

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

Ph.D. értekezés tézisei

Vedelek Viktor

Témavezető: Dr. Sinka Rita

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és
Informatikai Kar

Genetikai Tanszék

Szeged

2016

A kutatás előzményeinek összefoglalása

A *Drosophila melanogaster* (ecetmuslica) genetikai modellszervezet jó lehetőséget nyújt fejlődésbiológiai folyamatok, azon belül is a spermatogenezis tanulmányozására. Feltekert, vakon végződő csőre emlékeztető heréiben a spermatogenezis minden szakasza egyszerre megfigyelhető. A *Drosophila* spermiuma ugyan harminckétszer hosszabb az ember spermiumához viszonyítva, viszont ugyanazokból a sejtalkotókból áll, szerkezete konzervált.

A *Drosophila* poszt-meiotikus fejlődése során a spermatidák megnyúlnak, a megnyúláshoz nélkülözhetetlen a fuzionált mitokondriumokból kialakuló két mitokondrium származék. A mitokondrium származékok végigfutnak a spermatidák farki részének teljes hosszában. A megnyúlás során differenciálódnak, kialakítják a nagy mitokondrium származékot, ami parakrisztallint halmoz fel, valamint a kis mitokondrium származékot.

A spermatidák szinkronizált fejlődését plazmahidak biztosítják, amik a spermiumok egyedivé válásáig megmaradnak. Az individualizáció folyamán a sejtmagok körül kialakul az individualizációs komplex, melynek aktinban gazdag kúp alakú struktúrái szinkronizált vándorlásuk során kiszorítják a feleslegessé vált sejtalkotókat és kialakítják a spermiumok egyedi sejtmembránjait. Az individualizáció folyamatában aktív lebontó folyamatok figyelhetőek meg; az ubikvitin proteaszóma rendszer több eleme szükséges az individualizációs komplex szabályos vándorlásához, valamint a nem apoptotikus kaszpáz kaszkád aktiválásához. A nem

apoptotikus kaszpáz kaszkád hiányában a spermatidák nem képesek egyedivé válni.

Az *ecetmuslica* egy genetikailag jól jellemzett modellszervezet, ahol a klasszikus és modern genetika és molekuláris biológia gazdag eszköztára áll rendelkezésünkre. A transzpozon inszerciós törzsgyűjtemények remek lehetőséget biztosítanak az ivarsejtfejlődésben szükséges gének azonosításához. Csoportunk több lépcsős szűréseken keresztül számos hím- és nőtényszeril allélt azonosított. Dolgozatomban az általunk kiszűrt *bb8* és *ago* génekkel és hímsteril mutáns alléljeikkel foglalkoztam.

Kutatásunknak célja volt, hogy meghatározzuk a *bb8* és az *ago* gének spermatogenezisben betöltött szerepét. Célul tűztük ki, hogy genetikai módszerekkel jellemezzük a *bb8* és *ago* gének eddig nem jellemzett hímsteril alléljeit. Célunk volt meghatározni, hogy a spermatogenezis mely stádiumai hibásak a mutáns legyekben, továbbá a mutáns fenotípusok menekítése és a *Bb8* és az *Ago* fehérjék szubcelluláris lokalizációjának meghatározása.

Alkalmazott módszerek

1. Klasszikus genetikai módszerek:
 - fertilitási tesztek
 - komplementációs tesztek
 - P és Minos transzpozon remobilizálás
 - mutáns allélok rekombinálása
 - transzgenikus törzsek előállítása, jellemzése és azok mutáns háttéren történő vizsgálata
2. Molekuláris biológiai és mikroszkópos módszerek:
 - genomiális és plazmid DNS izolálás
 - transzgének előállítása klasszikus klónozással
 - qRT-PCR
 - RNS izolálás és cDNS szintézis különböző *Drosophila* szövetekből
 - DIG jelölt RNS próba készítése
 - élő minták, sejtszervek *in vivo* festése tesztisz preparátumokon
 - immunfestés tesztisz preparátumon
 - RNS *in situ* hibridizáció tesztisz preparátumon
 - TUNEL jelölés tesztisz preparátumon
 - fázis kontraszt mikroszkópia
 - fluoreszcens mikroszkópia
 - konfokális mikroszkópia
 - elektronmikroszkópia (kooperációban)
3. Bioinformatika:
 - online adatbázisok és eszközök használata
 - primerek, próbák, klónozások tervezése

- képek elemzése (GIMP, ImageJ)
- többszörös szekvencia illesztés (Ugene, ClustalW)
- filogenetikai fa építése (Mega 6)
- 3D molekula modellek kezelése (Chimera, MODELLER)
- qRT-PCR adatok elemzése (Bio Rad CFX manager)
- statisztikai elemzések (R)

Elért eredmények és következtetések

A *bb8^{ms}* mutáns hímsteril allél azonosítása, Minos elem inszerciós törzsgyűjteményből történő szűrést követően.

A komplementációs analízis, revertálás és menekítési kísérletek segítségével bebizonyítottuk, hogy a hímsteril fenotípusért a *bb8* génbe épült Minos elem a felelős.

A *bb8^{ms}* mutáns tesztiszekben a *bb8* transzkript szintje körülbelül 80% csökkenést mutatott, aminek következtében 100% hímsterilitást tapasztaltunk.

Megállapítottuk, hogy a *bb8* gén egy glutamát dehidrogenázt kódol. *Drosophila*-ban két glutamát dehidrogenázt kódoló gén található a *Gdh* és a *bb8* (*CG4434*). Aminosav szekvencia elemzéseink és 3D molekula modellek alapján arra jutottunk, hogy nagy valószínűség szerint a Bb8 fehérje egy funkcionális glutamát dehidrogenáz, amelynek szabályozása eltérő lehet a Gdh enzimétől. A glutamát dehidrogenázokon végzett filogenetikai elemzéseink kimutatták, hogy a Bb8 kevésbé konzervált szerkezetű, mint a Gdh. A Bb8 a szekvenált *Drosophila* fajok mindegyikében előfordul, amiből megállapítottuk, hogy a Bb8 a *Drosophila* félék korai evolúciójában bekövetkezett génduplikáció eredménye.

Megállapítottuk, hogy míg a *Gdh* expressziója általános, a *bb8* tesztisz specifikusan, a 8 sejtes cisztától kezdődően fejeződik ki és jelentősen felhalmozódik a meiotikus, poszt-meiotikus stádiumokban.

A *bb8^{ms}* mutáns tesztiszekben a korai fejlődési stádiumoknál nem figyelhető meg rendellenes fenotípus. A meiózist követően azonban a ciszták megnyúlása sérül, és az

individualizáció folyamata is hibás, ami a spermatogenezis leállítását eredményezi. A *bb8^{ms}* mutánsban nem alakulnak ki érett spermiumok.

Megállapítottuk, hogy a Bb8 fehérje a mitokondriumokba lokalizálódik a spermatogenezis korai stádiumaiban, és a meiózist követően is. A *bb8^{ms}* mutánsban mitokondriális rendellenességeket mutattunk ki a meiózist követően. A *bb8^{ms}* mutáns megnyúló cisztákban a mitokondrium származékok elvesztik identitásukat, mind a kettő hibás szerkezetű parakrisztallint halmoz fel. Kimutattuk, hogy a *bb8^{ms}* mutáns cisztákban megamitokondriumok képződnek. Kimutattuk, hogy a megamitokondriumok egy része membrán potenciállal rendelkezik.

Feltételezzük, hogy a hibás mitokondrium szerkezet okozza a ciszták hibás megnyúlását.

A fenotípus alapján úgy véljük, hogy a glutamát és glutamin szint meghatározó a parakrisztallin kialakulása szempontjából valamint hozzájárul a megamitokondriumok képződéséhez. A mitokondriális hibák a spermatidák megnyúlását és a normális individualizációt gátolják

Azonosítottuk az *archipelago* gén egy P-elem inszerciós hímsteril allélját (*ago^{ms}*).

Genetikailag jellemeztük az *ago^{ms}* allélt komplementációs analízissel, a transzpozon revertálásával , valamint a vad típusú cDNS-t tartalmazó transzgén kifejeztetésével.

Megállapítottuk, hogy az *ago* génről képződő transzkriptek szintje *ago^{ms}* tesztiszekben lecsökken, és eredményeink arra utalnak, hogy a hímsterilitás kialakításáért nagy valószínűséggel az *ago-RB* és *ago-RC* transzkript csökkenése a felelős.

Az *ago^{ms}* mutáns vizsgálata során megállapítottuk, hogy a spermatogenezis korai stádiumai normálisan lezajlanak, de a meiózt követően az *ago^{ms}* mutáns ciszták individualizációja hibát szenved.

Megállapítottuk, hogy az mCherry-Ago fehérje a spermatogenezis korai szakaszában a sejtmagokban, a meiózt követően pedig citoszolikusban halmozódik fel a ciszták farki végén, valamint az individualizáció során a cisztikus hólyagban figyelhetjük meg.

Az *ago^{ms}* mutánsban az individualizációs komplex szétcsúszik, eltérő méretű aktin kúpokat figyelhetünk meg, amiknek az irányultsága is megváltozhat. Az mCherry-Ago transzgenikus fehérje jelenlétét kimutattuk a vándorló individualizációs komplexek aktin kúpjainak bazális végén, amely felvetette a nem apoptotikus kaszpáz útvonal érintettségét. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a nem apoptotikus kaszpáz kaszkád az *ago^{ms}* mutáns tesztiszekben aktiválódik, a ciszták teljes hosszában megfigyelhető. Nem

tapasztaltunk rendellenességet az *ago^{ms}* mutánsban a kaszpáz aktivitást gátló, dBruce és Soti fehérjék elhelyezkedésében.

A ciszták farki végén az mCherry-Ago fehérje kolokalizációt mutat az Imp-GFP fehérjével. Az Imp-GFP hibás elrendeződését mutattuk az *ago^{ms}* mutáns ciszták farki végén, amely azt sugallja, hogy az Ago funkciója szükséges az Imp fehérje lokalizációjának kialakításához.

Az *ago^{ms}* mutáns megnyúlt cisztáiban a sejtmagok rendezetlenül helyezkednek el. TUNEL jelöléssel kimutatnunk a magi DNS aprózódását, amely a hibás ciszták apoptózisára utalhat.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy azonosítottunk kettő a poszt-meiotikus fejlődés során nélkülözhetetlen gént. Kimutattuk, hogy a *bb8* glutamát dehidrogenáz kódoló gén terméke szükséges a megnyúló spermatidákban a mitokondrium származékok szabályos fejlődéséhez. A *Bb8* hiányában a mitokondrium származékok elvesztik azonosságukat és megamitokondriumokat képeznek, feltehetőleg az anyagcsere útvonalban bekövetkezett változások miatt.

Megállapítottuk, hogy az Ago F-box fehérje többféle szerepet játszhat a spermatidák egyedivé válása folyamán. Az Ago fehérjének szerepe lehet a megnyúlt ciszták farki végén, az Imp fehérjével interakcióban. A fluoreszcensen jelölt Ago fehérjét az individualizáció során sikerült kimutatnunk az individualizációs komplex aktin kúpjainak bazális végein, valamint kimutattuk, hogy az Ago fehérje hiánya az individualizáció hibáihoz vezet. Ezek az eredmények valószínűsítik az Ago fehérjének a cisztikus hólyagban történő protein lebontással való kapcsolatát.

Publikáció referált folyóiratban:

Vedelek Viktor MTMT azonosító: 10030587

Vedelek V., Laurinyecz B., Kovács AL., Juhász G, Sinka R.
Testis-Specific Bb8 Is Essential in the Development of
Spermatid Mitochondria
Plos One 2016 11 (8): e0161289.
doi:10.1371/journal.pone.0161289.

Laurinyecz B., Péter M., Vedelek V., Kovács A. L., Juhász G.,
Maróy P., Vígh L., Balogh G., Sinka R.
Reduced expression of CDP-DAG synthase changes lipid
composition and leads to male sterility in *Drosophila*.
Open biology 2016. 6 (1).
doi:10.1098/rsob.150169.

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott, Dr. Sinka Rita, Vedelek Viktor PhD munkájának témavezetőjeként igazolom, hogy a jelölt tézisei az általa végzett munka eredményeit tükrözi és PhD értekezéséhez felhasznált közlemény létrehozásához jelentős mértékben hozzájárult.



Dr. Sinka Rita

Társszerzői nyilatkozat

Alulírott Dr. Sinka Rita, Dr. Laurinyecz Barbara, Dr. Juhász Gábor, Dr. Kovács Attila Lajos nyilatkozok arról, hogy a "Testis-Specific Bb8 Is Essential in the Development of Spermatid Mitochondria" (Plos One 2016) című közleményünkben, illetve "A *Drosophila melanogaster* poszt-meiotikus spermatogenezisében szerepet játszó gének vizsgálata" című doktori értekezésében közölt eredményekben a jelölt, Vedelek Viktor szerepe meghatározó fontosságú. Hozzájárulok, hogy a közleményünkben foglalt eredményeket a jelölt felhasználja Szegedi Tudományegyetem TTIK Biológia Doktori Iskola keretében a doktori fokozat eléréseért benyújtott dolgozatában, és egyúttal kijelentem, hogy ezeket az eredményeket nem használtam fel tudományos fokozat megszerzésekor, és ezt a jövőben sem teszem.



Vedelek Viktor
(jelölt)



Dr. Sinka Rita



Dr. Laurinyecz Barbara


.....
Dr. Juhász Gábor
.....
Dr. Kovács Attila Lajos