai és annak szabályozása a <i>Drosophila</i> spermatogenezise során	12
1.4 A glutamát anyagcsere	14
1.5 Fehérjelebontás a spermatidák individualizációja során	16
1.5.1 Az ubiquitin proteasóma rendszer	16
1.5.2 Tesztisz-specifikus protein degradációban szerepet játszó fehérjék	17
1.6 Az <i>archipelago</i> gén	20
2. Célkitűzés.....	21
3. Anyagok és módszerek	22
3.1 Felhasznált <i>Drosophila</i> törzsek, klasszikus genetikai vizsgálatok.....	22
3.2 Molekuláris biológiai módszerek.....	23
3.2.1 DNS izolálás	23
3.2.2 Transzpozon remobilizálás molekuláris ellenőrzése	23
3.2.3 Transzgének létrehozása	24
3.3 Génexpressziós vizsgálatok, RT-PCR és q-RT-PCR	25
3.4 <i>RNS in situ</i> hibridizáció	26
3.5 Immunfestés, mikroszkópia	27
3.6 Elektronmikroszkópia	28
3.7 Statisztikai elemzések, bioinformatika	28
4. Eredmények.....	30
4.1 A Minos transzpozon inszerciója a <i>CG4434/bb8</i> génben hímsterilitást eredményez.....	30
4.2 A <i>bb8</i> gén egy glutamát dehidrogenázt kódol	32
4.3 A <i>bb8</i> gén expressziója és a Bb8 fehérje lokalizációja tesztiszben.....	36

4.4 Késői spermatogenezis hiba okozza a <i>bb8^{ms}</i> mutánsok sterilitását	40
4.5 A <i>bb8^{ms}</i> mutánsok mitokondrium morfológiai hibákat mutatnak, és megamitokondriumokat képeznek.....	46
4.6 P-elem inszerció az <i>archipelago (ago)</i> génben sterilitást eredményez.....	52
4.7 Az <i>ago</i> génexpresszójának jellemzése.....	54
4.8 Az mCherry-Ago tesztisz-specifikus kifejeződési mintázata	55
4.9 Az <i>ago^{ms}</i> allél hímsteril fenotípusának jellemzése	58
4.10 Lehetséges Ago kölcsönható partnerek, és célfehérjék.....	65
5. Az eredmények értékelése	71
6. Köszönetnyilvánítás.....	83
7. Irodalomjegyzék	84
8. Összefoglaló.....	92
9. Summary.....	96
10. Függelék.....	100
10.1 Felhasznált oligonukleotidok jegyzéke	100
10.2 Jelmagyarázat és keresztezési sémák:.....	102

Rövidítések jegyzéke

3'UTR – 3' Untranslated Region (3' Nem Transzlálódó Régió)
5'UTR – 5' Untranslated Region (5' Nem Transzlálódó Régió)
ago – archipelago
Arp2/3 - Actin-related protein 2/3 complex
bb8 – big bubble 8
c-Jun – AP-1 transcription factor subunit
c-Myc myelocytomatosis cellular oncogene
ctp – cut up
Cul1 – Cullin1
Cul3 – Cullin3
Cyt-c-d – Citokró-m-c-distal
DAPI – 4', 6-diamidino-2-fenilindol
DIG – Digoxigenin
dj – don juan
DJ-GFP – Don Juan-GFP
dmfrn/mfrn – mitoferrin
DNS – deoxiribonukleinsav
E3 ligáz – E3 ubikvutin ligáz
EC – Elongációs komplex
eGFP – Enhanced Green Fluorescent Protein
EMS – Etil Metil Szulfonát
F1 – Első generáció
F2 – Második generáció
FBW7 - F-box and WD repeat domain-containing 7
GABA – Gamma amino vajsav
Gdh – Glutamát dehidrogenáz (Drosophila)
GLUD1 – Glutamát dehidrogenáz 1 (ember)
GLUD2 – Glutamát dehidrogenáz 2 (ember)
hAgo – human archipelago
hCDC4 – human cyclin dependent kinase 4

hSel-10 – human Suppressor/Enhancer of Lin-12
IC – Individualizációs komplex
imp – IGF-II mRNA-binding protein
ISH – In Situ Hibridizáció
Khl10/Cul3/Roc1b – E3 enzimkomplex
Mcl – Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MyoV – Miozin V
MyoVI – Miozin VI
ntc – nutcracker
Ntc-SCF – Nutcracker SKPA Cullin1 E3 enzyme complex
PBS – Phosphate Buffered Saline puffer
PCR – Polimeráz láncreakció
PLK-1 – Polo-Like Kinase 1
Poe – Purity of essence
qRT-PCR – Real Time quantitative Reverse transcription PCR (valós idejű, reverz transzkripció kapcsolt kvantitatív polimeráz láncreakció)
RBR – RING between RING
RING – Really Interesting New Gene
HECT – homology to E6AP C terminus
RNS – ribonukleinsav
Roc1b – Regulator of cullins 1b
SCF- SKP, Cullin, F-box típusú E3 ubikvutin ligáz
SkpA – SKP1-related A
Soti - Scotti
SREBP-2 – Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2
TAE – Tris, acetát, EDTA puffer
TUNEL – terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling
TV3 – testis vektor 3
Vps28 – Vacuolar protein sorting 28
Wasp - Wiscott-Aldrich syndrome protein

1. Bevezetés

1.1 A *Drosophila melanogaster* alkalmazása, mint genetikai modellszervezet

A gyümölcslégy vagy ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) az egyik legjobban ismert genetikai modellszervezet. *Drosophilát* laboratóriumi vizsgálatokhoz először William Castle harvardi csoportja használt 1901-ben (Kohler 1994), azonban a *Drosophila* kutatások, és ezzel a modern genetika megalapozója Thomas Hunt Morgan volt. Morgan 1933-ban kapott Nobel díjat a kromoszómák öröklődésben betöltött szerepének kimutatásáért. Herman Muller (Morgan tanítványa) pedig az 1920-as években végzett kísérleteivel mutatta ki a gamma-sugárzás mutagén hatását, amelyet 1946-ban Nobel díjjal jutalmaztak. Ezek a felfedezések megalapozták a *Drosophila* használatát a kutató laboratóriumokban, így az elmúlt 100 év során az ecetmuslica a genetika, a fejlődésbiológia, a neurobiológia, a viselkedéstan, és az élettan modellszervezete lett. A kis testméret, a gyors generációs idő és a magas utódszám alkalmassá teszi a *Drosophilát* laboratóriumi tenyésztésre. A muslicák generációs ideje 25°C-on 10 napig tart, az imágók körülbelül 60 napig élnek. A *Drosophila melanogasternek* egyszerű a genomja, amely mindössze négy pár kromoszómából áll, megkönnyítve ezzel a klasszikus genetikai vizsgálatokat. A *Drosophila* genomja volt az egyik első szekvenált eukarióta genom (Adams és mtsai. 2000). A szűz nőtények gyűjtése biztosítja, hogy azok később csak az adott keresztezésben felhasznált hímekkel párosodjanak. A nőtények párosodást követően a hím spermiumait a spermiumtarisznyájukban tárolják és ritkán párosodnak újra. A nőtények akár napi száz petét is rakhatnak, így életük során akár a kétezzer utódot is létrehozhatnak.

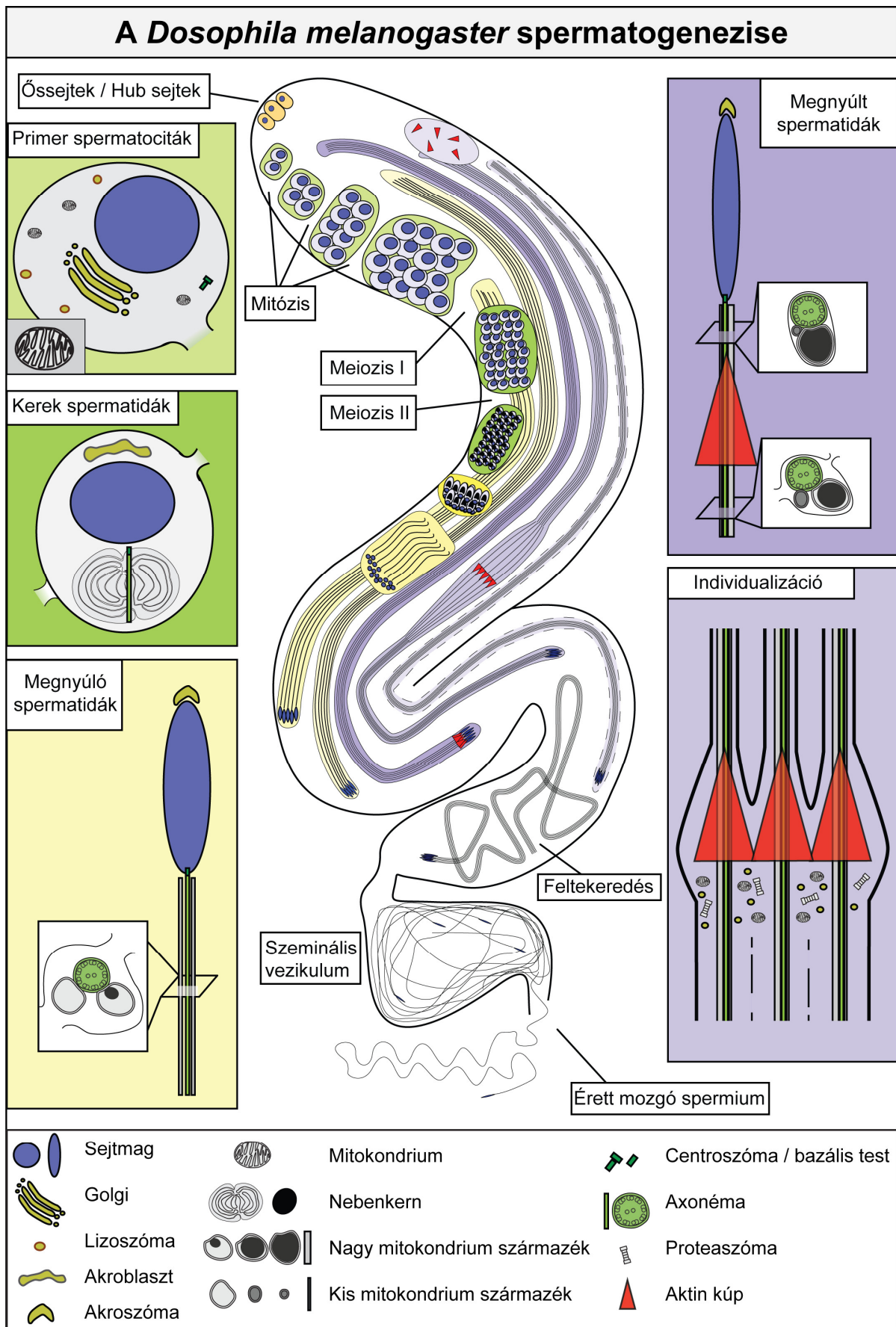
A *Drosophila melanogaster* egyedfejlődés alapvető szabályozó mechanizmusainak (pl.: anterior-poszterior, dorzális-ventrális testtengelyek meghatározása) megismerését követően kiderült, hogy azok általános alapelvek szerint működnek. A *Drosophila* embriogenezis genetikai szabályozásának feltárásáért Christiane Nüsslein-Volhard, Eric Wieschaus, és Ed Lewis Nobel díjban részesült 1995-ben. A *Drosophila* modell további előnye, hogy vizsgálatához hatalmas genetikai eszköztár áll rendelkezésünkre, köszönhetően a kémiai, röntgen és transzpozonos mutagenézissel előállított mutánsgyűjteményeknek (pontmutások, deléciók, duplikációk, transzpozon inszerciók). A *Drosophila* genetikai tanulmányozásához mesterséges transzpozonok sokasága érhető el a törzsgyűjteményekből (Bellen és mtsai. 2004; Ryder és mtsai. 2004). A transzpozonok felhasználása a beépülésük

által okozott mutációk tanulmányozásától kezdve, mesterségesen összeépített idegen DNS szakaszok genomba építésén át, deléciók vagy rekombinációk célzott előidézéséig terjed (Parks és mtsai. 2004; Ryder és mtsai. 2004). *Drosophilában* lehetőségünk van a reverz genetika számos megközelítését is alkalmazni. A baktériumok antivirális védekezésénél megismert genetikai manipulációra alkalmas CRISPR/Cas9 rendszert is sikeresen adaptálták *Drosophilában* (Port és mtsai. 2014). Az élesztőkből izolált Gal4-UAS rendszer kiválóan működik az *ecetmuslica* szomatikus és ivarsejtjeiben egyaránt. Az UAS rendszer felhasználásával célzott, szövet-specifikus transzgén kifejeztetés és géncsendesítés is előidézhető (Fischer és mtsai. 1988; Phelps és Brand 1998).

1.2 A *Drosophila* spermatogenezise

Az ivaros szaporodó állatokra jellemző, hogy az ivarsejtek morfológiája hívekben és nőstényekben különböző. A hímivarsejtek, azaz a spermiumok szerkezete nagyfokú hasonlóságot mutat a különböző állatcsoportok esetében. A rovarok spermiuma is ugyanazokból az elemekből áll, mint az emlősöké, nevezetesen erősen összecsomagolt DNS-t tartalmazó sejtmagból, akroszómából, axonémából, mitokondriumokból, redukált sejtplazmából, és sejtmembránból. Az akroszóma *Drosophilában* a megtermékenyítés után a pronukleuszok egyesüléséhez, míg magasabbrendűekben a petesejt plazmamembránjának feloldásához, a spermium petesejtbe történő bejutásához szükséges (Loppin és mtsai 2015). A spermatogenezisére jellemző, hogy a fejlődő hímivarsejtek plazma hidakkal kapcsolódnak, szinkronizáltan fejlődnek és cisztát alkotnak. Az élővilágban jellemző, hogy általában jelentősen több spermium képződik, mint petesejt. Kivételt képez a *Drosophila bifurca*, az eddig ismert leghosszabb (58,29 mm) spermiumával, ahol a spermiumok száma nem haladja meg jelentősen a nőstények petesejtjeinek számát. A *D. bifurca* nőstényekben a megtermékenyítés során a hosszú, egészséges spermium előnyt élvez a rosszabb minőségű, rövidebb spermiumokkal szemben (Pitnick és mtsai 1995). Ez az ivari szelekciós hatás, a nőstény preferencia legszélsőségebb formája az élővilágban (Lüpold és mtsai. 2016). A *Drosophila* fajokra általában jellemző az extrém hosszúságú spermium. A *Drosophila melanogaster* is 1,8 mm hosszú spermiummal rendelkezik, ami a humán spermium hosszának a 32-szerese. Ennek ellenére a *Drosophila melanogaster* esetében a spermiumok száma jelentősen meghaladja a nőstények petesejtjeinek számát.

A *Drosophila melanogaster* tesztisze a hímek utótestéből könnyen izolálható és tanulmányozható. A *Drosophila* spermatogenezisének minden lépése nyomon követhető a feltekeredett csőre emlékeztető páros herékben (1. Ábra). Az ősvarsejtek egyenlőtlen osztódásával létrejön az úgynevezett goniálblaszt, amiből az úgynevezett primer spermatociták keletkeznek. A meiózist követően a fejlődő ivarsejteket spermatidáknak nevezzük. A tesztisz apikális, csúcsi részén figyelhetjük meg a spermatogenezis korai szakaszait, a mitotikus osztódással keletkező spermatocitákat, az apikális végétől távolabb, a tesztisz kanyarulatában figyelhetjük meg a meiótikus sejteket valamint a kerek spermatidákat. A tesztisz bazális vége felé haladva pedig a poszt-meiotikus differenciáció lépései, a megnyúlás és az individualizáció követhetők. A differenciálódott egyedi spermiumok a szeminális vezikulumban tárolódnak a megtermékenyítésig (Fuller 1993).



1. Ábra A *Drosophila melanogaster* spermatogenezisének sematikus áttekintése

1.2.1 A spermatogenezis korai szakasza

A spermatogenezis korai fejlődési stádiumai a testisz csúcsi, apikális részén figyelhetők meg. A testisz apikális részén található az ősvarsejtek és a belőlük mitotikus osztódással keletkező elsődleges (primer) spermatociták, valamint a szomatikus hub sejtek. A szomatikus hub sejtek biztosítják az őssejt niche fenntartását. Az őssejt niche-ben a csíravonal őssejtek osztódásával párhuzamosan a szomatikus cisztaőssejtek is osztódnak. A ciszták kialakításához két szomatikus cisztasejt differenciálódik, amelyek körülveszik a spermatocitákat (de Cuevas és Matunis 2011). Az így kialakult cisztákban zajlik a csíravonal sejtek osztódása és differenciálódása.

A primer spermatociták négy mitotikus osztódás után hozzák létre a szomatikus cisztasejtek által határolt 16-sejtes cisztákat. A cisztában a spermatociták gyűrűcsatornákkal kapcsolatban maradnak egymással és szinkronizáltan fejlődnek. A primer spermatociták felhalmozzák a meiotikus, valamint a poszt-meiotikus fejlődéshez szükséges faktorok nagy részét.

1.2.2 A meiotikus ciszták, kerek spermatidák

A 16 sejtes ciszták spermatocitái meiotikus osztódáson mennek keresztül, kialakítva a 64 darab kerek spermatidát tartalmazó cisztát. A meiotikus spermatociták a testisz csúcsi részétől távolabb, a testisz kanyarulatában található. A meiózist követően a kerek spermatidák még mindig plazmahidakkal kapcsolódnak egymáshoz és kialakítják a spermiumokra jellemző sejtszervecskék előalakjait. A sejtmag egyik oldalán létrejön az akroblaszt, az akroszóma előalakja. A sejtmag akroblaszttal átellenes oldalán a mitokondriumok fúzionálnak, hagymahéjszerűen egymásra rétegződnek és kialakítják a sejtmaggal megegyező méretű úgynevezett Nebenkernt. A centroszómából (bazális test) kiindulva elkezd kialakulni az axonéma. A sejtszervecskék eloszlása és egymáshoz viszonyított helyzete a cisztákban található összes ivarsejtben megegyezik, ez határozza meg a fejlődő ivarsejtek polaritását és a ciszta irányultságát a testiszen belül.

A *Drosophila* spermatidák poszt-meiotikus fejlődéséhez elsősorban a primer spermatociták által felhalmozott géntermékek szükségesek, ugyanis a meiózis után a transzkripció minimális (Barreau és mtsai. 2008).

1.2.3 A poszt-meiotikus fejlődés első szakasza, a megnyúlás

A spermatidák poszt-meiotikus fejlődése hasonlóan a korábbi stádiumokhoz, szinkronizáltan zajlik. A kerek spermatidák megnyúlása során kialakul az akroblasztból az akroszóma. A spermatidákban a sejtmagok kompakt szerkezetet vesznek fel és megnyúlnak. A hisztonok a szorosabb kromatin szerkezet kialakítása érdekében protaminokra cserélődnek (Raja és Renkawitz-pohl 2005; Rathke és mtsai. 2007). Az axonéma a spermatidák teljes farki részén végigfut. Az axonémát az endoplazmatikus retikulumból kialakuló axiális membrán veszi körül keresztmetszeti képe a mozgásra képes csillókra jellemző 9X2+2 mikrotubulus szerkezetet mutatja. A Nebenkern letekeredik, és két mitokondrium származékot alakít ki, amik az axonéma mellett a farki rész teljes hosszában végigfutnak. A megnyúlás során a ciszták bazális végén citoszeletális elemek halmozódnak fel és kialakítják az elongációs komplexet (EC) (Ghosh-roy és mtsai. 2004). Az elongációs komplexben megfigyelhető egy aktinháló, valamint egy jellegzetes struktúra, a spektrinek és intermedier filamentumok által kialakított fuzóma, ami gyűrűcsatornákon keresztül összeköti a megnyúló spermatidákat. A megnyúlás végére a kezdeti 20 µm átmérőjű sejtekből 1,8 mm hosszúságot elérő spermatidák alakulnak ki. A ciszták feji része a megnyúlt magokkal a testisz bazális részén található, míg a farki részük visszanyúlik a testisz apikális régiójának a közelébe.

A ciszták megnyúlása során kiemelt szerep jut a Nebenkernből kialakuló két mitokondrium származéknak. A megnyúló cisztákban a mitokondrium származékokhoz úgynevezett járulékos mikrotubulusok kapcsolódnak és együttesen szabályozzák a megnyúlási folyamatot (Noguchi és mtsai. 2011). A megnyúlás során a két mitokondrium származék eltérő fejlődésen megy keresztül; az egyikben elindul a parakrisztallin felhalmozódás, kialakítva a nagy mitokondrium származékot, míg a kis mitokondrium származék szinte teljesen eltűnik a spermatogenezis végére. A parakrisztallin elektronmikroszkópos felvételeken megfigyelhető elektrondenz kristályszerű struktúra, amelynek összetétele ismeretlen. A nagy mitokondrium származék és feltehetően a parakrisztallin szerkezeti támaszt nyújt az 1,8 mm hosszú spermiumnak (Tokuyasu 1974). A megnyúlás végére a ciszták még mindig plazmahidakkal kapcsolódnak.

1.2.4 A poszt-meiotikus fejlődés későbbi szakasza, az individualizáció

A megnyúlást követő lépés a spermatidák egyedivé válása, az úgynevezett individualizáció. Ennek első lépése az individualizációs komplexek (IC) összeszerelődése a sejtmagok körül. Az individualizációs komplex kialakulása során a ciszta minden sejtmagja körül létrejön egy főleg F-aktinból álló, kúp alakú szerkezet (aktinkúp), melyet a MyoVI fehérje stabilizál (Hicks és mtsai. 1999). Az individualizáció során a kúpok elkezdnek szinkronizáltan vándorolni a ciszta bazális vége felé, kiszorítva a citoplazmát és a feleslegessé vált sejtalkotókat, valamint kialakítva a folyamatos egyedi sejtmembránokat a spermatidák körül. Az aktinkúpok fenntartásában és vándorlásában a MyoV, Ctp (Dd1c1), Arp2/3, Wasp fehérjék szerepét azonosították (Fabian és Brill 2012). A spermatida egyedi membránjának kialakításához a Shbire, Vps28 és Lasp fehérjék szerepét mutatták ki (Fabian és Brill 2012). A vándorló individualizációs komplex körül kialakul, a cisztikus hólyag, ami együtt vándorol a komplexszel. A cisztikus hólyagban két különböző fehérje lebontó folyamatot azonosítottak, a proteaszóma és a kaszpázok által irányítottat (Zhong és Belote 2007; Arama és mtsai. 2003). Az individualizáció szabályos lefolyásában ismert a Poe, a Ntc-SCF, a Khl10/cul3/Roc1b E3 enzimek, valamint a tesztisz specifikus proteaszóma alegységek szerepe is (Fabrizio és mtsai. 1998; Bader és mtsai. 2010; Kaplan és mtsai. 2010; Zhong és Belote 2007). Az aktiválódó kaszpáz kaszkád térben és időben szigorúan szabályozott ezért nem okoz apoptózist.

Az individualizáció végén a cisztikus hólyag lefűződik az egyedi spermiumokat tartalmazó cisztáról és a vándorlás során kiszorított sejtalkotók és bomlástermékek az úgynevezett „waste bag”-be kerülnek.

A megnyúlás és az individualizáció során nagymértékű membrán átrendeződések történnek a spermatidákban. Az endoplazmatikus retikulumból kialakul az axiális membrán, a mitokondriumok megnyúlnak, kialakul a spermatidák egyedi sejtmembránja. Az 1,8 cm-es spermatidák membránjai a megnyúlás és az individualizáció során jelentős felület növekedésen mennek keresztül, ami intenzív membrán, illetve lipid bioszintézissel párosul (Tokuyasu 1975). A membránok lipidösszetétele meghatározó jelentőségű a spermatidák normális fejlődéséhez (Laurinyecz és mtsai. 2016).

1.3 A mitokondriumok szerepe a spermatogenezis során

1.3.1 A mitokondriumok szerkezeti változásai és annak szabályozása a *Drosophila* spermatogenezise során

A primer spermatociták mitokondriumai morfológiailag nem különböztethetők meg a testi sejtek mitokondriumaitól. A 16 sejtes cisztákban a spermatociták mitokondriumainak száma megemelkedik (Dorogova és mtsai. 2013). A kerek spermatidákban kialakuló Nebenkernben a mitokondriumok fúzionálnak, egymásra rétegződnek melynek során a fuzionáló mitokondriumok belső membránszerkezete megváltozik. A spermatidák megnyúlásával a Nebenkernből a két mitokondrium származék fűződik le, amelyek végig futnak az axonéma mentén. A mitokondriumok megnyúlása során a nagy mitokondrium származék parakrisztallint halmoz fel, a kis mitokondrium származék összezsugorodik.

A *Drosophila* spermatogenezisében a mitokondriumok az anyagcsere utakban betöltött szerepük mellett különösen fontosak a spermiumok szabályos fejlődésében és működésében, melyet tesztisz-specifikusan kifejeződő mitokondriális fehérjék segítségével valósítanak meg. Érdekes jelenség, hogy a *Drosophila* genomban fellelhető génduplikációk jelentős részében a génpárok egyik tagja tesztisz-specifikus expressziót mutat (Ranz és mtsai. 2003). A spermatogenezis során a magban kódolt, mitokondriális légzési láncban szereplő fehérjék 78%-a rendelkezik tesztisz-specifikus változattal, ami azt sejteti, hogy a *Drosophila* herében egy tesztisz-specifikus mitokondriális proteom alakulhatott ki (Tripoli és mtsai. 2005).

Számos olyan hímsteril mutánst izoláltak, ahol a fenotípus hátterében a mitokondriális funkciók spermatogenezis során történt megváltozása áll. Ezek egyike a mitokondriumok mennyiségi szabályozásában szerepet játszó gén az *nmd* (*no mitochondrial derivative*) mutáns allélja (Noguchi és mtsai 2011). Az *Nmd* fehérje a mitokondrium külső membránjában elhelyezkedő ATP-áz. Az *nmd* mutáns *Drosophila* tesztiszében a mitokondriumok felhalmozódása a 16 sejtes cisztákban elmarad, ezért a mitokondriumok fúziójából kisebb méretű Nebenkern alakul ki. Az *nmd* mutánsokban a kisebb méretű Nebenkern mellett a megnyúlt ciszták hossza alig éri el az 1 mm-t (Noguchi és mtsai 2011).

A Nebenkern kialakítása során mikrotubulusok mentén szállítódnak a mitokondriumok és aggregációjukhoz szükséges a Drp1 dynamin fehérje (Aldridge és mtsai. 2007). A mitokondriális fúzió folyamatához szükség van a *fzo* (*fuzzy onions*) gén termékére (Hales és Fuller 1997). A *Fzo* fehérje a mitofuzinok családjába tartozó GTP-áz, hiányában a

mitokondriumok nem fúzionálnak megfelelően, ezáltal több kisméretű Nebenkern alakul ki, kettőnél több mitokondrium származék keletkezik és a spermatidák megnyúlása is sérül (Noguchi és mtsai 2011). A Nebenkern kialakulásához szükséges még az Opa-1 dynamin, a Rho-7 szerin endopeptidáz és a Milton miozin-kötő fehérje. Ezeknek a géneknek a mutánsaiban hasonló fenotípust tapasztaltak, mint az *fzo* mutánsban (Poole és mtsai. 2008; McQuibban és mtsai. 2006; Noguchi és mtsai 2011; Deng és mtsai. 2008).

A kerek spermatidák megnyúlása során a Drp1 fehérje szükséges a mitokondriumok lefűződéséhez (Aldridge és mtsai. 2007). A Pink1/Parkin útvonal is fontos szerepet tölt be a mitokondrium származékok letekeredésében. A Parkin E3 ligáz enzim hiányában a Nebenkern kialakul, azonban csak a nagy mitokondrium származék fűződik le (Poole és mtsai. 2008). Az útvonal többi ismert tagja, a PINK1 protein kináz és a DJ-1 α szabályozó fehérjét kódoló gének mutánsai is hasonló fenotípust mutatnak (Poole és mtsai. 2008).

A spermatidák megnyúlását a mitokondrium származékok a járulékos mikrotubulusokkal együttműködve szabályozzák. A kapcsolatot a mitokondrium és a járulékos mikrotubulusok között a Milton miozin kötő és a dMiro mitokondriális Rho GTP-áz fehérjék mediálják (Noguchi, és mtsai 2011). A mitokondriumok megnyúlásához a Fascetto, Nebbish, Khc73 mikrotubulus keresztkötő fehérjék is szükségesek (Noguchi és mtsai. 2011).

A parakrisztallin normális felhalmozódásához szükséges a Mitoferrin (*dmfrn*) vas transzporter fehérje (Metzendorf és Lind 2010).

A Don Juan (DJ) egy tesztisz-specifikus kisméretű fehérje, aminek szerepe még nem tisztázott a spermatogenezisben (Santel és mtsai. 1998; Santel és mtsai. 1997). Ismert, hogy a *dj* mRNS az elongáció végéig transzlációs gátlás alatt áll, ezért a *dj-GFP* transzgén csak a megnyúlt spermatidák mitokondriumaiban figyelhető meg és így jól használható a késői spermatidák mitokondriumainak vizsgálatához (Santel és mtsai. 1997). Aram és munkatársai 2016-ban kimutatták, hogy a DJ fehérje a megnyúlt nagy mitokondrium származék mátrixában halmozódik fel (Aram és mtsai. 2016).

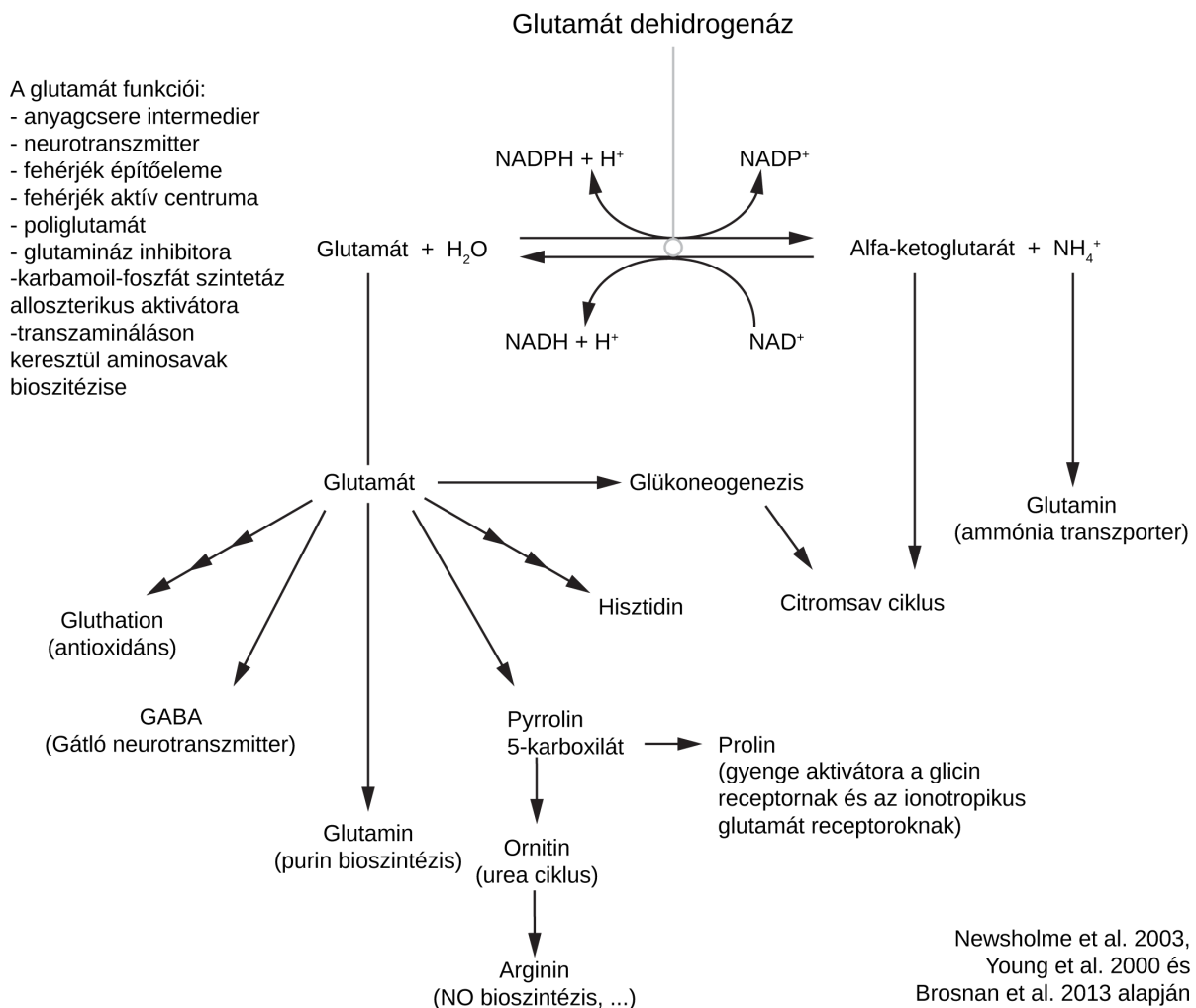
A mitokondriumoknak az individualizáció folyamatában is szerepük van, a mitokondriumból felszabaduló Citokróm-c-distal (Cyt-c-d) szükséges a kaszpáz kaszkád aktiválásához (Arama és mtsai. 2003). Az individualizáció során a szukcinil koenzim A szintetáz β alegysége a mitokondrium származékok felszínére kerül, és ott kihorgonyozza a kaszpáz kaszkád aktivitásáért felelős Khl10/Cul3/Roc1b E3 enzim komplexet, ami a mitokondrium származékok közvetlen környezetére korlátozza a kaszpáz aktivitást (Aram és mtsai. 2016).

Drosophilában a mitokondrium a spermium teljes farki részét kitölti és a megtermékenyítés során a teljes spermium bejut a petesejtbe. A mitokondriális genom ugyanakkor maternálisan öröklődik a Drosophila esetében is, mert a hím mitokondriális DNS, az individualizáció során egy endonukleáz, az EndoG aktivitásának köszönhetően lebomlik (DeLuca és O'Farrell 2012).

1.4 A glutamát anyagcsere

A munkánk során azonosítottunk egy hímsteril alléllal rendelkező glutamát dehidrogenáz fehérjét kódoló gént. A glutamát dehidrogenáz enzim minden élőlényben előfordul és központi szerepet tölt be az alapvető anyagcsereutakban. A glutamát dehidrogenáz a glutamátot reverzibilis folyamatban ammóniára és alfa-ketoglutarátra, a citromsav ciklus egyik közti elemére bontja, e közben NAD(P)^+ kofaktort használ elektrondonornak (2. Ábra). A glutamát egy sor anyagcsere útvonal központi eleme, mely szükséges a prolin, glutaminsav, hisztidin és az arginin aminosavak bioszintéziséhez, valamint a glutathion antioxidáns egyik alkotóeleme. A glutamátról ismert, hogy az anyagcsereutakon kívül jelátviteli utakban is szerepet játszik (Brosnan és Brosnan 2013; Newsholme és mtsai. 2003). A glutamát az emlősökben a legáltalánosabb serkentő hatású neurotranszmitter, valamint előanyaga a gátló hatású neurotranszmitternek, a GABA-nak.

A glutamát dehidrogenáz kapcsolatot teremt az aminosav metabolizmus és az energiatermelő központi metabolizmus között. A glutamát dehidrogenáz enzim a szabad glutamát bontása révén extra energiához juttathatja a sejteket (Gibala és mtsai. 1997; Smith 1978). A rákos sejtek a glutamátot energiatermelésre is felhasználják (Moreadith és Lehninger 1984). Ugyanakkor az ilyen irányú energianyerés hosszú távon nem fenntartható, hiszen az aminosavak előállítása energiaigényes a sejteknek, és a nagymértékű bontásuk miatt hiány léphet fel a fehérjék szintézise során (Aledo 2004). A glutamát dehidrogenáz enzim a nitrogén háztartást is szabályozza, hiszen a glutamát bontása során ammónia is keletkezik (Spanaki és Plaitakis 2012).



2. Ábra A glutamát metabolizmus áttekintése (Young és Ajami 2000; Newsholme és mtsai. 2003; Brosnan és Brosnan 2013)

A glutamát dehidrogenáz fehérjék egy mitokondriális szignálpeptidből, egy dimerizációs és egy NAD(P) kötő doménből állnak. Kiemelt szerkezeti elemük még az úgynevezett antenna régió és a tengely hélix. Az antenna régióknak szerepe van az enzimkomplex összeszerelésében, és a tengely hélixszel közösen az enzim aktivitás allosztérikus szabályozásában (Papadopoulou és Louis 1999; Banerjee és mtsai. 2003). A glutamát dehidrogenáz fehérje homo hexamer formában alkotja a holoenzimet (Smith és mtsai. 2001).

Emlősökben magas glutamát dehidrogenáz aktivitást mutattak ki a májban, az agyban, a vesékben, a hasnyálmirigyben, a szívben, a petefészkekben és a herékben (Newsholme és mtsai. 2003). Az emberi genom kettő glutamát dehidrogenázt kódol, a *GLUD1* és a *GLUD2* enzimfehérjéket. A *GLUD1* gén duplikációjával jött létre a *GLUD2*, körülbelül 22 millió éve a főemlősök törzsfelődése során (Varki 2004). A *GLUD1* és *GLUD2* fehérje között mindössze 15

aminosavnyi eltérés van. A *GLUD1* gén általánosan expresszálódik, a róla készült fehérje hőstabil, az enzim alap aktivitása magas, amit az ADP és az l-leucin serkent, míg a GTP gátol. A *GLUD2* expressziója szövet-specifikus (retina, agy, here), nem hőstabil, alap aktivitása alacsony, az ADP és az l-leucin szükséges az aktiválódásához, viszont a GTP nem gátolja (Plaitakis és mtsai. 2000; Zaganas és mtsai. 2014).

A humán *GLUD* enzimeknek *Drosophilában* két ortológja van, a *Gdh* és a *CG4434/Bb8*. A *Gdh* enzimnek *Drosophilában* négy formáját azonosították, kettő mitokondriális szignálpeptidet hordoz és kettőben ez a szakasz hiányzik, ami feltehetőleg citoszolikus jelenlétet biztosít (Tiwari és mtsai. 2014)(modENCODE). A citoszolikus formák főleg a lárvákban expresszálódnak. A mitokondriális célpeptiden kívül a funkcionális fehérjének két formája van, a kettő közötti különbség az enzimműködését szabályozó antenna régiójában található (Papadopoulou és Louis 1999; Banerjee és mtsai. 2003). A *Gdh* szabályozása hasonló a humán *GLUD1*-hez: ADP aktiválja, GTP represszálja (Bond és Sang 1968).

A *CG4434/Bb8* fehérjével kapcsolatban funkcionális analízist még nem végeztek.

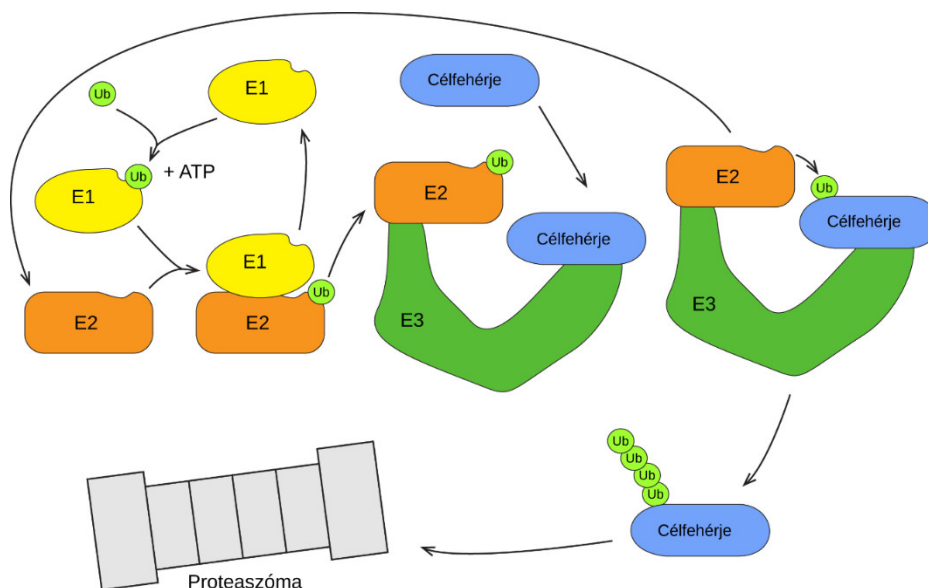
1.5 Fehérjelebontás a spermatidák individualizációja során

1.5.1 Az ubikvitin proteaszóma rendszer

A fehérjék egyik poszt-transzlációs módosítása az ubikvitináció, mely során egy 76 aminosav hosszú fehérje, az ubikvitin kapcsolódik a célfehérjéhez. A módosítás hatása eltérő lehet, okozhat változást a fehérje funkciójában, lokalizációjában, de okozhatja a fehérje célzott lebontását is. A legáltalánosabb és legismertebb módosítás a poliubikvitináció a fehérjék lizin oldalláncán, a poliubikvitin lánc kijelöli a fehérjét a proteaszóma általi lebontáshoz. A fehérjék célzott lebontása szükséges a sejtciklus, a szignalizációs útvonalak, a transzkripció faktorok, valamint az enzimaktivitás szabályozásához, ugyanakkor a hibás szerkezetű fehérjék egy része is ezen az útvonalon bomlik le (Hershko és Aaron 1998). A rendszer hatékonyságát és pontosságát leginkább talán az bizonyítja, hogy a sejtciklus szabályozása is az ubikvitin rendszeren keresztül valósul meg, ahol a szabályozó faktorok tér- és időbeli jelenléte nagy jelentőséggel bír. A ciklin függő kinázok, és maguk a ciklinek is ilyen módon degradálódnak (Teixeira és Reed 2013).

Az ubikvitináció folyamatához több enzim együttműködése szükséges (Hershko 1992)(3. Ábra). Az *E1* enzimek ATP felhasználásával aktiválják az ubikvitint, majd az aktív központjukban lévő ciszteinre tioészter kötéssel kovalensen csatolják az ubikvitint. Az *E2*

ubikvitin konjugáló enzimek átveszik az aktivált ubikvitineket az E1 enzimektől, az ubikvitin így a saját aktív centrumjukban található ciszteinre kerül. Az E2 enzimek az E3 enzimhez szállítják az ubikvitint, ahol az E3 enzim azt egy (közvetlenül az E2 enzimről) vagy két (az E3-ra kerül először) lépésben a célfehérjére csatolja (Metzger és mtsai. 2012). Az E1 és E2 enzimek száma viszonylag csekély, *Drosophilában* 8 E1 és körülbelül 30 E2 található. *Drosophilában* az E3 enzimek pontos száma nem ismert, száznál is több lehet belőlük.



3. Ábra Az ubikvitin proteasóma rendszer sematikus ábrázolása

Az E3 enzimek három csoportra oszthatók doménszerkezetük alapján: a RING (really interesting new gene) a HECT (homology to E6AP C terminus) és az RBR (RING between RING) csoportokra (Metzger és mtsai. 2012). A legnépesebb csoport a RING típusú E3 ligázok, melyek működhetnek monomerként, dimerként vagy nagyobb komplexekként (Li és mtsai. 2008). A RING típusú SCF (SKP, Cullin, F-box) E3 ligázok enzim komplexbe szerveződnek. A cullinok alkotják az SCF komplex vázát, míg az enzim komplex célfehérjéit az F-box fehérjék határozzák meg (Metzger és mtsai. 2012). Az SCF E3 enzim komplexek homo- és heterodimereket alkothatnak (Ponyeam és Hagen 2012; Choo és Hagen 2012).

1.5.2 Tesztisz-specifikus protein degradációban szerepet játszó fehérjék

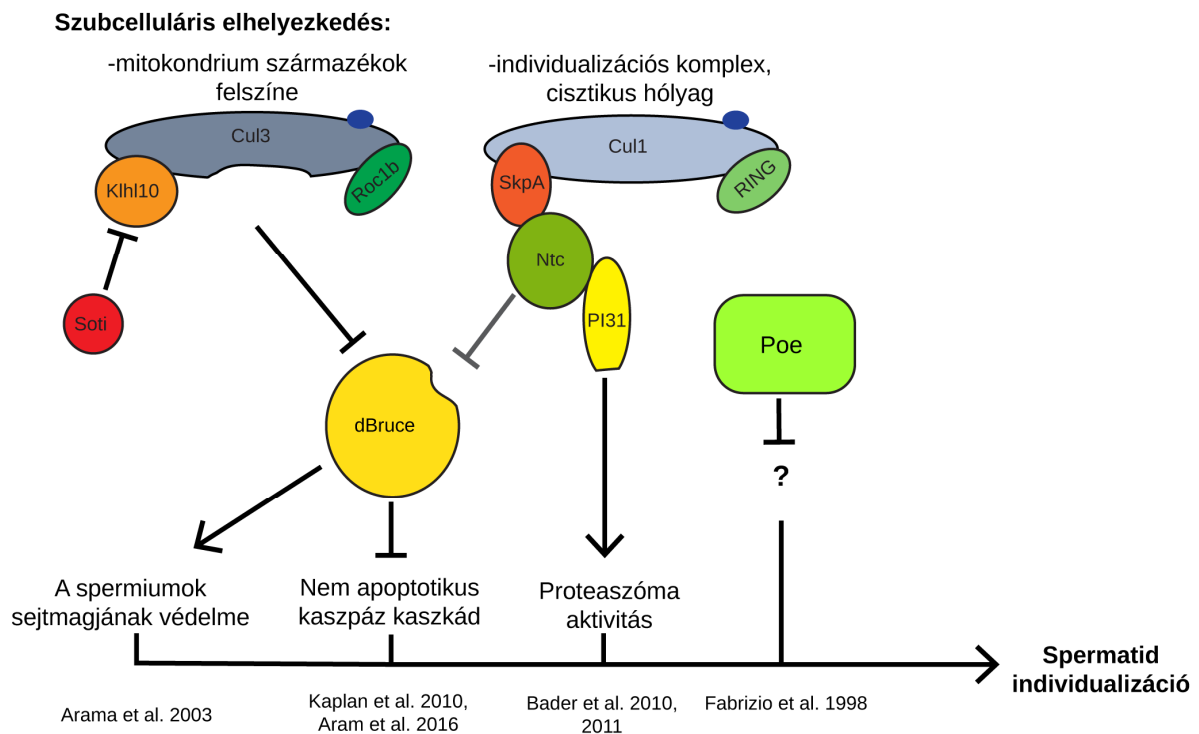
A proteasóma alegységei között több tesztisz-specifikus forma létezik (Prosa3T, Prosa4T1, Prosa4T2, Prosa6T, Prosβ5R1, Prosβ5R2, Prosβ4R2, Prosβ4R1, Prosβ2R2, Prosβ2R1), ami arra

enged következtetni, hogy a tesztisz-specifikus proteaszómáknak fontos szerepe van a spermatogenezisben. Bizonyított, hogy a Pro α 6T proteaszóma alegység szükséges a spermatidák sejtmagjainak éréséhez, és a normális individualizációhoz (Zhong és Belote 2007). A FLYAtlas és ModENCODE online expressziós adatbázisok alapján számos tesztisz-specifikus E3 alegység létezik (tesztisz-specifikus F-box alegységek: CG32085, CG2247, CG7707, CG9316, CG13088, CG30466, CG34025, ntc; tesztisz-specifikus Skp alegységek: SkpB, SkpC, SkpD, SkpE, SkpF; egyéb tesztisz-specifikus E3 elemek: Cullin3 – Cullin3_{testis}, Roc1b). Azonban a spermatogenezisben szerepet játszó gének nem szükségszerűen tesztisz-specifikusak. Az általánosan expresszáldó Poe (Purity of essence) fehérje egy kalmodulin függő E3 ubikvitin ligáz. A Poe tesztisz-specifikus szerepét az individualizációban írták le, mutánsában a sejtmagok szétszóródtak, az individualizációs komplex kialakulása sérült és a vándorló komplex kisebb méretű volt (Fabrizio és mtsai. 1998). A Poe pontos működési mechanizmusát még nem vizsgálták (4. Ábra).

További két E3 enzim komplex hozható összefüggésbe az individualizáció folyamatával, a Khl10/Cul3/Roc1b és a Ntc/Cul1/SkpA (Ntc-SCF) E3 komplex (4. Ábra). Mind a két komplex célfehérjéje a dBruce E2 ubikvitin transzferáz és apoptózis inhibitor fehérje, amely lebontásával az individualizáció folyamatában szerepet játszó kaszpázok aktiválódnak (Arama és mtsai. 2007; Bader és mtsai. 2010; Kaplan és mtsai. 2010). A Khl10/Cul3/Roc1b komplex a kaszpáz aktiváció finomszabályozásához szükséges. A megnyúló cisztákban a poszt-meiotikusan expresszáldó Scotti (Soti) fehérje gátolja a Khl10/Cul3/Roc1b komplexet. A megnyúlás végén a Soti degradálódik, ezáltal az E3 enzim gátlása megszűnik, így a dBruce fehérje is lebomlik (Kaplan és mtsai. 2010). A dBruce gátló hatásának hiányában a kaszpázok aktiválódnak. A Soti fehérje egy növekvő koncentrációjú grádiens alakot a megnyúló ciszták bazális vége felé, ami ellentétes irányú az individualizálódó cisztákban az aktivált kaszpázok grádiensével. Így a kaszpázok aktivitása főleg a cisztikus hólyag környezetére korlátozódik. Ugyanakkor a Soti gátlása alól felszabadult Khl10/Cul3/Roc1b komplex a mitokondrium származékok felületén a szukcinil koenzimA szintetáz β alegységéhez kapcsolódik, ezáltal a Khl10/Cul3/Roc1b a korai kaszpáz aktivációt a mitokondriumok környezetére korlátozza (Aram és mtsai. 2016).

A Nutcracker F-box fehérjéről kimutatták, hogy felismeri és befedi a DmPI31 fehérje C-terminális végét, ezáltal stabilizálja a DmPI31 fehérjét, ami pedig a proteaszóma aktivitást serkenti (Bader és mtsai. 2010; Bader és mtsai. 2011). A nem apoptotikus kaszpáz kaszkád az

individualizáció megindulásával egyszerre aktiválódik (Arama és mtsai. 2003). Az aktivátor kaszpázok az aktin kúpok bazális végén aktiválódnak, a tesztisz-specifikus Cyt-c-d (Citokró-m-C distal) mitokondriumból történő felszabadulásának következményeként (Arama és mtsai. 2003). A kaszkád szükséges az individualizációhoz, hiányában az aktin kúpok vándorlása hibát szenved, és az individualizáció nem megy végbe.



4. Ábra Az individualizációban szerepet játszó E3 enzimek áttekintése

1.6 Az *archipelago* gén

Az *archipelago* (*ago*) gén az SCF (SkpA, Cul1, F-box) komplex 1326 aminosav hosszú, a célfehérjék felismeréséért felelős F-Box alegységét kódolja. (Moberg és mtsai. 2001). Humán ortológja az FBW7 (FBXW7, hCDC4, hAgo, hSel-10) ami ismert tumor szupresszor fehérje, ezért a tudományos érdeklődés központjában áll. Az FBW7-nek fontos szerepe van a sejtciklus és szignálutak szabályozásában, célfehérjéi között található a Ciklin-E, a c-Myc, a c-Jun, az Mcl és a Notch (Davis és mtsai. 2014). Az FBW7-nek ismert célfehérjéje a PLK-1, ami a Golgi és a sejtciklus S fázisának minőségellenőrzésében fontos (Giráldez és mtsai. 2014). Az FBW7 szerepét a koleszterin bioszintézisben is kimutatták a SREBP-2 szabályozásán keresztül (Sundqvist és mtsai. 2005).

Caenorhabditis elegans modellszervezetben az *ago* ortológját *sel-10*-nek nevezik és a Notch szignálút szabályozásában ismert a szerepe (Hale és mtsai. 2012). A Sel-10 egy másik F-box fehérjével, a Lin-23-mal közösen a centroszóma fenntartásával is összefüggésbe hozható (Peel és mtsai. 2012). Élesztőben az FBW7 orthológja a CDC4, célfehérjéi között szerepel a hiszton-deacetiláz Hst3, ami a genom stabilitásának fenntartásához nélkülözhetetlen (Edenberg és mtsai. 2014).

Drosophila melanogaster modellszervezetben az *ago* fehérjének számos szövetben leírták a funkcióját. Az Ago ismert célfehérjéi között van a Ciklin-E, a dMyc, a Trachealess (Doronkin és mtsai. 2003; Moberg és mtsai. 2004; Mortimer és Moberg 2007). Az *ago* hiányának hatását kimutatták az idegrendszerben, az embrionális trachea képződés során, a fejlődő szövetekben, a szemekben, és az oogenezis folyamatában is (Giangrande és mtsai. 2009; Mortimer és Moberg 2007; Mortimer és Moberg 2013; Nicholson és mtsai. 2011; Nicholson és mtsai. 2009; Doronkin és mtsai. 2003). Az Ago fehérjének két nagyobb jellemzett, a fehérje-fehérje interakciókért felelős szerkezeti eleme van, az F-box domén és a WD40 domén, ami egy béta korong másodlagos fehérjeszerkezethez köthető, és a célfehérjékhez történő kötődést biztosítja (Moberg és mtsai. 2001). Nagy áteresztőképességű fehérje-fehérje kölcsönhatásokat vizsgáló algoritmusok és kísérletek további potenciális Ago célfehérjéket sejtetnek.

2. Célkritika

A spermatogenezis folyamata nagyfokú konzerváltságot mutat az élővilágban. Munkacsoportunk a spermatogenezisben szerepet játszó gének azonosításán és jellemzésén dolgozik. Ennek megvalósításához *Drosophila melanogaster*t használunk, ami modellszervezetként a nagyfokú genetikai konzerváltsággal és a rendelkezésre álló genetikai és molekuláris eszközrendszerek széles választékával rendelkezik, kiváló modell a fejlődés- és sejtbiológiai kérdések megválaszolásához. Transzpozon inszerciós, eddig nem jellemzett *Drosophila* vonalak tesztelésével számos hímsteril mutáns vonal azonosítására került sor munkacsoportunkban. Célom volt a poszt-meiotikus fejlődési stádiumokat szabályozó gének genetikai és molekuláris vizsgálata az azonosított jelöltek segítségével. A spermatidák megnyúlása a spermatidák jelentős méretnövekedését eredményezi. A megnyúlást szabályozó faktorok csupán részlegesen ismertek, így a pontos mechanizmus tisztázása még várat magára. Célom volt *CG4434/big bouble 8 (bb8)* glutamát dehidrogenázt kódoló gén hímsteril mutáns alléljének részletes fenotipikus jellemzése valamint a *bb8* gén kifejeződési mintázatának és a géntermék szubcelluláris lokalizációjának vizsgálata és a *bb8* gén tisztázott funkciójának megállapítása.

A spermatidák megnyúlását követően a citoplazma és a benne található sejtalkotók jelentős része egy irányított lebontó folyamat révén kerül eltávolításra. Ebben a folyamatban már azonosítottak két E3 komplexet (Khl10/Cul3/ Roc1b és a Ntc/Cul1/SkpA (Ntc SCF) komplex), melyek célfehérjék ubiquitinálásán keresztül indítják be a kaspázok általi fehérje lebontást. Ezzel a folyamattal egy időben zajlik a spermatidák egyedivé válása, az individualizáció folyamata is. Csoportunk azonosította az *ago* gén egy mutáns allélját, melyben a spermatidák individualizációja sérül. Célom volt az *ago* mutáns genetikai és molekuláris jellemzése és az *ago* gén által kódolt E3 ubiquitin ligáz fehérje szerepének meghatározása a spermatogenezis során.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Felhasznált *Drosophila* törzsek, klasszikus genetikai vizsgálatok

A *Drosophila melanogaster* törzseket 25°C-on illetve 18°C-on neveltük, standard kukorica keményítőös táptalajon (Lakovaara 1969). Az etetési kísérletek során a táptalajt 5mM, 10mM, 20mM 100mM alfa-ketoglutaráttal egészítettük ki (Shmihel 2015).

A kísérletekhez használt törzsek a kyotói (Kyoto Stock Center) valamint a bloomingtoni törzsközpontból (Bloomington Drosophila Stock Center) származtak. Kivételt képeznek azok a törzsek, amik után feltüntettük a referenciát.

Felhasznált törzsek:

Oregon-R	w^{1118} ; UbiGFP-PACT
w^{1118}	Imp-GFP (James J Fabrizio és mtsai. 2008)
$w^{1118}; Mi\{ET1\}CG4434^{MB10362} (bb8^{ms})$	Snky-GFP (Wong és mtsai. 2005)
$w^{1118}; Df(3R)Exel9012 /TM6B, Tb^1$	w^{1118} ; Pbac{WH}ntc ^{f07259}
$w^{1118}; Df(3R)BSC619/TM6C, cu^1 Sb^1$	w^{1118} ; P{DJ-GFP.S}AS1/CyO
$w^{1118}; noc[Sco]/SM6a, P\{hsLMiT\}2.4$	$ago^1/TM6$ (Moberg és mtsai. 2001)
$w^{1118}; P\{RS5\}ago^{5-HA-2760} (ago^{ms})$	$ago^3/TM6$ (Moberg és mtsai. 2001)
$w^{1118}; Df(3L)BSC370/TM6C, Sb1 cu1$	$y[1] sc[*] v[1];$
$w^{1118}; Df(3L)GN50$	P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMC04797}attP40
$w^{1118}; Sp/SM6b; Df(37C)ry/TM3,Sb,P\{\Delta 2-3\}$	w^{1118} ; Tft/Cyo; P{Bam-Gal4}
$w^{1118}; P\{His2Av^{T:Avic\backslash GFP-S65T}\}$	
w^* ; P{ProtamineB-eGFP}1 / CyO	

Kontroll törzsnek az Oregon-R törzset, valamint a fáziskontraszt mikroszkópiához a w^{1118} törzset használtuk. A transzgenikus markert hordozó vonalak esetében, a vizsgált mutációt ($ago^{ms}/ago^{5-HA-2760}$, $bb8^{ms}/CG4434^{MB10362}$) nem hordozó törzs egyedeit használtuk kontrollnak. Az itt nem említett vonalakat a munkám során alapítottuk. A vonalak alapításához használt keresztezési sémák a 10.2 függelékben találhatók.

A fertilitási tesztek során a vizsgált egyedi hímekeket 4-5 vad típusú szűz nősténnyel, a nőstények esetében pedig a vizsgált egyedi nőstényeket 4-5 vad típusú hímmel kereszteztük. A fertilitást a keresztezést követő 5. naptól vizsgáltuk, a lárvák jelenléte alapján. A transzpozon

remobilizáláshoz, a transzgenikus markerek vizsgálatához, a kettős mutánsok előállításához, valamint a rekombinánsok létrehozásához használt keresztezési sémák, a 10.2 Függelékben található.

3.2 Molekuláris biológiai módszerek

3.2.1 DNS izolálás

DNS izolálás egyedi hím muslicából

A legyet 50 µl squishing pufferben (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl, frissen hozzáadott 0,2 µg/µl proteinázK) pipettahegy segítségével szétroncsoltuk. A mintát 37°C-on 30 percig inkubáltuk, majd 95°C-n 2 percig inaktívtuk a proteinázK-t. Az elkészült mintákat -20°C-n tároltuk, majd PCR reakciókban használtuk.

Nagy tisztaságú DNS izolálás

A muslicákat (30) -20°C fagyasztást követően üveg homogenizátorban 1 ml Grinding pufferben (250 ml-hez: 17,115 g szacharóz, 25 ml 1M Tris pH 9,2, 12,5 ml 2 M NaCl, 2 ml 0,9 M EDTA, 12,5 ml 10% SDS, 175 ml H₂O) homogenizáltuk, majd 30 percig 65°C-n inkubáltuk. Ezt követően 150 µl 8 M K-acetátot adtunk a mintához, és többszöri keverés mellett 30 percig jégen tartottuk. Asztali centrifugán 13000 rpm fordulatszámmal 5 percig centrifugáltuk a mintát. A felülúszót két részre osztottuk, és azonos térfogatnyi -20°C-os etanollal egészítettük ki. A kicsapódott DNS-t 13000 rpm fordulatszámon centrifugáltuk 5 percig. A felülúszót eltávolítottuk és a pelletet -20°C-os 70%-os etanollal mostuk. Ezt követően a DNS pelletet beszárítottuk, végül 150 µl TE oldatban (10 mM Tris pH 7,5, 1 µM EDTA) oldottuk fel.

3.2.2 Transzpozon remobilizálás molekuláris ellenőrzése

A transzpozonok kivágódását, a transzpozon markergénjét (*miniwhite*, *GFP*) nem hordozó egyedi muslicákból izolált DNS mintákon végzett PCR reakciókkal ellenőriztük DreamTaq DNS polimeráz (Thermo Fisher Scientific) felhasználásával a gyártó által javasolt reakciókörülmények alkalmazásával. Genomi régió specifikus és transzpozon-specifikus primerek alkalmazásával győződünk meg a transzpozonok precíz kivágódásáról. A genomi régió szekvencia ellenőrzését DNS szekvenálással végeztük (MTA SZBK). A felhasznált primerek a 10.1 Függelékben található.

3.2.3 Transzgének létrehozása

A transzgének klónozásához Phusion DNS polimerázt (Thermo Fisher Scientific) használtunk a gyártó javaslatai szerint. A felhasznált primerek a 10.1 Függelékben találhatóak. A PCR termékeket 1%-os agaróz gélen futtattuk TAE (1l-hez: 4,84 g Tris, 1,14 ml ecetsav, 2 ml EDTA (0,5 M) pufferben és a PCR termékeket GeneJet Gel Extraction kittel (Thermo scientific) gélből izoláltuk.

A P{bb8gr} genomi menekítő transzgén létrehozásához a géntől upstream elhelyezkedő 1081 bp-t és a gén teljes genomi szakaszát amplifikáltuk, majd a PCR terméket NotI, illetve XbaI restrikciós endonukleázzal hasítottuk. Az emésztett terméket agaróz gélen futtattuk, majd gélizolálás (GeneJet Gel Extraction kittel (Thermo scientific)) után PUASt *Drosophila* transzformációs vektorba ligáltuk T4 DNS ligázzal. A ligálást követően a plazmidokat kémiaiailag kompetenssé tett 2T1 *Eserichia Coli* törzsbe transzformáltuk standard DNS transzformációs protokoll szerint (Maniatis). A transzformált baktérium kultúrákat karbenicillinnel kiegészített 2YT (1 l-hez: 16 g tripton, 10 g élesztő kivonat, 5 g NaCl, 15 g agar pH 7) táptalajon egy éjszakán át 37°C-on növesztettük, majd karbenicillinnel kiegészített 2,5 ml folyékony 2YT tápoldatban szaporítottuk egy éjszakán át 37°C-on. A pozitív klónok kiválasztásához CloneChecker™ rendszert (ThermoFisher Scientific) alkalmaztunk a gyártó által javasolt módon. A pozitív restrikciós mintázatot mutató kultúrákból plazmid DNS izolálást végeztünk Qiagen miniprep kit felhasználásával, a gyártó által előírt módon. A 3097 bázispár és a 8897 bázispár nagyságú restrikciós mintázattal rendelkező klónokat szekvenálásra küldtük. A szekvenálás alapján hibátlan szekvenciával rendelkező klónokból nagyobb mennyiségű, és tisztaságú plazmid DNS-t izoláltunk Qiagen Midi plazmid DNS preparáló kit segítségével, a gyártó által előírt módon. A dolgozatban szereplő transzgének létrehozása a P{bb8gr} vektor előállításához hasonló módon történt, az alábbi módosításokkal. A P{bb8^{N100as}-GFP} esetében a PCR terméket először pJET1.2 vektorba illesztettünk a CloneJET PCR Cloning Kit (Life Technologies) segítségével. A pozitív klónokat szekvenáltuk és a pJET-bb8^{N100as} plazmidból az inszertet NotI és XhoI emésztéssel vágtuk ki, majd azt PUASt vektorba ligáltuk.

A P{bb8-GFP} transzgén létrehozásához cDNSről (Lásd génexpressziós vizsgálatok) amplifikáltuk a *bb8* kódoló régióját, amit először a pJET1.2 vektorba illesztettünk. A szekvenálást követően MfeI, XhoI restrikciós emésztést végeztünk és az általunk módosított TV3-GFP vektorba illesztettük a *bb8* kódoló régióját EcoRI, XhoI helyekre (Wong és mtsai. 2005).

A P{mCherry-Ago} transzgén létrehozásához az LD21322 számú cDNS klónból amplifikáltuk az *ago* kódoló régióját, majd XhoI, XbaI restrikciós emésztéssel az általunk módosított TV3-mCherry vektorba illesztettük, majd szekvenálással ellenőriztük a kódoló régió hibamentességét (Wong és mtsai. 2005).

A tisztított plazmidokat (*PUAST-bb8^{gr}*, *PUAST-bb8^{N100as}-GFP*, *TV3-bb8-GFP*, *TV3-mCherry-ago*) *Drosophila* embriókba injektáltattuk az MTA SzBK injektáló szolgálatával (10.1 függelék).

A transzgénikus *Drosophilák* a *miniwhite* markergént hordozták, a transzgének beépülését az F1 generációban vizsgáltuk. A transzgenikus törzseket *w¹¹¹⁸*; If/CyO; MKRS/TM6 balanszer kromoszómákat hordozó muslicákkal kereszteztük, majd az F1 generációból kelt utódokat ismét kereszteztük *w¹¹¹⁸*; If/CyO; MKRS/TM6 genotípusú egyedekkel. Így az F2-ből meg lehetett határozni, hogy a beépülés melyik kromoszómára történt, valamint a balanszírozott kromoszómák megkönnyítették a transzgént hordozó kromoszóma követését és a mutáns háttéren transzgént hordozó vonalak alapítását. A keresztezési sémák a 10.2 függelékben találhatók.

3.3 Génexpressziós vizsgálatok, RT-PCR és q-RT-PCR

A génexpressziós vizsgálatokhoz, különböző szövetekből (fej, test), valamint a here darabolásából (egész here, here csúcsi része, here meiotikus cisztákat tartalmazó és poszt-meiotikus cisztákat tartalmazó része) származó darabokból teljes RNS-t izoláltunk. A kiboncolt szöveteket cseppfolyós N₂-ben fagyasztottuk, homogenizátorral porítottuk, majd teljes RNS-t GeneJET RNS tisztító kittel (Thermo Scientific) nyertük ki. A fej mintához 30, a test mintához 10 legyet használtunk. A here mintákhoz 30-60 legyet, a here darabolásához mintánként 100 legyet boncoltunk. A kontroll és a mutáns esetében a felhasznált állatok száma minden kísérletnél megegyezett. A cDNS-t a RevertAid™ First Strand cDNS szintézis Kit (Life Technologies) felhasználásával, random hexamer primerekkel, a gyártó által ajánlott protokoll szerint állítottuk elő. Szemikvantitatív, reverz transzkripcióval kapcsolt PCR reakciókkal ellenőriztük a cDNS mintákat és a kvantitatív real time PCR-hoz (qRT-PCR) használt primereket. A qRT-PCR reakcióhoz a Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mixet (Life Technologies) használtuk, a mintákat a CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) gép segítségével analizáltuk. A reakciókörülmények a következők voltak: 95°C 10 perc, 50 ciklusig – 95°C 15 másodperc, 54°C 30 másodperc, 72°C 30 másodperc. Minden kísérletet három független biológiai mintán végeztünk el. A kísérletekben az *rp49* háztartási gént használtuk

referenciaként. A stádium specifikus RNS eloszlás vizsgálatánál a *CG10252* gén RNS terméke volt a referencia. A felhasznált primer szekvenciák a 10.1 függelékben vannak feltüntetve.

3.4 RNS *in situ* hibridizáció

A *CG4434* génről átíródó mRNS tesztiszen belüli eloszlását vizsgáltuk a DIG jelölt RNS *in situ* hibridizáció segítségével. A teljes RNS izolálást (lásd 3.3) követően cDNS-t írtunk át random hexamer segítségével. A próba készítéséhez egy 1183 bp hosszú terméket amplifikáltunk, ami ellentétes oldalain hordozza a T7 (FW) és SP6 (Rev) RNS polimerázok transzkripció start helyeit. Tisztított PCR terméket használtunk templátnak a DIG jelölt RNS átírásánál DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche) felhasználásával, a gyártó által előírt módon. A DIG jelölt szensz próbát SP6 polimerázzal, az antiszensz próbát T7 polimerázzal szintetizáltuk. Az *in situ* hibridizáció során pozitív kontrollként a *CycB* génre specifikus (626 bp hosszú) próbát használtunk. A minták preparálását, és az *in situ* hibridizációt Morris és munkatársai által leírt protokoll alapján végeztük, azzal a változtatással, hogy a Hibridizáló puffert tRNS-sel egészítettük ki 100 µg/ml végkoncentrációban (Morris és mtsai 2009). A jel előhívását követően felszálló (30% 50% 70% 90% 96% 10 perc) és leszálló alkohol koncentrációkat (96% 90% 70% 50% 30% PBS) alkalmaztunk a háttér csökkentésének érdekében, majd a mintákat 80% glicerolban fedtük le. A kész preparátumok vizsgálata Olympus BX51 mikroszkóppal, DIC optika felhasználásával történt.

3.5 Immunfestés, mikroszkópia

A heréket hideg tisztázó pufferben (183 mM KCl, 47 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 6.8) boncoltuk, majd 20 percig fixáltuk (PBS 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄ pH 7.4, 4% formaldehid frissen készítve). A fixáló oldatot eltávolítottuk és a mintákat 3X20 percig mostuk PBSTX-ben (0.1% tween20-at 0.3% TritonX-et tartalmazó PBS). Egy órán keresztül PBSTX + 1% BSA-ban (1% BSA-t tartalmazó PBSTX) blokkoltuk, majd az elsődleges ellenanyaggal egy éjszakán keresztül inkubáltuk 4°C-on. A tesztiszeket ezt követően 3X20 percig PBSTX-ben mostuk szobahőmérsékleten, majd a preparátumokat a másodlagos ellenanyaggal 1,5 -2 óráig inkubáltuk szintén szobahőmérsékleten. A DAPI (1 µg/ml) és phalloidin (TexasRed vagy Alexa 488 jelölt) (1:250) festést 20 percig PBSTX-ben végeztük. Ezt követően a mintákat 3X20 percig PBSTX-ben mostuk. A mintákat SlowFade® Gold antifade reagent (Life Technologies) médiumban fedtük le. Ezzel a módszerrel végeztük az AXO49, a kaszpáz-3, az alfa-spektrin, a Soti és a dBruce immunfestéseket.

A tesztiszek vizsgálata során úgynevezett squash preparátumot is készítettünk, amelyben a kiboncolt tesztiszeket csipeszek és rovartűk segítségével felszakítottuk és tartalmukat pozitívan töltött vagy poly-L-lizinnel kezelt tárgylemezre folytattuk. Ezt követően szilikonizált 22X22 mm-es fedőlemezzel lefedtük, és cseppfolyós nitrogénben lefagyasztottuk. A fagyasztott mintáról egy szike segítségével lepattintottuk a fedőlemezt, majd a mintát -20°C etanolban inkubáltuk 10 percig. Ezt követően 10 percig fixáltuk (4% formaldehid PBS-ben). A mintákat, nedves kamrában (műanyag petricsésze megnedvesített papírtörülkövel) tároltuk, és a fentebb leírt módon végeztük az immunfestést. Az így készített mintákon az ATP5A ellenanyagot használtuk.

Az *in vivo* festések esetén, a tesztiszeket csipeszekkel és rovartűkkel felhasítottuk, pozitívan töltött tárgylemezre folytattuk. Ezt követően a mintát 10-15 percig inkubáltuk a tárgylemezen a Mitotracker vagy JC-1 festékkel kiegészített tisztázó pufferben. A puffereket pipettázással távolítottuk el. Kétszeri tisztázó pufferrel történő öblítést követően az élő mintákat tisztázó pufferben fedtük le. A mikroszkópiát Olympus BX51 és Olympus Fluoview Fv10i mikroszkópokkal végeztük. Az elkészült képeket GIMP és ImageJ programok segítségével értékeltük ki.

A TUNEL jelöléshez Click-iT® TUNEL Alexa Fluor® 594 Imaging Assay (Life Technologies) kitet használtunk M. V. Kibanov publikált protokollja alapján (Kibanov és mtsai. 2013).

Felhasznált fluoreszcens festékek, ellenanyagok:

Festékek	koncentráció/ hígítás	Gyártó / forgalmazó
DAPI	1 µg/ml	Life Technologies
Texas Red®-X Phalloidin	1:250	Life Technologies
Alexa Fluor® 488 Phalloidin	1:251	Life Technologies
Mitotracker Red CMXRos	0.5 µM	Life Technologies
JC-1	5 µg/ml	Molecular Probes

Elsődleges ellenanyagok	hígítás	típus	Gyártó / forgalmazó
α-pan poliglicilált tubulin (AXO49)	1:5000	egér	Merck Millipore
α-ATP5α (15H4C4)	1:100	egér	Abcam
α-hasított kaszpáz-3 (5A1E)	1:200	nyúl	Cell Signalling Tech.
α-alfa-spektrin (3A9)	1:200	egér	DSHB
α-Soti	1:100	tengerimalac	Eli Arama laboratórium
α-dBruce (B710)	1:250	nyúl	Eli Arama laboratórium

Másodlagos ellenanyagok	hígítás	típus	gyártó
α-egér (Alexa Fuor 488, 546, 633)	1:400	szamár	Life Technologies
α-nyúl (Alexa Fuor 488, 546, 633)			
α-tengerimalac (Alexa Fuor 488, 546, 633)			

3.6 Elektronmikroszkópia

Az elektronmikroszkópos felvételek esetében a Laurinyecz és mtsai. által leírt módszert alkalmaztuk, az ELTE Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszékével közreműködve (Laurinyecz és mtsai. 2016).

3.7 Statisztikai elemzések, bioinformatika

A glutamát dehidrogenáz ortológ fehérje szekvenciákat a FlyBase és az OrthoDB v8 adatbázisokból töltöttük le. A szekvenciákat ClustalW program segítségével illesztettük. A Filogenetikai fák maximum-likelihood módszerrel MEGA 6.06. programmal készültek. A filogenetikai fák a csomópontoknál feltüntetett értékek az 1000X replikátum „bootstrap” százalékos értéke (csak a 70%-nál magasabb értékeket írtuk fel).

A *bb8^{ms}* ciszták hosszának méréséhez ImageJ programot használtuk. A *bb8^{ms}* ciszták hosszának mérésénél és az *ago^{ms}* megnyúlt cisztáinak statisztikai elemzésénél a szórás (+/-) fel van tüntetve. A Bb8 individualizációs fenotípusát a boxplot analízist R 3.2.4 program segítségével

ábrázoltuk. A szignifikanciát Student-t-teszttel és a boxplot esetében Welch két mintás t-teszttel állapítottuk meg. A táblázatok és grafikonok Microsoft Excelben készültek. A fehérjék szerkezeti modelljének illesztését az UCSF Chimera 1.11 MODELLER bővítményével végeztük. A modellek elemzése az UCSF Chimera 1.11 program segítségével történt.

4. Eredmények

4.1 A Minos transzpozon inszerciója a *CG4434/bb8* génben hímsterilitást eredményez

A hímivarsejtek kialakításában szerepet játszó gének azonosítására a klasszikus genetikai módszerek jó lehetőséget biztosítanak. A transzpozonok által előállított mutáns gyűjtemények törzsközpontokból megrendelhetők. A mutáns vonalak esetében ismert a transzpozonok beépülésének helye, ami lehetőséget ad az *in silico* elemzésre. A bloomingtoni Minos transzpozon inszerciók gyűjteményből olyan homozigóta életképes vonalakat választottunk ki, amelyekben szegregáló balanszer kromoszóma jelenlétét tapasztalták. A szegregáló balanszer utalhat szemiletalításra, illetve sterilitásra. Az így kiszűrt vonalakat teszteltük hím és nőstény sterilitásra. Az azonosított vonalak közül a *Mi{ET1}CG4434^{MB10362}* (az inszerciót hordozó kromoszómát *bb8^{ms}*-nek neveztük el, és ezt az elnevezést használjuk az értekezésben) vonal homozigóta hím egyedei 100%-ban sterilnek, míg a nőstények teljes mértékben fertiliseknek bizonyultak (1. táblázat).

A *bb8^{ms}* mutáns genetikai jellemzését a homozigóták és a *Df(3R)BSC619* valamint a *Df(3R)Exel9012* átfedő delécióval létrehozott hemizigóta hímek fertilitási tulajdonságainak összehasonlításával kezdtük. A homozigóta *bb8^{ms}* és a hemizigóta *bb8^{ms}/Df(3R)BSC619*, *bb8^{ms}/Df(3R)Exel9012* hímek sterilek voltak (1. táblázat). Ez az eredményünk megerősíti, hogy a hímsterilitás hátterében a *bb8* gén hibája áll.

genotípus:	Vad (n=48)	<i>bb8^{ms}</i> (n=49)	<i>bb8^{ms}/Df(3R)BSC619</i> (n=35)	<i>bb8^{ms}/Df(3R)Exel9012</i> (n=35)	<i>Δbb8^{MB10362}</i> (n=34)	<i>P{bb8^g};bb8^{ms}</i> (n=35)
fertilis (%)	97,9	0	0	0	100	97,1
steril (%)	2,1	100	100	100	0	2,9

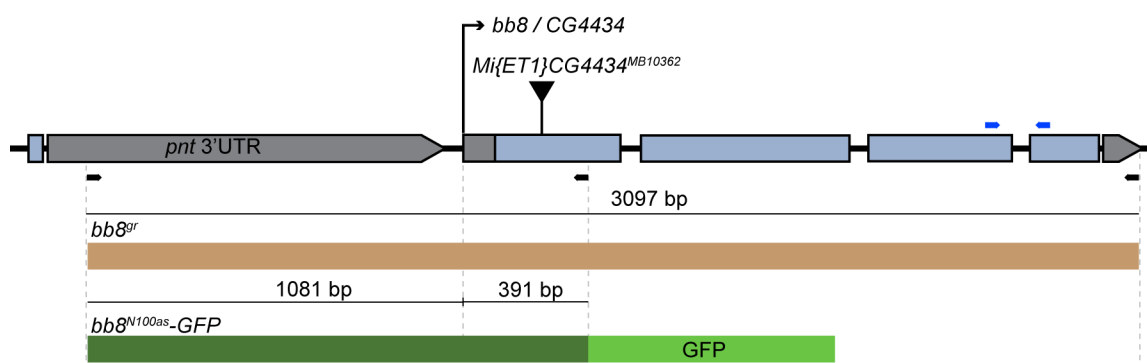
1.táblázat A *bb8* mutánsok fertilitása

Az MB10362 Minos elem jelenlétét a *CG4434/bb8* gén első exonjában molekulárisan is igazoltuk (5. Ábra). A MB10362 Minos transzpozon beépülését a *bb8* génbe PCR reakcióval igazoltuk a transzpozon 5' és 3' végére specifikus valamint a *bb8* génre specifikus primerek felhasználásával. A transzpozon által okozott mutáció a transzpozon precíz remobilizálásával általában revertálható (Metaxakis és mtsai. 2005). A MB10362 Minos elem revertálásánál a DhydMinos transzpozázt (*w¹¹¹⁸,noc^{Sco}/SM6a, P{hsILMiT}2.4*) használtunk. A szemben

kifejeződő GFP expresszió elvesztésére szelektáltunk, 10 revertáns törzset alapítottunk és az alapított törzsek fertilitását teszteltük (1. táblázat). A 8 fertilis revertáns vonal esetében PCR technikával, majd azt követően a PCR termék szekvenálásával is megerősítettük a Minos elem precíz kivágódását.

A genetikai jellemzés egyik fontos lépése a mutáns fenotípus menekítése, egy, az érintett gén vad típusú kópiáját tartalmazó transzgénnel (5. Ábra). Létrehoztunk egy genomi szakaszt tartalmazó transzgént, amelyben benne van a *bb8* géntől upstream elhelyezkedő 1081 bázispáros szakasz, a *bb8* gén feltételezett promóter régiójával együtt, valamint a *bb8* gén teljes kódoló régiója P{*bb8^{gr}*}. 10 transzgenikus vonalat alapítottunk, ebből három vonalon teszteltük a hímsteril fenotípus menekítését mind a *w¹¹¹⁸;P{bb8^{gr}}; bb8^{ms}*, mind a *w¹¹¹⁸;P{bb8^{gr}}; bb8^{ms}/Df(3R)BSC619* genotípusú egyedekben. A fertilitás mind a *w¹¹¹⁸;P{bb8^{gr}}; bb8^{ms}*, mind a *w¹¹¹⁸;P{bb8^{gr}}; bb8^{ms}/Df(3R)BSC619* genotípus esetében is vad típusra állt vissza (1. Táblázat). Kontrollként a *w¹¹¹⁸; bb8^{ms}* és *w¹¹¹⁸* típusú egyedeket használtunk.

A klasszikus *bb8^{ms}* allél mellett megvizsgáltuk a *bb8* génre specifikus P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TriP.HMC04797}attP40 RNS interferencia vonal fenotípusát, *Bam-Gal4* driverrel történő meghajtást követően. A géncsendesítés eredményeként hímsteril fenotípust tapasztaltuk. Ezek az eredmények megerősítik, hogy valóban a *bb8* gén mutációja okozza a hímek sterilitását a *bb8^{ms}* vonalban.

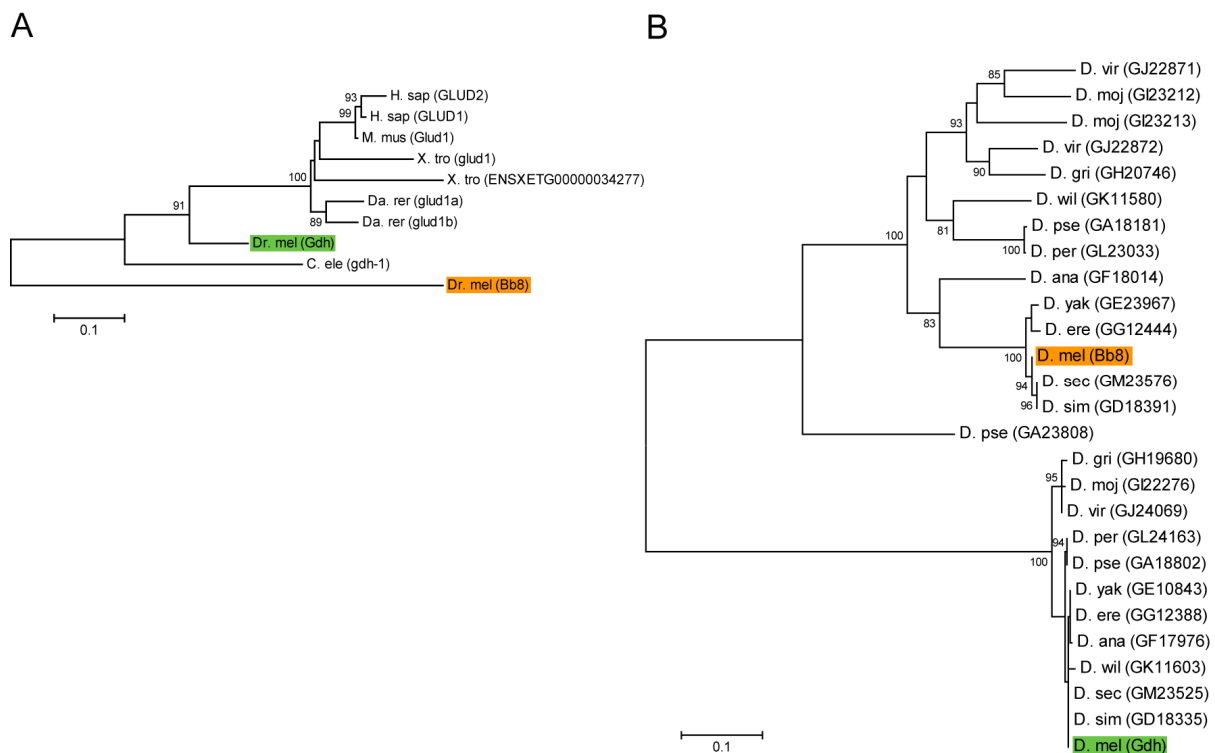


5. Ábra A CG4434/*bb8* gén és a létrehozott transzgének szerkezete

(A) A *bb8* genomi környezetének sematikus ábrázolása. (fekete vonalak: intronikus szakaszok; szürke mezők: UTR régiók; kék hasábok: exonikus régiók; nyíl: *bb8* transzkripció start helye; fekete háromszög: *Mi{ET1}CG4434^{MB10362}* transzpozon beépülésének helye; fekete nyilak: a klónozáshoz használt PCR primerek pozíciója; kék nyilak: q-RT-PCR primerek pozíciója) és a transzgének szerkezetét (vékony fekete vonalak számokkal: a transzgének hossza; barna hasáb: *bb8^{gr}* genomi menekítő szakasz; zöld hasáb: *bb8^{N100as}-GFP* riporter transzgén).

4.2 A *bb8* gén egy glutamát dehidrogenázt kódol

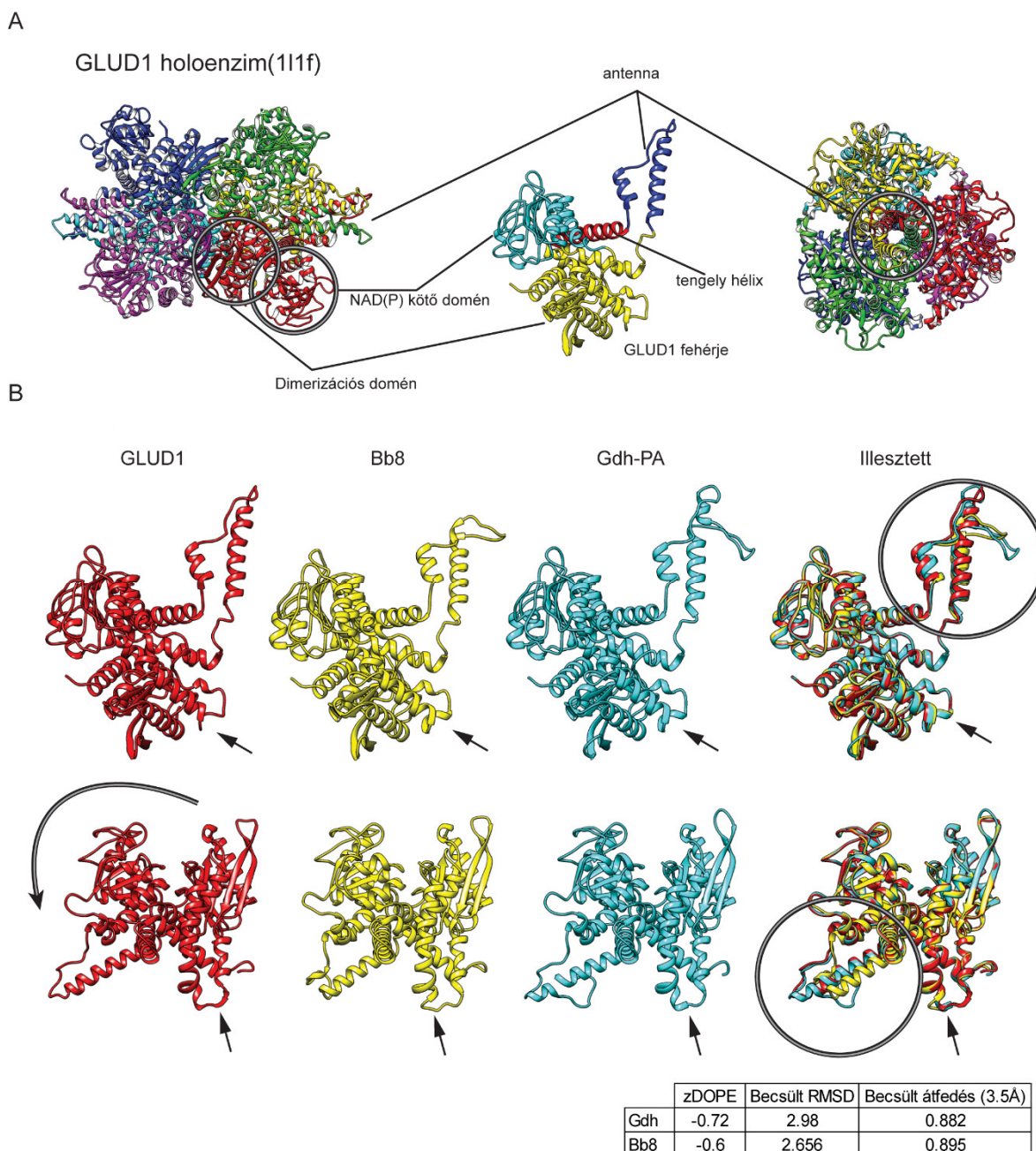
A *Drosophila melanogaster* genomja kettő glutamát dehidrogenáz gént kódol a *Glutamate dehydrogenase*-t (*Gdh*) és a *bb8* -at. Fehérje szekvenciákon alapuló filogenetikai elemzést végezve azt tapasztaltuk, hogy a *Drosophila bb8* génje által kódolt fehérje kevésbé konzervált, kisebb hasonlóságot mutat a modellszervezetekben található fehérjékkel (6. Ábra A). A Bb8 a fehérje aminosav szekvencia alapján 44%-os hasonlóságot mutat a humán GLUD1-gyel és GLUD2-vel, a *Drosophila Gdh*-val pedig 45%-ot. A *Gdh* 64%-os aminosav szekvencia hasonlóságot mutat a humán GLUD1 és GLUD2 fehérjékkel. A Bb8 a szekvenált *Drosophila* fajok mindegyikében jelen van, és kevésbé konzervált, mint a *Gdh* fehérje (6. Ábra B). A Bb8 ortológ fehérjék hasonlóságainak átlaga a Bb8 fehérjéhez 81%-os, a *Gdh* fehérjékhez hasonlítva 44%, míg a *Gdh* fehérje és ortológjai esetében az egymáshoz viszonyított hasonlóságok átlaga 97% (6. Ábra).



6. Ábra A glutamát dehidrogenázok filogenetikai elemzése

(A) Különböző modellszervezetek és az emberi glutamát dehidrogenáz fehérjék filogenetikai elemzése. (B) A *Gdh* és a *Bb8* fehérjék filogenetikai elemzése a szekvenált *Drosophila* fajokban.

Az aminosav szekvenciák különbségei ellenére az ismert térszerkezetű GLUD1 fehérje 1l1f azonosítójú molekulamodelljére (7. Ábra A) (Banerjee és mtsai. 2003) szinte tökéletesen illeszthető mind a Bb8, mind a Gdh fehérje (7. Ábra B). A térszerkezet konzerváltnak tűnik a GLUD1, a Gdh és a Bb8 fehérje között. Jelentősebb szerkezeti eltérést két pontban figyeltünk meg, az egyik a NAD(P) kötő domén rövid, 6 aminosav hosszú (1l1f 91-97. as) szakaszához köthető. A modellekben a legszembevetőbb különbség az antenna régióban tapasztalható, aminek az enzimek allosztérikus szabályozásában és az alegységek trimerizációjában tulajdonítanak szerepet (Peterson és Smith 1999).



7. Ábra A glutamát dehidrogenázok szerkezeti elemzése

(A) Az 1l1f GLUD1 molekula szerkezete és a GLUD1 fehérje és a 6 db GLUD1 fehérjéből álló glutamát dehidrogenáz holoenzim szerkezete (B) A Gdh és Bb8 fehérjék illesztése a GLUD1 modelljére. Az egyenes fekete nyilak a dimerizációs doménben lévő eltérésekre mutatnak, a körök az antenna régió eltéréseit emelik ki. Az ívelt nyíl a felső sorban lévő molekula modellekhez viszonyított elforgatást szemlélteti. Az illeszkedés pontosságának meghatározására három értéket tüntettünk fel: *zDOPE* (normalized Discrete Optimized Protein Energy) – az atomok távolságától függő statisztikai érték, a negatív értékek pontosabb modellt jelentenek; *RMSD* (Root-Mean-Square Deviation) – a C α atomok az illesztett modell templát modelltől való eltérése, a kisebb értékek pontosabb illeszkedést jelölnek; *becsült átfedés (3.5Å)* – 3.5Å-on belüli C α atomok átfedése, a nagyobb értékek pontosabb illeszkedést jelölnek.

Az emlős glutamát dehidrogenázok aktív centrumában található a szubsztrátok kötésében kiemelt szerepet játszó aminosavak ismertek (Peterson és Smith 1999). Megvizsgáltuk az alfa-ketoglutarát/glutamát és NAD(P) kötésben szerepet játszó aminosavak konzerváltságát a GLUD1, GLUD2, Gdh és Bb8 fehérjék között. Azt tapasztaltuk, hogy a glutamát kötéséhez szükséges aminosavak teljes mértékben megegyeznek a vizsgált fehérjék között (2. Táblázat). A NAD(P) kötő aminosavak esetén különbséget tapasztaltunk (3. Táblázat). A GLUD1 és GLUD2 között két aminosavas különbség figyelhető meg. A Bb8 esetén 8, a Gdh esetén 9 aminosav egyezik meg a GLUD1-gyel. Érdekesség, hogy a Gdh 9 aminosavban egyezik meg a GLUD1 és GLUD2 fehérjékkel, ugyanakkor a Bb8 8 aminosava egyezik meg a GLUD1-gyel viszont a GLUD2-vel 10 aminosav egyezik. A 227-es pozícióban és 384-es pozícióban található aminosavak csak a GLUD2-ben és a Bb8-ban konzerváltak.

α -Kg zseb	Pozíció								%
	147	149	171	183	268	406	438	egyezés (GLUD1)	
GLUD1	K	G	K	K	R	N	S	7	100
GLUD2	K	G	K	K	R	N	S	7	100
Gdh	K	G	K	K	R	N	S	7	100
Bb8	K	G	K	K	R	N	S	7	100

2. Táblázat A glutamát dehidrogenáz enzimek alfa-ketoglutarát és glutamát kötéséért felelős aminosavak

NAD(P) zseb	Pozíció													egyezés (GLUD1)	%	Egyezés (GLUD2)	%
	225	226	227	268	309	311	332	333	383	384	387	406	431				
GLUD1	D	M	S	R	F	N	E	S	A	S	Q	N	N	13	100	11	84
GLUD2	D	M	N	R	F	N	E	S	A	T	Q	N	N	11	84	13	100
Gdh	D	M	G	R	F	N	E	H	A	V	V	N	N	9	69	9	69
Bb8	D	V	N	R	F	N	E	F	A	T	V	N	N	8	61	10	76

3. Táblázat A glutamát dehidrogenáz enzimek NAD(P) kötéséért felelős aminosavak

Banerjee és munkatársai 2003-ban meghatározták a glutamát dehidrogenázok GTP és ADP kötéséhez szükséges aminosavak pozícióját (Banerjee és mtsai. 2003). A GLUD1, GLUD2 és Gdh kiemelt aminosav pozícióihoz hozzárendeltük a Bb8 ugyanezen pozíciójában szereplő aminosavakat. A GLUD1 és GLUD2 esetében a kiemelt pozícióban lévő aminosavak mindkét

esetben (ADP, GTP zseb) teljesen megegyeztek. Az enzim aktivitását növelő ADP molekula 24 db meghatározott pozícióban lévő aminosavon fejtheti ki hatását. A GLUD1 fehérjére, ezekben a pozíciókban a Bb8 fehérjével 13 aminosavban (54%), míg a Gdh esetében 19 aminosavban (79%) egyezik meg (4. táblázat). A GTP kötőhelyben az eltérések sokkal jelentősebbek, a GLUD1-ben meghatározott 14 aminosav a bb8 fehérje esetében csak 4 aminosavban egyezik meg (28%), 10-ben eltér, viszont a Gdh esetében csak egy aminosavban tér el és 13 aminosavban (92%) megegyezik a GLUD1 fehérjével (5. táblázat).

ADP zseb	Pozíció																								egyezés (GLUD1)	%
	142	143	169	173	176	177	178	179	439	512	516	545	548	549	260	261	263	264	266	444	449	450	453	502		
GLUD1	H	R	T	A	D	V	P	F	Y	Y	R	K	K	V	I	S	G	G	H	K	V	S	R	E	24	100
GLUD2	H	R	T	A	D	V	P	F	Y	Y	R	K	K	V	I	S	G	G	H	K	V	S	R	E	24	100
Gdh	H	K	T	A	D	V	P	F	F	Y	R	K	T	T	I	N	G	G	H	K	V	S	R	E	19	79
Bb8	H	R	T	A	N	V	P	Y	Y	T	S	K	Q	A	V	H	G	G	N	K	V	S	K	E	13	54

4. Táblázat Az ADP kötésben szerepet játszó aminosav pozíciók Banerjee et al. 2003 alapján

GTP zseb	Pozíció														egyezés (GLUD1)	%
	266	267	269	270	274	314	315	318	319	322	346	349	503	507		
GLUD1	H	G	I	S	R	L	H	R	Y	R	K	E	K	H	14	100
GLUD2	H	G	I	S	R	L	H	R	Y	R	K	E	K	H	14	100
Gdh	H	G	V	S	R	L	H	R	Y	R	K	E	K	H	13	92
Bb8	N	G	H	S	R	S	F	K	Y	E	N	F	A	D	4	28

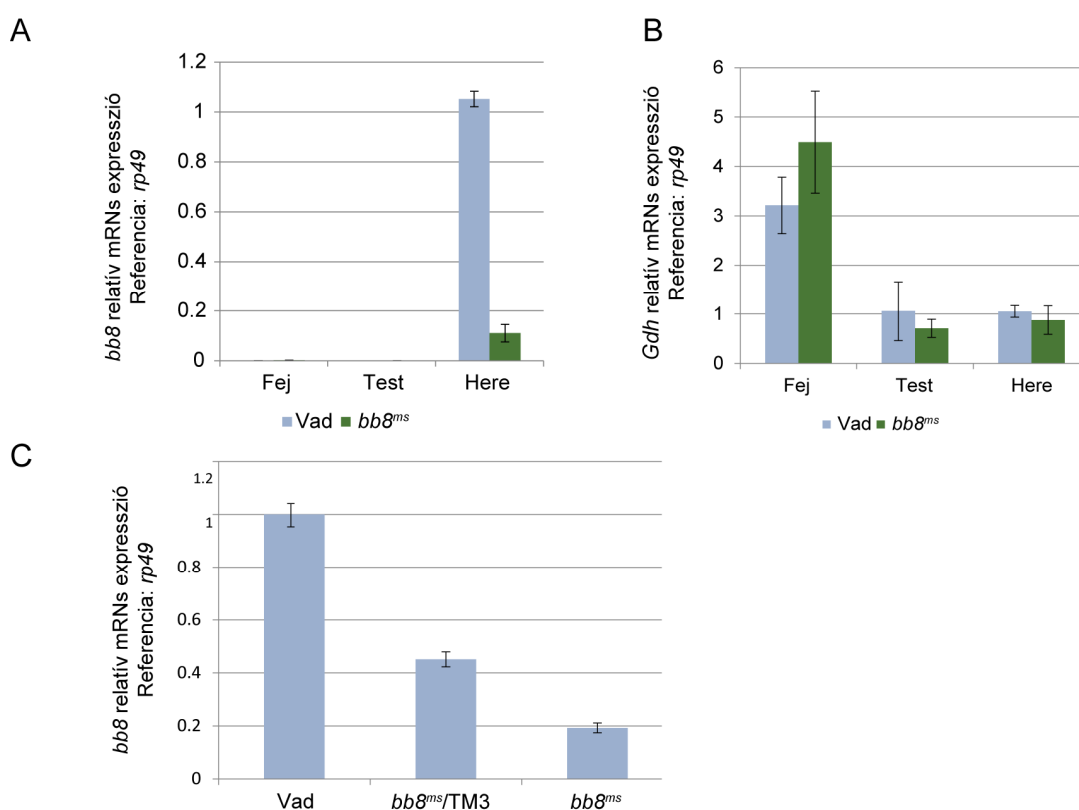
5. Táblázat A GTP kötésben szerepet játszó aminosav pozíciók Banerjee et al. 2003 alapján

A filogenetikai elemzés és a molekula modellek alapján azt tapasztaltuk, hogy a glutamát dehidrogenáz fehérjék térszerkezete a kisebb szintű fehérje szekvencia homológia ellenére nagy konzerváltságot mutat. A kiemelt pozícióban lévő aminosav szekvencia hasonlóságok alapján feltételezhetjük, hogy a Bb8 egy funkcionális glutamát dehidrogenáz. Ugyanakkor a térszerkezeti modell és az ADP és GTP kötésben felelős aminosavak eltérései alapján feltételezzük, hogy a Bb8 és Gdh paralógok szabályozása különböző.

4.3 A *bb8* gén expressziója és a Bb8 fehérje lokalizációja testiszben

A FlyAtlas adatbázis szerint, a *bb8* génre tesztisz-specifikus génexpresszió jellemző. A *bb8* gén expresszióját qRT-PCR reakció segítségével vizsgáltuk. RNS-t izoláltunk fejből, testből és

heréből, majd az átírt cDNS-ből a *bb8* és a *Gdh* gén relatív expresszióját mértük qRT-PCR reakcióban. Referenciaként az általánosan expresszáldó *rp49* riboszomális gén kifejeződését vettük alapul. A *bb8* gén expresszióját kizárólag a testiszből izolált RNS-ek esetében tapasztaltunk (8. Ábra A), míg a *Gdh* expressziója mind a három mintában kimutatható volt (8. Ábra B). A *bb8* gén expresszióját megvizsgáltuk vad típusú, heterozigóta (*bb8^{ms}/TM6c*) és homozigóta (*bb8^{ms}*) mutánsok testiszeiben, ahol a *bb8* géntermék 80%-os csökkenését tapasztaltuk a homozigóta *bb8^{ms}* mutánsok esetében a vad típushoz képest. (8. Ábra C). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a *bb8^{ms}* egy erős hipomorf allél.

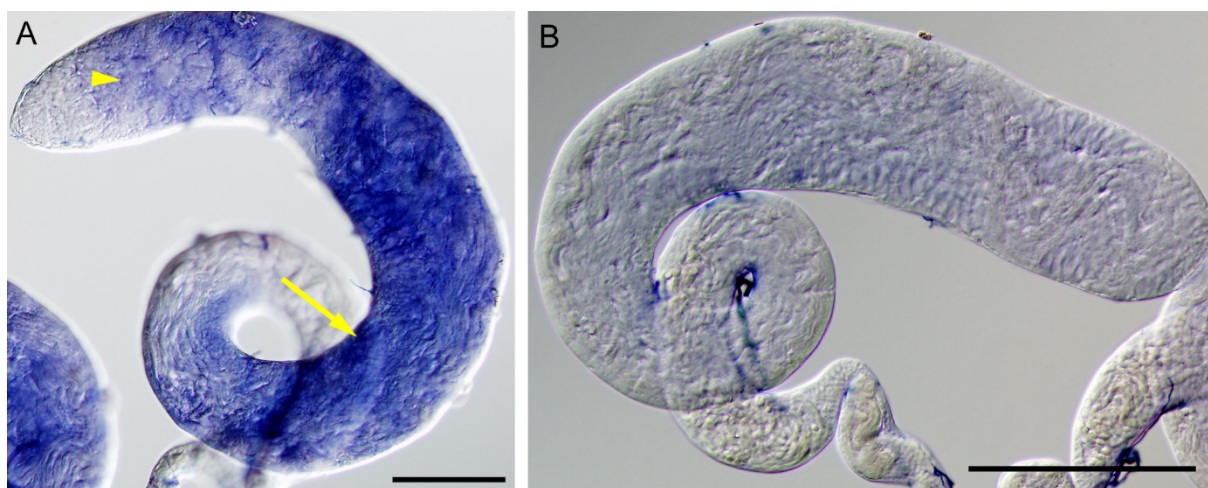


8. Ábra A *bb8*, *Gdh* és *bb8^{ms}* génexpressziója

A *bb8* gén (A) és a *Gdh* gén (B) expressziójának vizsgálata vad típusú (kék) és *bb8^{ms}* mutáns (zöld) fejben, testben és herében. (C) A *bb8* gén expressziójának vizsgálata vad típusú, *bb8^{ms}* heterozigóta és homozigóta herében. Minden esetben az *rp49* génterméke volt a referencia.

Elképzeltető, hogy a *bb8^{ms}* mutánsban a glutamát dehidrogenáz enzimaktivitásának megszűnése miatt az enzim metabolikus termékeinek hiánya okozza a hímsteril fenotípust. A *Drosophila* táptalajának különböző metabolitokkal (szterol), nyomelemekkel (vas) történő kiegészítése menekítheti a mutánsok hímsteril fenotípusát (Ma és mtsai. 2010; Metzendorf és

Lind 2010). Az alfa-ketoglutaráttal történő etetés hatását is említi a szakirodalom (Shmihel 2015). Vad típusú és *bb8^{ms}* mutáns muslicákat neveltünk 5mM, 10mM, 20mM és 100mM alfa-ketoglutaráttal kiegészített táptalajon, majd az így nevelt hím egyedek fertilitását teszteltük. A vad típus minden esetben megőrizte a fertilitását. A *bb8^{ms}* homozigóta mutáns állatok sterilek maradtak, még a 100mM-os alfa-ketoglutaráttal kiegészített táptalajon sem voltak fertilisek. Ezek alapján kijelenthetjük, hogy az alfa-ketoglutaráttal történő etetéssel nem menekíthető a *bb8^{ms}* hímsteril fenotípusa. A *bb8* transzkript tesztisz-specifikus eloszlásának megállapítására, antiszensz, DIG-jelölt *bb8* RNS próbával *in situ* hibridizációt végeztünk. A *bb8* mRNS megjelenését már az elsődleges spermatocitákban tapasztaltuk, illetve a meiotikus és korai poszt-meiotikus cisztákban megfigyelhettük a *bb8* RNS feldúsulását (9. Ábra A). A DIG-jelölt szensz *bb8* RNS próba nem ad hibridizációs jelet a tesztiszekben, ami megerősíti az antiszensz próbával kapott jel specifitását (9. Ábra B).

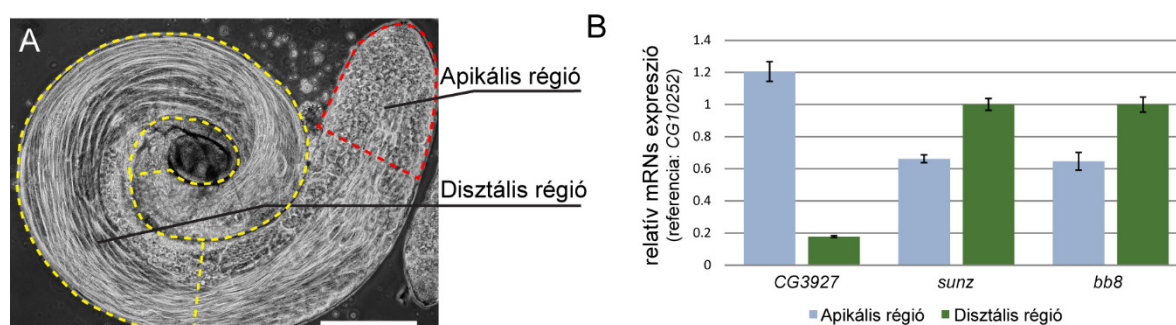


9. Ábra A *bb8* gén expressziós mintázata tesztiszben

(A) *In situ* hibridizáció az antiszensz *bb8* próbával a *bb8* expresszióját mutatja a 8 sejtes cisztákban (nyílhegy) és a *bb8* mRNS jelenlétét a meiotikus cisztákban (nyíl) vad típusú tesztiszekben. (B) A *bb8* szensz DIG-jelölt próba vad típusú tesztiszben. Skála méret: 200 μ m.

A spermatogenezis késői stádiumaiban történő *bb8* mRNS feldúsulás igazolása érdekében a tesztiszek apikális és disztális részét izoláltuk és belőlük RNS-t tisztítottunk (10. Ábra). qRT-PCR segítségével vizsgáltuk több, tesztisz-specifikus gén relatív expresszióját a különböző tesztisz régiókban. A *bb8* kifejeződése mellett mértük a korai spermatocitákban expresszáldó *CG3927* gén termékét, a poszt-meiotikusan expresszáldó *sunz* gént, valamint a tipikus késői fejlődési stádiumokban felhalmozódó *CG10252* génterméket (Barreau és mtsai. 2008). Az

adatelemzés során a kapott adatokat Barreau és munkatársai által bemutatott módon a *CG10252* expressziós szintjére normalizáltuk. Míg a *CG3927* géntermék az apikális, csúcsi régióban expresszálódik nagyobb mértékben, addig a *bb8* géntermék, a vártak megfelelően, a disztális, poszt-meiotikus sejteket tartalmazó régióban dúsul fel, hasonlóan a késői expressziót mutató *sunz* géntermékhez (10. Ábra).



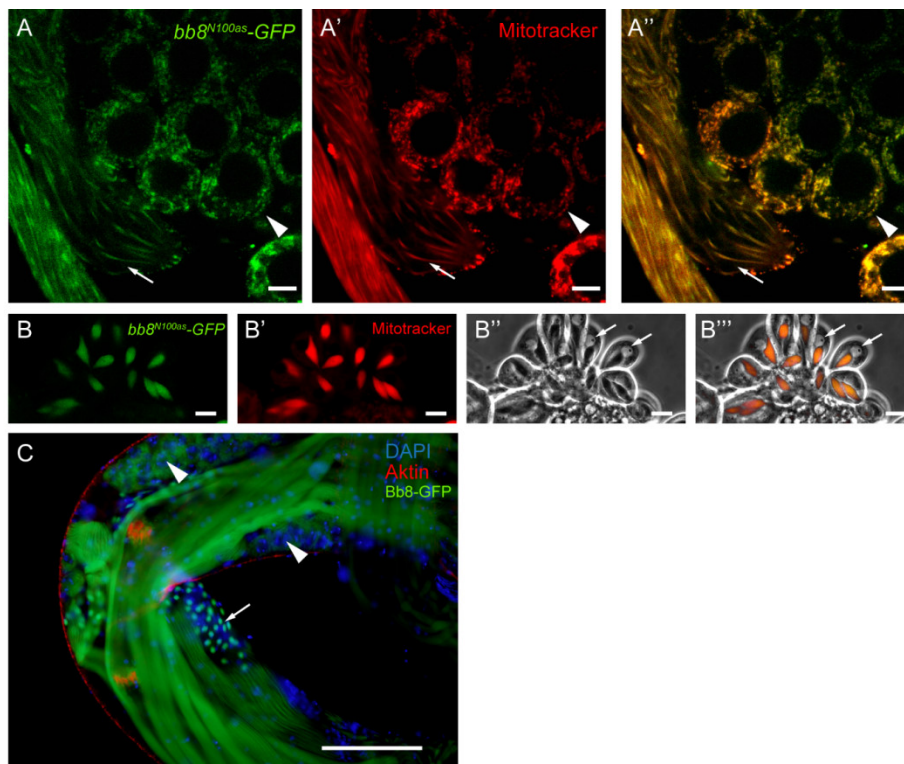
10. Ábra A *bb8* génexpresszió vizsgálata herében

(A) Az RNS izoláláshoz használt testisz régiók (apikális (piros), disztális (sárga)) sematikus ábrázolása vad típusú testiszen (a kép fáziskontraszt mikroszkópiával készült). (B) Az izolált testisz régiók expressziós mintázata a *CG3927*, a *sunz* és a *bb8* géntermékek estében qRT-PCR reakcióval mérve. A *CG10252* gént használtuk referenciának. Skála méret: 200 μ m.

Az emberi a GLUD fehérjék mitokondriális és endoplazmatikus retikulumbeli felhalmozódást mutatnak, amit az N-terminálisán elhelyezkedő szignálpeptid biztosít (Mastorodemos és mtsai. 2009). A Bb8 fehérje szubcelluláris lokalizációjának vizsgálatára létrehoztuk a *P{bb8-GFP}* transzgenikus vonalat, amelyben a transzgén egy testisz-specifikus expressziót biztosító $\beta 2$ tubulin promótert, valamint a *bb8* gén teljes kódoló régióját és egy C-terminális GFP riportert tartalmaz. A Bb8-GFP fehérje egyértelműen a mitokondriumokhoz lokalizálódik a primer spermatocitákban és a spermatidákban is (11. Ábra C). A *bb8-GFP* transzgén nem menekíti a *bb8^{ms}* mutáns fenotípusát, feltehetően a C-terminálisán lévő GFP megakadályozza az enzim polimerizációját és ezáltal a normális működését.

Létrehoztuk a *P{bb8^{N100as}-GFP}* Drosophila transzformációs vektort, ami tartalmazza a *bb8* gén előtti 1081bp szakaszt, a feltételezett promóter szekvenciával és a *bb8* gén első 391 bázispárját, ami tartalmazza a feltételezett mitokondriális lokalizációs szignált és a GFP riportert szekvenciáját. Ezzel a konstrukcióval a *bb8* gén expressziós mintázatát, valamint a fehérje stádium-specifikus szubcelluláris lokalizációját is vizsgálni tudjuk. A *P{bb8^{N100as}-GFP}*-t hordozó transzgenikus vonalak testiszeiben a GFP jel mitokondriális lokalizációt mutat a 8

sejtes cisztáktól kezdődően, a meiotikus ciszták Nebenkernjeiben és a megnyúló spermatidákban (11. Ábra A, B). A $P\{bb8^{N100as}\text{-GFP}\}$ transzgénről képződő fehérje mitokondriális lokalizációját Mitotracker festéssel erősítettük meg (11. Ábra A, B). A $bb8^{N100as}\text{-GFP}$ riporter transzgén kifejeződése megerősíti az *in situ* hibridizációval megállapított kifejeződési mintázatot. Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a Bb8 fehérje a mitokondriumhoz lokalizálódik, és az ehhez szükséges szignálpeptidet a fehérje első 100 aminosava tartalmazza.



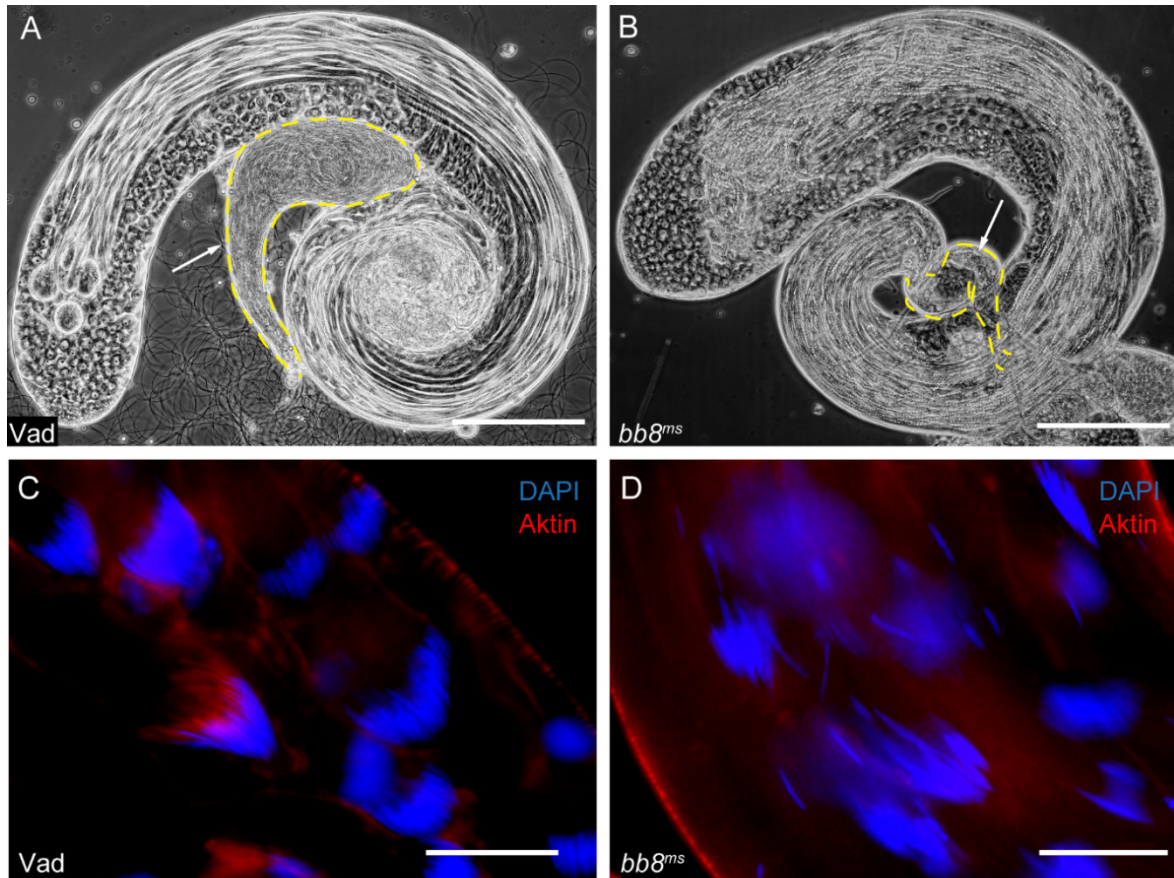
11. Ábra A Bb8 fehérje kifejeződése és szubcelluláris lokalizációja tesztiszben

(A) A $P\{bb8^{N100as}\text{-GFP}\}$ transzgén GFP kifejeződése a primer spermatociták (nyílhegy) és a megnyúló spermatidák (nyíl) mitokondriumaiban. (A - Bb8^{N100as}-GFP; A' – Mitotracker; A'' – összevetítés) (B) A $P\{bb8^{N100as}\text{-GFP}\}$ transzgén GFP kifejeződése a korai megnyúló spermatidák Nebenkernjeiben Mitotracker festéssel. A sejtmagokat nyilakkal jelöltük. (B - Bb8^{N100as}-GFP; B' – Mitotracker; B'' – fáziskontraszt; B''' – összevetítés) Skála méret: 10 μm . (C) A Bb8-GFP kifejeződése vad típusú primer spermatocitákban (nyílhegy), és kerek spermatidákban (nyilak). Skála méret: 100 μm .

4.4 Késői spermatogenezis hiba okozza a $bb8^{ms}$ mutánsok sterilitását

A $bb8^{ms}$ hímsteril fenotípus hátterének megállapítására először a tesztiszek morfológiai vizsgálatát végeztük el. Fáziskontraszt mikroszkópos vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy a vad típussal (12. Ábra A, 14. Ábra Q) ellentétben a $bb8^{ms}$ mutáns szeminális vezikuluma üres, nem tartalmaz érett spermiumokat (12. Ábra B, 14. Ábra R). A fázis kontraszt képeken

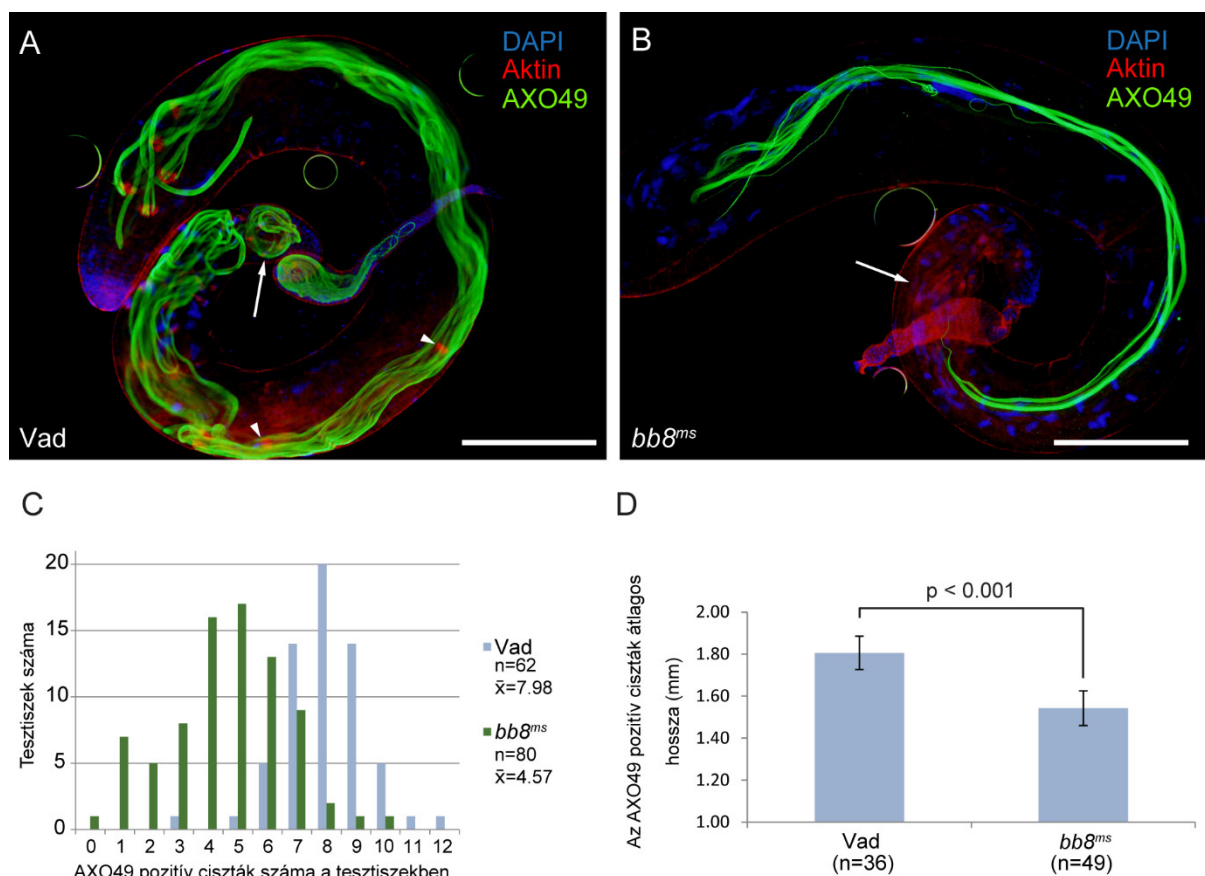
megfigyelhetjük, hogy a *bb8^{ms}* mutáns testiszekben a korai fejlődési stádiumok normálisak, és megnyúlt spermatidák is kialakulnak. A vad típusú spermatidák sejtmagjai a ciszta megnyúlása során kondenzálódnak, tű alakot vesznek fel, és szorosan összetapadó kötegeket képeznek (12. Ábra C). A *bb8^{ms}* mutánsban a megnyúlt spermatidák sejtmagjai normálisan megnyúlnak, azonban több esetben eltávolodnak egymástól, és szétszóródnak a ciszták feji részén (12. Ábra D).



12. Ábra A *bb8^{ms}* mutáns testiszekben nincsenek érett spermiumok és a megnyúlt ciszták sejtmagjai szétszóródtak

(A) Vad típusú testisz fáziskontraszt mikroszkópos képe, a szeminális vezikulum sárga szaggatott vonallal van kiemelve. (B) *bb8^{ms}* mutáns testisz fáziskontraszt mikroszkópos képe. Skála méret: 200 μ m. Vad típusú (C) és *bb8^{ms}* mutáns (D) megnyúlt ciszták fluoreszcens mikroszkópos képe, ahol a sejtmagok (kék) és a vad típusban kialakuló aktin kúpok (piros) vannak jelölve. Skála méret: 25 μ m.

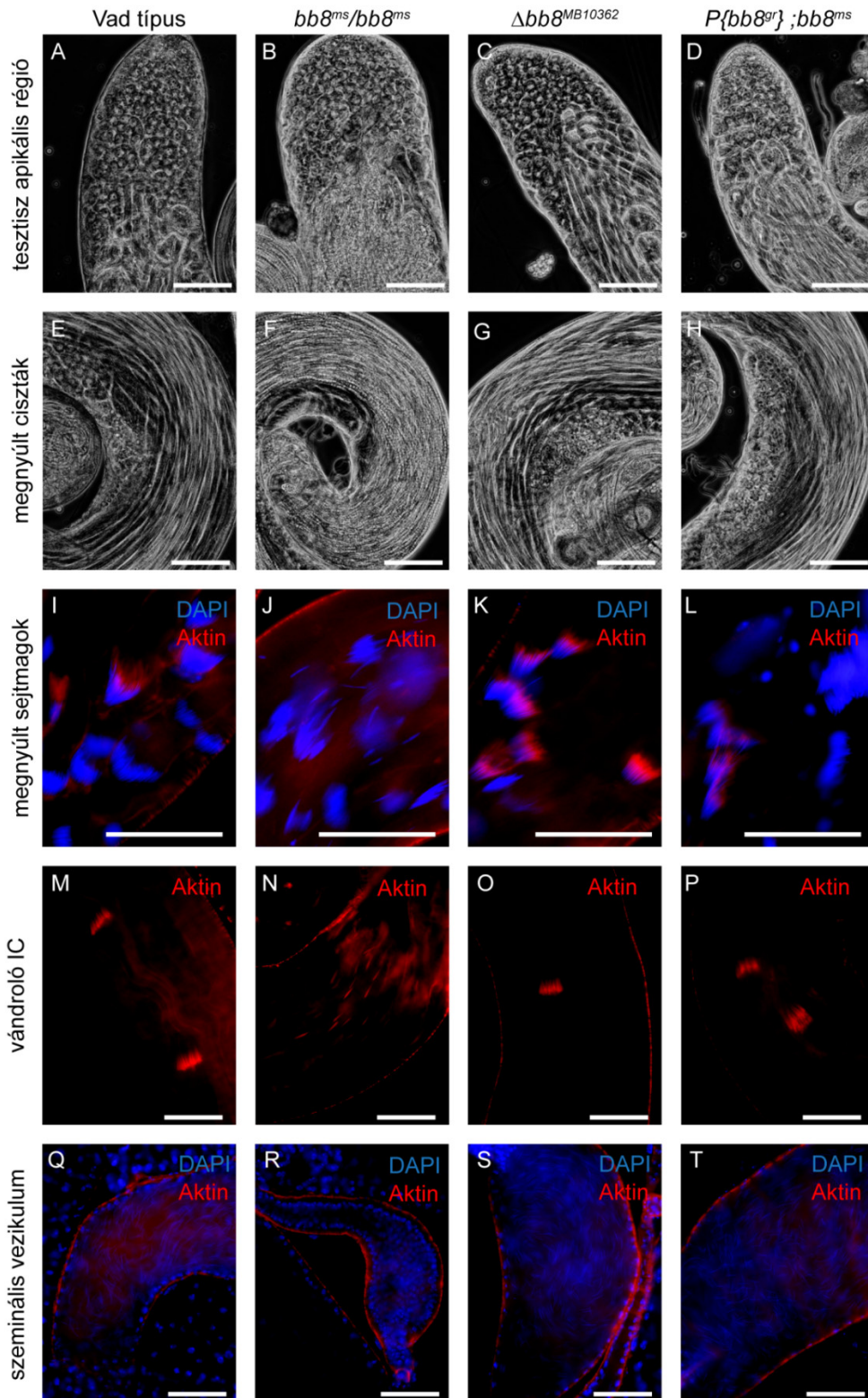
A vad típusban a ciszták megnyúlását követően az axonémális tubulinok poliglicilálódnak, és kijelölik a megnyúlt cisztákat (Bré és mtsai. 1996). Poliglicilált tubulin elleni ellenanyaggal (AXO49) immunfestést végeztünk tesztisz preparátumokon, majd a tesztiszekben festődő cisztákat megszámoltuk és a hosszukat is megmértük mind a vad típusban (13. Ábra A), mind a *bb8^{ms}* mutánsokban (13. Ábra B). Átlagosan 7,98 darab AXO49 pozitív ciszta van a kettő napos muslicákból boncolt vad típusú tesztiszekben és 4,57 darab a *bb8^{ms}* tesztiszekben (13. Ábra C). Az AXO49 pozitív ciszták hosszában is eltérést tapasztaltunk, a vad típusú ciszták átlagos hossza 1,8 mm, míg a *bb8^{ms}* mutáns ciszták átlagos hossza 1,55 mm (13. Ábra D). Ezen eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a *bb8^{ms}* mutáns herékben a spermatidák megnyúlása hibát szenved.



13. Ábra A *bb8^{ms}* mutánsban hibás a spermatidák megnyúlása

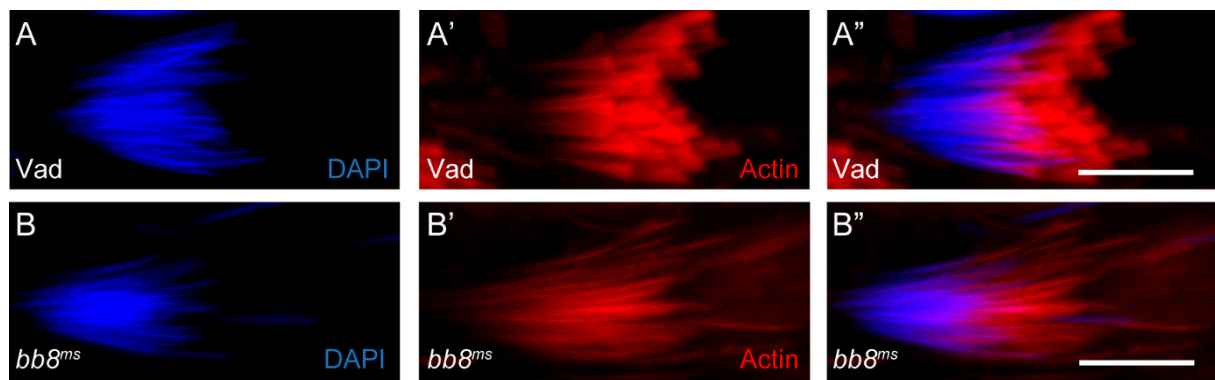
Vad típusú (A) és *bb8^{ms}* mutáns (B) tesztiszben a megnyúlt ciszták axonémáit poliglicilált tubulinra specifikus ellenanyaggal (AXO49, zöld), a sejtmagot DAPI festéssel (kék), az aktint TexasRed-Phalloidin festéssel (piros), festettük. A vándorló individualizációs komplexek (nyílhegyek) a tesztisz apikális vége felé tartanak, a feltekeredett érett spermiumok (nyíl) a szeminális vezikulum felé haladnak. Skála méret: 200µm. (C) Az AXO49 pozitív ciszták számának statisztikai elemzése vad típusban (kék) és *bb8^{ms}* mutánsban (zöld). (D) Az AXO49 pozitív ciszták átlagos hosszának összehasonlítása vad típusú és *bb8^{ms}* mutáns cisztákban.

A spermatidák egyedivé válásának folyamata, az individualizáció, a ciszták megnyúlása után következik be. Az individualizáció folyamatát fluoreszcensen jelölt phalloidin festéssel könnyen nyomon követhetjük; a phalloidin az individualizációs komplexek kúp alakú, aktin-gazdag egységeit festi meg (14. Ábra I, K-P 15. Ábra A). A vad típusú cisztákban az aktin kúpok kialakulása és vándorlása is szinkronizáltan történik (14. Ábra I, M, 15. Ábra A). A *bb8^{ms}* mutáns esetében az aktin kúpok elkezdenek összeszerelődni (15. Ábra B), azonban tú alakot vesznek fel, általában nem távolodnak el a sejtmagtól, a vándorlás során egymástól szétcsúsznak és szinkronizált mozgásuk sérül (14. Ábra N). A phalloidin festés a szeminális vezikulum epiteliális rétegében található izomrostokat is megfesti, a vad típusú szeminális vezikulum nagyobb méretű, és DAPI festéssel megfigyelhetjük benne a felhalmozódott spermiumok sejtmagjait (14. Ábra Q), míg a *bb8^{ms}* mutánsban kis méretű és nem figyelhetünk meg benne a spermiumokat (14. Ábra R). Az individualizáció folyamatát megvizsgáltuk a $\Delta bb8^{MB10362}$ revertált és $w^{1118}; P\{bb8^{gr}\}; bb8^{ms}$ menekített mutáns állatok tesztiszeiben és azt tapasztaltuk, hogy a folyamat szabályosan lezajlik (14. Ábra K, L, O, P), valamint a szeminális vezikulumokban érett spermiumokat figyeltünk meg (14. Ábra S, T). A *bb8^{ms}* mutánsban megfigyelt individualizációs hibákról statisztikai elemzést készítettünk (15. Ábra C). Megszámoltuk a szétszóródott sejtmaggal rendelkező ciszták számát, a sejtmagok körül kialakuló individualizációs komplexek (IC) számát, a szabályosan és rendellenesen vándorló individualizációs komplexek számát (15. Ábra C). Megállapítottuk, hogy a *bb8^{ms}* mutáns cisztákban a szétszóródott sejtmaggal rendelkező ciszták száma jelentősen magasabb, kevesebb individualizációs komplex alakul ki a sejtmagok körül. Az elemzésből kiderül, hogy nem nincsenek vad típusú individualizációs komplexek és a vándorló, hibás individualizációs komplexek száma is csökken (15. Ábra C). Az eredményeink azt mutatják, hogy a ciszták megnyúlása hibás a *bb8^{ms}* mutánsokban, és feltehetően ennek a következtében az individualizáció folyamata sem képes lezajlani.

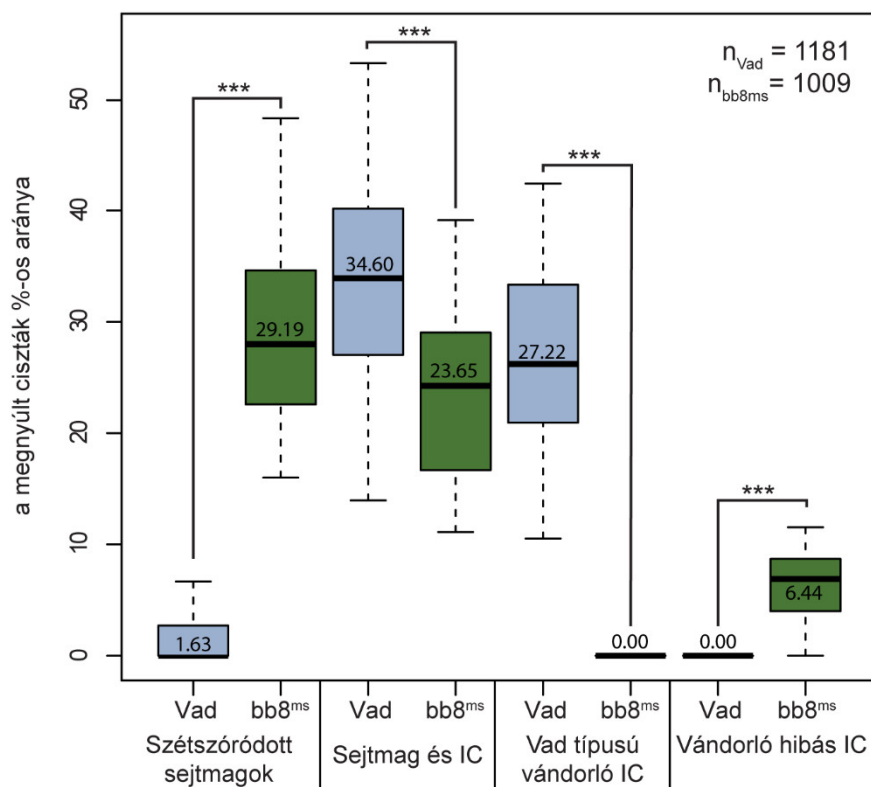


14. Ábra A vad típusú, a *bb8^{ms}*, az *MB10362* Minos-elem revertált és a *bb8^{gr}* transzgénnel menekített tesztiszek fenotípusa

(A-H) Fáziskontraszt mikroszkópos képek. (I-T) Fluoreszcens mikroszkópos képek. A *bb8^{ms}* (B, F, J, N, R) mutánsban megfigyelt fenotípusok nem figyelhetők meg sem a vad típusban (A, E, I, M, Q), sem a revertált ($\Delta bb8^{MB10362}$) (C, G, K, O, S) sem a menekített (*P{bb8^{gr}};bb8^{ms}*) (D, H, L, P, T) törzsekben. Skála méret: 50 μ m.



C

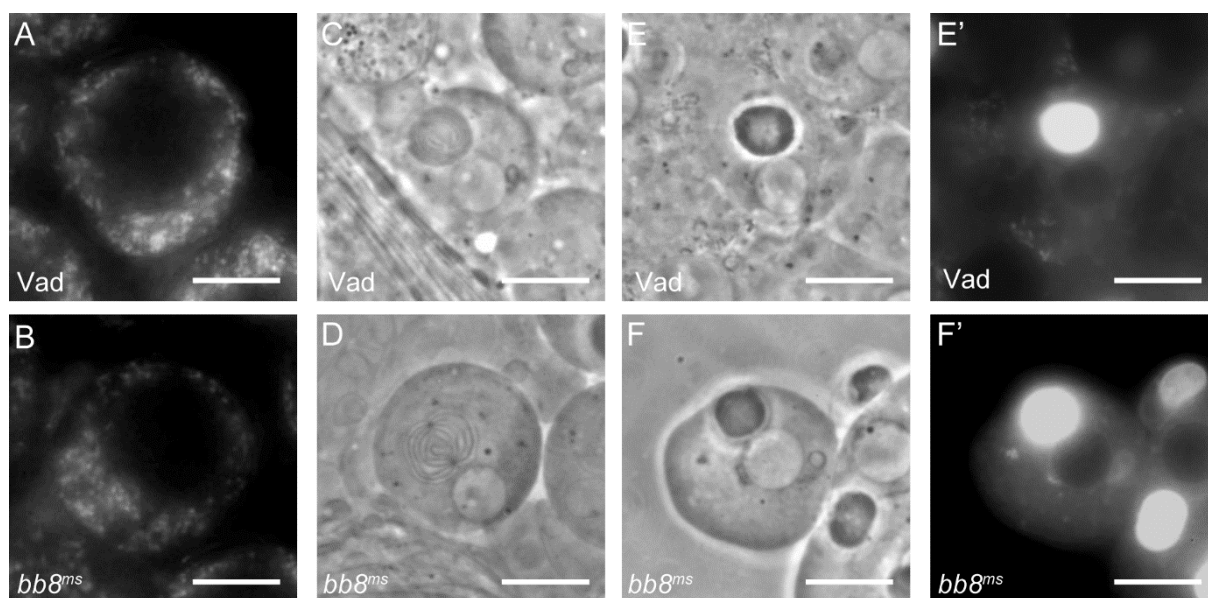


15. Ábra Az aktin kúpok kialakulása, és az individualizációs hiba statisztikai elemzése

(A) Vad típusú aktin kúpok (piros) szerveződése a sejtmag (kék) körül. (B) A *bb8^{ms}* mutáns hibás, elvékonyodott aktin kúpok (piros) szerveződése a sejtmagok (kék) körül. Skála méret: 10 μ m. (C) A vad típusú (kék) és *bb8^{ms}* mutáns (zöld) individualizációs fenotípusának eltérései melyek statisztikai ábrázolása boxplot módszer segítségével történt, a szignifikanciát Welch két mintás t-tesztel számoltuk ki. ***P<0.001 IC – Individualizációs komplex

4.5 A *bb8^{ms}* mutánsok mitokondrium morfológiai hibákat mutatnak, és megamitokondriumokat képeznek

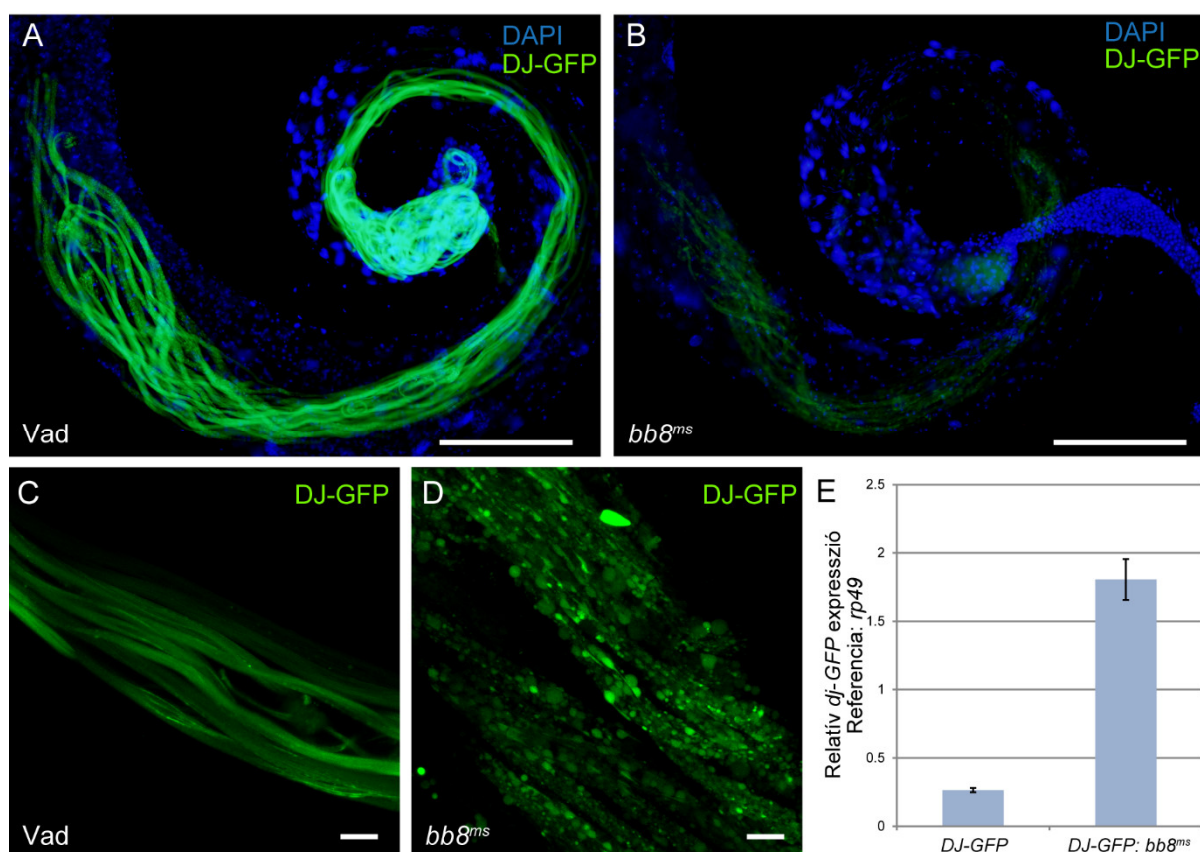
Mivel a Bb8-GFP és a Bb8^{N100as}-GFP is egyértelműen mitokondriális lokalizációt mutat, megvizsgáltuk a *bb8^{ms}* mutáns mitokondriális fenotípusát. A korai és meiotikus mitokondriumok vizsgálatához fáziskontraszt mikroszkópiát és Mitotracker festést használtunk (16. Ábra). Mind a vad típusú, mind a *bb8^{ms}* mutáns kerek spermatidákban fáziskontraszt mikroszkópiával jól megfigyelhető a hagymahéjszerűen szerveződő Nebenkern (16. Ábra C, D). A Mitotracker membránpotenciál-érzékeny festék, ami a mitokondriumok belső membránjához lokalizálódik (Bunting és mtsai. 1989), így lehetővé teszi a membránpotenciállal rendelkező, azaz működőképes mitokondriumok követését. A *bb8^{ms}* mutáns cisztákban az elsődleges spermatociták normális, vad típusú mitokondriumokkal rendelkeznek és a Nebenkern kialakulása, elhelyezkedése és struktúrája sem mutat rendellenességet (16. Ábra).



16. Ábra A primer spermatociták és a kerek, meiotikus spermatidák mitokondriális fenotípusa

A primer spermatociták szabályos Mitotracker festődést mutatnak a vad típusú (A) és a *bb8^{ms}* mutáns (B) cisztákban. . Fáziskontraszt mikroszkópos kép a vad típusú (C) és *bb8^{ms}* mutáns (D) kerek spermatidák hagyma stádiumú Nebenkernjéről. Vad típusú (E, E') és *bb8^{ms}* mutáns (F, F') kondenzálódott Nebenkern struktúra fáziskontraszt mikroszkópiával (E, F) és Mitotracker festéssel (E', F'). Skála méret: 10 μ m.

A meiotikus ciszták megnyúlási hibája gyakran a mitokondriumok szerveződésében, szerkezetében bekövetkezett hiba következménye (Noguchi és mtsai 2011). Az individualizálódó spermatidák mitokondriumai jól követhetők *dj-GFP* transzgén alkalmazásával (Santel és mtsai. 1997; Santel és mtsai. 1998). A DJ és DJ-GFP fehérje transzlációja gátolt a ciszták megnyúlásának végéig (Santel és mtsai. 1998). A poszt-meiotikus megnyúlt spermatidák mitokondriumait *dj-GFP* transzgenikus vonal felhasználásával vizsgáltuk (17. Ábra). Vad típusban a DJ-GFP a megnyúlt ciszták és az érett spermiumok mitokondriumában halmozódik fel, így láthatóvá teszi a spermatidák és a spermiumok farki részét (17. Ábra A). A *bb8^{ms}* homozigóta mutánsokban a DJ-GFP a vad típusnál alkalmazott expozíciós idővel (500 ms ISO200) nagyon gyenge mitokondriális lokalizációt mutatott (17. Ábra B). A *dj-GFP* expresszióját qRT-PCR-al teszteltük (17. Ábra E), és a mutánsban nagyobb relatív mRNS szintet detektáltunk, mint a vad típusban. A magasabb transzkript szintjének hátterében az állhat, hogy a *bb8^{ms}* mutánsban nem történik meg a ciszták szabályos megnyúlása és ennek következtében a *dj-GFP* mRNS felhalmozódik. Feltehetőleg a *dj-GFP* mRNS transzlációs gátlása viszont megakadályozza annak fehérjévé íródását. Hosszabb expozíciós időt (1500ms ISO400) vagy konfokális mikroszkópiát használva a vad típusú felvételhez képest (17. Ábra C) 5% érzékenység és 35% lézer intenzitás növelése mellett a *bb8^{ms}* mutáns cisztákban a DJ-GFP fluoreszcens jel jobban megfigyelhető, ahol rendellenes méretű és alakú mitokondrium származékokat jelöl ki (17. Ábra D).

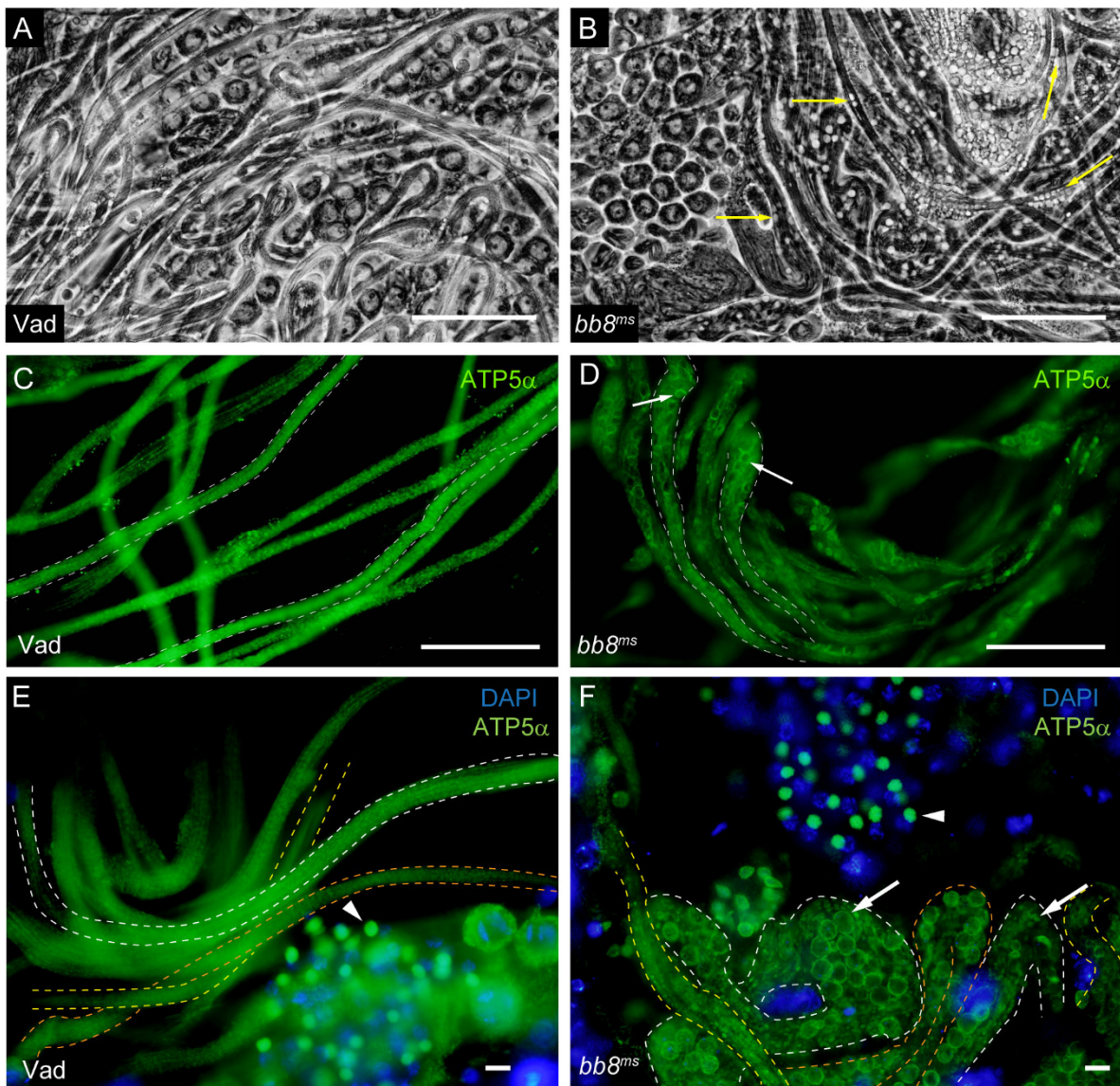


17. Ábra DJ-GFP expresszió vizsgálata

A megnyúlt spermatidáiban megfigyelt DJ-GFP expresszió (zöld) vad típusú (A) és *bb8^{ms}* mutáns (B) testiszben, a sejtmagok DAPI-val (kék) jelöltek. Skála méret: 200 μ m. (C) Vad típusú megnyúlt ciszták DJ-GFP expressziója. (D) A *bb8^{ms}* homozigóta mutánsban megfigyelhető DJ-GFP expressziós mintázat (a vad típushoz képest +5% érzékenység + 35% lézerintenzitás). Skála méret: 20 μ m. (E) A *dj-GFP* relatív expresszió szintje vad típusú és *bb8^{ms}* mutáns háttérben. A kísérletben az *rp49* génterméket használtuk referenciának.

A *bb8^{ms}* mutáns megnyúlt cisztáiban nagy, gömb alakú vezikulákat figyelhetünk meg fáziskontraszt mikroszkópiával (18. Ábra A). Ezek a vezikulák a vad típusban, valamint a menekített és revertált vonalak esetében nem figyelhetők meg (18. Ábra A, 14. Ábra A, C-E, G,H), így megjelenésük a *bb8* géntermék hiányának következménye. Hasonló vezikulák találhatóak egy mitokondriális, vasháztartásban szerepet játszó gén, a mitoferrin hímsteril allélje esetében (*dmfrn^{SH115}*) is, habár a vezikulák természetét a hivatkozott publikációban nem határozták meg (Metzendorf és Lind 2010). Mivel a Bb8 fehérje a mitokondriumokba lokalizálódik továbbá, hogy a DJ-GFP mitokondriális markerrel rendellenes szerkezetet figyeltünk meg, feltételeztük, hogy a vezikuláris struktúrák mitokondriális eredetűek. A struktúrák mitokondrium voltának vizsgálatára az Atp5 α ellenanyagot használtuk, ami a mitokondrium belső membránjához kapcsolt ATP5-szintáz alfa fehérjét ismeri fel. A *bb8^{ms}*

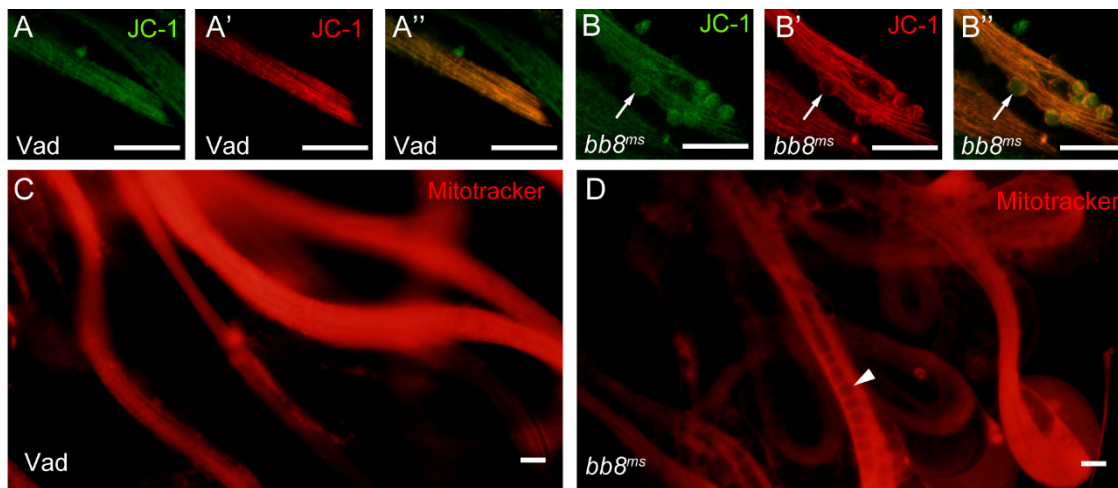
mutánsok testiszében a nagyméretű vezikulák membránja festődést mutatott az ATP5-szintáz alfa ellenanyaggal (18. Ábra C-F). Ezek alapján kijelenthetjük, hogy a *bb8* gén funkciójának kiesése óriás mitokondriumok, úgynevezett megamitokondriumok képződését eredményezi.



18. Ábra Mitokondriális rendellenesség a *bb8^{ms}* mutánsokban

Vad típusú (A) *bb8^{ms}* mutáns (B) ciszták fáziskontraszt mikroszkópos képe. Sárga nyilak jelölik a cisztákban található vezikulákat. Vad típusú (C, E) és *bb8^{ms}* mutáns (D, F) megnyúlt ciszták mitokondrium specifikus ATP5 α festése. Szaggatott vonallal jelöltük a megnyúlt ciszták határát. A *bb8^{ms}* mutánsban az ATP5 α festés kijelöli a megamitokondriumokat (nyilak) (D), a sejtmagok DAPI festéssel (kék) láthatók (E, F). Skála méret: 50 μ m (A-D), 10 μ m (E, F).

A morfológiai változások mellett, megvizsgáltuk a megnyúlt ciszták mitokondriumainak membránpotenciálját. Az aktív membránpotenciállal rendelkező mitokondriumok arányának meghatározására több *in vivo* fluoreszcensen jelölt mitokondriális festék is alkalmas (Bunting és mtsai. 1989). Egyik széleskörűen alkalmazott festék a JC-1, amely membránpotenciál-érzékeny. A JC-1 festék monomer formájában zölden fluoreszkál. Amennyiben membránpotenciállal rendelkező mitokondriumba jut, ott dimert képez, amely már vörös fluoreszcenciát mutat (Reers és mtsai. 1991). A megamitokondriumok membránpotenciáljának ellenőrzésére JC-1 festést alkalmaztunk. Azt tapasztaltuk, hogy a megamitokondriumok egy része nem veszítette el a membránpotenciálját a *bb8^{ms}* mutáns cisztákban, vörös fluoreszkáló membránpotenciállal rendelkező mitokondriumok is jelen voltak (19. Ábra B), míg a kontrollban nem figyeltünk meg rendellenes szerkezetű mitokondriumot (19. Ábra A). Mitotracker festéssel is megvizsgáltuk a *bb8^{ms}* mutáns cisztákban a megamitokondriumokat és a JC-1 festéshez hasonlóan azt tapasztaltuk, hogy a megamitokondriumok egy része rendelkezik membránpotenciállal (19. Ábra D), míg a kontrollban szabályos mitokondrium szerkezetet figyeltünk meg (19. Ábra C). A megfigyeléseink alapján megállapíthatjuk, hogy bár a mitokondriumok szerkezete nagymértékben megváltozott, mégis egy részük rendelkezik membránpotenciállal.

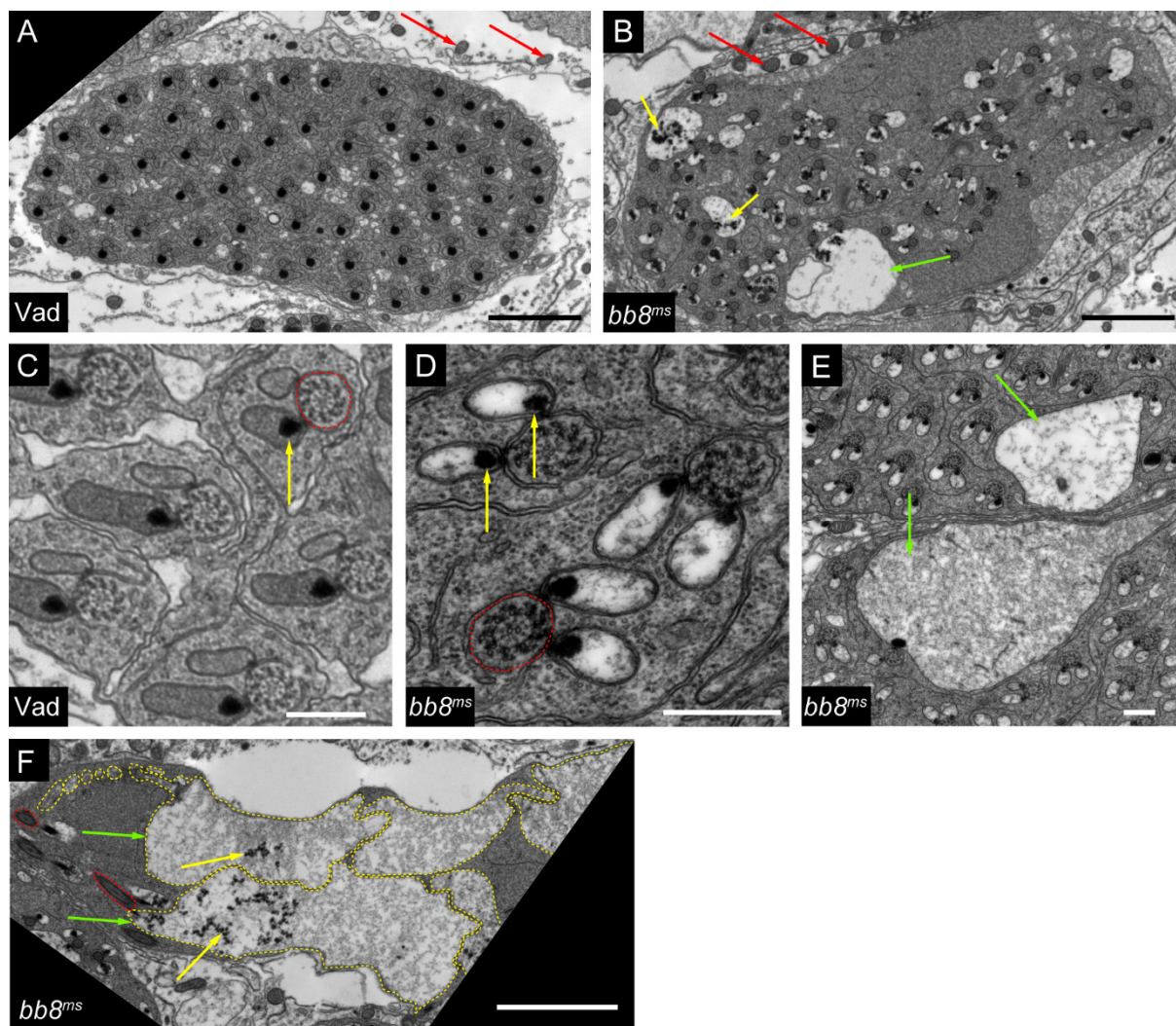


19. Ábra A megamitokondriumok egy része megőrzi a membránpotenciálját

Vad típusú (A) és *bb8^{ms}* mutáns (B) ciszták membránpotenciál-érzékeny JC-1 festése (A, B zöld monomer, A', B' piros dimer- aktív membránpotenciál A'', B'' összevetített). A *bb8^{ms}* mutáns ciszták JC-1 festéssel aktív megamitokondriumait nyílak jelölik (B, B', B''). Skála méret: 25 μ m. Vad típusú (C) és *bb8^{ms}* mutáns (D) ciszták Mitotracker festése. A *bb8^{ms}* mutáns cisztákban az aktív megamitokondriumokat nyílhegy jelöli. Skála méret: 10 μ m.

A vad típusú megnyúlt cisztákban minden spermatidában két mitokondrium származék fut párhuzamosan az axonémával. A megnyúlás során az egyik parakrisztallint halmoz fel és kialakítja a nagy mitokondrium származékot, míg a másik veszt térfogatóból és kialakítja a kis mitokondrium származékot, melyben nem található parakrisztallin. A *bb8^{ms}* mutánsokban található abnormális mitokondriumok részletesebb vizsgálatára transzmissziós elektronmikroszkópiát alkalmaztunk. Az elektronmikroszkópos vizsgálatokkal megfigyeltük a vad típusú megnyúlt ciszták finom szerkezetét (20. Ábra A, C). Az elektronmikroszkópos keresztmetszeti képeken jól megfigyelhető az axonéma 9+2-es mikrotubulus szerkezete, ami nem mutat rendellenességet a vad típushoz (20. Ábra C) képest a *bb8^{ms}* mutáns esetében (20. Ábra D). Az axonémát körülvevő endoplazmatikus retikulum eredetű axiális membrán sem különbözik a vad típustól (20. Ábra C) a *bb8^{ms}* mutánsban, és a mitokondrium származékokat körülvevő járulékos mikrotubulusok is szabályosak (20. Ábra D). A *bb8^{ms}* mutáns testiszek nem tartalmaznak egyedivé vált érett spermiumokat tartalmazó cisztákat, így egyedi sejtmembránnal rendelkező spermatidákat nem figyeltünk meg. Az elektronmikroszkópos keresztmetszeti képeken a vad típusban jól megfigyelhető az axonéma mellett mindkét mitokondrium származék, azok egymáshoz viszonyított helyzete és a nagy mitokondrium származékban a kialakuló parakrisztallin is (20. Ábra A, C). Az elektronmikroszkópos képeken a cisztasejtek szomatikus mitokondriumai vad típusú morfológiát mutatnak a *bb8^{ms}* mutánsban is (20. Ábra A, B). A *bb8^{ms}* mutáns spermatidák azonban a vad típustól eltérő morfológiájú mitokondrium származékokkal rendelkeznek (20. Ábra B, D, E, F). A vad típussal ellentétben, ahol csak a nagy mitokondrium származékban halmozódik fel a parakrisztallin (20. Ábra C), a *bb8^{ms}* mutánsban mind a két mitokondriumban parakrisztallin halmozódik fel az axiális membrán és a mitokondrium találkozásánál (20. Ábra D). A mitokondrium származékok nem különülnek el kicsi és nagy származékokra, ami identitás problémára utal. A *bb8^{ms}* mutáns cisztákban a parakrisztallin felhalmozódása szabálytalan, a kialakuló parakrisztallin szétesik, és nem szerveződik a vad típusban megfigyelhető szabályos struktúrává (20. Ábra B). A *bb8^{ms}* mutáns cisztákban megfigyelhetünk rendkívül nagyméretű mitokondrium származékokat is, amelyeknek térfogata többszöröse a vad típusú nagy mitokondrium származéknak, ami valószínűsíti, hogy ezek a struktúrák a fénymikroszkópos képeken megfigyelt megamitokondriumok (20. Ábra B, E, F). Az elektronmikroszkópos felvételeken és a fluoreszcens mikroszkópban megfigyelt mitokondriumok között 10 µm átmérőjű megamitokondriumok is megfigyelhetők (18. és 19. Ábra). A megamitokondriumok átlagos

mérete 8 μm , ezért adtuk a CG4434 génnek a *big bubble 8 (bb8)* nevet. Eredményeink alapján a Bb8 glutamát dehidrogenáz a glutamát anyagcsere részeként kulcsfontosságú a mitokondrium származékok identitásának meghatározásában és a parakrisztallin szabályos szerkezetének kialakításában.



20. Ábra A *bb8^{ms}* spermatidák elektronmikroszkópos vizsgálata

Vad típusú (A, C) és *bb8^{ms}* mutáns (B, D, E, F) ciszták elektronmikroszkópos keresztmetszeti képe. Piros nyilak jelölik a szomatikus mitokondriumokat (A, B), sárga nyíl jelöli a parakrisztallin felhalmozódást (B, C, D, F), a piros pontozott vonal az axonémát emeli ki (C, D, F). A *bb8^{ms}* mutáns ciszták elektronmikroszkópos képén (B, E, F) zöld nyilak jelölik a megnövekedett méretű mitokondrium származékokat. Skála méret: 2 μm (A, B, F) 0.5 μm (C-E).

4.6 P-elem inszerció az *archipelago (ago)* génben sterilitást eredményez

Kutatócsoportunk a transzpozon inszerció törzsgyűjtemények szűrése során azonosította a hímsterilitást okozó *P{RS5}ago^{5-HA-2760}* (az értekezés további részében ezt az allélt *ago^{ms}*-nek jelöljük) P-elem inszerciót. A *P{RS5}ago^{5-HA-2760}* mutációt hordozó kromoszómán a P-elem az

archipelago (*ago*) 5' nem transzlálódó régiójának intronikus szakaszába épült be. Az *ago^{ms}* allél szemiletális, valamint homozigóta formában a hímek és nőstények is sterilek.

Az *ago^{ms}* vonal genetikai jellemzése során megvizsgáltuk az *ago* gént átfedő delécióra (*Df(3L)BSC370*) hemizigóta *Df(3L)BSC370/ago^{ms}* egyedek életképességét és fertilitását. A *Df(3L)BSC370/ago^{ms}* muslicák szemiletálisak, az életképes utódok hím és nősténysterilitást mutatnak, hasonlóképpen a homozigóta *ago^{ms}* mutánsokhoz (6. és 7. Táblázat). Az *ago* génre elérhető EMS indukált letális mutáns allélok, az *ago¹* és az *ago³* (Moberg és mtsai. 2001). Létrehoztuk az *ago¹/ago^{ms}* és az *ago³/ago^{ms}* transzheterozigóta állatokat, melyek letálisnak bizonyultak (6. Táblázat). Megállapítottuk, hogy az általunk azonosított *ago^{ms}* hipomorf.

	<i>P{RS} ago[5-HA-2760] ago^{ms}</i>	<i>Df(3L) BSC370</i>	<i>ago¹</i> (EMS)	<i>ago³</i> (EMS)
<i>P{RS} ago[5-HA-2760] ago^{ms}</i>	szemiletális	szemiletális	letális	letális

6. Táblázat Az *ago^{ms}* genetikai interakciói

A P-elem precíz kivágódásával az általa okozott mutáció revertálható (Robertson és mtsai. 1988; Sved és mtsai. 1990). A *P{RS5}ago^{5-HA-2760}* elemet a *P{Δ2-3}* transzpozáz segítségével remobilizáltuk, majd az utódnemzedékben a *miniwhite* szemszín marker elvesztésére, a fehér szemre szelektáltunk. A P-elem precíz kivágódását PCR reakciókkal és szekvenálással ellenőriztük a fehér szemszínű muslicákon, 8 darab pontos kivágódást hordozó vonalat alapítottunk. A *ΔP{RS5}ago^{5-HA-2760}* vonalban molekulárisan is igazoltuk a transzpozon pontos kivágódását és a muslicák fertilitása is vad típusú (7. Táblázat). Ez az eredmény igazolta, hogy az *ago^{ms}*-re jellemző fenotípust valóban a P-elem inszerció okozza.

A mutáns fenotípus menekítése érdekében létrehoztunk egy tesztisz-specifikus β2 tubulin promóterrel meghajtott transzgént. A *TV3{β2tub-mCherry-Ago}* transzgén a vad típusú *ago* gén kódoló régiójának N-terminális végéhez fúzionáltatott *mCherry* gént hordoz. A *TV3{β2tub-mCherry-Ago}* transzgén *ago^{ms}* homozigóta mutáns háttéren expresszáltatva részlegesen (55,8%-ban) menekítette a hímsteril fenotípust. A részleges menekítésnek több magyarázata is lehet, egyrészt elképzelhető, hogy az mCherry jelölés interferál a fehérje funkciójával, másrésztől a menekítő transzgén csíravonal specifikus β2-tubulin promóter nem feltétlenül biztosítja az endogén *ago* kifejeződésének optimális idejét és mértékét.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy az *ago* génbe épült $P\{RS5\}ago^{5-HA-2760}$ elem felelős a hímsteril fenotípusért.

genotípus:	Vad (n=48)	<i>ago^{ms}</i> (n=50)	<i>ago^{ms}/Df BSC370</i> (n=14)	Δago^{ms} (n=15)	<i>P{mCh-ago}/Cyo;ago^{ms}</i> (n=27)	<i>ntc^{f07259}/ago^{ms}</i> (n=10)
fertilis (%)	97,9	2	0	100	55,8	100
steril (%)	2,1	98	100	0	44,2	0

7. Táblázat *ago^{ms}* homozigóta, hemizigóta, revertált, menekített és *ntc^{f07259}* transzheterozigóta egyedek sterilitása

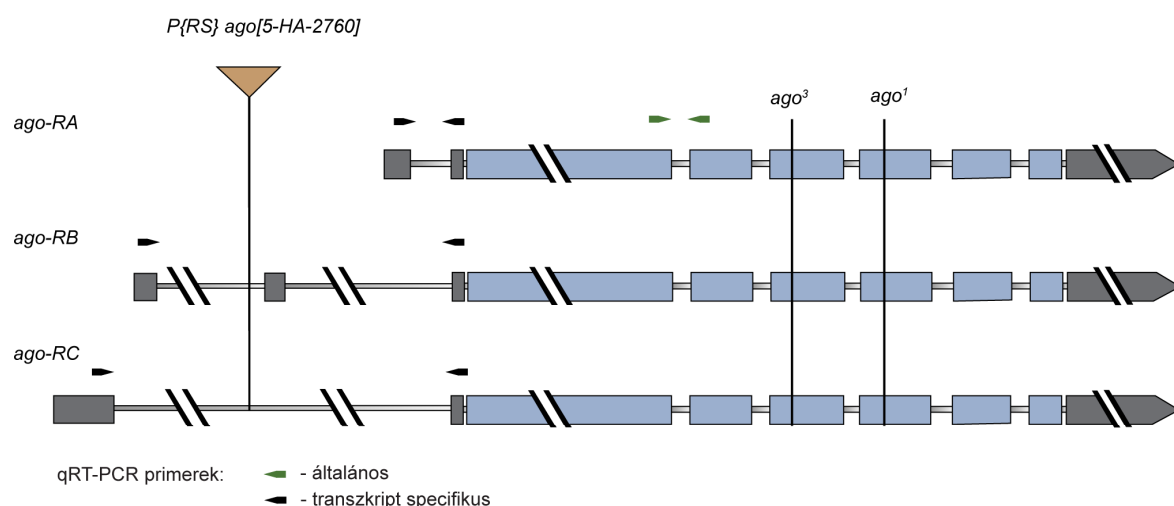
4.7 Az *ago* génexpresszójának jellemzése

Az *archipelago* gén a 3. kromoszómán található, és egy 1326 aminosav hosszú F-box fehérjét kódol. Az *ago* génről három potenciális transzkript képződik, amelyek kódoló régiója és 3'UTR régiója megegyezik, viszont az 5' nem transzlálódó végeik különböznek. Az *ago-RA*, *ago-RB*, és *ago-RC* transzkriptek szerkezete a 21. ábrán látható. A $P\{RS5\}ago^{5-HA-2760}$ elem az *ago* gén 5' UTR régiójába épült be, ahol az *ago-RB* és *ago-RC* transzkriptek intronikus szakaszán található. A $P\{RS5\}ago^{5-HA-2760}$ elem az *ago-RA* transzkript 5' nem kódoló végét nem érinti, attól messzebb található. Ahhoz, hogy megállapítsuk, hogy a $P\{RS5\}ago^{5-HA-2760}$ transzpozon beépülése milyen hatással volt az *ago* gén expressziójára, megvizsgáltuk az *ago* transzkripteket vad típusú, *ago^{ms}/ago^{ms}*, *ago^{ms}/TM3* és *Df(3L)BSC370/ago^{ms}* mutáns muslicák tisztázott RNS mintáin qRT-PCR reakciók segítségével. A reakciókban a második és harmadik exonra specifikus, az *ago-RA*, *ago-RB*, és *ago-RC* transzkriptekben jelenlévő szekvenciára specifikus primereket használtunk (21. Ábra A). A qRT-PCR reakciókban referenciának az *rp49* gént használtuk. A tisztázott mintákban az *ago^{ms}/TM3* heterozigóta esetén kisebb, az *ago^{ms}/ago^{ms}* homozigóta esetén jelentős csökkenést tapasztaltunk az *ago* transzkript mennyiségében a vad típushoz képest. A legjelentősebb csökkenést a *Df(3L)BSC370/ago^{ms}* hemizigóta egyedekben tapasztaltuk, melyek életképessége is gyengébb, mint a homozigóta *ago^{ms} allélnak* (21. Ábra B). Az eredményeink azt mutatják, hogy az *ago^{ms}* egy erős hipomorf allél.

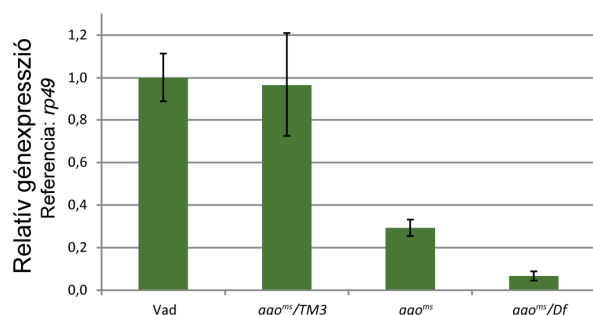
Annak eldöntésére, hogy az *ago* génbe épült 5-HA-2760 transzpozon hogyan befolyásolja az az egyes transzkriptek szintjét, *ago-RA*, *ago-RB*, és *ago-RC* transzkript-specifikus primerekkel végzett qRT-PCR-t végeztünk (21. Ábra A). Azt tapasztaltuk, hogy az *ago-RA* transzkript szintje kisebb mértékű csökkenést mutat, mint az *ago-RB* vagy az *ago-RC* transzkripteké (21. Ábra C).

Ezek alapján arra következtethetünk, hogy a hímsterilitásért elsősorban az *ago-RB* vagy az *ago-RC* transzkriptek kiesése a felelős.

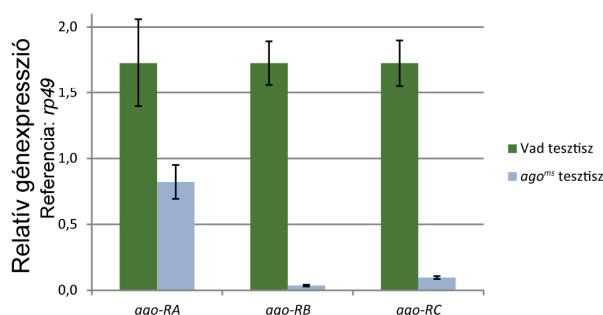
A



C



D



21. Ábra Az *ago* gén szerkezete és transzkripciójának vizsgálata

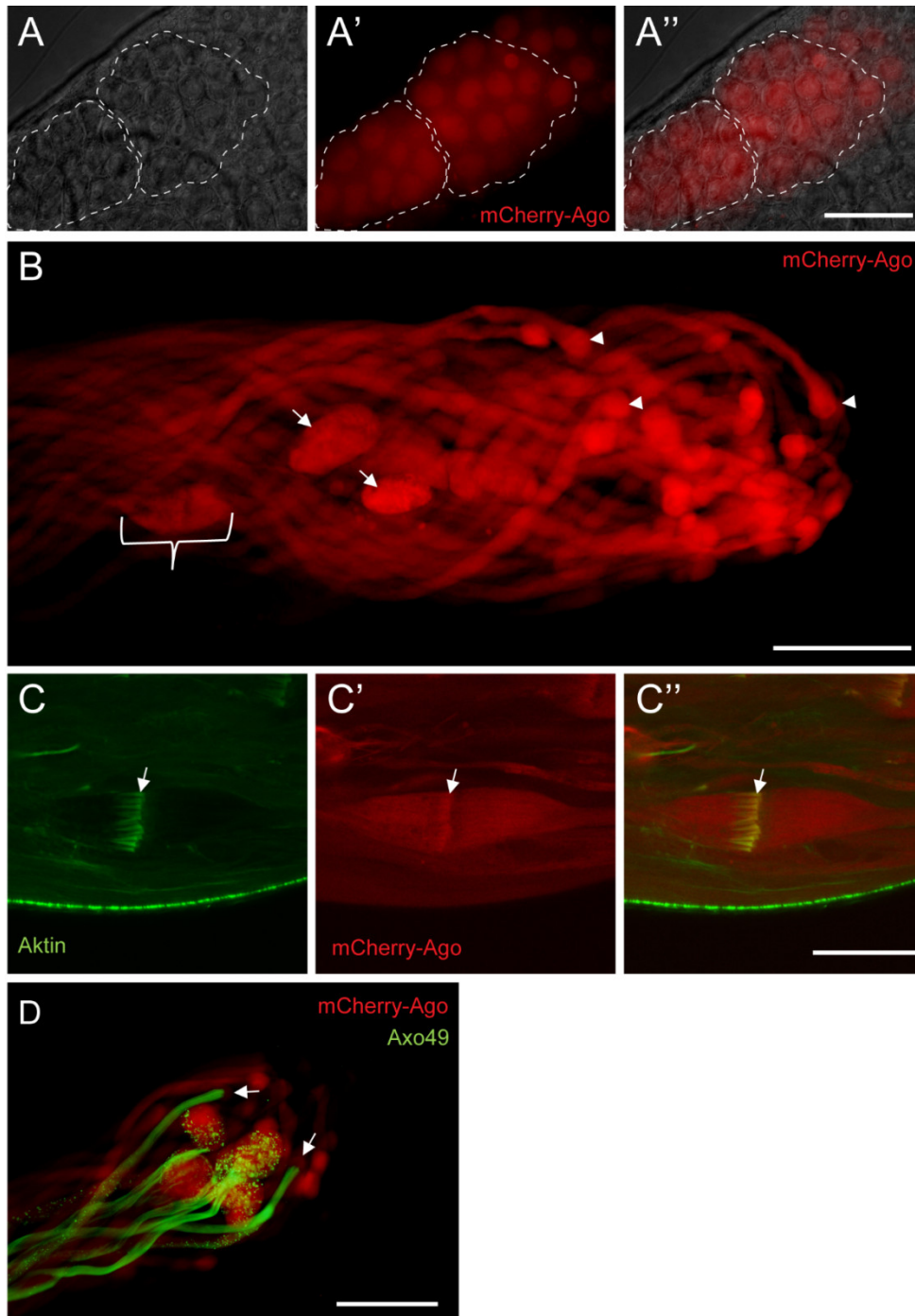
(A) Az *ago* génről átíródó transzkriptek sematikus rajza. A kék sávok jelölik a kódoló rész exonjait, a szürke sávok a nem kódoló régiókat, a közöttük lévő szürke vonalak szimbolizálják az intronikus régiókat. Kettős törtvonal jelöli a folytonosság megszakítását. A barna háromszög jelöli a $P\{RS\}ago^{5-HA-2760}$ transzpozon inszerció helyét. Az *ago¹* és *ago³* pontmutációk helyét pedig függőleges fekete vonalakkal jelöltük. A transzkripció vizsgálatához felhasznált qRT-PCR primerek helyzetét nyilakkal jelöltük. (B) Az *ago* transzkriptek relatív mennyisége vad típusú, *ago^{ms}* heterozigóta, homozigóta és hemizigóta genotípusú herékben a kódoló régióra specifikus primerek használatával. (C) Az *ago* transzkriptek testisz-specifikus expressziója csökkent a vad típushoz képest az *ago^{ms}* mutáns herékben. Mind a két esetben az *rp49* génterméket használtuk referenciának.

4.8 Az mCherry-Ago testisz-specifikus kifejeződési mintázata

Ahhoz, hogy meghatározzuk az Ago fehérje szubcelluláris elhelyezkedését a spermatogenezis különböző szakaszaiban, megvizsgáltuk a menekítési kísérletekben sikeresen használt $\beta 2-tub-mCherry-Ago$ transzgént hordozó egyedek testiszeit. Az elsődleges spermatocitákban

az mCherry-Ago fehérje a sejtmagban lokalizálódik (22. Ábra A), ami megegyezik a szakirodalomból ismert lokalizációjával, melyet a *Drosophila* lárvális testfal izmok sejtjeiben írtak le (Mortimer és Moberg 2013). A meiózis után az mCherry-Ago fehérje citoszolikusban figyelhető meg és a megnyúló spermatidákban egy grádiensszerű felhalmozódást mutat a ciszták farki végén (22. Ábra B).

AXO49 poliglicilált tubulin elleni ellenanyaggal végeztünk immunfestést, hogy az individualizálódó megnyúlt cisztákat megfessük és így a megnyúlt cisztákban is meghatározzuk az mCherry-Ago fehérje cisztán belüli elhelyezkedését. Az individualizálódó ciszták bazális végein az mCherry-Ago jel veszít intenzitásából a megnyúló cisztákban megfigyelhető erősebb jelintenzitáshoz képest (22. Ábra D). Az individualizáció során az mCherry-Ago a cisztikus hólyagokban, és később a „waste bag”-ekben halmozódik fel azokban a struktúrákban ahol a lebontó folyamatok a legaktívabbak (22. Ábra D, 29. Ábra C). Az mCherry-Ago erősebb feldúsulást mutat a vándorló aktin kúpok bazális végénél (22. Ábra C), amihez közel a tesztisz-specifikus proteaszómák is megtalálhatók (Zhong és Belote 2007). Összességében elmondható, hogy az mCherry-Ago fehérje a spermatogenezis minden lépésénél megfigyelhető, azonban szubcelluláris lokalizációja az egyes fejlődési állapotok között változik. Az *ago* gén szubcelluláris lokalizációja nagymértékű hasonlóságot mutat a cisztikus hólyagokban aktív Ntc-SCF E3 komplex tagjainak szubcelluláris lokalizációjával az individualizálódó spermatidákban (Bader és mtsai. 2010).



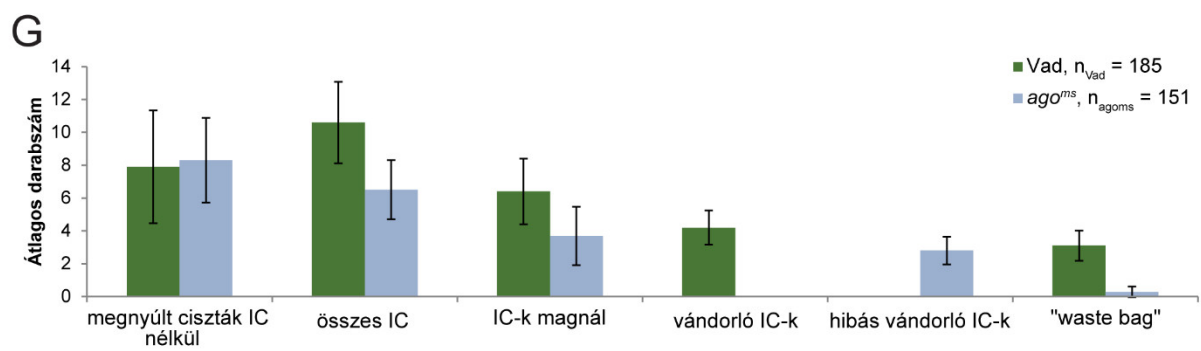
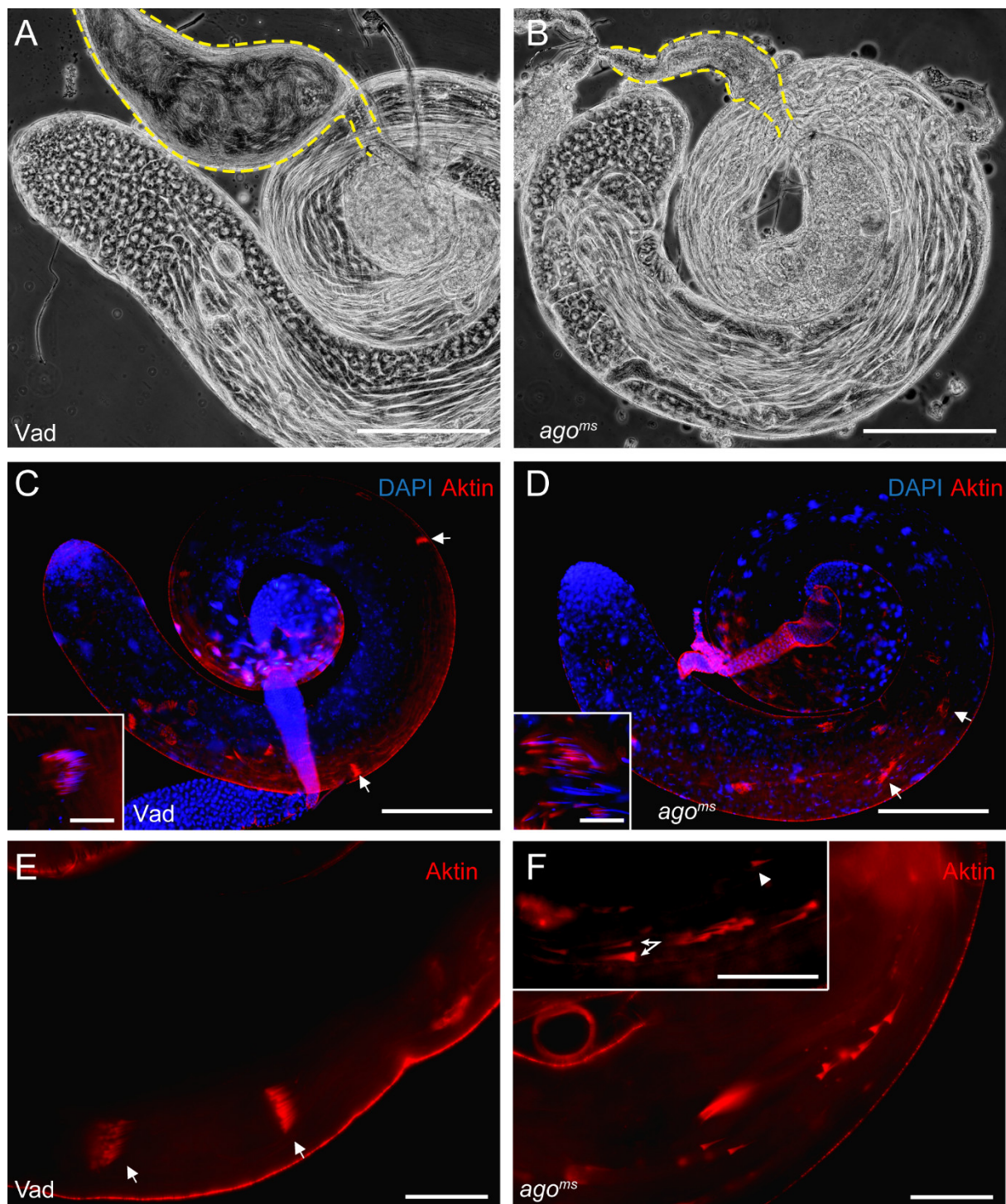
22. Ábra A *P{β2tub-mCherry-ago}* transzgenikus egyedek mCherry-Ago expressziója testtiszben

(A) Primer spermatociták sejtmagjaiban az mCherry-Ago fehérje felhalmozódik. (A mCherry-Ago, A' fáziskontraszt, A'' összevetített) Skála méret: 25 μm. (B) mCherry-Ago felhalmozódás a megnyúlt ciszták bazális végén (nyílhegyek), a vándorló cisztikus hólyagban (zárójel), és a "waste bag"-ekben (nyilak). Skála méret: 100 μm. (C) Az mCherry-Ago felhalmozódása jellemző a cisztikus hólyagokban, és az aktin kúpok bazális végénél egy erősebb jel figyelhető meg (nyilak). Az individualizációs komplexekben az aktin kúpok Alexa488-phalloidinnel jelöltek. (C phalloidin-aktin, C' mCherry-Ago, C'' összevetített) Skála méret: 50 μm. (D) Az mCherry-Ago (piros) disztális felhalmozódása gyengébb az AXO49 (zöld) pozitív cisztákban (nyilak). Skála méret: 50 μm.

4.9 Az *ago^{ms}* allél hímsteril fenotípusának jellemzése

A hímsterilitás okainak meghatározásához vad típusú és homozigóta *ago^{ms}* mutáns tesztiszeken fáziskontraszt mikroszkópos vizsgálatokat végeztünk. Az Ago fehérje ismert funkciói alapján a spermatogenezis korai szakaszában vártunk mutáns fenotípust, azonban meglepő módon a spermatogenezis korai lépéseiben nem találtunk rendellenességet. Az *ago^{ms}* mutáns tesztiszekben az elsődleges és meiotikus ciszták minden esetben a vad típussal megegyező fenotípust mutattak (23. Ábra A, B). A ciszták megnyúlása is megfelelő az *ago^{ms}* mutánsban, azonban nem figyelhetünk meg „waste bag”-eket, és a szeminális vezikulum nem tartalmaz érett spermiumokat (23. Ábra B). A vad típusban az aktin kúpok párhuzamosan, szinkronizáltan vándorolnak a tesztisz apikális vége felé, a megnyúlt magok rendezetten helyezkednek el a tesztisz bazális végén (23. Ábra C, E). Ezzel szemben az *ago^{ms}* mutáns cisztákban azt tapasztaltuk, hogy az individualizációs komplexek kialakulnak a sejtmagok körül, de azok vándorlásában hibák figyelhetők meg (23. Ábra D, F). Az aktin kúpok a cisztákban szétszóródnak, nem alakulnak ki normális cisztikus hólyagok és „waste bag”-ek. A vad típusra jellemző rendezetten elhelyezkedő sejtmagok szétszóródnak a mutáns cisztákban (23. Ábra D, F). Statisztikai elemzést készítettünk az *ago^{ms}* mutánsok individualizációs hibáiról (23. Ábra G), melyből megállapítható, hogy a mutánsban kevesebb individualizációs komplex (IC) alakul ki. Az elemzésből kiderül, hogy ugyan nem találtunk vad típusú vándorló individualizációs komplexeket, a rendellenes komplexek hasonló arányban kezdik meg vándorlásukat az *ago^{ms}* mutánsban, mint a szabályos szerkezetűek a vad típusban.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az *ago^{ms}* mutánsok spermatogenezise a spermatidák megnyúlásának késői szakaszában vagy az individualizáció folyamatában szenved hibát.

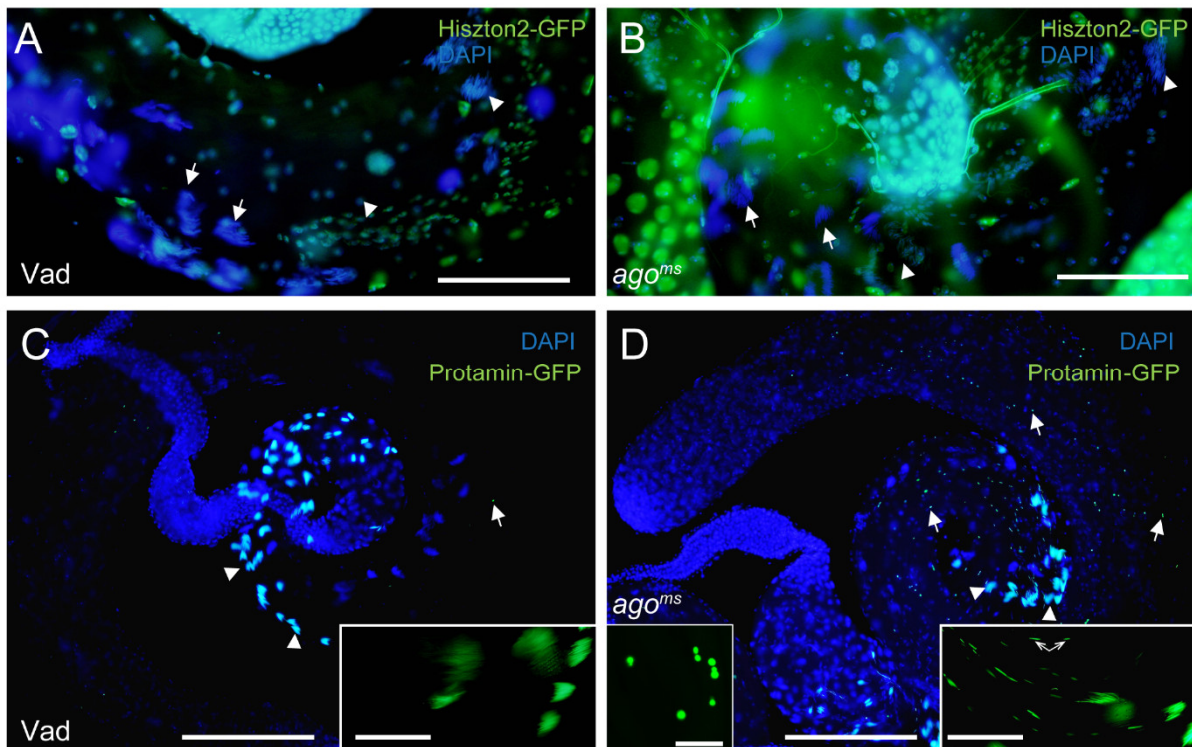


23. Ábra (előző oldal) Az *ago^{ms}* mutánsban hibás az individualizáció

Vad típusú (A) és *ago^{ms}* (B) mutáns testisz fáziskontraszt mikroszkópos képe. A szeminális vezikulumok sárga szaggatott vonallal vannak kiemelve. (C-F) Vad típusú (C) *ago^{ms}* mutáns (D) testisz fluoreszcens mikroszkópos képe. DAPI festéssel (kék) a sejtmagok, TexasRed-Phalloidin festéssel (piros) az individualizációs komplexekben található aktin festődik. A nyílak a vándorló individualizációs komplexeket jelölik. A bal alsó sarokban a sejtmagok körül kialakuló aktin kúpok vannak kiemelve. Skála méret: 200 μm , kis kép 20 μm . A vad típusú (E) individualizációs komplexek szinkronizáltan vándorolnak (nyíl), míg az *ago^{ms}* mutánsban (F) individualizációs komplexek szétcsúsznak. A bal felső képen a nyílak az aktin kúpok méretbeli különbségeit mutatják, a nyílhegy egy megfordult aktin kúpra mutat. Skála méret: 50 μm . (G) Az *ago^{ms}* mutáns testiszek individualizációs fenotípusának statisztikai jellemzése. IC= individualizációs komplex

Az Ago fehérje sejtmagban betöltött szerepe alaposan tanulmányozott, ahol a Trh és dMyc transzkripció faktorok és a CiklinE bontásra történő kijelölését végzi (Moberg és mtsai. 2001; Moberg és mtsai. 2004; Mortimer és Moberg 2007). Továbbá ismert, hogy az élesztő CDC4-nek a Hst3 hiszton deacetiláz célfehérjéje, aminek a szerepe a H3K56 acetiláció eltávolítása (Edenberg és mtsai. 2014).

Az mCherry-Ago bár a korai stádiumokban megtalálható a spermatociták sejtmagjában, az *ago^{ms}* mutáns nem mutat morfológiai hibát a spermatogenezis a korai stádiumaiban. A sejtmagok meiózis előtti és poszt-meiotikus stádiumaiban történő megfigyeléséhez Hiszton-GFP-t és Protamin-GFP-t hordozó transzgenikus törzseket használtunk. A megnyúlás során a hiszton–protamin átmenethez szükséges a hisztonok célzott lebontása (Raja és Renkawitz-pohl 2005). Vizsgálataink alapján a hiszton-protamin csere a vad típusú spermatidákkal megegyező módon megtörténik az *ago^{ms}* mutánsban és vad típusú protamin felhalmozódás figyelhető meg az *ago^{ms}* mutáns testiszek megnyúlt spermatidáiban (24. ábra). A Protamin-GFP kijelöli az *ago^{ms}* mutáns herékben a rendezetlen sejtmagokat, melyek között megfigyelhetők a ciszták teljes hosszában szétszóródott, kondenzált protamin jelek is, bizonyítva, hogy a rendezetlen sejtmagi struktúrák a megnyúlt spermatidákhoz tartoznak.



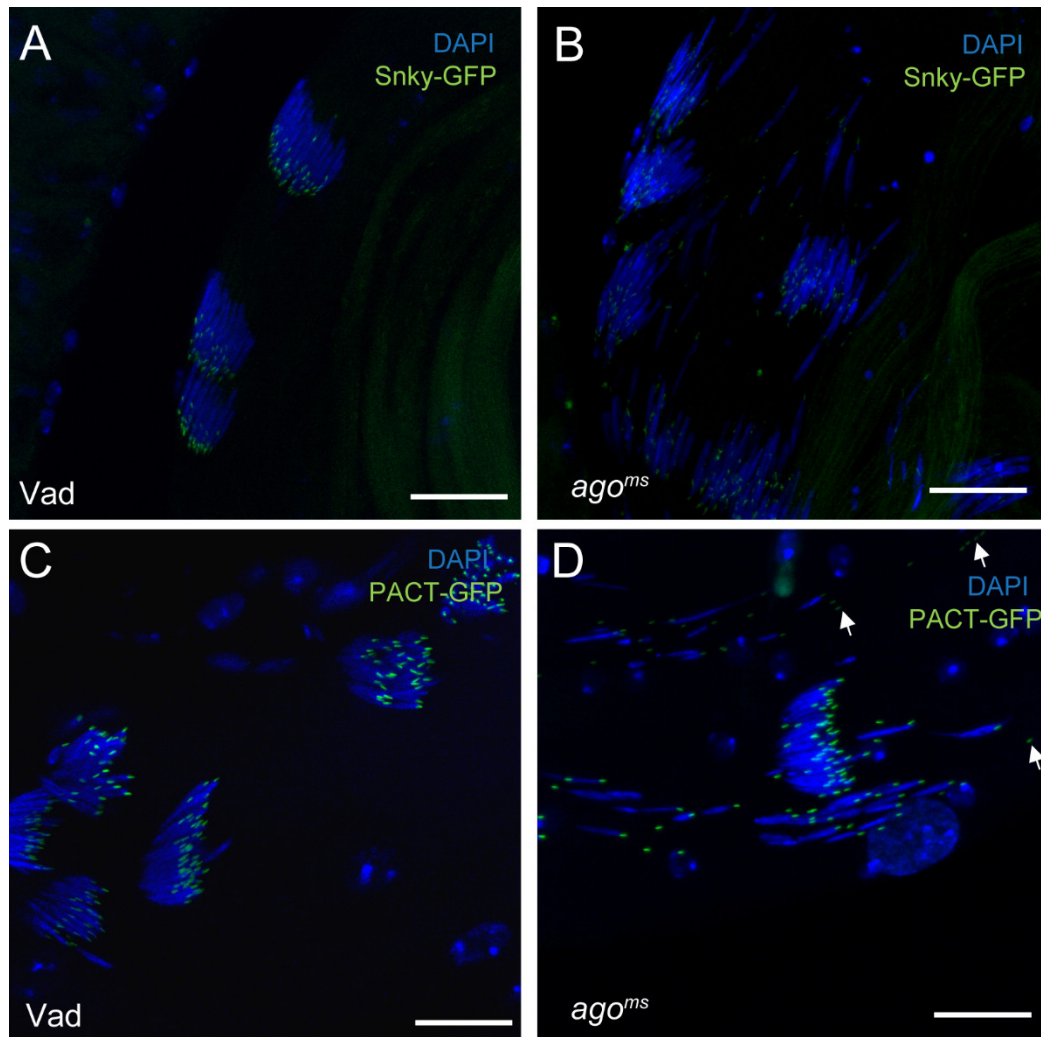
24. Ábra A hiszton-protamin átmenet vizsgálata az *ago^{ms}* mutánsban

(A, B) Vad típusú (A) és *ago^{ms}* mutáns (B) tesztisz fluoreszcens mikroszkópos képe. Nyilak jelölik a Hiszton-GFP-mentes (zöld) megnyúlt sejtmagokat (kék). Nyílhegyekkel jelöltük a megnyúló, még Hiszton-GFP-t tartalmazó sejtmagokat. Nem tapasztaltunk rendellenességet az *ago^{ms}* mutánsban. (C, D) Vad típusú (C) *ago^{ms}* (D) mutáns tesztisz fluoreszcens mikroszkópos képe. Nyílhegyek jelölik a Protamin-GFP-t (zöld) felhalmozó sejtmagokat (kék). A jobb alsó sarokban a megnyúlt sejtmagokban a Protamin-GFP felhalmozódása látható az *ago^{ms}* mutánsban is továbbá megfigyelhetjük az szétszóródott sejtmagokat. Nyilakkal jelöltük a cisztákban nagy számban megjelenő kondenzált Protamin-GFP jeleket (kiemelve a bal alsó sarokban) (D). Skála méret: 200 μm , jobb alsó kis kép: 50 μm , bal alsók kis képek: 10 μm .

A megnyúlt sejtmagok szétszóródását a megnyúlás során az akroblaszt (későbbi akroszóma), a sejtmag, a bazális test - axonéma és mitokondriumok meghatározott helyzetének hibája okozhatja (Fári és mtsai. 2016; Texada és mtsai. 2008; Dorogova és mtsai. 2008; Fabian és mtsai. 2010). Az akroszóma közvetlenül a sejtmag mellett a spermatida apikális csúcsán található. Az akroszómákat Snky-GFP-vel tettük láthatóvá (Wilson és mtsai. 2006) és azt tapasztaltuk, hogy az *ago^{ms}* mutánsban a Snky-GFP mind pozíciójában, mind kiterjedésében a vad típussal megegyező mintázatot mutat (25. Ábra A, B).

A bazális test a sejtmag akroszómával átellenes oldalán található, fontos szerepet tölt be az axonéma kialakításában. A bazális test vizsgálatához PACT-GFP-t használtunk (Martinez-Campos és mtsai. 2004). A vad típushoz képest az *ago^{ms}* mutánsban számos esetben tapasztaltuk, hogy a GFP jel távolabb helyezkedik el a sejtmagtól, leszakadozik (25. Ábra C, D).

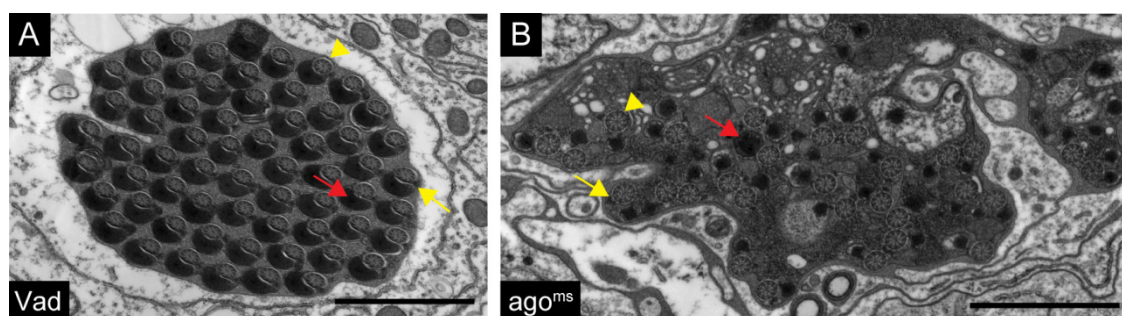
Számfeletti centroszóma jelenlétét leírták az SCF E3 enzim komplex tagjának, az SkpA gén mutáns alléljaiban (Murphy 2003), és a sejtmagokhoz nem kapcsolódott bazális testek jelenlétét okozhatja számfeletti centroszóma. A meiotikus sejtek vizsgálata során nem tapasztaltunk a centroszóma hibájára visszavezethető osztódási rendellenességet, így feltételezzük, hogy a bazális test sejtmag-membránba történő beágyazódása szenvedhetett hibát, vagy az individualizáció közvetett hibája okozza a fenotípust.



Ábra 25 Az akroszóma és bazális test vizsgálata az *ago^{ms}* mutánsban

Vad típusú (A) és *ago^{ms}* (B) mutáns fluoreszcens mikroszkópos képe, a sejtmagok kékek (DAPI) az akroszómák zöldek (Snky-GFP). A sejtmagok rendezetlenek a mutánsban, ugyanakkor a hozzájuk tartozó akroszóma mindig megfigyelhető. Vad típusú (C) és *ago^{ms}* (D) mutáns fluoreszcens mikroszkópos képe, a sejtmagok kékek (DAPI), a bazális testek zöldek (PACT-GFP). A vad típusban megfigyelhető rendezett sejtmagok a mutánsban szétszóródtak, és a több esetben a bazális testek leváltak a sejtmagokról (nyilak). Skála méret: 20 μ m.

A bazális test hibája okozhatja az axonéma hibás fejlődését. Az *ago^{ms}* mutáns testiszét transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatoknak vetettük alá (26. Ábra). Az elektronmikroszkópos képek alapján az *ago^{ms}* mutánsban az axonéma és mind a kettő mitokondrium származék kialakul és differenciálódik. Megfigyeléseink alapján a nem individualizálódott ciszták elvesztik szervezettségüket és szétesnek az *ago^{ms}* mutánsban.

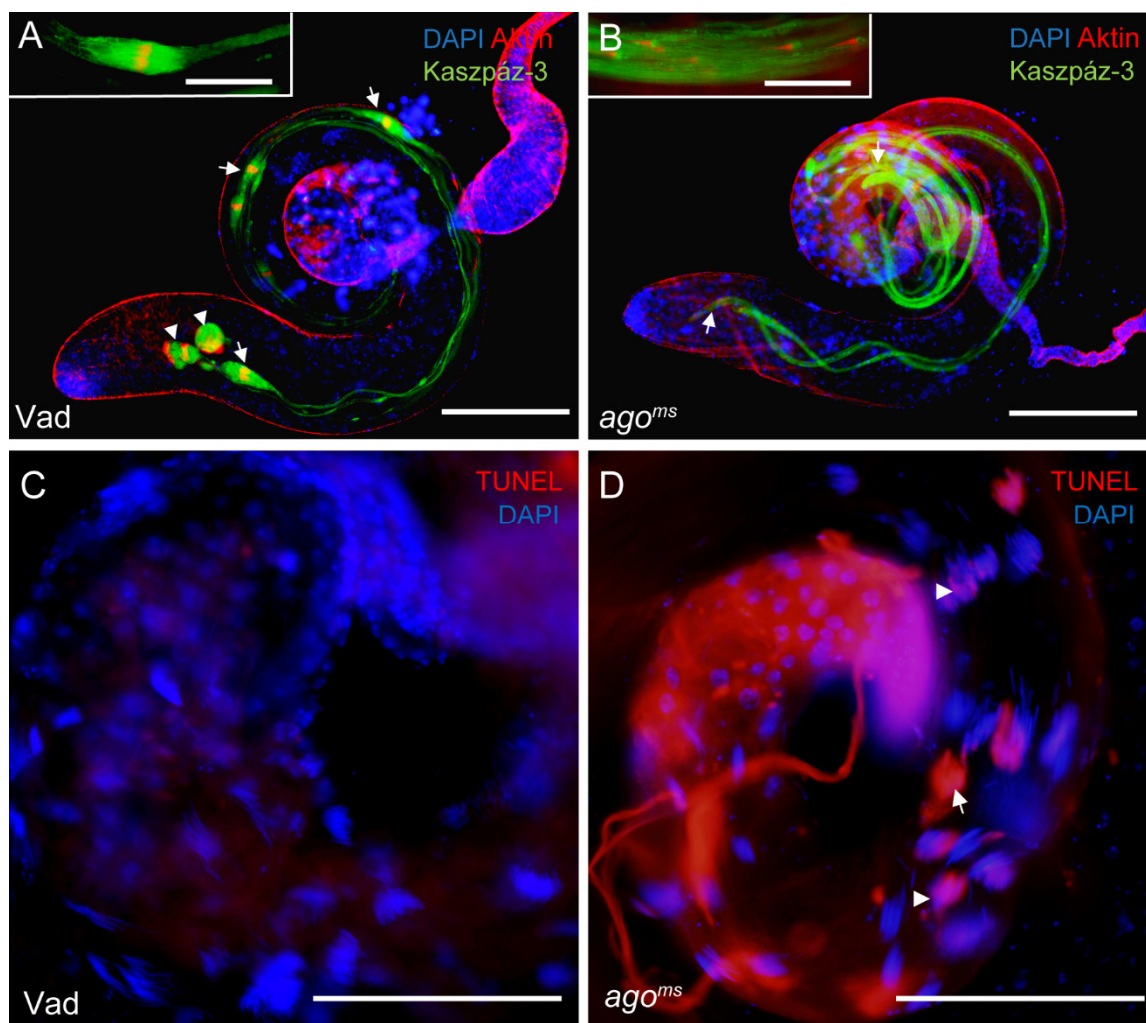


26. Ábra Vad típusú és *ago^{ms}* mutáns megnyúlt ciszták elektronmikroszkópos képe

Vad típusú (A) és *ago^{ms}* mutáns (B) megnyúlt ciszták elektronmikroszkópos képe. Mind a vad típusban, mind az *ago^{ms}* mutánsban szabályosan kialakul az axonéma (sárga nyílhegy), és differenciálódnak a mitokondrium származékok (sárga nyíl: kis mitokondrium származék, piros nyíl: nagy mitokondrium származék). Az *ago^{ms}* mutáns ciszta szerkezete azonban hibás és rendezetlen. Skála mérete: 2 μ m.

A Poe E3 ligáz fehérjének, a Khl10/Cul3/Roc1b és a Ntc-SCF E3 enzim komplexeknek az individualizációban betöltött szerepe ismert (Fabrizio és mtsai. 1998; Bader és mtsai. 2010; Arama és mtsai. 2007). Az *ago^{ms}* hipomorf mutáns fenotípusa a Ntc-SCF és a Khl10/Cul3/Roc1b komplex tagok hipomorf mutánsainak fenotípusára nagymértékben hasonlít (Arama és mtsai. 2007; Bader és mtsai. 2010). Mivel ezekben a mutánsokban a kaszpáz kaszkád aktiválása is érintett, ezért megvizsgáltuk a nem apoptotikus kaszpáz kaszkádot az *ago^{ms}* mutáns cisztákban. Az aktív kaszpáz kaszkád kimutatására a hasított kaszpáz-3 elleni ellenanyagot alkalmaztuk (Arama és mtsai. 2003). Vad típusban a cisztikus hólyagban egy erős kaszpáz jel figyelhető meg. A kaszpáz jel a még nem individualizálódott részekben, a farki vég felé egy gyengébb, grádiensszerűen csökkenő jelet mutat. (27. Ábra A) Az *ago^{ms}* mutáns esetében minden individualizálódó cisztában a ciszta teljes hosszában viszonylag erős kaszpáz jel figyelhető meg (27. Ábra B). A mutánsban nincsenek cisztikus hólyagok és „waste bag”-ek sem. Az individualizáció során részletesebben jellemzett E3 enzimek a kaszpáz kaszkád aktivitásához szükségesek. Eredményeink alapján az Ago

feltehetően nem szükséges a kaspáz kaszkád aktiválásához, azonban nem zárhatjuk ki a szerepét, mint a kaszkád antagonistája (Nicholson és mtsai. 2009). Ugyan apoptotikus folyamatok nincsenek leírva poszt-meiotikus cisztákban, feltételezhető, hogy a térben nem limitált kaspáz aktivitás hozzájárulhat a ciszták elhalásához. Haldokló cisztákat elektronmikroszkóppal is megfigyeltünk (26. Ábra). TUNEL jelöléssel vizsgáltuk a megnyúlt magok DNS-tartalmának integritását (Arama és Steller 2006)(27. Ábra C, D). A TUNEL a DNS szálak végének jelölésén alapul, ezért alkalmas a fragmentálódott DNS kimutatására, minél erősebb jelet figyelünk meg, annál jelentősebb a DNS degradálódása. Több TUNEL pozitív megnyúlt cisztát is megfigyelhetünk. Emellett nagyobb mennyiségű sejttörmelék is található az *ago^{ms}* mutáns testiszek bazális részén, ami a vad típusra nem jellemző (23. Ábra A, B). Ezek alapján az *ago^{ms}* mutánsban az individualizációban hibás ciszták elpusztulnak.



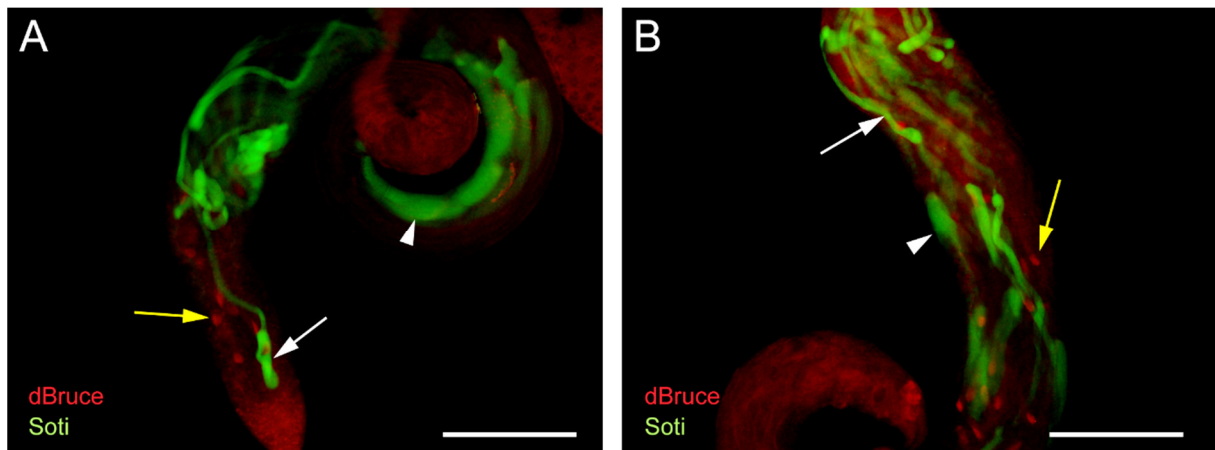
27. Ábra Az *ago^{ms}* mutáns kaszpáz aktivitásának és cisztái integritásának vizsgálata

DAPI (kék), TexasRed-Phalloidin (piros) és aktivált kaszpáz-3 ellenanyagossal festés vad típusú (A) és *ago^{ms}* mutáns (B) tesztiszeken fluoreszcens mikroszkópiával. Nyílhegyek jelölik a „waste bag”-eket, nyilak jelölik az individualizációs komplexeket, melyek az *ago^{ms}* mutánsban szétszóródnak. Skála méret: 200 μm kis kép: 50 μm . Vad típusú (C) és *ago^{ms}* (D) mutáns fluoreszcens mikroszkópos képe TUNEL jelöléssel (piros) és DAPI (kék) festéssel. Az *ago^{ms}* mutánsban megfigyelhetők DAPI jel nélküli, degradálódott sejtmagi DNS-sel rendelkező ciszták (nyilak), és TUNEL és DAPI pozitív ciszták is (nyílhegy). Skála méret: 100 μm .

4.10 Lehetséges Ago kölcsönható partnerek, és célfehérjék

Az *ago^{ms}* mutánsban tapasztalt individualizációs fenotípus több hasonlóságot is mutat a már jellemzett E3 enzimkomplexek individualizációs fenotípusával (Bader et al. 2010; Kaplan et al. 2007), ezért megvizsgáltuk a nem apoptotikus kaszpáz kaszkád ismert negatív szabályozó elemeinek eloszlását az *ago^{ms}* mutánsban.

A kaszpáz kaszkád aktivációjához a dBruce degradációja szükséges (Arama és mtsai. 2003). Az *ago^{ms}* mutánsokban a kaszpáz kaszkád aktív, ezért feltételezhetjük, hogy a dBruce degradációja végbemegy. Ugyanakkor dBruce mutáns testiszben a ciszta teljes hosszában szétszóródott, kondenzált sejtmagokat figyeltek meg, ami feltűnően hasonlít az *ago^{ms}* protaminnal megfigyelt fenotípusához (Arama és mtsai. 2003). A hasonlóság okán anti-dBruce ellenanyaggal vizsgáltuk a fehérje lokalizációját vad típusú és *ago^{ms}* mutáns testiszben (28. Ábra). A dBruce lokalizációja az *ago^{ms}* mutáns testiszben megegyezett a vad típus mintázatával, a ciszták farki végén egy kis kiterjedésű grádiens alakult. Vad típusú ciszták dBruce immunfestésével kimutattuk, hogy a megnyúlt cisztákban a dBruce fehérje egyszerre van jelen az mCherry-Ago fehérjével, azonban elhelyezkedési mintázatuk nem hasonlít, a dBruce jel korlátozva van a farki végen, míg az mCherry-Ago jel kiterjedtebb, hosszabb szakaszon is megfigyelhető (29. Ábra A).



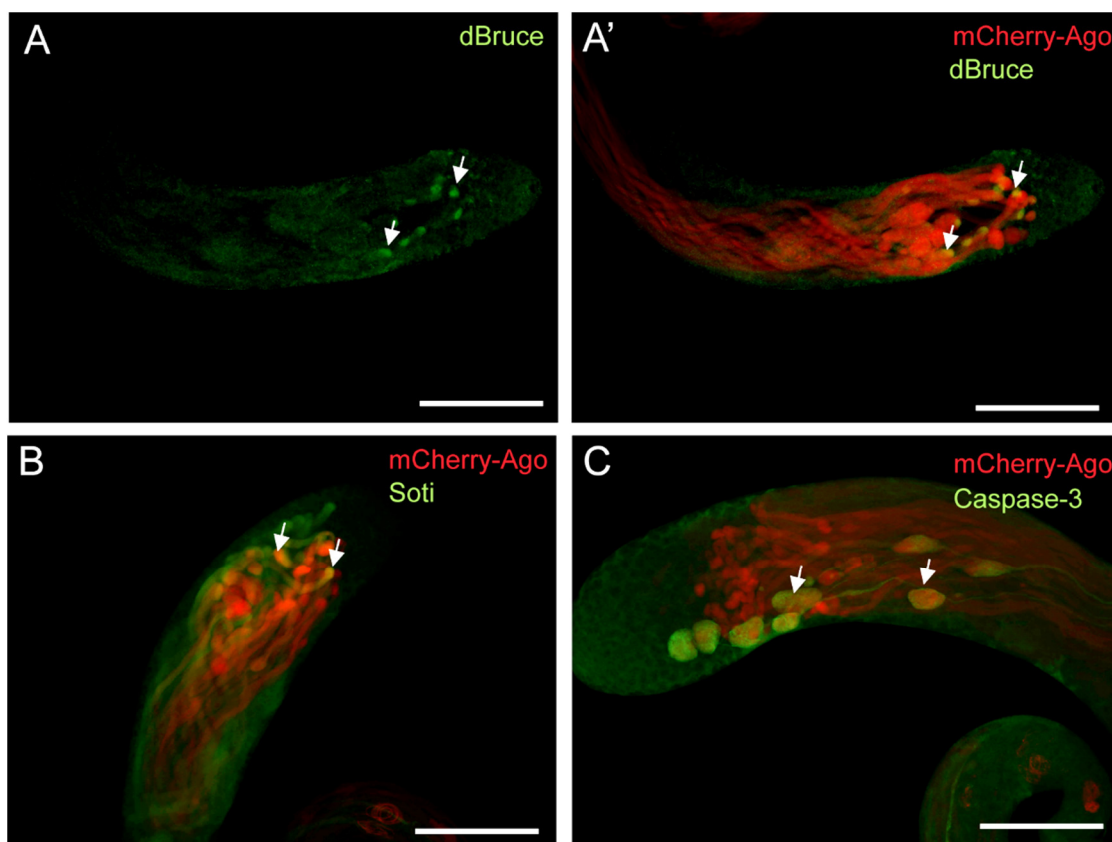
28. Ábra dBruce és Soti lokalizációja

Soti (zöld) és dBruce (piros) lokalizációja vad típusú (A) és *ago^{ms}* mutáns (B) cisztákban. Fehér nyílhegy mutatja a Soti lokalizációját a korai megnyúló cisztákban, a fehér nyilak a késői megnyúló cisztákban. Sárga nyíl mutatja a dBruce ciszták végi lokalizációját. Skála méret: 200 μm .

A Soti egy kisméretű fehérje, ami a dBruce apoptózis inhibitor bontásra kijelölő Khl10/Cul3/Roc1b E3 enzim komplexet gátolja. A Soti megnyúlást követően nem az ubiquitin proteasóma rendszeren keresztül bomlik le, így nem valószínű, hogy az Ago fehérje célfehérjeje volna (Kaplan és mtsai. 2010). Anti-Soti ellenanyaggal megvizsgáltuk a Soti here-specifikus lokalizációját vad típusban és *ago^{ms}* mutánsban, azonban nem tapasztaltunk különbséget (28. Ábra). A megnyúló cisztákban a ciszták farki vége felé a Soti növekvő grádiensben halmozódik fel, hasonlóan mCherry-Ago-hoz. Anti-Soti immunfestéssel

összehasonlítottuk a Soti és az mCherry-Ago grádiens mintázatát és azt tapasztaltuk, hogy a két jel tesztiszenként csak egy-két cisztában fed át (29. Ábra B).

Eredményeink alapján az Ago nem lép interakcióba a kaszpáz kaszkád gátlásáért felelős Soti és dBruce fehérjékkel. Az individualizáció során az mCherry-Ago jel szinte tökéletesen átfed az aktív kaszpáz-3 immunfestéssel (29. Ábra C), és hasonlóságot mutat több, a kaszkád gátlásában szerepet játszó fehérje (Soti, dBruce) grádiensszerű lokalizációs mintázatával, ezért nem zárhatjuk ki, hogy az Ago fehérje más útvonalon szabályozhatja, vagy korlátozhatja a kaszpáz kaszkád aktivitását.

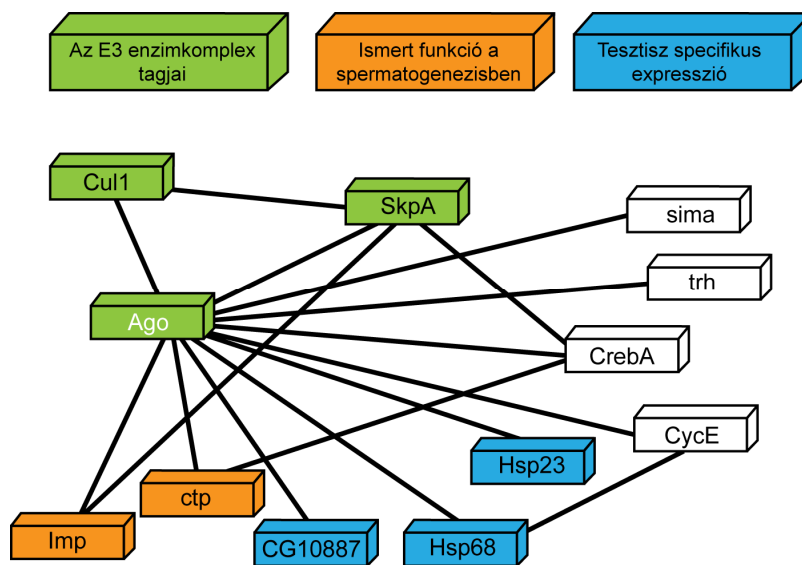


29. Ábra Az mCherry-Ago és az individualizáció során jelen lévő fehérjék lokalizációja

(A) A dBruce fehérje (zöld) a megnyúló ciszták bazális végén halmozódik fel, az mCherry-Ago (A') jel kiterjedtebb. (B) A megnyúló ciszták bazális végén az mCherry-Ago (piros) jel ideiglenesen átfed a Soti jellel (zöld). (C) Az mCherry-Ago jel átfed az aktív kaszpáz-3 jellel a cisztikus hólyagokban és "waste bag"-ekben. Skála méret: 100 μ m.

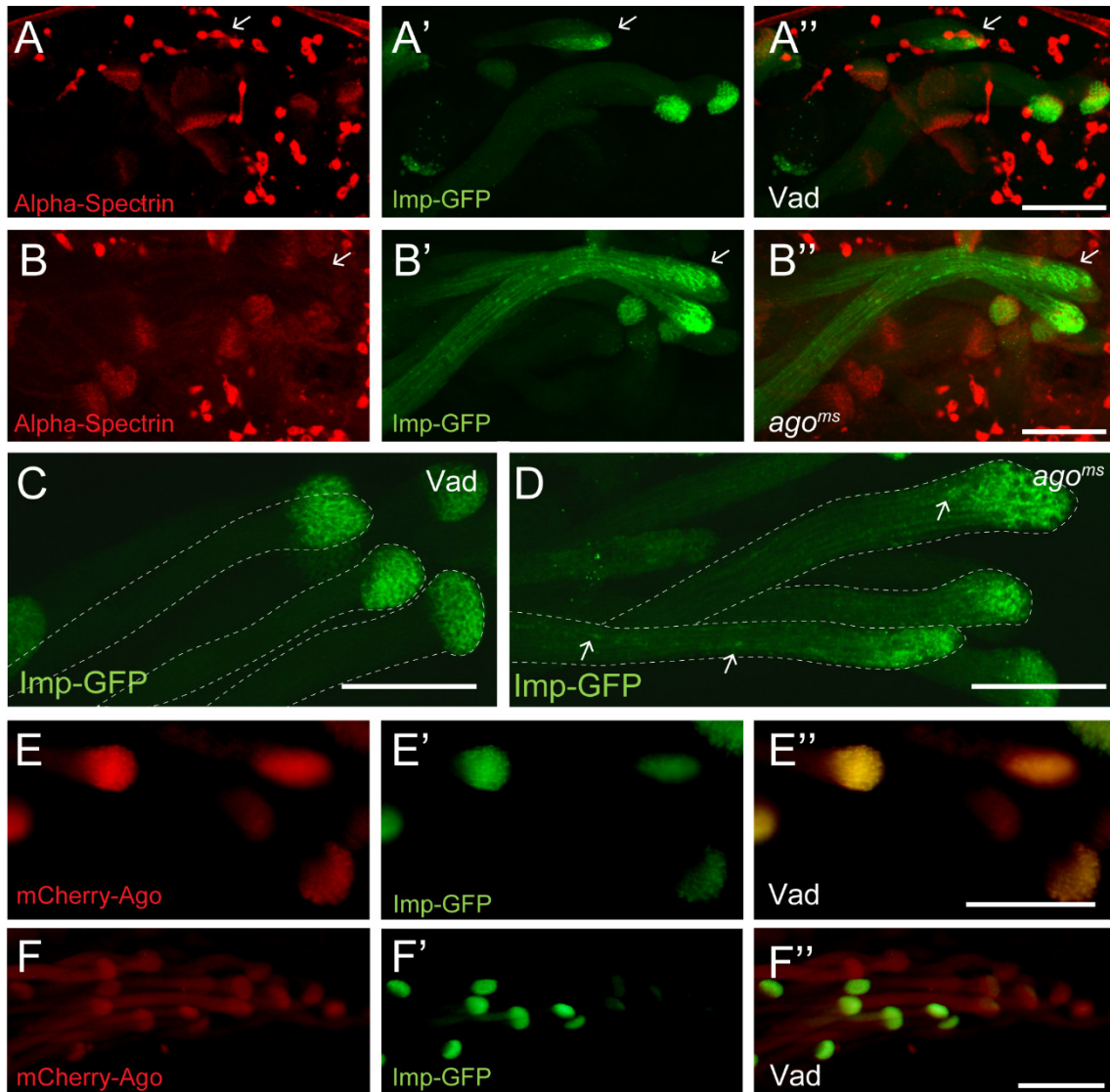
Feltételezhető, hogy az Ago és a Ntc fehérje is ugyanannak az SCF E3 enzimkomplexnek (SkpA/Cullin1/F-box) az F-box alegységei (Moberg és mtsai. 2001; Bader és mtsai. 2010). Több esetben is leírták már a különböző E3 ligázok együttes hatását (Ponyeam és Hagen 2012; Peel és mtsai. 2012; Giangrande és mtsai. 2009), valamint az enzimkomplexek dimerben történő

működését is (Hao és mtsai. 2007; Welcker és mtsai. 2013), így nem elképzelhetetlen, hogy a két komplex együttes hatásának hiányában erősebb fenotípus jelenik meg. Az individualizáció korai szakaszait leszámítva, az mCherry-Ago és Ntc fehérje tisztán belüli helyzete nagyon hasonló. Az *ntc^{f07259}* mutánsban az aktin kúpok kialakulásuk után nem vándorolnak, ezáltal az individualizáció hiányában a muslicák sterilek (Bader és mtsai. 2010) Az irodalmi adatok alapján indokoltnak láttuk az *ago^{ms}* és *ntc^{f07259}* kettős mutáns vonal előállítását. Az *ago* és a *ntc* is a harmadik kromoszómán helyezkedik el, ezért a kettős mutáns előállításához rekombinációt használtunk. Az *ago^{ms}* és *ntc^{f07259}* transzheterozigóta egyedek nem mutatnak rendellenességet. Az *ago^{ms}* és *ntc^{f07259}* kettős mutánsok homozigóta egyedei viszont életképtelennek bizonyultak. Létezik egy nagyméretű genomi deléción, a *Df(3L)GN50*, amely az *ago* és a *ntc* kódoló régióját is érinti. Ezért *Df(3L)GN50/ntc^{f07259}* és *Df(3L)GN50/ago^{ms}* genotípusú állatokat vizsgáltunk, így a vad típusú allél és a mutáns allél is hemizigóta állapotba kerül, azonban a *Df(3L)GN50/ntc^{f07259}* esetében a *ntc^{f07259}*-re jellemző stagnáló aktin kúpokat, a *Df(3L)GN50/ago^{ms}* esetében pedig az *ago^{ms}*-re jellemző hímsteril fenotípust tapasztaltunk. A *Tv3{β2tub-mCh-Ago}/Cyo; ntc^{f07259}* genotípusú egyedekben nem tapasztaltunk rendellenességet az mCherry-Ago mintázatában. Az eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy az Ago fehérje, a Ntc fehérjétől eltérő szereppel rendelkezik az individualizáció során. Nagy áteresztőképességű fehérje-fehérje kölcsönhatásokat kimutató kísérletek alapján (30. Ábra) az Ago egyik potenciális célfehérjeje az IGF-II mRNS kötő fehérje (Imp) (Guruharsha és mtsai. 2011).



30. Ábra Ago fehérje interakciók a Drosophila Protein interaction Map és a FlyBase alapján (Guruharsha és mtsai. 2011)

Az Imp RNS kötő fehérje a spermatogenezis korai szakaszában az ősvarsejtek fenntartásához szükséges (Toledano és mtsai. 2012). A spermatogenezis késői szakaszában a fehérje csapdázott mutáns vonalakban az Imp-GFP a megnyúló spermatidák apikális végéhez lokalizálódik, oda, ahova az mCherry-Ago is felhalmozódik (31. Ábra E, F). Ez a lokalizáció részben átfed az mCherry-Ago lokalizációjával. Az Imp-GFP-t *ago^{ms}* mutáns háttéren vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az Imp-GFP jel kevésbé korlátozódik a ciszta farki végére, mint azt a vad típusnál megfigyelhettük (31. Ábra A-D). Azt tapasztaltuk, hogy az *ago^{ms}* mutánsban az Imp-GFP a ciszta bazális vége felé diffúz lokalizációt mutat. A megnyúló ciszták farki végének szerkezetét, a fuzómákat, alfa-spektrin festéssel vizsgáltuk, és nem tapasztaltunk rendellenességet a mutáns és a vad típus között (31. Ábra A, B). Az eredmények azt mutatják, hogy a megnyúlás során a citoszkeletális elemek vad típusú szerkezettel rendelkeznek, míg az Imp-GFP jel a farki vég csúcsától disztálisan, ektopikusan is megjelenik a mutáns cisztákban.



31. Ábra Az Imp-GFP lokalizációja a megnyúlt cisztákban

Vad típusú (A, C) és *ago^{ms}* mutáns (B, D) Spektrin festett (piros) Imp-GFP (zöld) ciszták fluoreszcens mikroszkópos képe. (A B – α -spektrin, A' B' – Imp-GFP, A'', B'' – összevetített) Az *ago^{ms}* mutánsban a Spektrin vad típusú szerveződést mutat. Az *ago^{ms}* mutánsban az Imp-GFP jel kiterjedését nyíl jelzi. Skála méret: 20 μ m. Az mCherry-Ago (E, F piros) és Imp-GFP (E', F' zöld) kolokalizációja vad típusú herékben. (E'' F'' - összevetített) Skála méret: (E) 25 μ m, (F) 50 μ m.

5. Az eredmények értékelése

A *Drosophila* poszt-meiotikus spermatogenezise alatt a spermatidák drámai változásokon mennek keresztül. A meiózis után a 64-sejtes cisztában a kerek spermatidák elkezdik kialakítani a spermiumokra jellemző struktúrákat. A megnyúlás során differenciálódnak a spermiumra jellemző sejtalkotók, az individualizáció során a citoplazmahidak megszűnnek, és ezzel kialakul az egységes plazmamembrán. Intenzív lebontó folyamatok mellett a spermatidák citoplazmája redukálódik és az egyedi spermiumok felcsavarodnak. A spermatidák a számos egymásra épülő poszt-meiotikus folyamatot gyakorlatilag sejtmagi transzkripció nélkül valósítják meg, a meiózis előtt szintetizált géntermékek felhasználásával. A felhalmozott géntermékek kölcsönhatásain múlik a spermatogenezis sikeressége. Amennyiben a géntermékek mennyisége csökken, a ciszta nem képes a fejlődési programot végrehajtani. Ezzel magyarázható a poszt-meiotikus fenotípust mutató mutánsok nagy száma (Fabrizio és mtsai. 1998).

A tesztiszben kifejeződő gének több mint 60%-a mutat emelkedett expressziós szintet a meiotikus cisztákban, ez alapján szerepük lehet a meiózis utáni fejlődésben. Ezen gének közül számos génduplikáció eredménye, aminek következtében az általánosan expresszálandó gén mellett egy tesztisz-specifikus forma jelent meg. A magban kódolt mitokondriális gének közül számos rendelkezik tesztisz-specifikus paralóggal. A mitokondriális oxidatív foszforilációhoz szükséges gének 78%-ának van tesztisz-specifikus paralógja. Genomi és génexpressziós mintázatok elemzése arra utal, hogy a tesztisz specializált mitokondriumai alternatív, tesztisz-specifikus géntermékekkel működnek (Tripoli és mtsai. 2005).

A specializált mitokondriumok nagy jelentőséggel bírnak a spermatogenezis során. A megnyúló ciszták teljes hosszában, az axonémával párhuzamosan végigfut a két mitokondrium származék, melyek nélkülözhetetlenek a megnyúláshoz; szerkezeti támaszt nyújtanak az elongációhoz szükséges járulékos mikrotubulusoknak. A megnyúlást követően is fontos szerep jut a mitokondriumoknak; a parakrisztallint felhalmozó nagy mitokondrium származék a spermium farki részének rigiditásáért felel. A szerkezeti ismereteken túl, a megnyúlt mitokondriumok energetikai jellemzőiről hiányosak az ismereteink. Ezért indokolt a tesztisz-specifikus mitokondriális fehérjék vizsgálata.

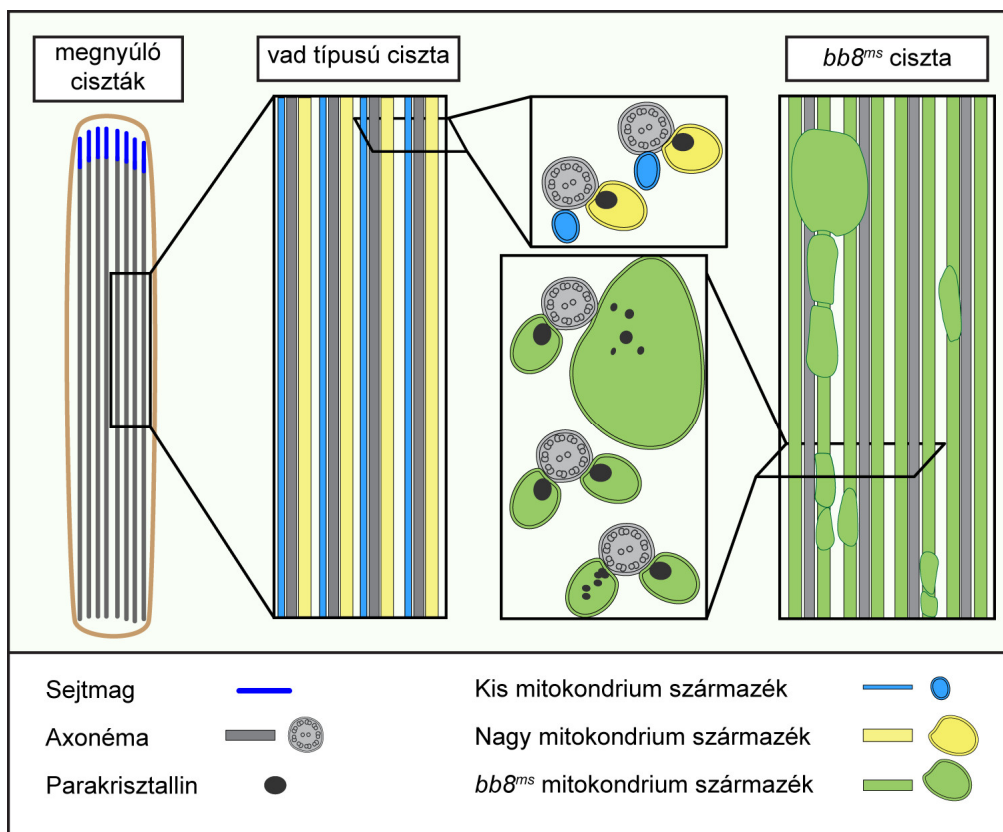
A Bb8 és a Gdh fehérjék filogenetikai elemzése kimutatta, hogy minden vizsgált *Drosophila* fajban előfordulnak, és különálló filogenetikai ágat képviselnek. A Gdh fehérjeszekvenciák magas konzerváltságot (97%) mutatnak, és minden *Drosophila* fajban egy kópiában vannak

jelen. Ezzel szemben a Bb8 fehérje a szekvenciája alapján kevésbé konzervált (81%), valamint a *Drosophila mojavensis*, a *Drosophila viridis* és a *Drosophila pseudoobscura* is több *bb8* ortológgal rendelkezik. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a *bb8* gén a *Drosophila* fajok korai törzsfeljődésében történt génduplikáció eredménye lehet, melynek során a transzlálódó Gdh fehérje megőrizte általános funkcióját, a Bb8 fehérje pedig alkalmazkodhatott a tesztisz-specifikus szerepre.

A fehérjeszekvenciák közötti eltérések ellenére a *Drosophila* Bb8 és Gdh fehérjék hasonló mértékben, nagy pontossággal illeszthetők a GLUD1 (1l1f) térszerkezeti modelljére. A modellben megfigyelt különbségek (antenna régió, dimerizációs domén) elsősorban az enzimaktivitás szabályozásában sejtetnek eltéréseket. Ezt támasztja alá az a megfigyelésünk is, hogy a glutamát dehidrogenázok allosztérikus szabályozásában szerepet játszó GTP kötésért felelős aminosavak a Bb8 fehérjében nem konzerváltak, ami arra utal, hogy a GTP gátlásának nincs hatása Bb8 fehérjére. Ugyanakkor az ADP kötő aminosavak 54%-ban konzerváltak a GLUD1-hez viszonyítva, ami 10%-kal több, mint a teljes szekvencia 44%-os hasonlósága. Ez alapján nem kizárt, hogy az ADP serkentheti az enzimaktivitást. A GLUD1 és GLUD2 példáján keresztül ismert (Banerjee és mtsai. 2003), hogy a fehérjeszekvenciákban történő minimális változások jelentős kihatással lehetnek az enzimek működésére. A vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a Bb8 fehérje aktív centrumában található, a szubsztrátok kötésében szerepet játszó aminosavak nagymértékben konzerváltak. Feltételezhetjük, hogy a Bb8 fehérje egy funkcionális glutamát dehidrogenáz, azonban a Bb8 részletes biokémiai jellemzése szükséges ahhoz, hogy a pontos molekuláris szerepére fény derüljön.

A szomatikus sejtekhez képest a poszt-meiotikus sejtek mitokondriumainak alakja és funkciója is módosul. Ezt támasztja alá az is, hogy számos ismert tesztisz-specifikus gén (*fzo*, *parkin*, *Hsp60*, *cyt-c-d*) és eddig nem jellemzett mitokondriális funkcióval rendelkező gén expressziója magasabb a meiotikus cisztákban (Vibranovski és mtsai. 2009) (saját nem publikált adatok). A *bb8* gén génexpressziós vizsgálataink eredményei is arra engednek következtetni, hogy a Bb8 fehérje feltehetően a poszt-meiotikus stádiumokban játszik szerepet, amit megerősít a *bb8^{ms}* mutáns késői spermatogenezisben mutatott fenotípusa, valamint az a tény, hogy a Bb8 fehérje a proteomikai elemzések szerint az érett spermiumban is jelen van (Wasbrough és mtsai. 2010).

A mitokondrium származékok nélkülözhetetlenek a *Drosophila* spermatidák megnyúlásához. A spermatidák megnyúlási hibáját számos olyan gén mutáns allélja mutatja, ahol a vad típusú géntermék a mitokondriumok 16-sejtes cisztában lévő mennyiségének növeléséhez, a kerek spermatidákban történő fúziójához, a Nebenkern kialakításához, vagy a mitokondrium származékok letekeredéséhez szükséges (Noguchi, Koizumi, és Hayashi 2011; Poole és mtsai. 2008; Aldridge és mtsai. 2007). A *Drosophila* spermatogenezise során a mitokondriumok megnyúlásához szükséges lipidek 30%-át a Nebenkernben halmozza fel, a maradék 70% a megnyúlás során szintetizálódik (Tokuyasu 1975). A lipid bioszintézis fontosságát kutatócsoportunkban is igazoltuk, ami során kimutattuk, hogy a foszfatisav megemelkedett szintje az axonémális és mitokondriális membrán változásán keresztül hímsterilitáshoz vezet (Laurinyecz és mtsai. 2016). Feltételezve, hogy a spermatidáknak ugyanannyi idő és nyersanyag áll rendelkezésére a megnyúlás során, a *bb8^{ms}* mutánsban megfigyelt körülbelül 14%-os rövidüléshez mindössze a mitokondrium származékok területének 0,2 μm -es, átmérőjük 0,02 μm -es növekedése szükséges. A *bb8^{ms}* mutáns esetében a spermatidák mitokondrium származékainak átmérője többszöröse lehet a vad típusnak, ami önmagában indokolhatja, hogy a *bb8^{ms}* mutánsban a megnyúló spermatidák nem érik el a vad típusú spermatidák hosszát. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a *bb8^{ms}* mutánsban a megnyúlási hiba a mitokondrium származékok morfológiai változásainak és a megamitokondrium képződésnek köszönhető (32. Ábra), valamint a mitokondriális rendellenességek miatt sérül az individualizáció folyamata.



32. Ábra A *bb8^{ms}* mutáns ciszták fenotípusának sematikus rajza

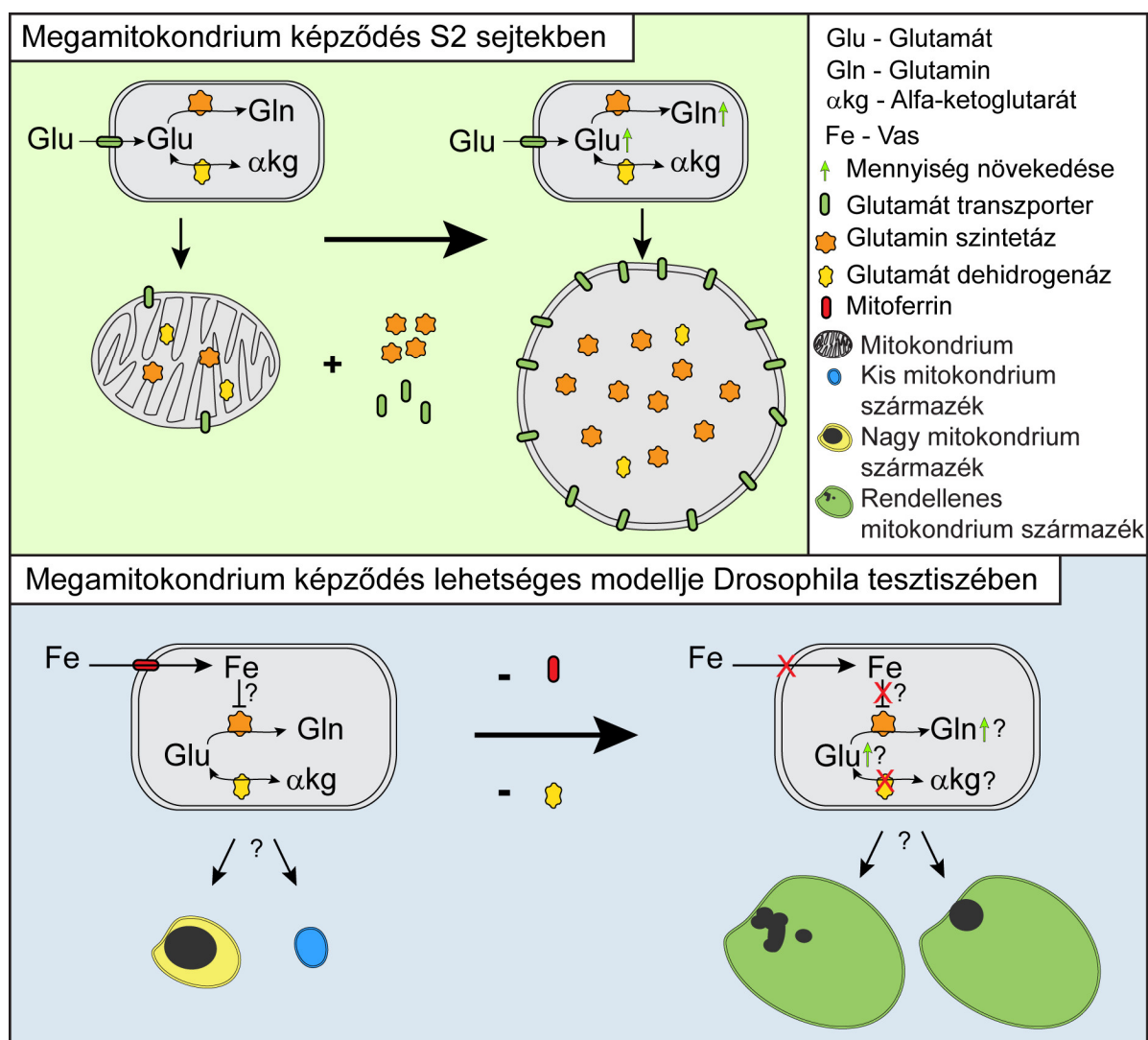
Kísérleteink során kimutattuk a *bb8* RNS késői meiotikus felhalmozódását, ami összeegyeztethető poszt-meiotikus funkciójával. Kimutattuk a Bb8 fehérje mitokondriális lokalizációját. A Bb8 fehérje hiánya megamitokondrium képződést, mindkét mitokondrium származékban történő parakrisztallin felhalmozódást és abnormalis parakrisztallin szerkezetet eredményez. A Bb8 szekvencia homológia alapján egy glutamát dehidrogenáz enzimet kódol. Hiánya okozhatja az alfa-ketoglutarát és ammónia szint növekedését és a glutamát csökkenését, vagy a glutamát szint növekedését és az alfa-ketoglutarát és ammónia csökkenését is. Mivel a késői megnyúló cisztákban feltehetőleg a lebontó folyamatok vannak többségben, ezért valószínűbb a második lehetőség. A *bb8^{ms}* muslicák alfa-ketoglutaráttal történő etetése nem menekítette a hímsteril fenotípust, és a vad típusú kontroll termékenységére sem volt hatással. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy az alfa-ketoglutarát mennyiségének növekedése nem okoz hímsterilitást, és nem a hiánya okozza a mutáns fenotípust. Nem zárhatjuk ki ugyanakkor, hogy az alfa-ketoglutarát a bélben belép a citromsav ciklusba és a tesztiszhez már nem jut elegendő mennyiségben.

Megamitokondrium képződést korábban már kimutattak S2 sejtekből, ahol a glutamin szint emelkedését érték el egy szelenofoszfát szintáz (SelD) transzkripció faktor csendesítésével (Shim és mtsai. 2009). A csendesítés hatására egy glutamát transzporter és a glutamin szintáz szintje emelkedett meg (Shim és mtsai. 2009). A dmGlut glutamát transzporter csendesítésével S2 sejtekben megakadályozták a mitokondrium glutamát felvételét, ezzel azt is kimutatták, hogy a glutamát szintje a limitáló a megamitokondriumok képződéséhez (Shim és mtsai. 2011). Érdekes még, hogy a FlyAtlas adatai alapján a dmGlut expressziója az ováriumban viszonylag magas, tesztiszben viszont rendkívül alacsony mértékű. Ez arra utalhat, hogy a tesztiszben lévő mitokondriumok nem szállítanak citoszolikus glutamátot a mátrixukba, ami azt jelezheti, hogy a spermatogenezis folyamán a spermatidák mitokondriumai érzékenyek a bennük található glutamát mennyiségére. A SelD csendesítésének, vagy a dmGlut és glutamin szintáz túltermeltetésének következtében az S2 sejtekben kialakult megamitokondriumok a membránpotenciáljukat megőrizték (Shim és mtsai. 2009). Az S2 sejtekben megfigyelhető megamitokondriumok és a *bb8^{ms}* mutánsban megfigyelhető megamitokondriumok fenotípusa rendkívül hasonló, ebből kifolyólag elképzelhető, hogy a *bb8^{ms}* mutánsban, a SelD csendesítéséhez hasonlóan, a glutamát szint emelkedése indukálja a megamitokondriumok képződését. Terveink között szerepel a mutáns és vad típusú tesztiszek glutamát és glutamin szintjének meghatározása.

A poszt-meiotikus fejlődés során a nagyobb mitokondrium származék parakrisztallint halmoz fel. A parakrisztallin anyaga és a parakrisztallin képződés folyamata még ismeretlen. A *bb8^{ms}* mutánsban a parakrisztallin kialakulása mind a két mitokondrium származékban megindul, valamint a későbbi fejlődés során a vad típushoz képest kisebb a mennyisége és a szerkezete rendellenes. Eredményeink azt mutatják, hogy a megnyúló spermatidákban a parakrisztallin normális, kizárólag a nagy mitokondrium származékban történő felhalmozódásához szükséges a Bb8 fehérje. Elképzelhető, hogy a Bb8 hozzájárul a parakrisztallin képződéséhez a nagy mitokondrium származékban, de az is lehetséges, hogy a kis mitokondrium származékban gátolja annak kialakulását, de nem zárhatjuk ki egy a glutamátot magába foglaló intracelluláris szignalizációs útvonal jelenlétét sem.

Hasonló parakrisztallin képződéssel járó fenotípus figyelhető meg az *emmenthal* és *mitoferrin* (*dmfrn^{SH115}*) mutáns tesztiszekben (Metzendorf és Lind 2010; Dorogova és mtsai. 2013). Az *emmenthal* mutáció esetében az érintett gén ismeretlen. A *mitoferrin* gén egy mitokondriális vas transzporter fehérjét kódol. Mitoferrin hiányában a *dmfrn^{SH115}* mutáns mind a két

mitokondrium származékban kis mennyiségű parakrisztallint halmoz fel. A *dmfrn^{SH115}* mutánsban a sejtmagok megnyúlnak és gyakran szétszóródnak a ciszták hosszában, valamint csak korai individualizálódó ciszták figyelhetőek meg, vándorló aktin kúpokat nem. A *dmfrn^{SH115}* mutáns esetén a megnyúló cisztákban fázis kontraszt mikroszkóppal gyakran figyeltek meg fehér vezikula szerű képződményeket (Metzendorf és Lind 2010). Azt tapasztaltuk, hogy *dmfrn^{SH115}* és a *bb8^{ms}* mutáns fenotípusa feltűnően hasonló, mind a két mutánsban megfigyelhető megamitokondrium képződés, és a parakrisztallin felhalmozódás mindkét mitokondrium származékban. Ez a megfigyelés felveti annak a lehetőségét, hogy a glutamát anyagcsereút mellett a vasháztartás is kiemelt szerepet játszhat a megnyúlt spermatidákban differenciálódó kis és nagy mitokondrium származékok azonosságának kialakításában. Az is ismeretes, hogy a vas a glutamin szintetázt gátolja (Levine 1983). *Drosophilában* két glutamin szintetáz gén van, azonban egyik sem tesztisz-specifikus. Érdekes kérdés, hogy gátolja-e a vas a glutamin szintézist? A kérdés megválaszolásához etetési kísérletet és a herékben a glutamin szintjének a mérését tervezzük. (33. Ábra)



33. Ábra Megamitokondrium képződés molekuláris háttere S2 sejtekben, és feltételezett mechanizmusa a spermátidák mitokondriumaiban.

A hibás mitokondrium szerkezet mögött több tényező is állhat. Nem zárhatjuk ki, hogy a hibás morfogenezis és az individualizációs komplex hibás összeszerelődése energiahány következménye. A *Drosophila* metabolit-térképe alapján a glutamát és a glutamához köthető aminosavak a hét legnagyobb mennyiségben előforduló anyagcsere termék között vannak. Tesztiszben a glutamát és glutamin szintek magasabbak, a prolin és hisztidin szintek hasonlóak, míg az arginin szintje alacsonyabb a teljes testre kiterjedő, általános metabolit szinthez képest (Chintapalli és mtsai. 2013). Ismeretes az is, hogy a gyorsan osztódó sejtek sok glutamint/glutamátot használhatnak energiaforrásként (Moreadith és Lehninger 1984), így elképzelhető, hogy a Bb8 fehérje hiányában a megnyúló ciszták nem jutnak hozzá a glutamin/glutamát által képzett energia tartalékhoz. Ez okozhat energiahányt, ami gátolja a

mitokondriumok normális fejlődését és az individualizáció korai lépéseit. A megnyúló spermatidák jelentős morfológiai változásokon mennek keresztül, ami jelentős membrán átrendeződéssel, és lipid bioszintézissel jár (Tokuyasu 1975). Amennyiben a fejlődő mitokondriumok energia termelő folyamataikhoz glutamint és glutamátot használnak fel, az azt eredményezheti, hogy a citromsav ciklusban felhasználódó acetil-koenzim A mennyisége csökken, és így az acetil-koenzim A felhasználhatóvá válik zsírsavak *de novo* szintéziséhez (Parlo és Coleman 1984). A zsírsavak pedig nyersanyagot szolgáltatnak a spermatidák fejlődéséhez szükséges foszfolipidek bioszintéziséhez. A mitokondriumok membránpotenciál-érzékeny festése csak a membránpotenciál jelenlétéről ad bizonyítékot, az energia termelő folyamatokról nincs információnk. Érdeemes megemlíteni, hogy a vad típusú spermatidák mitokondrium származékainak az energiatermelésben betöltött szerepe még nem vizsgálták. A tesztisz specifikus Bb8 glutamát dehidrogenáz vizsgálta felhívta a figyelmet arra, hogy az alapvető anyagcsere útvonalaknak jelentős szerepük van a sejtorganellek morfogenezisében a *Drosophila* spermatogenezisében.

A mitokondrium származékok a megnyúlás irányításán és a parakrisztallin felhalmozódásán túl a megnyúlt mitokondriumok az individualizáció során biztosítják a kaszpáz aktivitáshoz szükséges Cyt-c-d fehérjét valamint a felszínükre horgonyozzák a szukcinil koenzimA szintetáz- β fehérje közreműködésével a Khl10/Cul3/Roc1b E3 enzimkomplexet.

Az *archipelago* egy általánosan kifejeződő gén, az általa kódolt Ago fehérje SCF E3 ubikvitin ligáz alegységeként szerepet játszik a sejtciklus szabályozásában, a lárvális tracheák fejlődésben és eredményeink alapján a spermatogenezisben (Moberg et al. 2001; Mortimer & Moberg 2007; Mortimer & Moberg 2013). Az *archipelago* génről három transzkript íródik át. A transzkriptek szabályozó régiójába, illetve 5' nem kódoló intronikus régiójába épült P{RS5}ago^{5-HA-2760} elem a géntermékek jelentős mértékű csökkenését eredményezi. Az *ago-RA* transzkript Mortimer és Moberg eredményei alapján az általános sejtműködéshez, míg az *ago-RC* transzkript a tracheák szabályos fejlődéséhez szükséges (Mortimer és Moberg 2013). Vizsgálatainkkal megállapítottuk, hogy az *ago-RA* transzkript az *ago^{ms}* mutánsban kisebb mértékben csökkent, feltehetően ez a csökkent génexpresszió is elegendő a sejtciklusban betöltött szerep ellátásához. Ezt támasztja alá az is, hogy a WD40 domént kódoló szekvenciában hibás, de vad típusú F-box doménnel rendelkező *ago¹* és *ago³* allélokat hordozó

transzheterozigóta *ago^{ms}* muslicák letálisak, feltehetően az EMS allélok domináns negatív hatásának következtében. Mivel a P-elem inszerció miatt az *ago-RA* szintje nem csökkent jelentős mértékben, azt feltételezzük, hogy a sterilitásért az *ago-RB* és az *ago-RC* transzkriptek kiesése felelős.

Az Ago fehérje sejtmagi szerepe jól ismert, a CycE és dMyc bontásán keresztül szabályozza a sejtciklust, a Trh és Sima transzkripciós faktorok szintjének szabályozásával befolyásolja a lárvális tracheák fejlődését (Moberg és mtsai. 2001; Moberg és mtsai. 2004; Mortimer és Moberg 2007; Mortimer és Moberg 2013). Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy az mCherry-Ago fehérje a spermatogenezis korai szakaszaiban a spermatociták sejtmagjában lokalizálódik. Az *ago^{ms}* mutánsok korai spermatogenezis stádiumai normálisak, nem tapasztaltunk sejtciklus hibájából eredő rendellenességet. Az mCherry-Ago fehérje lokalizációjából arra következtethetünk, hogy az Ago eloszlása a meiózist követően megváltozik. A magi mCherry-Ago jel megszűnik, majd a ciszták farki vége felé növekvő grádiensszerű, diffúz felhalmozódást mutat, amit egy, az individualizációs komplexek jellegzetes struktúráinak végén, az aktin kúpok disztális részén megfigyelhető lokalizáció vált fel. Térben és időben az Ago poszt-meiotikus lokalizációja egybeesik az intenzív lebontó folyamatokkal jellemzett individualizáció folyamatával, amikor a megnyúlt spermatidák citoplazmája redukálódik és a sejtek közötti plazmahidak felszámolásra kerülnek.

Az Ago fehérje magon kívüli elhelyezkedése, citoplazmatikus célfehérjékhez és komplexekhez történő hozzáférést biztosíthat. A megnyúló ciszták farki végén az elongációs komplex számos citoszkeletális eleme mellett a Soti és dBruce fehérjék is jelen vannak, amelyek a lebontó folyamatokban jelentős kaszpáz kaszkád szabályozásában vesznek részt (Arama és mtsai. 2003; Kaplan és mtsai. 2010). Az *ago^{ms}* mutánsban az elongáció normálisan megy végbe, de az azt követő individualizáció hibát szenved, az individualizációs komplexek szétcsúsznak. A kaszpáz kaszkád aktiválódik, de annak grádiense a cisztikus hólyagtól a ciszta farki vége felé nem mutat gradiens eloszlást, az individualizálódó ciszták teljes hosszában egységes kaszpáz jelet figyelhetünk meg.

Az Ago élesztő ortológja, a CDC4 fehérje genomstabilitásban betöltött szerepe már ismert (Edenberg és mtsai. 2014). A Cdc4 a Hst3 hiszton deacetilázt jelöli ki lebontásra, így közvetett módon szabályozza a hiszton kódot. Az Ago és a His2Av hiszton fehérje kölcsönhatását kettős hibrid kísérletben mutatták ki (Formstecher és mtsai. 2005). Megvizsgáltuk, hogy az *ago^{ms}* mutánsban a meiózist követően megtörténik-e a kromatin átszerveződése a megnyúló

spermatidákban. Azt tapasztaltuk, hogy az *ago^{ms}* mutánsban a hiszton-protamin csere létrejön, ugyanakkor a sejtmagok szétszóródnak, a ciszták disztális részében pedig kerek kondenzált protamin pozitív sejtmagok halmozódnak fel. Ez a fenotípus a dBruce mutáns fenotípusára hasonlít (Arama és mtsai. 2003). A dBruce fehérje a kaszpáz kaszkád inhibitora a spermatogenezis során, a kaszpáz aktivitás beindítása a dBruce fehérje lebomlását követően történik. A dBruce lokalizációja az *ago^{ms}* mutánsban nem sérült ezért nem valószínű, hogy az Ago fehérjének szerepe volna a lebontásában. Elképzelhető, hogy a megfigyelt sejtmagi rendellenességek hasonlóságának hátterében a szabályozatlan kaszpáz aktivitás áll, ugyanis az *ago^{ms}* mutánsban a ciszták teljes hosszában megjelenik a kaszpáz aktivitás. Ugyanakkor az sem kizárható, hogy amennyiben a dBruce kölcsönhatásba lép az Ago-SCF-kompleksszel, akkor azt nem mint célfehérje teszi, hanem mint E2 enzim.

A sejtmagok rendellenességére utal az is, hogy az *ago^{ms}* mutánsok esetén a megnyúlás során a sejtmagtól gyakran elválik a bazális test. A bazális test a centroszómából alakul ki és a spermatidák fejlődése során a sejtmag-membránba horgonyzódik. A *C. elegans* esetében a Sel-10 (Drosophila ortológ Ago) egy másik F-box fehérjével a Lin-23-mal (Drosophila ortológ Slimb) együttműködve szabályozzák a centroszómák duplikációját (Peel és mtsai. 2012). Drosophilában kimutatták, hogy az Slimb és az Ago fehérjék közösen szabályozzák a Gcm fehérje szintjét, ezzel a gliasejtek számát (Giangrande és mtsai. 2009). A szakirodalomból ismert, hogy a Drosophilában is van szerepe az SCF komplex SkpA alegységének a centroszómák duplikációjának szabályozásában (Murphy 2003). Az *ago^{ms}* mutánsokban nem tapasztaltunk centroszóma duplikációval járó fenotípust, sem az axonéma szerkezeti megváltozását. Az eredményeink alapján elképzelhető, hogy az Ago fehérjének a magi szerepe nem ér véget a meiózissal, ugyanakkor az mCherry-Ago fehérje sejtmagi lokalizációját nem sikerült kimutatnunk sem a megnyúlás, sem az individualizáció során. Azt is kijelenthetjük, hogy az *ago^{ms}* mutánsban a sejtmagot érintő fenotípusok nem egységesek.

Az individualizáció során az mCherry-Ago fehérje a bazális végről a cisztikus hólyag területére lokalizálódik, majd a „waste bag”-be. Az aktin kúpok korai szerveződésénél az mCherry-Ago-t nem tudtuk kimutatni, viszont a vándorló aktin kúpok bazális végén feldúsulását tapasztaltuk. Az individualizáció során a Ntc F-box fehérje is az aktin kúpokhoz, és a cisztikus hólyagba lokalizálódik, azonban már az aktin kúpok formálódásánál is jelen van (Bader és mtsai. 2010). A *ntc^{f07259}* mutáns esetén az aktin kúpok kialakulnak, azonban vándorlásukat nem kezdik el. Az *ago^{ms}* mutánsban azt tapasztaltuk, hogy individualizációs komplex megkezdí vándorlását,

az aktin kúpok szétszóródnak, méretük sok esetben különbözik, és vándorlásuk iránya is megváltozhat. Az *ago* és a *ntc* között genetikai interakciót nem sikerült kimutatnunk, ugyanakkor elképzelhető, hogy míg a *Ntc* az individualizáció megkezdésében és korai szakaszában játszik szerepet, addig az *Ago* szerepe elsősorban a vándorló individualizációs komplexhez köthető. Nem zárható ki annak a lehetősége, hogy a fenotípusos különbségek hátterében a különböző mutánsok erőssége áll.

Az *Ago* fehérje interakciós kísérletben azonosított kölcsönható partnere az *Imp* fehérje (Guruharsha és mtsai. 2011). Kísérleteinkben az *Imp*-GFP fehérjecsapdázott vonal az *ago^{ms}* mutáns háttéren vizsgálva rendellenes *Imp*-GFP lokalizációt mutatott. A ciszták végén a citoskeletális elemek (aktin, spektrin) szerkezetében nem tapasztaltunk rendellenességet az *ago^{ms}* mutáns megnyúló farki végén. A poszt-meiotikus fejlődés bizonyos szakaszaiban az *mCherry-Ago* és az *Imp*-GFP fehérje átfedő szubcelluláris lokalizációt mutatott. A közvetlen kapcsolat kimutatására további biokémiai kísérletek szükségesek. A „cup” és „comet” típusú poszt-meiotikusan expresszáldó gének mRNS-einek felhalmozódása a ciszták farki végén történik, ami az *Imp*-GFP megnyúlt spermatidákban megfigyelt szubcelluláris lokalizációjához hasonlít (Barreau és mtsai. 2008). Bár az *Imp* fehérje szerepe a spermatogenezis késői szakaszaiban nem ismert, de feltételezett RNS-kötő tulajdonsággal rendelkezik, emiatt szerepet játszhat a poszt-meiotikusan expresszáldó mRNS-ek lokalizációjának a kialakításában (Munro és mtsai. 2006; Toledano és mtsai. 2012).

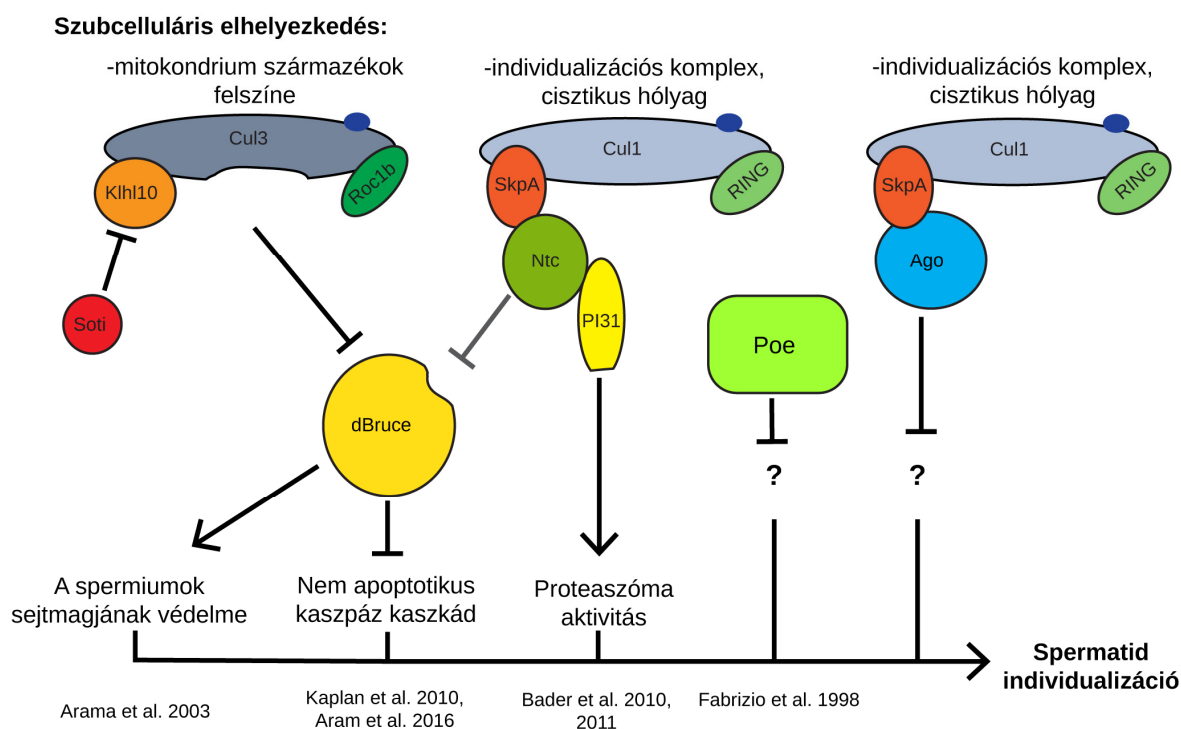
Az *Ago* fehérjének a *Drosophila* Protein interaction Map alapján a Cut up (*Ctp*) vagy *Ddlc1* egy potenciális cél fehérjeje (Guruharsha és mtsai. 2011). A *ctp* egy dinein fehérje. A *ctp* mutánsok többféle különböző spermatogenezis fenotípust mutatnak. A *Ctp*-nak az összejt niche fenntartásában van szerepe a szomatikus cisztasejtekben, a megnyúlás során az elongációs komplex szerveződésében és a sejtmagok megnyúlásában vesz részt, majd individualizáció során az aktin kúpok fenntartásában játszik szerepet (Ghosh-roy és mtsai. 2004; Joti és mtsai. 2011; Ghosh-roy és mtsai. 2005).. A *ctp* mutánsban a megnyúló ciszták farki végén rendezetlen fuzóma figyelhető meg és a spermatidák vége visszahajlik, ami az *ago^{ms}* mutánsra nem jellemző. Az *ago^{ms}* mutánsban a spermatidák farki végén az *Imp*-GFP lokalizációja hibás, más rendellenességet nem tapasztaltunk. A *Ctp* individualizáció során az aktin kúpok csúcsi részéhez, míg az *mCherry-Ago* fehérje az aktin kúpok bazális végéhez lokalizálódik (Ghosh-roy és mtsai. 2005). A *ctp* mutánsban, az *ago^{ms}* mutánshoz hasonlóan, az individualizációs komplex szétcuszik, de az aktin kúpok mérete, iránya változatlan marad. Érdemes megjegyezni, hogy

a Ctp-n kívül még más citoszkeletális fehérjék mutánsai (miozin VI, miozin V, Dlc90F) is hasonló fenotípust mutatnak az individualizáció során (Mermall és mtsai. 2005; Hicks és mtsai. 1999; Li és mtsai 2004). A tesztisz-specifikus proteaszóma alegység, a Prosa6T mutánsában is megfigyelhetjük az aktin kúpok szétcsúszását (Zhong és Belote 2007). Ezek alapján azt feltételezhetjük, hogy az individualizáció során a citoszkeletális elemek dinamikája az ubikvitin proteaszóma rendszertől függ, illetve a lebontó folyamatok hibájára az aktin kúpok vándorlása kiemelten érzékeny.

Az *ago* génről elmondható, hogy a kaspázok aktivitását szabályozó génektől függetlenül szükséges a spermatidák szabályos fejlődéséhez.

A Khl10/Cul3/Roc1b és a Ntc-SCF komplexektől eltekintve, az E3 enzimek tesztiszben betöltött szerepéről viszonylag keveset tudunk. A nagyszámú tesztisz-specifikus E3 alegység jelenlétéből arra következtethetünk, hogy az E3 ubikvitin ligázok még számos ismeretlen szereppel rendelkezhetnek a spermatogenezis során. Az SCF komplex esetében a tesztisz-specifikus alegységekből elméletileg akár 40 különböző komplex is létrejöhet. Az utóbbi években kimutatták, hogy az E3 ligázok is képezhetnek homo- és heterodimereket (Ponyeam és Hagen 2012; Welcker és mtsai. 2013). Összességében elmondható, hogy az E3 enzimek egy változatos szabályozási rendszert hozhatnak létre a *Drosophila* spermatogenezise során. (34.

Ábra)



34. Ábra A *Drosophila* poszt-meiotikus spermatogenezisében ismert E3 ubikvitin ligázok

6. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Sinka Ritának, hogy a csoportjában végezhettem munkámat, és elsajátíthattam számos genetikai és molekuláris biológiai technikát! Hálás vagyok a rengeteg tanácsért és a dolgozat megírásában nyújtott hatalmas segítségéért!

Hálás vagyok Laurinyecz Barbarának, tanácsaiért, javaslataiért és a munkám során nyújtott sok segítségéért!

Köszönettel tartozom kutató csoportunk minden tagjának, munkám során nyújtott segítségükért, támogatásukért!

Hálával tartozom Juhász Gábornak és Kovács L. Attilának az elektronmikroszkópos felvételekért.

Köszönöm Vedelek Balázsnak, a konstruktív megjegyzéseit, tanácsait, és a molekula modellek előállításában nyújtott segítségét!

Köszönöm családomnak a sok támogatást és biztatást!

7. Irodalomjegyzék

- Adams, Mark D., Susan E. Celniker, Robert A. Holt, Cheryl A. Evans, Jeannine D. Gocayne, Peter G. Amanatides, Steven E. Scherer, és mtsai. 2000. „The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*”. *Science* 287. doi:10.1126/science.287.5461.2185.
- Aldridge, Amanda C., Levi P. Benson, Monica M. Siegenthaler, Benjamin T. Whigham, R. Steven Stowers, és Karen G. Hales. 2007. „Roles for Drp1, a dynamin-related protein, and mltin, a kinesin-associated protein, in mitochondrial segregation, unfurling and elongation during *Drosophila* spermatogenesis”. *Fly* 1 (1): 38–46. doi:3913 [pii].
- Aledo, J. Carlos. 2004. „Glutamine breakdown in rapidly dividing cells: Waste or investment?” *BioEssays* 26 (7): 778–85. doi:10.1002/bies.20063.
- Aram, Lior, Tslil Braun, Carmel Braverman, Yosef Kaplan, Liat Ravid, Smadar Levin-Zaidman, és Eli Arama. 2016. „A Krebs Cycle Component Limits Caspase Activation Rate through Mitochondrial Surface Restriction of CRL Activation”. *Developmental Cell* 37 (1). Elsevier Inc.: 15–33. doi:10.1016/j.devcel.2016.02.025.
- Arama, Eli, Julie Agapite, és Hermann Steller. 2003. „Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in *Drosophila*.” *Developmental cell* 4 (5): 687–97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12737804>.
- Arama, Eli, Maya Bader, Gabrielle E Rieckhof, és Hermann Steller. 2007. „A ubiquitin ligase complex regulates caspase activation during sperm differentiation in *Drosophila*.” *PLoS biology* 5 (10): e251. doi:10.1371/journal.pbio.0050251.
- Arama, Eli, és Hermann Steller. 2006. „Detection of apoptosis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling and acridine orange in *Drosophila* embryos and adult male gonads.” *Nature protocols* 1 (4): 1725–31. doi:10.1038/nprot.2006.235.
- Bader, Maya, Eli Arama, és Hermann Steller. 2010. „A novel F-box protein is required for caspase activation during cellular remodeling in *Drosophila*.” *Development (Cambridge, England)* 137 (10): 1679–88. doi:10.1242/dev.050088.
- Bader, Maya, Sigi Benjamin, Orly L Wapinski, David M Smith, Alfred L Goldberg, és Hermann Steller. 2011. „A conserved F-box–regulatory complex controls proteasome activity in *Drosophila*” 145 (3): 371–82. doi:10.1016/j.cell.2011.03.021.A.
- Banerjee, Soojay, Timothy Schmidt, Jie Fang, Charles A. Stanley, és Thomas J. Smith. 2003. „Structural studies on ADP activation of mammalian glutamate dehydrogenase and the evolution of regulation”. *Biochemistry* 42 (12): 3446–56. doi:10.1021/bi0206917.
- Barreau, Carine, Elizabeth Benson, Elin Gudmannsdottir, Fay Newton, és Helen White-Cooper. 2008. „Post-meiotic transcription in *Drosophila* testes.” *Development (Cambridge, England)* 135 (11): 1897–1902. doi:10.1242/dev.021949.
- Bellen, Hugo J., Robert W. Levis, Guochun Liao, Yuchun He, Joseph W. Carlson, Garson Tsang, Martha Evans-Holm, és mtsai. 2004. „The BDGP gene disruption project: Single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes”. *Genetics* 167 (2): 761–81. doi:10.1534/genetics.104.026427.
- Bond, P A, és J H Sang. 1968. „Glutamate dehydrogenase of *Drosophila* larvae.” *Journal of insect physiology* 14 (3): 341–59. doi:10.1016/0022-1910(68)90076-0.
- Bré, M H, V Redeker, M Quibell, J Darmanaden-Delorme, C Bressac, J Cosson, P Huitorel, és mtsai. 1996. „Axonemal tubulin polyglycylation probed with two monoclonal antibodies: widespread evolutionary distribution, appearance during spermatozoan maturation and possible function in motility.” *Journal of cell science* 109 (Pt 4): 727–38.
- Brosnan, John T, és Margaret E Brosnan. 2013. „Glutamate: a truly functional amino acid.” *Amino acids* 45 (3): 413–18. doi:10.1007/s00726-012-1280-4.

- Bunting, James R, Trung V Phan, Eleanor Kamali, és Robert M Dowben. 1989. „Fluorescent cationic probes of mitochondria Metrics and mechanism of interaction Mitochondria isolation”. *Biophysical journal* 56 (November): 979–93. doi:10.1016/S0006-3495(89)82743-2.
- Chintapalli, Venkateswara R, Mohammed Al Bratty, Dominika Korzekwa, David G Watson, és Julian a T Dow. 2013. „Mapping an atlas of tissue-specific *Drosophila melanogaster* metabolomes by high resolution mass spectrometry”. *PLoS ONE* 8 (10): e78066. doi:10.1371/journal.pone.0078066.
- Choo, Yin Yin, és Thilo Hagen. 2012. „Mechanism of cullin3 E3 ubiquitin ligase dimerization”. *PLoS ONE* 7 (7). doi:10.1371/journal.pone.0041350.
- Davis, Ryan J., Markus Welcker, és Bruce E. Clurman. 2014. „Tumor Suppression by the Fbw7 Ubiquitin Ligase: Mechanisms and Opportunities”. *Cancer Cell* 26 (4). Elsevier Inc.: 455–64. doi:10.1016/j.ccell.2014.09.013.
- de Cuevas, Margaret, és Erika L Matunis. 2011. „The stem cell niche: lessons from the *Drosophila* testis.” *Development (Cambridge, England)* 138 (14): 2861–69. doi:10.1242/dev.056242.
- DeLuca, Steven Z, és Patrick H O’Farrell. 2012. „Barriers to male transmission of mitochondrial DNA in sperm development.” *Developmental cell* 22 (3). Elsevier Inc.: 660–68. doi:10.1016/j.devcel.2011.12.021.
- Deng, Hansong, Mark W Dodson, Haixia Huang, és Ming Guo. 2008. „The Parkinson’s disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in *Drosophila*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (38): 14503–8. doi:10.1073/pnas.0803998105.
- Dorogova, N V, E U Bolobolova, K a Akhmetova, és S a Fedorova. 2013. „*Drosophila* male-sterile mutation emmenthal specifically affects the mitochondrial morphogenesis.” *Protoplasma* 250 (2): 515–20. doi:10.1007/s00709-012-0434-2.
- Dorogova, Natalia V, Elena M Akhmametyeva, Sergei a Kopyl, Natalia V Gubanov, Olga S Yudina, Leonid V Omelyanchuk, és Long-Sheng Chang. 2008. „The role of *Drosophila* Merlin in spermatogenesis.” *BMC cell biology* 9 (január): 1. doi:10.1186/1471-2121-9-1.
- Doronkin, Sergey, Inna Djagaeva, és Steven K Beckendorf. 2003. „The COP9 signalosome promotes degradation of Cyclin E during early *Drosophila* oogenesis.” *Developmental cell* 4 (5): 699–710. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12737805>.
- Edenberg, Ellen R, Ajay a Vashisht, Benjamin R Topacio, James a Wohlschlegel, és David P Toczyski. 2014. „Hst3 is turned over by a replication stress-responsive SCF(Cdc4) phospho-degron.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (16): 5962–67. doi:10.1073/pnas.1315325111.
- Fabian, Lacramioara, és Julie A Brill. 2012. „Big things come from little packages *Drosophila* spermiogenesis”, sz. September: 197–212.
- Fabian, Lacramioara, Ho-chun Wei, Janet Rollins, Tatsuhiko Noguchi, J Todd Blankenship, Kishan Bellamkonda, Gordon Polevoy, és mtsai. 2010. „Cell Polarity and Exocyst Localization in *Drosophila*” 21: 1546–55. doi:10.1091/mbc.E09.
- Fabrizio, J J, G Hime, S K Lemmon, és C Bazinet. 1998. „Genetic dissection of sperm individualization in *Drosophila melanogaster*.” *Development (Cambridge, England)* 125 (10): 1833–43. doi:10.1101/gad.3.9.1273.
- Fabrizio, James J, Christina A Hickey, Cecylia Stabrawa, Vadim Meytes, Jessica A Hutter, Caitlin Talbert, és Nadine Regis. 2008. „Imp (IGF-II mRNA-binding protein) is expressed during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster* James”, sz. February: 47–52.
- Fári, Karolina, Sándor Takács, Dániel Ungár, és Rita Sinka. 2016. „The role of acroblast formation during *Drosophila* spermatogenesis”. *Biology Open*, bio.018275. doi:10.1242/bio.018275.
- Fischer, J a, E Giniger, T Maniatis, és M Ptashne. 1988. „GAL4 activates transcription in *Drosophila*.” *Nature* 332

(6167): 853–56. doi:10.1038/332853a0.

- Formstecher, Etienne, Sandra Aresta, Vincent Collura, Alexandre Hamburger, Alain Meil, Alexandra Trehin, Virginie Betin, és mtsai. 2005. „Protein interaction mapping: A *Drosophila* case study”. *Genome Research* 33 (February 2004): 376–84. doi:10.1101/gr.2659105.
- Fuller, Margaret T. 1993. *The Development of Drosophila melanogaster Volume I Spermatogenesis*. Szerkesztette Michael Bate és Alfonso Martinez Arias. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ghosh-roy, Anindya, Bela S Desai, Krishanu Ray, és *Drosophila* Stocks. 2005. „Dynein Light Chain 1 Regulates Dynamitin-mediated F-Actin Assembly during Spermatid Individualization in” 16 (July): 3107–16. doi:10.1091/mbc.E05.
- Ghosh-roy, Anindya, Madhura Kulkarni, Vikash Kumar, Seema Shirolkar, és Krishanu Ray. 2004. „Cytoplasmic Dynein – Dynactin Complex Is Required for Spermatid Growth but Not Axoneme Assembly in” 15 (May): 2470–83. doi:10.1091/mbc.E03.
- Giangrande, Angela, Margaret Su-chun Ho, Hungwen Chen, Minghan Chen, és Cheng-ting Chien. 2009. „Gcm protein degradation suppresses proliferation of glial progenitors”.
- Gibala, Martin J, Dave A Maclean, Terry E Graham, és Bengt Saltin. 1997. „Anaplerotic processes in human skeletal muscle during brief dynamic exercise”, 703–13.
- Giráldez, Servando, Joaquín Herrero-Ruiz, Mar Mora-Santos, Miguel a Japón, Maria Tortolero, és Francisco Romero. 2014. „SCF(FBXW7 α) modulates the intra-S-phase DNA-damage checkpoint by regulating Polo like kinase-1 stability.” *Oncotarget* 5 (12): 4370–83. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24970797>.
- Guruharsha, K G, Jean-François Rual, Bo Zhai, Julian Mintseris, Pujita Vaidya, Namita Vaidya, Chapman Beekman, és mtsai. 2011. „A protein complex network of *Drosophila melanogaster*.” *Cell* 147 (3): 690–703. doi:10.1016/j.cell.2011.08.047.
- Hale, Valerie a, Evan L Guiney, Lindsey Y Goldberg, Josephine H Haduong, Callie S Kwartler, Katherine W Scangos, és Caroline Goutte. 2012. „Notch signaling is antagonized by SAO-1, a novel GYF-domain protein that interacts with the E3 ubiquitin ligase SEL-10 in *Caenorhabditis elegans*.” *Genetics* 190 (3): 1043–57. doi:10.1534/genetics.111.136804.
- Hales, Karen G., és Margaret T. Fuller. 1997. „Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase”. *Cell* 90 (1): 121–29. doi:10.1016/S0092-8674(00)80319-0.
- Hao, Bing, Stephanie Oehlmann, Mathew E Sowa, J Wade Harper, és Nikola P Pavletich. 2007. „Structure of a Fbw7-Skp1-cyclin E complex: multisite-phosphorylated substrate recognition by SCF ubiquitin ligases.” *Molecular cell* 26 (1): 131–43. doi:10.1016/j.molcel.2007.02.022.
- Hershko, A. 1992. „The Ubiquitin System for Protein Degradation”. *Annual Review of Biochemistry* 61 (1): 761–807. doi:10.1146/annurev.biochem.61.1.761.
- Hershko, A., és C. Aaron. 1998. „The Ubiquitin System”. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 425–79. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.425.
- Hicks, J L, W M Deng, a D Rogat, K G Miller, és M Bownes. 1999. „Class VI unconventional myosin is required for spermatogenesis in *Drosophila*.” *Molecular biology of the cell* 10 (12): 4341–53. doi:10.1091/mbc.E12-02-0158.
- Joti, Prakash, Anindya Ghosh-Roy, és Krishanu Ray. 2011. „Dynein light chain 1 functions in somatic cyst cells regulate spermatogonial divisions in *Drosophila*.” *Scientific reports* 1 (január): 173. doi:10.1038/srep00173.
- Kaplan, Yosef, Liron Gibbs-Bar, Yossi Kalifa, Yael Feinstein-Rotkopf, és Eli Arama. 2010. „Gradients of a ubiquitin E3 ligase inhibitor and a caspase inhibitor determine differentiation or death in spermatids.” *Developmental cell* 19 (1). Elsevier Ltd: 160–73. doi:10.1016/j.devcel.2010.06.009.

- Kibanov, Mikhail V., Alexei A. Kotov, és Ludmila V. Olenina. 2013. „Multicolor fluorescence imaging of whole-mount *Drosophila* testes for studying spermatogenesis”. *Analytical Biochemistry* 436 (1): 55–64. doi:10.1016/j.ab.2013.01.009.
- Kohler, Robert E. 1994. „Lords of the Fly: *Drosophila* Genetics and the Experimental Life.” *Contemporary Sociology* 24 (May): 264. doi:10.2307/2076910.
- Lakovaara S. 1969. „Malt as a culture medium for *Drosophila* species”. *Drosophila Information Service*, 1969. [http://www.ou.edu/journals/dis/DIS44/Lakovaara 128.pdf](http://www.ou.edu/journals/dis/DIS44/Lakovaara%20128.pdf).
- Laurinyecz, Barbara, Mária Péter, Viktor Vedelek, Attila L Kovács, Gábor Juhász, Péter Maróy, László Vígh, Gábor Balogh, és Rita Sinka. 2016. „Reduced expression of CDP-DAG synthase changes lipid composition and leads to male sterility in *Drosophila*.” *Open biology* 6 (1). doi:10.1098/rsob.150169.
- Levine, Rodney L. 1983. „Oxidative modification of glutamine Oxidative Modification of Glutamine Synthetase” 258 (19): 11823–27.
- Li, Wei, Mario H. Bengtson, Axel Ulbrich, Akio Matsuda, Venkateshwar A. Reddy, Anthony Orth, Sumit K. Chanda, Serge Batalov, és Claudio A P Joazeiro. 2008. „Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle’s dynamics and signaling”. *PLoS ONE* 3 (1). doi:10.1371/journal.pone.0001487.
- Loppin, Benjamin, Raphaëlle Dubruille, és Béatrice Horard. 2015. „The intimate genetics of *Drosophila* fertilization.” *Open biology* 5 (8): 1–16. doi:10.1098/rsob.150076.
- Lüpold, Stefan, Mollie K Manier, Nalini Puniamoorthy, Christopher Schoff, William T Starmer, Shannon H Buckley Lüpold, John M Belote, és Scott Pitnick. 2016. „How sexual selection can drive the evolution of costly sperm ornamentation”. *Nature* 533 (7604). Nature Publishing Group: 535–38. doi:10.1038/nature18005.
- Ma, Zhiguo, Zhonghua Liu, és Xun Huang. 2010. „OSBP- and FAN-mediated sterol requirement for spermatogenesis in *Drosophila*.” *Development (Cambridge, England)* 137 (22): 3775–84. doi:10.1242/dev.049312.
- Maniatis - Green, R. Michael, Sambrook, Joseph - Molecular Cloning A laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory Press Fourth Edition www.molecularcloning.org
- Martinez-Campos, Maruxa, Renata Basto, James Baker, Maurice Kernan, és Jordan W. Raff. 2004. „The *Drosophila* pericentrin-like protein is essential for cilia/flagella function, but appears to be dispensable for mitosis”. *Journal of Cell Biology* 165 (5): 673–83. doi:10.1083/jcb.200402130.
- Mastorodemos, Vasileios, Dimitra Kotzamani, Ioannis Zaganas, Giovanna Arianoglou, Helen Latsoudis, és Andreas Plaitakis. 2009. „Human GLUD1 and GLUD2 glutamate dehydrogenase localize to mitochondria and endoplasmic reticulum”. *Biochemistry and Cell Biology* 87 (3): 505–16. doi:10.1139/O09-008.
- McQuibban, G Angus, Jeffrey R Lee, Lei Zheng, Mikko Juusola, és Matthew Freeman. 2006. „Normal mitochondrial dynamics requires rhomboid-7 and affects *Drosophila* lifespan and neuronal function.” *Current biology : CB* 16 (10): 982–89. doi:10.1016/j.cub.2006.03.062.
- Mermall, Valerie, Nathalie Bonafé, Lynn Jones, James R. Sellers, Lynn Cooley, és Mark S. Mooseker. 2005. „*Drosophila* myosin V is required for larval development and spermatid individualization”. *Developmental Biology* 286 (1): 238–55. doi:10.1016/j.ydbio.2005.07.028.
- Metaxakis, Athanasios, Stefan Oehler, Apostolos Klinakis, és Charalambos Savakis. 2005. „Minos as a genetic and genomic tool in *Drosophila melanogaster*.” *Genetics* 171 (2): 571–81. doi:10.1534/genetics.105.041848.
- Metzendorf, Christoph, és Maria I Lind. 2010. „*Drosophila* mitoferrin is essential for male fertility: evidence for a role of mitochondrial iron metabolism during spermatogenesis.” *BMC developmental biology* 10 (január): 68. doi:10.1186/1471-213X-10-68.

- Metzger, M. B., V. A. Hristova, és A. M. Weissman. 2012. „HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance”. *Journal of Cell Science* 125 (3): 531–37. doi:10.1242/jcs.091777.
- Min-gang Li, Madeline Serr, Eric A. Newman, and Thomas S. Hays. 2004. „The Drosophila tctex-1 Light Chain Is Dispensable for Essential Cytoplasmic Dynein Functions but Is Required during Spermatid Differentiation”. *Molecular biology of the cell* 15. doi:10.1091/mbc.E04-01-0013.
- Moberg, K H, D W Bell, D C Wahrer, D A Haber, és I K Hariharan. 2001. „Archipelago regulates Cyclin E levels in Drosophila and is mutated in human cancer cell lines.” *Nature* 413 (September): 311–16. doi:10.1038/35095068.
- Moberg, Kenneth H., Daohne W. Bell, Doke C. R. Wahrer, Daniel A. Haber, és Iswar K. Hariharan. 2001. „Archipelago regulates Cyclin E levels in Drosophila and is mutated in human cancer cell lines.” *Nature* 413 (September): 311–16. doi:10.1038/35095068.
- Moberg, Kenneth H, Ashim Mukherjee, Alexey Veraksa, Spyros Artavanis-tsakonas, Iswar K Hariharan, és Michael Street. 2004. „The Drosophila F Box Protein Archipelago Regulates dMyc Protein Levels In Vivo” 14: 965–74. doi:10.1016/j.
- Moreadith, Randall W, és Albert L Lehninger. 1984. „The Pathways of Glutamate and Glutamine Oxidation by Tumor Cell Mitochondria”. *The Journal of biological chemistry* 259: 6215–21.
- Morris, Ceri a, Elizabeth Benson, és Helen White-Cooper. 2009. „Determination of gene expression patterns using in situ hybridization to Drosophila testes.” *Nature protocols* 4 (12). Nature Publishing Group: 1807–19. doi:10.1038/nprot.2009.192.
- Mortimer, Nathan T, és Kenneth H Moberg. 2007. „The Drosophila F-box protein Archipelago controls levels of the Trachealess transcription factor in the embryonic tracheal system.” *Developmental biology* 312 (2): 560–71. doi:10.1016/j.ydbio.2007.10.002.
- . 2013. „The archipelago ubiquitin ligase subunit acts in target tissue to restrict tracheal terminal cell branching and hypoxic-induced gene expression.” *PLoS genetics* 9 (2): e1003314. doi:10.1371/journal.pgen.1003314.
- Munro, Trent P., Sunjong Kwon, Bruce J. Schnapp, és Daniel St Johnston. 2006. „A repeated IMP-binding motif controls oskar mRNA translation and anchoring independently of Drosophila melanogaster IMP”. *Journal of Cell Biology* 172 (4): 577–88. doi:10.1083/jcb.200510044.
- Murphy, Terence D. 2003. „Drosophila skpA, a component of SCF ubiquitin ligases, regulates centrosome duplication independently of cyclin E accumulation.” *Journal of cell science* 116 (Pt 11): 2321–32. doi:10.1242/jcs.00463.
- Newsholme, P., M. M R Lima, J. Procopio, T. C. Pithon-Curi, S. Q. Doi, R. B. Bazotte, és R. Curi. 2003. „Glutamine and glutamate as vital metabolites”. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 36 (2): 153–63. doi:10.1590/S0100-879X2003000200002.
- Nicholson, Sarah C, M Melissa Gilbert, Brandon N Nicolay, Maxim V Frolov, és Kenneth H Moberg. 2009. „The archipelago tumor suppressor gene limits rb/e2f-regulated apoptosis in developing Drosophila tissues.” *Current biology : CB* 19 (18). Elsevier Ltd: 1503–10. doi:10.1016/j.cub.2009.07.068.
- Nicholson, Sarah C, Brandon N Nicolay, Maxim V Frolov, és Kenneth H Moberg. 2011. „Notch-dependent expression of the archipelago ubiquitin ligase subunit in the Drosophila eye.” *Development (Cambridge, England)* 138 (2): 251–60. doi:10.1242/dev.054429.
- Noguchi, Tatsuhiko, Michiko Koizumi, és Shigeo Hayashi. 2011. „Sustained elongation of sperm tail promoted by local remodeling of giant mitochondria in Drosophila.” *Current biology : CB* 21 (10). Elsevier Ltd: 805–14. doi:10.1016/j.cub.2011.04.016.
- Papadopoulou, Depy, és Christos Louis. 1999. „Gene of Drosophila Melanogaster : Molecular Analysis and Expression” 14 (3): 125–43.

- Parks, Annette L, Kevin R Cook, Marcia Belvin, Nicholas a Dompe, Robert Fawcett, Kari Huppert, Lory R Tan, és mtsai. 2004. „Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome.” *Nature genetics* 36 (3): 288–92. doi:10.1038/ng1312.
- Parlo, R. A., és P. S. Coleman. 1984. „Enhanced rate of citrate export from cholesterol-rich hepatoma mitochondria. The truncated Krebs cycle and other metabolic ramifications of mitochondrial membrane cholesterol”. *Journal of Biological Chemistry* 259 (16): 9997–10003.
- Peel, Nina, Michael Dougherty, Jacqueline Goeres, Yan Liu, és Kevin F O’Connell. 2012. „The *C. elegans* F-box proteins LIN-23 and SEL-10 antagonize centrosome duplication by regulating ZYG-1 levels.” *Journal of cell science* 125 (Pt 15): 3535–44. doi:10.1242/jcs.097105.
- Peterson, Peter E., és Thomas J. Smith. 1999. „The structure of bovine glutamate dehydrogenase provides insights into the mechanism of allostery”. *Structure* 7 (7): 769–82. doi:10.1016/S0969-2126(99)80101-4.
- Phelps, C B, és A H Brand. 1998. „Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system.” *Methods (San Diego, Calif.)* 14 (4): 367–79. doi:10.1006/meth.1998.0592.
- Pitnick, S, T A Markow, és G S Spicer. 1995. „Delayed male maturity is a cost of producing large sperm in *Drosophila*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (23): 10614–18. doi:10.1073/pnas.92.23.10614.
- Plaitakis, Andreas, Maria Metaxari, és P. Shashidharan. 2000. „Nerve tissue-specific (GLUD2) and housekeeping (GLUD1) human glutamate dehydrogenases are regulated by distinct allosteric mechanisms: Implications for biologic function”. *Journal of Neurochemistry* 75 (5): 1862–69. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0751862.x.
- Ponyeam, Wanpen, és Thilo Hagen. 2012. „Characterization of the Cullin7 E3 ubiquitin ligase - Heterodimerization of cullin substrate receptors as a novel mechanism to regulate cullin E3 ligase activity”. *Cellular Signalling* 24 (1). Elsevier Inc.: 290–95. doi:10.1016/j.cellsig.2011.08.020.
- Poole, Angela C, Ruth E Thomas, Laurie A Andrews, Heidi M McBride, Alexander J Whitworth, és Leo J Pallanck. 2008. „The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (5): 1638–43. doi:10.1073/pnas.0709336105.
- Port, Fillip, Hui-Min Chen, Tzumin Lee, és Simon L Bullock. 2014. „Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in *Drosophila*”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (29): E2967-2976. doi:10.1073/pnas.1405500111.
- Raja, Sunil Jayaramaiah, és Renate Renkawitz-pohl. 2005. „Replacement by *Drosophila melanogaster* Protamines and Mst77F of Histones during Chromatin Condensation in Late Spermatids and Role of Sesame in the Removal of These Proteins from the Male Pronucleus +” 25 (14): 6165–77. doi:10.1128/MCB.25.14.6165.
- Ranz, M, Cristian I Castillo-Davis, Colin D Meiklejohn, és Daniel L Hartl. 2003. „Sex-dependent gene expression and evolution of the *Drosophila* transcriptome”. *Science* 300 (June): 1742–45. doi:10.1126/science.1085881.
- Rathke, Christina, Willy M Baarends, Sunil Jayaramaiah-Raja, Marek Bartkuhn, Rainer Renkawitz, és Renate Renkawitz-Pohl. 2007. „Transition from a nucleosome-based to a protamine-based chromatin configuration during spermiogenesis in *Drosophila*.” *Journal of cell science* 120 (Pt 9): 1689–1700. doi:10.1242/jcs.004663.
- Reers, M, T W Smith, és L B Chen. 1991. „J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential.” *Biochemistry* 30 (18): 4480–86. doi:10.1021/bi00232a015.
- Robertson, H M, C R Preston, R W Phillis, D M Johnsonschlitz, W K Benz, és W R Engels. 1988. „A Stable Genomic Source of P-Element Transposase in *Drosophila-Melanogaster*”. *Genetics* 118 (3): 461–70. <Go to ISI>://A1988M440400009.

- Ryder, Edward, Fiona Blows, Michael Ashburner, Rosa Bautista-Llacer, Darin Coulson, Jenny Drummond, Jane Webster, és mtsai. 2004. „The DrosDel collection: A set of P-element insertions for generating custom chromosomal aberrations in *Drosophila melanogaster*”. *Genetics* 167 (2): 797–813. doi:10.1534/genetics.104.026658.
- Santel, a, N Blümer, M Kämpfer, és R Renkawitz-Pohl. 1998. „Flagellar mitochondrial association of the male-specific Don Juan protein in *Drosophila* spermatozoa.” *Journal of cell science* 111 (Pt 2 (november): 3299–3309. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9788872>.
- Santel, Ansgar, Thomas Winhauer, Nicole Blümer, és Renate Renkawitz-Pohl. 1997. „The *Drosophila* don juan (dj) gene encodes a novel sperm specific protein component characterized by an unusual domain of a repetitive amino acid motif”. *Mechanisms of Development* 64 (1–2): 19–30. doi:10.1016/S0925-4773(97)00031-2.
- Shim, Myoung Sup, Jin Young Kim, Hee Kyoung Jung, Kwang Hee Lee, Xue Ming Xu, Bradley a. Carlson, Ki Woo Kim, Ick Young Kim, Dolph L. Hatfield, és Byeong Jae Lee. 2009. „Elevation of glutamine level by selenophosphate synthetase 1 knockdown induces megamitochondrial formation in *Drosophila* cells”. *Journal of Biological Chemistry* 284 (47): 32881–94. doi:10.1074/jbc.M109.026492.
- Shim, Myoung Sup, Jin Young Kim, Kwang Hee Lee, Hee Kyoung Jung, Bradley a. Carlson, Xue Ming Xu, Dolph L. Hatfield, és Byeong Jae Lee. 2011. „L201810 Is a Novel Type of Glutamate Transporter That Is Responsible for Megamitochondrial Formation”. *Biochemical Journal* 439 (2): 277–86. doi:10.1042/BJ20110582.
- Shmihel, Halyna. 2015. „Alpha-Ketoglutarate Partially Protects Fruit Fly *Drosophila Melanogaster* From Ethanol Toxicity”. *Journal of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University* 2 (1). doi:10.15330/jpnu.2.1.115-121.
- Smith, Emil L. 1978. „The Evolution of Glutamate Dehydrogenases and a Hypothesis for the Insertion or Deletion of Multiple Residues in the Interior of Polypeptide Chains”. *Proceedings of the American Philosophical Society* 123 (1): 73–84. <http://www.jstor.org/stable/986471>.
- Smith, T J, P E Peterson, T Schmidt, J Fang, és C a Stanley. 2001. „Structures of bovine glutamate dehydrogenase complexes elucidate the mechanism of purine regulation.” *Journal of molecular biology* 307 (2): 707–20. doi:10.1006/jmbi.2001.4499.
- Spanaki, Cleanthe, és Andreas Plaitakis. 2012. „The role of glutamate dehydrogenase in mammalian ammonia metabolism”. *Neurotoxicity Research* 21 (1): 117–27. doi:10.1007/s12640-011-9285-4.
- Sundqvist, Anders, Maria T. Bengoechea-Alonso, Xin Ye, Vasyl Lukiyanchuk, Jianping Jin, J. Wade Harper, és Johan Ericsson. 2005. „Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCFF^{bw7}”. *Cell Metabolism* 1 (6): 379–91. doi:10.1016/j.cmet.2005.04.010.
- Sved, J. A., W. B. Eggleston, és W. R. Engels. 1990. „Germ-line and somatic recombination induced by in vitro modified P elements in *Drosophila melanogaster*”. *Genetics* 124 (2): 331–37.
- Teixeira, Leonardo K, és Steven I Reed. 2013. „Ubiquitin ligases and cell cycle control.” *Annual review of biochemistry* 82 (March): 387–414. doi:10.1146/annurev-biochem-060410-105307.
- Texada, Michael J, Rebecca a Simonette, Cassidy B Johnson, William J Deery, és Kathleen M Beckingham. 2008. „Yuri gagarin is required for actin, tubulin and basal body functions in *Drosophila* spermatogenesis.” *Journal of cell science* 121 (Pt 11): 1926–36. doi:10.1242/jcs.026559.
- Tiwari, Anand K., Pragnya Panda, és Jogeswar S. Purohit. 2014. „Evaluation of sub-cellular distribution of glutamate dehydrogenase (GDH) in *Drosophila melanogaster* larvae”. *Acta Histochemica* 116 (2). Elsevier GmbH.: 297–303. doi:10.1016/j.acthis.2013.08.007.
- Tokuyasu, K. T. 1974. „DYNAMICS OF SPERMIOGENESIS IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* III . Relation between

- Axoneme and Mitochondrial Derivatives During spermiogenesis of many insects, the 'onion' nebenkern of a basically common morphology is transformed into one or two mitochondria" 84: 239–50.
- . 1975. „Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. VI. Significance of »onion« nebenkern formation". *Journal of Ultrastructure Research* 53 (1): 93–112. doi:10.1016/S0022-5320(75)80089-X.
- Toledano, Hila, Cecilia D'Alterio, Benjamin Czech, Erel Levine, és D Leanne Jones. 2012. „The let-7-Imp axis regulates ageing of the *Drosophila* testis stem-cell niche." *Nature* 485 (7400). Nature Publishing Group: 605–10. doi:10.1038/nature11061.
- Tripoli, G, D D'Elia, P Barsanti, és C Caggese. 2005. „Comparison of the oxidative phosphorylation (OXPHOS) nuclear genes in the genomes of *Drosophila melanogaster*, *Drosophila pseudoobscura* and *Anopheles gambiae*". *Genome Biol* 6 (2): R11. doi:gb-2005-6-2-r11 [pii]\r10.1186/gb-2005-6-2-r11.
- Varki, Ajit. 2004. „How to make an ape brain." *Nature genetics* 36 (10): 1034–36. doi:10.1038/ng1004-1034.
- Vibrantovski, Maria D, Hedibert F Lopes, Timothy L Karr, és Manyuan Long. 2009. „Stage-specific expression profiling of *Drosophila* spermatogenesis suggests that meiotic sex chromosome inactivation drives genomic relocation of testis-expressed genes." *PLoS genetics* 5 (11): e1000731. doi:10.1371/journal.pgen.1000731.
- Wasbrough, Elizabeth R, Steve Dorus, Svenja Hester, Julie Howard-Murkin, Kathryn Lilley, Elaine Wilkin, Ashoka Polpitiya, Konstantinos Petritis, és Timothy L Karr. 2010. „The *Drosophila melanogaster* sperm proteome-II (DmSP-II)." *Journal of proteomics* 73 (11). Elsevier B.V.: 2171–85. doi:10.1016/j.jprot.2010.09.002.
- Welcker, Markus, Elizabeth a. Larimore, Jherek Swanger, Maria T. Bengoechea-Alonso, Jonathan E. Grim, Johan Ericsson, Ning Zheng, és Bruce E. Clurman. 2013. „Fbw7 dimerization determines the specificity and robustness of substrate degradation". *Genes and Development* 27 (23): 2531–36. doi:10.1101/gad.229195.113.
- Wilson, Kathleen L, Karen R Fitch, Blaine T Bafus, és Barbara T Wakimoto. 2006. „Sperm plasma membrane breakdown during *Drosophila* fertilization requires sneaky, an acrosomal membrane protein." *Development (Cambridge, England)* 133 (24): 4871–79. doi:10.1242/dev.02671.
- Wong, Raymond, Irene Hadjiyanni, Ho Chun Wei, Gordon Polevoy, Rachel McBride, Kai Ping Sem, és Julie A. Brill. 2005. „PIP2 hydrolysis and calcium release are required for cytokinesis in *Drosophila* spermatocytes". *Current Biology* 15 (15): 1401–6. doi:10.1016/j.cub.2005.06.060.
- Young, V R, és a M Ajami. 2000. „Glutamate: an amino acid of particular distinction." *The Journal of nutrition* 130 (4S Suppl): 892S–900S.
- Zaganas, Ioannis V., Konstantinos Kanavouras, Nikolas Borompokas, Giovanna Arianoglou, Christina Dimovasili, Helen Latsoudis, Metaxia Vlassi, és Vasileios Mastorodemos. 2014. „The odyssey of a young gene: Structure-function studies in human glutamate dehydrogenases reveal evolutionary-acquired complex allosteric regulation mechanisms". *Neurochemical Research* 39 (3): 471–86. doi:10.1007/s11064-014-1251-0.
- Zhong, Lei, és John M Belote. 2007. „The testis-specific proteasome subunit Prosalpha6T of *D. melanogaster* is required for individualization and nuclear maturation during spermatogenesis." *Development (Cambridge, England)* 134 (19): 3517–25. doi:10.1242/dev.004770.

8. Összefoglaló

A *Drosophila melanogaster* nagyfokú genetikai konzerváltságának és a rendelkezésre álló genetikai és molekuláris eszközrendszerek széles választékának köszönhetően egy kiváló modellszervezet a spermatogenezis vizsgálatára. A hímivarsejtek kialakításában szerepet játszó gének azonosítására a klasszikus genetikai módszerek jó lehetőséget biztosítanak. A transzpozon mutagenézis kísérletekben létrehozott, eddig nem jellemzett vonalak tesztelésével számos hímsteril mutáns vonal azonosítására került sor kutatócsoportunkban. Dolgozatomban első felében az így azonosított vonalak közül a *Mi{ET1}CG4434^{MB10362} (bb8^{ms})*-vel foglalkoztam. Kimutattuk, hogy a *bb8^{ms}* vonal homozigóta hím egyedei 100%-ban sterilek, míg a nőstények teljes mértékben fertilisek. Genetikai módszerekkel meggyőződünk róla, hogy a sterilitásért valóban a *bb8* génbe épült Minos MB10362 elem a felelős. Az MB10362 elem remobilizálása visszaállította a vad típusra jellemző fertilitást. A *bb8^{ms}* mutáns háttéren kifejeztetett vad típusú *bb8* transzgén menekítette a hímsteril fenotípust. Fehérje szekvencia homológia alapján a *bb8* gén a glutamát dehidrogenázokkal mutat nagyfokú hasonlóságot. *Drosophilában* ismert egy másik glutamát dehidrogenáz (Gdh) is. Fehérje szekvenciák alapján filogenetikai elemzést végeztünk, ami alapján megállapítottuk, hogy a *Drosophila Bb8* kisebb konzerváltságot mutat a modellszervezetekben megtalálható glutamát dehidrogenáz ortológokkal, mint a Gdh. Azt is kimutattuk, hogy a Bb8 fehérje ortológjai minden eddig szekvenált *Drosophila* fajban megtalálhatók, bár az aminosav sorrendjük kevésbé konzervált a Gdh-hoz viszonyítva. Ezek alapján feltételezzük, hogy a Bb8 és a Gdh szétválása a *Drosophila* félék törzsfajlásának korai szakaszában történhetett. A Bb8 fehérjét *in silico* szerkezeti vizsgálatnak is alávetettük. 1l1f humán GLUD1 szerkezeti modellje alapján illesztettük a Gdh-t és a Bb8-at. Azt tapasztaltuk, hogy az aminosav sorrendben megfigyelhető különbségek ellenére a fehérjék térszerkezeti modellje nagymértékben megegyezik, a különbségeket a szabályozásért és komplex képzésért felelős antenna régióban találtunk. A GLUD1 és GLUD2 humán glutamát dehidrogenázok vizsgálatánál meghatározták az enzimek nukleotid (ADP, GTP) kötésért felelős, az allosztérikus szabályozásában kiemelt aminosavak pontos helyzetét. Ezek az aminosavak nagymértékű konzerváltságot mutatnak a GLUD1 és Gdh között, azonban kimutattuk, hogy a Bb8 fehérjében a GTP kötésért felelős aminosavak jelentős része nincs jelen, és az ADP kötésért felelős aminosavak 54%-os konzerváltságot mutatnak. Ezek alapján kijelenthetjük, hogy a Bb8 fehérje egy olyan glutamát dehidrogenáz, aminek szabályozása jelentősen eltér a Gdh-tól.

Génexpressziós vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a *Gdh*-nak általános, ezzel szemben a *bb8* génnek tesztisz specifikus az expressziója. A *bb8* mRNS a 8 sejtes cisztákban volt először kimutatható, majd felhalmozódását figyeltük meg a meiotikus és korai posztmeiotikus stádiumokban. *bb8^{N100as}-GFP* riporter transzgén expresszáltatásával megállapítottuk, hogy a Bb8 fehérje már a 8 sejtes cisztákban jelen van, és megfigyelhető a meiotikus és a megnyúló cisztákban is. A *bb8-GFP* és a *bb8^{N100as}-GFP* riporter transzgén kifejeztetése feltárta, hogy a Bb8 fehérje a mitokondriumhoz lokalizálódik. Megállapítottuk, hogy a *bb8^{ms}* mutánsban az individualizációs komplexek kialakulása hibás, az aktin kúpok száma és vándorlása eltér a vad típustól. A *bb8^{ms}* mutánsban az individualizáció nem zajlik le, érett spermiumok nem képződnek. Megállapítottuk, hogy a *bb8* géntermék kiesése a *bb8^{ms}* mutáns herékben mitokondriális rendellenességekhez vezet. Azt tapasztaltuk, hogy a *bb8^{ms}* mutáns herékben a mitokondrium származékok identitása sérült, a parakrisztallin hibásan mindkét mitokondrium származékban felhalmozódik és megamitokondriumok keletkeznek. A megamitokondriumok alaposabb vizsgálatával arra a következtetésre jutottunk, hogy a méretük ellenére nem veszítik el teljesen a membránpotenciáljukat. Úgy véljük, hogy a mitokondriális rendellenességek vezetnek a *bb8^{ms}* mutánsban a ciszták megnyúlásának hibájához és a későbbi individualizációs rendellenességekhez.

Összességében elmondhatjuk, hogy a Bb8 fehérje feltétlenül szükséges a hímivarsejtek poszt meiotikus fejlődéséhez, a mitokondrium származékok identitásának kialakításához és a parakrisztallin kialakításához.

Dolgozatom második felében az archipelago (*ago*) gén jellemzésével foglalkoztam. Az *ago* egy E3-enzimkomplex F-box alegységét kódolja. Megállapítottuk, hogy a gén 5' nem transzlálódó intronikus régiójába épült P{RS5}*ago*^{5-HA-2760} elem (*ago^{ms}*) a homozigóta állatok szemiletalítását és az imágók sterilitását okozza. Genetikai módszerekkel igazoltuk, hogy ezt a fenotípust a 5-HA-2670 elem beépülése okozza. Az *ago^{ms}/Df(3L)BSC370* és *ago^{ms}/Df(3L)GN50* hemizigóta muslicák is szemiletalíusak, és sterilek. Az *ago*¹ és *ago*³ EMS allélok az *ago^{ms}* alléllal transzheterozigóta formában letálisak. A P{RS5}*ago*^{HA-5-2760} elem transzpozázzal történő remobilizálását elvégeztük, és a revertánsok fertilisnek bizonyultak. A mutáns háttéren kifejeztetett mCherry-*ago* transzgén pedig részlegesen menekítette a fenotípust.

Munkánk során qRT-PCR-al megállapítottuk, hogy az *ago^{ms}* egy hipomorf allél. Az archipelago génről három transzkript keletkezik. Transzkript specifikus qRT-PCR-al azt tapasztaltuk, hogy az *ago*-RA transzkript szintje kevésbé csökken, mint az *ago*-RB vagy *ago*-RC transzkriptek

szintje. Ebből arra következtettünk, hogy az ago-RB és az ago-RC transzkriptek mennyisége a meghatározó a normális spermatogenezisben.

Meghatároztuk az mCherry-ago transzgén szubcelluláris lokalizációját a spermatogenezis során, és azt tapasztaltuk, hogy a primer spermatocitákban az mCherry-ago a sejtmagokban figyelhető meg. A meiózt követően azonban citoszolikus felhalmozódást mutatott, a megnyúló ciszták farki végén tapasztaltunk grádiens szerűen erősödő mCherry-Ago jelet, ami a poliglicilált axonémával rendelkező megnyúlt cisztákban már nem volt jellemző. Az individualizáció során az mCherry-Ago a cisztikus hólyagokban az aktin kúpok bazális végén mutatott erősebb felhalmozódást, hasonlóan a Ntc és Cul1 fehérjékhez. Az mCherry-Ago jel megfigyelhető volt a késői cisztikus hólyagban és „waste bage” –ben is.

Az *ago^{ms}* vizsgálata során megállapítottuk, hogy a spermatogenezis korai szakaszai szabályosan végbemennek. Az *ago^{ms}* mutáns herékben megfigyeltük a megnyúlt cisztákat, azonban érett spermiumokat nem. Megfigyeltük, hogy a hiszton-protamin átmenet lezajlik, az axonémák is normálisan kialakulnak az *ago^{ms}* mutánsban. Kimutattuk, hogy az *ago^{ms}* mutánsban az individualizáció folyamata hibás, az individualizációs komplex szétcsúszik és az aktin kúpok mérete nem egységes. Azt tapasztaltuk, hogy az *ago^{ms}* mutánsban aktiválódik a nem apoptotikus kaspáz kaskád, ami a ciszták teljes hosszában megfigyelhető. Az individualizáció hiányában a ciszták elpusztulnak, amelyet TUNEL festéssel, valamint elektronmikroszkópos vizsgálatokkal is megerősítettünk.

Az E3-ubikvitin ligázoknál előfordul, hogy több F-boksz fehérje együttesen szabályoz bizonyos funkciókat. Azonban az Ago fehérje és az individualizációban leírt E3-ligázok között nem sikerült kimutatnunk hasonló interakciót. A Klhl10/Cul3/Roc1b komplexet gátló Soti fehérje és a dBruce apoptózis inhibitor fehérje vad típusú lokalizációt mutatott az *ago^{ms}* mutánsban. A *ntc* és *ago* mutáns allélok vizsgálatával nem tapasztaltunk szinergisztikus hatásra utaló fenotípust.

Az Ago fehérje lehetséges interakciós partnereit is vizsgáltuk. Az egyik az Imp RNS kötő fehérje, ami az mCherry-Ago jellel átfedő mintázatot mutat a megnyúlt cisztákban. Az *ago^{ms}* mutáns cisztákban az Imp eloszlása eltér a vad típustól. Az Imp fehérje szerepét csak a spermatogenezis korai szakaszában írták le. Az Imp RNS kötő fehérje késői szerepe nem ismert, viszont a megnyúlt cisztákban lokalizációja átfed a felhalmozódó cup és comet gének mRNS-eivel. Az Ago és az Imp fehérjék közötti közvetlen kapcsolat felderítése későbbi terveink között szerepel.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy az Ago F-boksz fehérjének szerepe van a spermatogenezis során, a megnyúlt ciszták egyedivé válásában. Megállapítottuk, hogy az Ago fehérje az eddig azonosított lebontó útvonalak ismert elemeitől függetlenül fejti ki a hatását. Megállapítottuk, hogy a nem apoptotikus kaszpáz útvonal aktiválódik, de a cisztikus hólyag kialakulása és az individualizációs komplex vándorlása nem történik meg, melynek a spermatogenezis leállása az eredménye.

Az általunk vizsgált *bb8* és *ago* gének vizsgálata arra világított rá, hogy mind az alapvető metabolikus enzimek, mind az általánosan ismert lebontó folyamatok speciális funkcióval rendelkezhetnek az ivarsejtfejlődés poszt-meiotikus szakaszában. A sejtorganellek speciális szerkezetet és eloszlást vesznek fel a megnyúlás során és a sejtek citoplazmája is jelentősen degradálódik. A dolgozatban jellemzett mitokondriális Bb8 fehérje a mitokondrium identitás meghatározásához nélkülözhetetlen, míg az Ago fehérje a cisztikus hólyagban történő lebontó folyamatokban vesz részt.

9. Summary

Drosophila melanogaster is an ideal model organism to study spermatogenesis, as the process of it is similar to higher organisms and there is a high degree of genetic conservation between *Drosophila* and mammals. A wide range of genetic and molecular biological methods could be applied in *Drosophila*, which made this model organism a favorable choice to developmental biologists for many years.

We did an *in silico* screening of the publicly available transposon insertion lines and identified several male sterile lines. Characterization of the affected genes allow us to understand better the difficult process of spermatogenesis, especially regulation of post-meiotic spermatid elongation and individualization.

The first part of my work is about the characterization of the *bb8* gene, which is a putative glutamate dehydrogenase. We identified and characterized the *Mi{ET1}CG4434^{MB10362} (bb8^{ms})* transposon insertion line with male sterile phenotype. The *bb8^{ms}* homozygous males are 100% sterile, but females are fertile. We verified that the sterility is caused by the Minos MB10362 element insertion with genetic methods. The *bb8^{ms} / Df (3R) BSC619* and *bb8^{ms} / Df (3R) Exel9012* hemizygous flies showed the same male sterile phenotype as the homozygous *bb8^{ms}*. The precise excision of the MB10362 Minos element reverted the fertility back to wild type. The expression of the wild type copy of the genomic region of *bb8* (*bb8^{gr}*) rescued the male sterile phenotype of homozygous *bb8^{ms}*.

Due to the Minos element insertion expression of the *bb8* gene is reduced approximately 80%. Based on protein sequence homology Bb8 is a glutamate dehydrogenase and it is exclusively expressed in testis. In *Drosophila*, there is also a ubiquitously expressed glutamate dehydrogenase, Gdh. We performed phylogenetic analyses of known glutamate dehydrogenases and we determined that the Gdh shows higher similarity to the glutamate dehydrogenases of classical model organisms than Bb8. Phylogenetic analysis of the glutamate dehydrogenase orthologues from sequenced *Drosophila* species showed that Gdh and Bb8 is present in all of the tested species. Gdh-s are highly conserved, but Bb8 paralogs are more diverse. We assume that the divergence of Gdh and Bb8 could happen in an early stage of the *Drosophilidae* evolution. We performed an *in silico* analysis of the *Drosophila* glutamate dehydrogenases, using the human Gdh (protein database id: 1l1f) 3D model to determine the structure of Gdh and Bb8. In both cases the alignment was highly similar. The differences that we noticed mainly affect the regulatory antenna region. The exact position of

allosteric regulation sites of the human GLUD1 and GLUD2 enzymes was determined. We used sequence alignment to identify the amino acids of the GTP and ADP binding pockets. We found that, the Bb8 binding pockets are less conserved, and the GTP binding pocket only have 28% similarity with the human GLUD1. We concluded that the regulation of the Bb8 protein might be different from the Gdh and GLUD proteins.

We performed gene expression analyses on *bb8* gene and concluded that *bb8* expression is started in 8 cell cysts using *in situ* hybridization and by the expression pattern of *bb8^{N100as}-GFP* reporter transgene. The *bb8* mRNA accumulates also in the round and early elongating spermatids, which was confirmed by stage specific qRT-PCR.

The transgenic Bb8-GFP and *bb8^{N100as}-GFP* reporter expression revealed the mitochondrial localization of Bb8 protein.

The loss of *bb8* in mutant testes leads to post-meiotic mitochondrial disorders. The post-meiotic Dj-GFP mitochondrial localization is damaged and we observed megamitochondria formation in the *bb8^{ms}* mutant. The diameter of the megamitochondria is in a range between 5-10 μm with an average of 8 μm . We examined the membrane potential of the megamitochondria in *bb8^{ms}* mutant and found activity in them. Ultrastructural analysis of the elongated *bb8^{ms}* cysts revealed that the two mitochondrial derivatives are formed, however the accumulation and the structure of the paracrystalline material are abnormal and both of the derivatives start to accumulate it.

We believe that the mitochondrial malformation in *bb8^{ms}* mutant leads to the failure of cyst elongation and subsequently to individualization disorders. We found that the formation and movement of investment cones are damaged and there are no individualized cysts, therefore no mature sperms are developed in the *bb8^{ms}* mutants.

Overall, the Bb8 glutamate dehydrogenase is required for the post-meiotic development of the sperm mitochondria. Bb8 is required for the normal formation of mitochondrial derivatives and paracrystalline accumulation in the larger one.

In the second half of my thesis I characterize the role of *archipelago (ago)* in spermatogenesis. *ago* gene encodes an F-box subunit of an E3 ubiquitin ligase enzyme complex.

We found that the *P{RS5}ago^{5-HA-2760} (ago^{ms})* element inserted in the 5' untranslated intronic region of *ago*, causing semilethality and sterility of the homozygous flies. With genetic methods we confirmed that the incorporation of the 5-HA2760 element responsible for the observed phenotype. The *ago^{ms}/Df(3L)BSC370* and *ago^{ms}/Df(3L)GN50* hemizygotes are

semilethal and sterile. We remobilized the *P{RS5}ago^{5-HA-2760}* element and we found wild type fertility in the revertants. We established a transgenic line expressing *mCherry-ago* and with this transgene the male sterile phenotype of the *ago^{ms}* mutant is partially restored to wild type.

We determined that the *ago^{ms}* is a strong hypomorphic allele and reduction of the *ago-RB* and *ago-RC* transcripts might be responsible for sterility.

Expression of *mCherry-ago* revealed the subcellular localization of Ago during spermatogenesis. We observed mCherry-Ago signal in the nuclei of the primary spermatocytes and after meiosis we detected a cytosolic accumulation of it in the caudal end of the late elongating cysts. Subsequently Ago signal accumulates in the cystic bulges near the basal end of the actin cones. This localization is very similar to the localization pattern of Cul1 and Ntc, two members of an E3 ligase complex, which is active during individualization of spermatids. After individualization Ago accumulation was observed in the waste bag.

The phenotypic characterization of *ago^{ms}* testes revealed that the early stages of spermatogenesis are normal, we observed elongated cysts, but there were no mature sperms in the seminal vesicles. The histone-protamine transition is completed in *ago^{ms}* mutant, however the nuclear bundles are disturbed and there are hypercondensed and dispersed nuclei in the *ago^{ms}* testes.

We found that the individualization process of the *ago^{ms}* mutant is defective, the individualization complexes are disturbed, the actin cones are scattered and their size are not uniform. The non-apoptotic caspase cascade is activated during individualization in the *ago^{ms}* mutant, and instead of concentrating around the investment cones it can be observed in the entire length of the cysts. We showed that in the lack of individualization the cysts are dying, and we observed the degradation of nuclear DNA with TUNEL staining and the disordered cysts with transmission electron microscopy.

There are several examples that different E3 ubiquitin ligases may act on the same biological processes. The two known E3 ligase complex regulators, Soti and dBruce distribution was normal in *ago^{ms}* mutant cysts. We tested and did not find synergistic effects with Ntc mutants, suggesting that there is no interaction between the E3 ligases during individualization.

We tested the potential interaction partners of Ago using the available data of high throughput protein-protein interaction screens. One of them is the RNA binding protein Imp. The role of Imp protein was described in early stages of spermatogenesis, and its localization

to the caudal end of the elongated cysts is known. We found that Imp-GFP colocalizes with mCherry-Ago signal in elongated spermatids. Moreover in *ago^{ms}* mutant testes the Imp-GFP signal shows dispersed distribution, suggesting that the Ago function could be necessary to restrict Imp to the caudal end of the elongated cysts.

Based on our results Ago protein is essential in the individualization of spermatids probably via the regulation of protein degradation during investment cone migration.

10. Függelék

10.1 Felhasznált oligonukleotidok jegyzéke

Transzgének előállításához felhasznált primerek:

AGO_FW_XhoI	5'-ACTGCGCTCGAGATGGAAAGAGGATGCCCAGCT-3'
AGO_Rev_XbaI	5'-ACTGCGTCTAGACTATGAGCACTTCACACATGCACC-3'
Bb8GFP_FW_MfeI	5'-ACTGCGCAATTGATGCTTCGTTATACGGCACG-3'
Bb8GFP_Rev_XhoI	5'-ACTGCGCTCGAGCTGTTGGGAAATCCGGAGC-3'
bb8_Resc_Rev_XbaI	5'-ACTGCGTCTAGAATGCCAATATAGGTTGTAAGTTG-3'
bb8_Resc_Fw_NotI	5'-ACTGCGGCGGCCGCGAGCGTTATTGTTTACCAAG-3'
bb8_Rep_Rev_XhoI	5'-ACTGCGCTCGAGGGGAAAATTAACCTCCACCGA-3'
GFP_Fw_XhoI	5'-ACTGCGCTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGG-3'
GFP_Rev_XbaI	5'-GCTCTAGACTATTGTACAGCTCGTCCATGCC-3'
mCh_FW_EcoRI	5'-ACTGCGGAATTCATGGTGAGCAAGGGCGA-3'
mCh_Rev_NotI	5'-ACTGCGGCGGCCGCTCTTGTACAGCTCGTCCAT-3'

P és Minos elem specifikus primerek:

Mi5R	5'-TTGCTCTTGAGATTAAGGTA-3'
FKMi12	5'-CGCCTTCTATGAAAGGTTGG-3'
Pry4	5'-CAATCATATCGCTGTCTCACTCA-3'
Plac1	5'-CACCCAAGGCTCTGCTCCCACAAT-3'
PWH_ntc_FW	5'-GCATGAATTAGTGTACGTTGTCT-3'
PWH_ntc_rev	5'-TTGAGTGACAAATCGCAGTA-3'

RT-qRT-PCR primerek

Ago qpcr rev	5'-TGACCAACCAAAGTGCGCAGGC-3'
Ago qpcr fw	5'-GTGTATTGTCATCGGAGCCGGAC-3'
Ago-U	5'-ATTCAAAAGTGGGTAATGCGTTCTC-3'
Ago-RA	5'-CAGTTTGCGCTTGTTGCGTG-3'
Ago-RB	5'-AACAAATTGTGCCCCGCTAAAGTGGG-3'
Ago-RC	5'-GTACAGAGTCATCTGAAAAACGC-3'
p49-Fw	5'-TCGTGAAGAAGCGCACCAAG-3'
rp49-Rev	5'-CTTGAAGCGGCGACGCAC-3'
sunz_QPCR_FW	5'-GTGTGTTCTTCAACGGAAGTCTG-3'
sunz_QPCR_Rev	5'-GTGAAGAATTGTTCAATGGCCAC-3'
CG3927_QPCR_FW	5'-GTCGGCCAAGAAAAGTAACGGAC-3'
CG3927_QPCR_Rev	5'-TACTTGGGAGCCCTATTCCTG-3'
CG10252_QPCR_FW	5'-GTCCCAATGCCTACAAGTACG-3'
CG10252_QPCR_Rev	5'-CCCGGAGAATTCGTCTTGTTTC-3'
GDH_QPCR_Rev	5'-CACGTTACCGAAGCCCTGGAC-3'
GDH_QPCR_FW	5'-GCCTGGAGAACTTCATCAACG-3'
bb8_QPCR_Rev	5'-CATGAATGCCCCGATAGTCAAC-3'
bb8_QPCR_FW	5'-GATATCCGCCTCTGTGGTGC-3'

Szekvenáló primerek

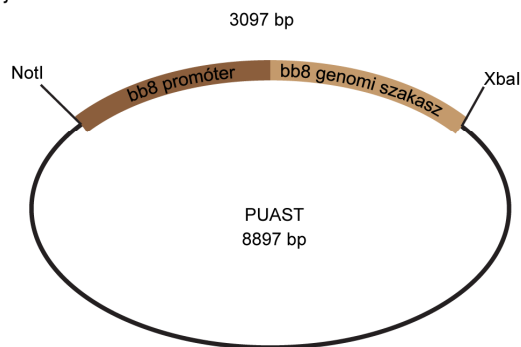
pJET1.2 FW Seq	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'
pJET1.2 Rev Seq	5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'
Ago_s_F1	5'-GAACCTGGCTTTGGGAAGATGT -3'
Ago_s_F2	5'-CAACAGGATCAGGAGGAGAATGT-3'
Ago_s_F3	5'-GATTTTGCATCTACGCCGCGCT-3'
Ago_s_F4	5'-ACACACTTCAGGGGCATACGT-3'
Ago_s_R1	5'-AGCAGACGTCCCTCGTTGAAC-3'

ISH primerek

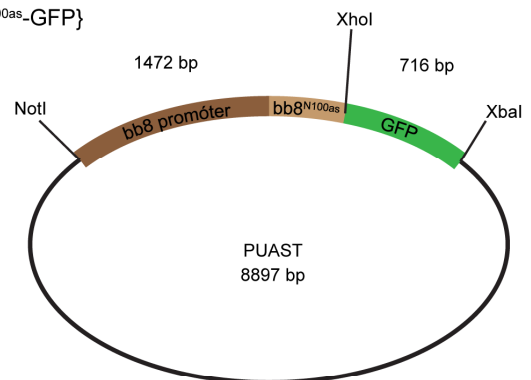
ISH_bb8_FW_T7	5'-GCAACGTAATACGACTCACTATAGGGTAGTGCAGGGATTGGCAATG-3'
ISH_bb8_Rev_Sp6	5'-GCAACGTAATACGACTCACTATAGGGCTGTGGTGCATTGTTGTATCCTC-3'

Transzgenikus konstruktok

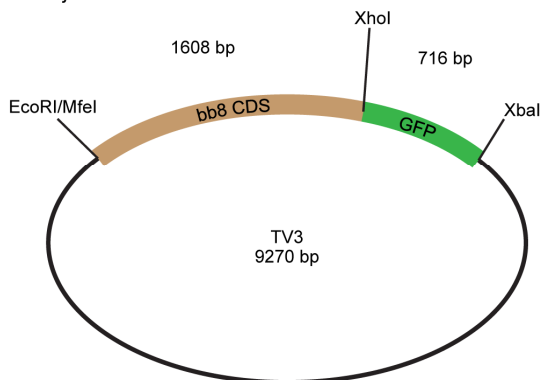
P{bb8^{gr}}



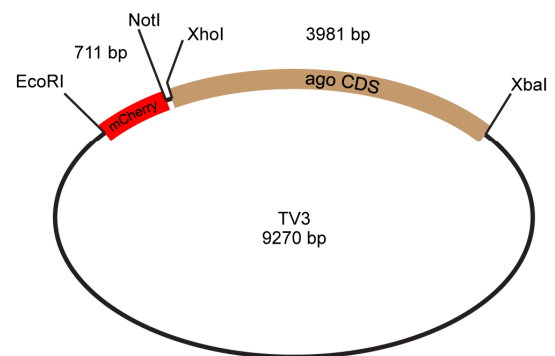
P{bb8^{N100as}-GFP}



P{bb8-GFP}



P{mCherry-ago}



10.2 Jelmagyarázat és keresztezési sémák:

Hím: ♂

Nőstény: ♀

Törzs: \$

Vizsgálni kívánt allélek*:

(A): dj-GFP, Prot-GFP, H2-GFP, PACT-GFP, Snky-GFP, mCh-Ago, Bb8-GFP, Bb8^{gr}, Bb8^{N100as}-GFP

(B): ntc^{f07259}, ago^{ms}, bb8^{ms}

A vizsgált allélhoz tartozó balanszer kromoszómák:

-második kromoszóma: SMX

-harmadik kromoszóma: TMX

Domináns markerek: Cy (Pörge szárny), Roi (durva szem, szabálytalan ommatidák), If (szabálytalan ommatidák), Tb (rövidebb utótest), Hu (számfeletti szőr a középtest anterio-dorzális végén), Sb (rövidebb szőrök), Ser (csipkézett szárny), Sco (scutellumon kevesebb szőr), Sp (középső lábnál számfeletti szőr)

Balanszer kromoszómák: FM7c (X), SM6 (2.Kr), CyO (2. Kr), TM3 (3. Kr), TM6b (3. Kr), TM6c (3. Kr), MKRS (3. Kr)

*a vizsgált törzsek fel vannak sorolva az anyag és módszer fejezetben

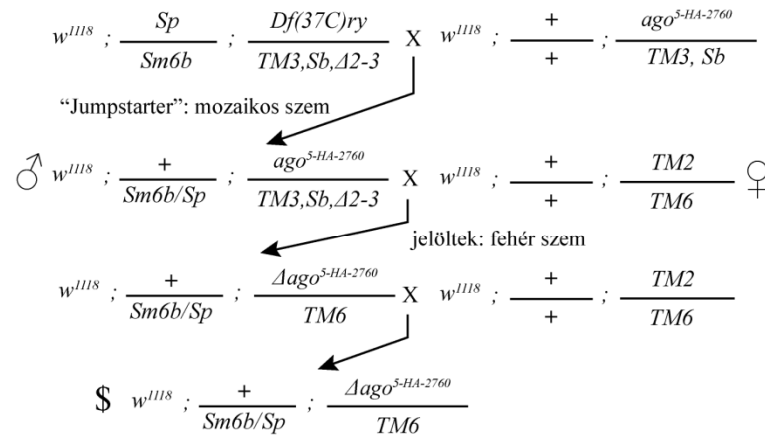
Fertilitási teszt

Homozigóta	Hemizigóta	Transzheterozigóta I	Transzheterozigóta II
$\frac{(A)}{TMX} \times \frac{(A)}{TMX}$	$\frac{(A)}{TMX} \times \frac{Df(A)}{TMX}$	$\frac{(A)}{TMX} \times \frac{(A')}{TMX}$	$\frac{(A)}{TMX} \times \frac{(B)}{TMX}$
$\begin{array}{c} \text{♂} \frac{(A)}{(A)} \times \text{WT} \text{♀} \\ \swarrow \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{♂} \frac{(A)}{Df(A)} \times \text{WT} \text{♀} \\ \swarrow \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{♂} \frac{(A)}{(A')} \times \text{WT} \text{♀} \\ \swarrow \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{♂} \frac{(A)}{(B)} \times \text{WT} \text{♀} \\ \swarrow \end{array}$

Egyedi hímek (n=15-50) keresztezve 3-4 db vad típusú szűz nősténnyel. A vizsgált allélok pontos genotípusa az anyag és módszerek fejezetben megtalálható

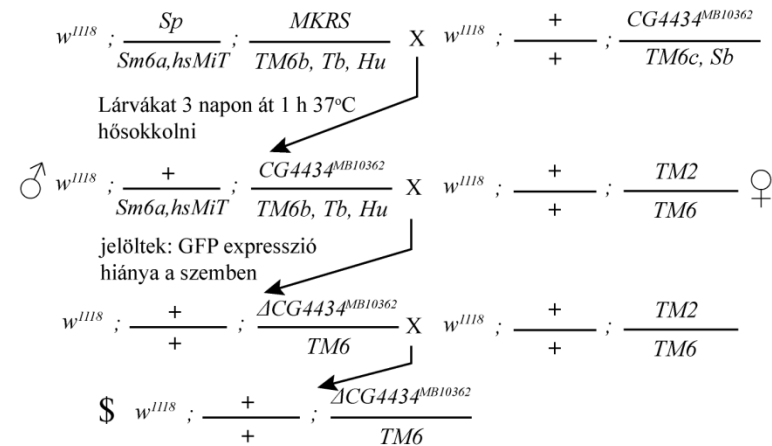
Transzpozon remobilizálás

P{RS5}ago^{5-HA-2760} elem remobilizálása



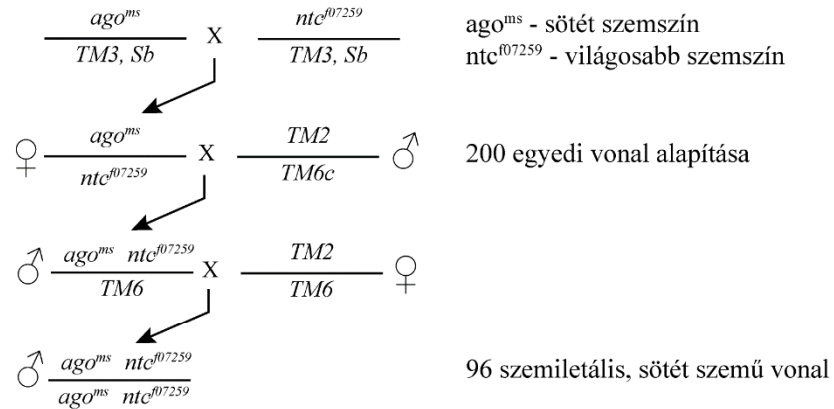
150 jumpstarter hímet használtunk jelölt vonalak alapításához. Az alapított $\Delta ago^{5-HA-2760}$ vonalak fertilitását és életképességét ellenőriztük. A remobilizálást molekulárisan PCR-ral és szekvenálással ellenőriztük. 8db precíz excíziót hordozó törzset izoláltunk.

Mi{ET1}CG4434^{MB10362} elem remobilizálása



100 hímet használtunk jelölt vonalak alapításához. Az alapított $\Delta CG4434^{MB10362}$ vonalak fertilitását és életképességét ellenőriztük. A remobilizálást molekulárisan PCR-ral és szekvenálással ellenőriztük. 8db precíz excíziót hordozó törzset izoláltunk.

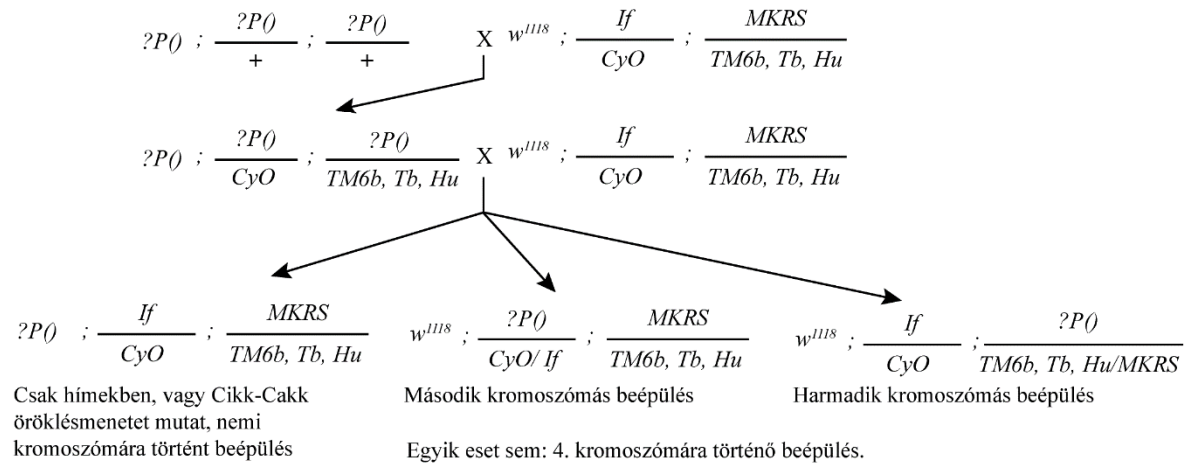
Rekombinások előállítása



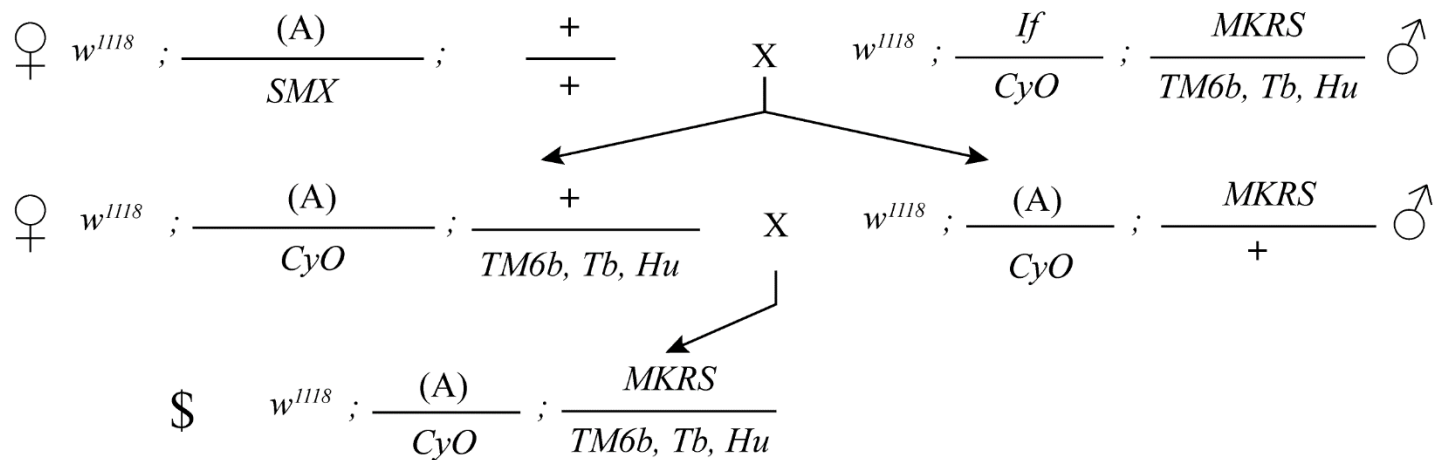
P-elemek ellenőrzése PCR reakciókkal: 3 db rekombináns

Transzformások vizsgálata

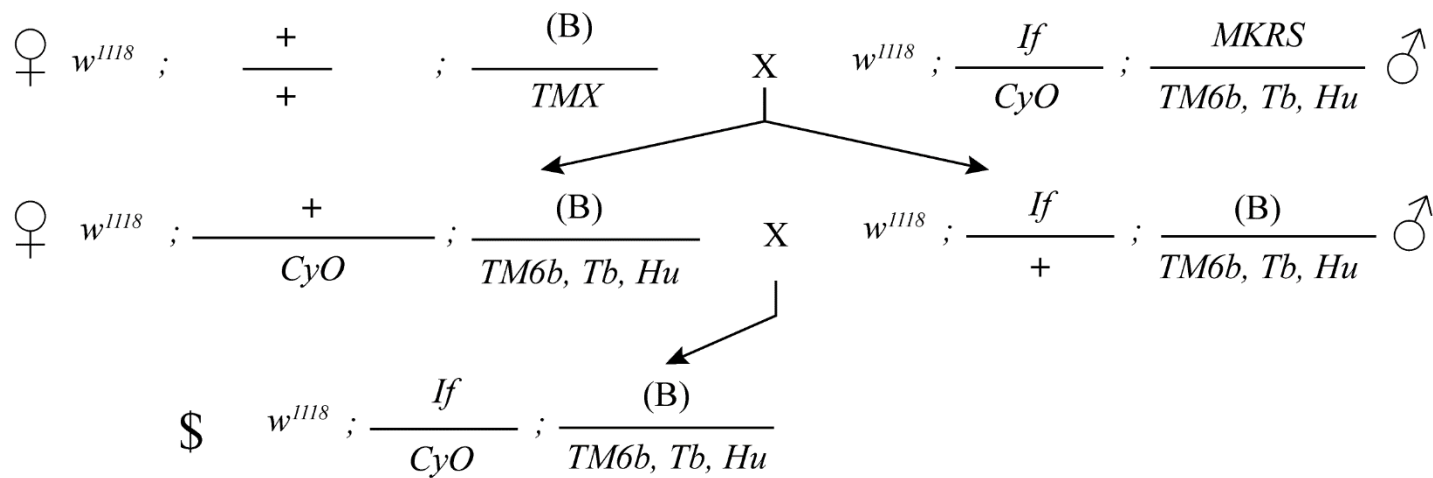
?P() - transzgén beépülés miniwhite markergénre szelektálható



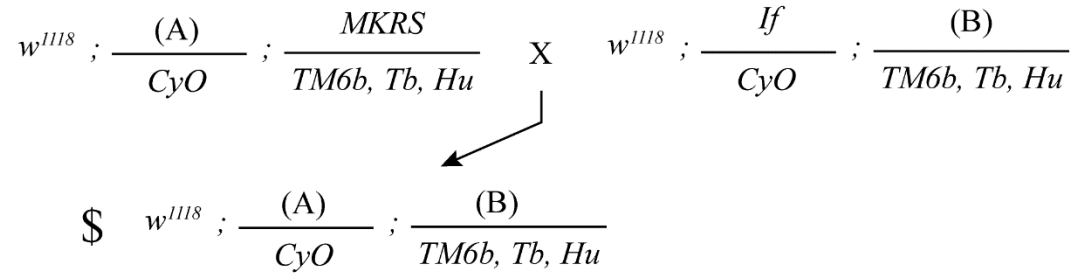
Második kromoszóma balanszírozása



Harmadik kromoszóma balanszírozása



Transzgének, mutáns háttéren történő expresszállása



Imp-GFP; ago^{ms} vonal létrehozása

