

36. OTDK Biológia Szekció

A tesztisz-specifikus gamma-Tubulin gyűrűkomplex funkciójának és összetételének vizsgálata *Drosophila melanogaster*ben

Készítette: Németh Dóra

Molekuláris-, immun- és mikrobiológia szakirány

MSc II. évfolyam

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Genetikai Tanszék

Témavezető: Dr. Sinka Rita

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	2
1.1. A mikrotubulusok sejten belüli jelentősége	2
1.2. Gamma-Tubulin gyűrűkomplex felépítése	3
1.3. A <i>Drosophila melanogaster</i> spermatogenezise	4
1.4. Alternatív gamma-tubulin gyűrűkomplexek	6
1.5. CRISPR-Cas9 rendszer alkalmazása genomszerkesztésre	8
2. Célkitűzések	10
3. Alkalmazott módszerek	11
3.1. Klasszikus genetikai módszerek.....	11
3.1.1. <i>Drosophila</i> fenntartási körülmények és felhasznált törzsek	11
3.1.2. Fertilitási tesztek.....	11
3.2. Molekuláris biológiai módszerek	11
3.2.1. Felhasznált oldatok	11
3.2.2. DNS izolálása egy légyből (SFP)	12
3.2.3. Polimeráz láncreakció (PCR)	12
3.2.4. Agaróz gélelektroforézis	13
3.2.5. Szekvencia analízis	14
3.2.6. Tesztiszek izolálása, fixálása és festése	14
4. Eredmények	16
4.1. Grip163 deléciós mutáns törzsek előállítás CRISPR/Cas9 rendszerrel	16
4.2. Grip163 mutáns törzsek fenotípusának jellemzése	20
4.2.1. Mutánsok fertilitásának tesztelése	20
4.2.2. Mutánsok immunhisztokémiai jellemzése	20
4.3. Grip163 <i>in vivo</i> GFP jelölt törzsek létrehozása CRISPR/Cas9 rendszerrel	25
4.4. Grip163 <i>in vivo</i> jelölt törzsek fenotípusának jellemzése és kifejeződési mintázatának leírása	28
5. Összefoglalás	30
Köszönetnyilvánítás	32
Irodalomjegyzék	33
Függelék	36
Nyilatkozat	37

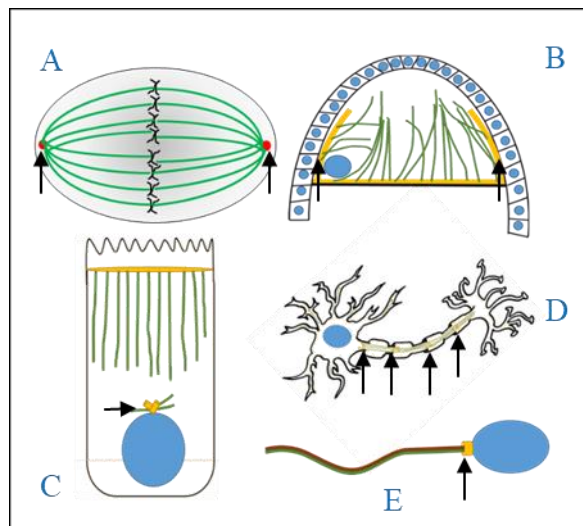
1. Bevezetés

1.1. A mikrotubulusok sejten belüli jelentősége

A sejtek mikrotubulusai a mikrotubulus szervező központokból (MTOC) erednek. A mikrotubulusok minden eukarióta sejtben megtalálhatóak. Habár evolúciósan konzerváltak, viselkedésükben, funkciójukban és struktúrájukban eltérhetnek a különböző fajok között. (1.) Elengedhetetlenek a kromoszómák szétválásánál sejtosztódáskor, intracelluláris transzportfolyamatokban, sejtservecskék lokalizációjában és mozgásában, valamint a sejtek mozgásában. (2.) Ezek a mintegy 25nm átmérőjű üreges henger alakú, citoskeletális filamentumok olyan heterodimerekből épülnek fel, mint az alfa-Tubulin és béta-Tubulin. (1.) 13 lánc alfa és béta-Tubulin alkot egy protofilamentet. Az általános alfa- és béta-Tubulin izoformák erősen konzerváltak a távoli fajok között. Néhány izoforma valószínűleg egy speciális mikrotubulus funkcióra jöhetett létre (1).

A mikrotubulusok nukleációjáért a mikrotubulus szervező központok felelnek (MTOC). Állati sejtekben elsődlegesen a centroszómák töltik be ezt a feladatot (3.), de lehetnek ilyen központok neuronokban dendritikus MTOC-vel, a petekezdemény anterior belső felszínén vagy a mitokondrium felszínén *Drosophila* spermiumban (4).

A centroszómákhoz lokalizálódik a gamma-Tubulin amely a mikrotubulus felépítésénél kiinduló szervezőfehérjeként szolgál (3.).



1.Ábra: Különböző mikrotubulus szervező központok (MTOC) (fekete nyilak). A: osztódó szomatikus sejt, B: fejlődő *Drosophila* petesejt (10.stádium), C: Epithel sejt, D:Neuron, E: *Drosophila* spermium bazális testtel.

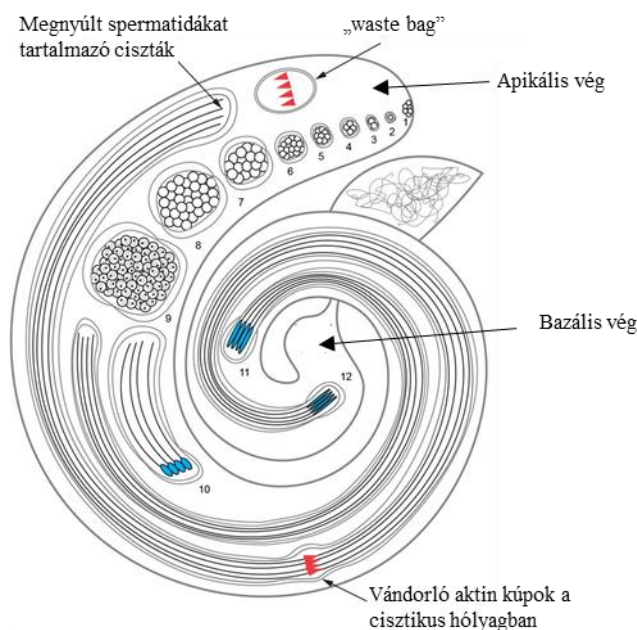
1.2. Gamma-Tubulin gyűrűkomplex

A mikrotubulus kötegek kialakulásához az evolúciósan konzervált gamma-Tubulin gyűrűkomplexek (γ -TuRC) elengedhetetlenek. A gyűrűkomplex magját a gamma-Tubulin kis komplex adja (γ -TuSC). Az emlős γ -TuSC két gamma-Tubulinból és egy GCP2 illetve GCP3 proteiból áll (2. Ábra). A GCP2 és GCP3 fehérjék a C-terminális γ -Tubulin gyűrű fehérje 2 (GRIP2) doménjükön keresztül képesek egy-egy γ -Tubulin kötésre és heterotetramer formálásra. Hét γ -TuSC alkot egy egyeneses hélixet, majd további GCP proteinek (GCP4, GCP5 és GCP6) hozzákapcsolódásával kialakul a γ -TuRC. A gyűrűkomplex ezek hiányában is elkezd beépülni a mikrotubulus szervező központokba. A GCP4, GCP5 és GCP6 fehérjék szerepe a magasabb rendű eukariótákban további γ -TuRC specifikus fehérjék kötése és ezáltal a stabil MTOC-k kialakítása (2.). A konzervált γ -TuRC *Drosophila melanogaster*-ben a Grip84 és a Grip91 által alkotott γ -TuSC-ből, valamint a hozzá kapcsolódó Grip75, Grip128 és Grip163 fehérjékből áll szomatikus sejtekben (2.). Hasonlóan a magasabb rendűekhez, a Grip84 és Grip91 gének esszenciálisak *Drosophilában* (5.), míg a Grip128 mutánsa életképes, de hím és nőstényszeril.

A konzervált γ -TuRC tagokon kívül még járulékos partner fehérjéket is azonosítottak. Egyik ilyen a *Drosophila* ováriumában kifejeződő Grip71 gén, amelynek terméke nem tartalmaz GCP domént, hanem az N terminális végén egy WD40 ismétlődést (2.). A kináz NME7 (*Drosophilában* Nmdyn-D7) szükséges a centroszómák nukleációjához, és a gyűrűkomplexben megnöveli a nukleációs aktivitást, ennek jelentősége azonban más párhuzamosan zajló és eredményében ugyanazt adó folyamatokkal szemben csekély. Egy másik konzervált járulékos fehérje a MOZART1 (Mzt1). Ez a fehérje három alfa hélixet tartalmaz és közvetlenül érintkezik a GCP3 és GCP5 (Grip91 és Grip128). fehérjék N-terminálisával, ezzel szabályozza a gyűrűkomplex és az ahhoz kötődő fehérjék kapcsolatát (2., 5.). Mzt1 hiányában a mitózis folyamata magasabbrendűekben hibás. *Drosophilában* a *mzt1* nélkülözhető, hiánya a hímek öregedéssel kapcsolatba hozható fertilitás csökkenését fokozza (2.).

A meiotikus stádiumot a poszt-meiotikus fejlődési szakasz követi. Az ún. kerek spermatidák megnyúlnak, és kialakul az akroblasztból az akroszóma, amely a megtermékenyítést követően a pronukleuszok egyesülésénél játszik szerepet. A mitokondriumok a sejtmag mellett csoportosulnak és egymásra rétegződve a kerek óriás mitokondriumot az ún. Nebenkernt hozzák létre. A centroszómák a meiotikus osztódás során bazális testté alakulnak, amely a meiózist követően tovább módosul és „centriolum adjunkt”-ként a megnyúló mag mellett helyezkedik el, az akroszómával ellentétes oldalon. A sejtmagban a hisztonok protaminra cserélődnek és a mag tú alakúra nyúlik. A bazális test vagy „centriol adjunkt” az eredési helye a 9+2 alfa és beta tubulin dimerekből felépülő axonémának, amely a teljes farki részben végigfut. Az axonémát az endoplazmikus retikulum eredetű axiális membrán veszi körül. Az axonémával párhuzamosan, a ciszta teljes hosszában megtalálható a Nebenkern letekeredésével létrejövő két mitokondrium származék. A megnyúló mitokondrium származékoknak és a felületükhöz kapcsolódó járulékos mikrotubulusoknak fontos szerepe van a ciszta megnyúlási folyamatában (8.). A megnyúlással párhuzamosan morfológiailag és szerkezetiileg is elkülönül a két mitokondrium származék. A nagy mitokondrium származékban parakrisztallin szerű anyag felhalmozódása indul el, míg a kis mitokondrium származék összezsugorodik. A megnyúlást követően az individualizáció, a spermatidák egyedivé válásának folyamata zajlik. Kialakításra kerül az individualizációs komplex, ami a ciszták bazális részén lévő citoszkeletális elemek tömege. A megnyúlás alatt és azt követően a ciszták közötti összeköttetést plazmahidak biztosítják.

Ennek során először a sejtmagok körül individualizációs komplexek jönnek létre, amelyekben jellegzetes kúp alakban F-aktint halmoznak fel, kialakulnak az ún. aktinkúpok (9.). Az aktinkúpokat tartalmazó individualizációs komplex az ún. cisztikus hólyagban a ciszta bazális vége felé vándorol és proteolízis segítségével a nem apoptotikus hatású kaszpázok segítségével a spermatidák citoplazmája degradálódik és kialakul a kompakt egyedi membránnal körülhatárolt spermium (6.). A folyamat végén a cisztikus hólyag lefűződik és a felesleges anyagok a „waste bag”-be kerülnek (6.).



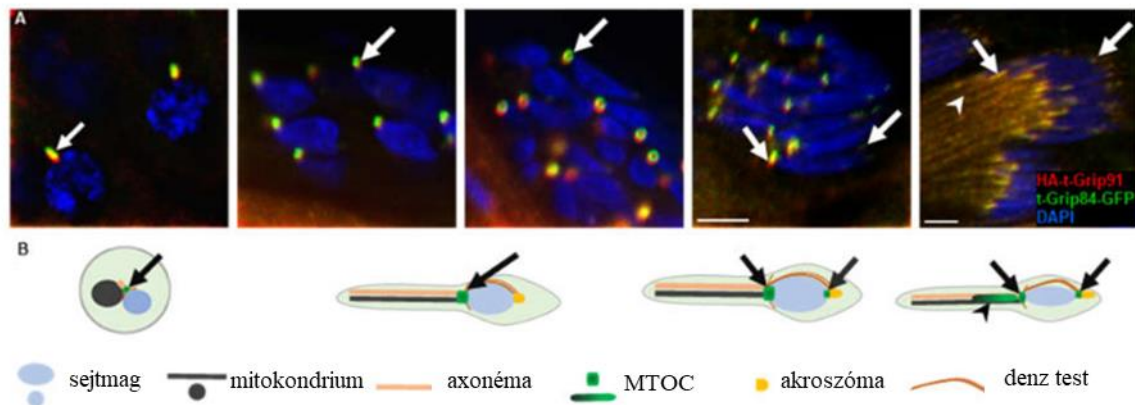
3.Ábra: A spermatogenezis sematikus rajza *Drosophila* testiszben

1.4. Alternatív gamma-Tubulin gyűrűkomplexek

A mikrotubulusok központi szerepet töltenek be a spermatociták osztódásában, a sejtorganelumok átalakulásában a meiózist követően, valamint a spermatidák megnyúlásában (5.). *Drosophilában* nagy számban lettek azonosítva testisz-specifikus géntermékek, amelyek a késői spermatogenezis során játszanak szerepet (10., 11., 12., 13.). Megfigyelték, hogy ezek mutánsaiban az előbb említett képletek kialakulása, működése érintett, ami a hímek sterilitását okozza. (5.). Munkacsoportunk korábban már leírta, hogy a szomatikus Grip gének (Grip84, Grip91, Grip128, Grip163, Grip71) transzkriptjei leginkább a testisz apikális végén halmozódnak fel. Sikerült azonosítani három testisz specifikus γ -TuRC paralóg gént, a t-Grip84, t-Grip91 és a t-Grip128-t. A testisz-specifikus paralógok termékei a testisz bazális részen halmozódtak fel, a poszt-meiotikus stádiumokban. Fehérje lokalizációs és biokémiai vizsgálatokkal egyaránt jellemezték az azonosított testisz-specifikus γ -TuRC-t.

Klasszikus mutáns analízisével megmutatták, hogy a t-Grip128 nem szükséges a hím fertilitáshoz, viszont a t-Grip84 hímek sterilek, a t-Grip91 hímek pedig szemi-sterilitást mutatnak. A t-Grip84 és a t-Grip91 további vizsgálata megmutatta, hogy a mitotikus és meiotikus osztódások rendben voltak, normálisan lezajlott az elongáció és az axonéma kialakulása, viszont a bazális testek és a sejtmagok elváltak egymástól. Az aktin kúpok kialakulásuk után szétszórtnak helyezkednek el, ami a ciszta individualizációjának leállítását eredményezte a mutánsokban. Ezekből arra következtethetünk, hogy az alternatív, testisz-

specifikus γ -TuRC a spermatogenezis késői stádiumaiban nélkülözhetetlen. A t- γ -TuRC fehérjék a meiózist követően különböző MTOC-khez lokalizálódnak. Először a bazális testből kialakuló centriolum adjunkhoz, majd párhuzamosan a megnyúló sejtmag apikális végére és végül a mitokondriumok felszínén (12., 14.).

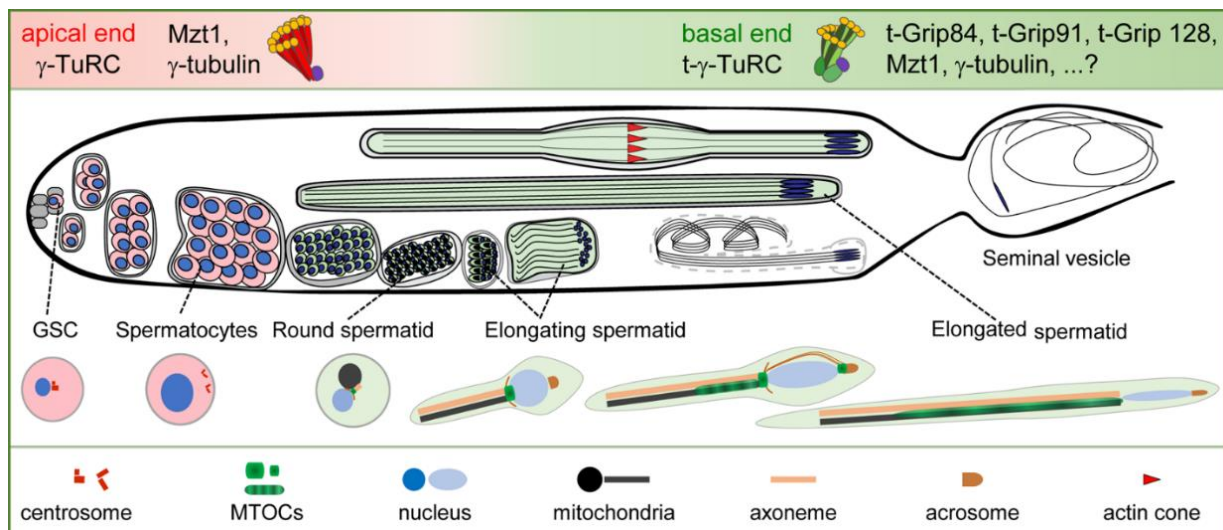


4.Ábra: A t- γ -TuRC fehérjék a bazális testhez, a megnyúló sejtmag apikális végéhez és a mitokondriumok felszínéhez lokalizálódnak

Biokémiai módszerekkel azt is bizonyították, hogy mind a három t- γ -TuRC fehérje képes a gamma-Tubulin kötésére és a t-Grip91 N-terminális vége felelhet a t- γ -TuRC és Mzt1 kapcsolatáért.

A Grip75 és 128 valamint a t-Grip84 és a t-Grip91 hím steril mutánsok azt bizonyítják, hogy spermatogenezis poszt-meiotikus fázisa igen érzékeny a gyűrűtagok megváltoztatására (5.).

A t-Grip128 esetében nem tapasztaltunk fertilitás változást, amely akár a szomatikus Grip128-cal fennálló redundanciának is köszönhető lehet. A Grip163-ról azt tudjuk, hogy bár tesztisz-specifikus paralóggal nem rendelkezik, a *Drosophila* spermium proteom részeként azonosították proteomikai módszerekkel (5.).



5.Ábra: A spermatogenezis során jelen lévő MTOC-k és γ -TuRC-k

1.5 CRISPR-Cas9 rendszer alkalmazása genomszerkesztésre

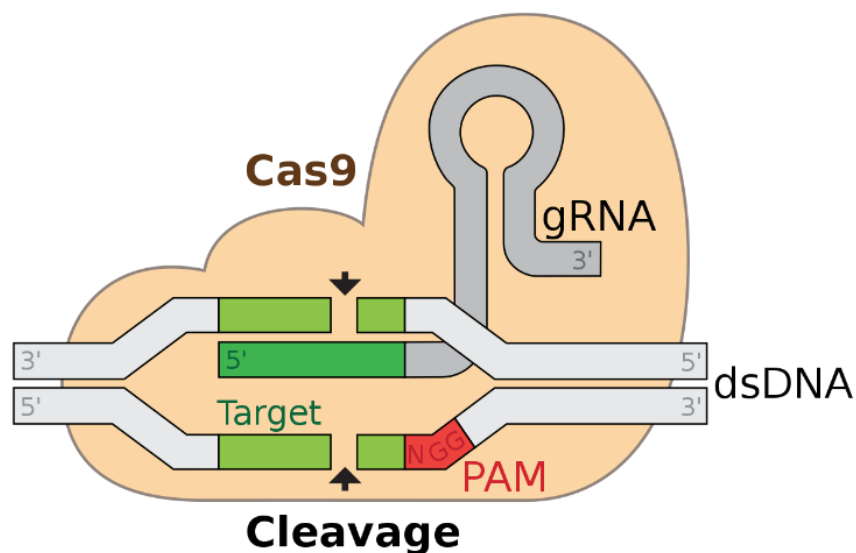
A *Drosophila melanogaster* ideális modellként szolgál különböző biokémiai útvonalak és betegségek modellezésére, és azok mechanizmusának kutatásához. A génexpresszió megváltoztatására alapuló technikákat széles körben alkalmazzák különböző *Drosophila* kutatásokban, mint például a GAL/UAS és FLP/FRT(15.). Az utóbbi években rohamos fejlődésen mentek keresztül az *in vivo* és *in vitro* használt technikák, itt is elérhetővé vált a genomszerkesztés egyik legújabb és legmodernebb típusa, a CRISPR/Cas9 rendszer. A CRISPR/Cas9 rendszert először baktériumokban írták le, mint az adaptív immunrendszer része, ami detektálja és kivágja az idegen DNS-t. CRISPR/Cas9 rendszer kettős törést okoz a célpontul választott génben. Ezeket a töréseket általában magasabb rendűekben olyan javító mechanizmusok javítja ki, mint a nem homológ végekkel való illesztés, azonban ezen javítások következtében kisebb deléciók/inszerciók jöhetnek létre(15.). Magasabb rendűekben való alkalmazhatósága miatt gyorsan a reverz genetika egyik legdinamikusabban fejlődő technikájává vált.

A rendszer működésénél egy kis CRISPR RNS (crRNS) és egy transz-aktiválódó CRISPR RNS (tracRNS) működnek együtt, melyek segítségével a Cas9 endonukleáz megtalálja a célpontul szolgáló DNS-t. Az egyszerűbb működés érdekében a crRNS és tracRNS fuzionál és mint „single-guide” RNS (sgRNS) működik. Ebben a sgRNS-ben van egy kb 20 bp hosszúságú szakasz, ami komplementer a célpontul szolgáló DNS szakasszal, ami mellett pedig egy PAM (protospacer szekvencia) helyezkedik el. Így a Cas9 jelenlétében csak ezt a kb 20 bp-nyi szakaszt kell megtalálni a genomom belül, hogy elérjük a célgént. A rendszer egyszerűsége,

hatásossága és specifikussága miatt jól használható különböző organizmusok különböző sejtvonalain, de egész állatokban is sikerrel alkalmazható.

Drosophilákban több ilyen CRISPR/Cas9 rendszert hoztak létre stabil mutációk generálására. Ezek között a különbségek a Cas9 és sgRNA bejuttatásában vannak. Bejuttatás történhet például DNS plazmid beinjektálásával, *in vitro* átíródott RNS beinjektálásával, vagy transzgének segítségével bevitt gRNS-ek felhasználásával (15.).

Kis méretű deléciók segítségével leolvasási kereteltolódási mutációk idézhetők elő a fehérjekódoló génekben, de különböző jelölő fehérjék is bevihetők. Null mutáns előállításához általában kettő sgRNA-t használunk, amelyek egymástól elkülönítve a gén 5' és 3' végét célozzák meg. Ezzel a módszerrel a modellszervezeteken kívül eddig nem vizsgált élőlények is genetikailag manipulálhatóvá válnak és a CRISPR-Cas9 rendszer humán alkalmazására vonatkozóan is már klinikai vizsgálatok folynak.



6.Ábra: CRISPR/Cas9 rendszer felépítésének sematikus rajza

2. Célkitűzések

A t- γ -TuRC tagjainak jellemzése során felmerült a kérdés, hogy vajon a különböző mikrotubulus organizáló központokban lokalizálódó t- γ -TuRC összetétele eltérő-e. A Grip163 egyedülként került azonosításra a γ -TuRC fehérjék közül a spermium proteomban. Az embrió centroszómája a spermiumtól öröklődik, ezért a centroszómális komponensként ismert Grip163 spermatogenezis alatti elhelyezkedése, valamint az esetleges jelenléte a t- γ -TuRC-nek fontos fejlődésbiológiai kérdésekre adhat választ.

Célunk volt továbbá a Grip163 szerepének meghatározása a *Drosophila* spermatogenezisének különböző stádiumaiban.

Ennek megvalósításához a CRISPR-Cas9 rendszerrel klasszikus mutáns előállítását és annak genetikai és morfológiai jellemzését tűztük ki célul.

A Grip163 fehérje spermatogenezisen belüli elhelyezkedését a CRISPR-Cas9 technológia segítségével, a gén saját kromoszómális régiójába juttatott GFP jelzőfehérje vizsgálatával kívántuk leírni.

3. Alkalmazott módszerek

3.1. *Drosophila* fenntartási körülmények és felhasznált törzsek

A törzseket fiolába öntött agarral szilárdított, kukoricadara, liszt, élesztő és dextróz tartalmú táptalajon, vattadugóval lezárva tartottuk 25°C-on, inkubátorban (16.). A táptalaj hozzáadott, fungicid hatású Nipagint tartalmazott.

Felhasznált törzsek:

w¹¹¹⁸ (kontroll)

y[1] M{RFP[3xP3.PB] GFP[E.3xP3]=vas-Cas9}ZH-2A w[1118]/FM7c (BL51323)

w/w; +/+ , TM2,Ubx,e/TM6, Sb, e

w/w; Sp/SM6b; Cxd/TM3, Sb, Ser

w; gRNA-Grip163; +

w/w; +/+; TM3, Sb, Ser/TM6, Tb, Hu

3.1.2. Fertilitási tesztek

A vizsgálni kívánt törzsekből származó homozigóta hímeket egyesével kereszteztük 3-4 vad típusú, *w¹¹¹⁸* szűz nőténnyel. Ezzel egyidőben kontroll keresztezések is készültek, ahol mindkét nem tekintetében *w¹¹¹⁸* törzset használtunk. A fertilitást 6-8 nap elteltével a lárvák, bábok jelenlétével állapítottuk meg.

3.2. Molekuláris biológiai módszerek

3.2.1. Felhasznált oldatok

SB: Squishing Buffer: (10 ml): 66,6 µl 10 mM TRIS (pH 8.2), 10 µl 1 mM EDTA, (pH 8.0), 50 µl 25 mM NaCl, 9,87 ml H₂O

1xTAE (500 ml): 490 ml H₂O, 10 ml 50X TAE (24,2 g TRIS, 5,7 ml ecetsav, 10 ml 0,5 mM EDTA)

Tesztisz Puffer (TB) (50 ml): 9,15 ml 182 mM KCl, 0,47 ml 47 mM NaCl, 0,5 ml 10 mM Tris-HCl (pH 6,8), H₂O

PBS (1000 ml): 8 g 137 mM NaCl, 0,2 g 2,7 mM KCl, 1,44 g 10 mM Na₂HPO₄, 0,24 g 2 mM KH₂PO₄ (pH 7.4), 800 ml H₂O

PBSTX (50 ml): 300 µl 50% Tween20, 500 µl 10% TritonX, 49,2 ml 1 X PBS

Fixáló oldat: PBS 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄ pH 7.4,

Formaldehides fixáló (400 µl): 100 µl 16% formaldehid, 300 µl fixáló oldat

3.2.2. DNS izolálása egy ecetmuslicából

A kiválasztott genotípusú állatot (hím) PCR csőbe helyeztem, és jégre tettem. Csövenként 49,5 µl SB puffer és 0,5 µl Proteináz K-t használtam. Az oldatok hozzámerése után a pipetta hegyével összezúztam az állatot, és PCR gépbe a következő beállításokkal izoláltam a DNS-t: 30 percig 37°C és 2 percre 95°C. A program lefutása után még aznap használva 4°C-on, későbbi felhasználás esetén -20°C-on tároltam a mintákat.

PCR templátként az egy légyből izolált DNS-t használtam.

3.2.3. Polimeráz láncreakció (PCR)

Komponensek	Szükséges mennyiség (25µl végtérfogatra)
10x DreamTaq Puffer	2,5 µl
dNTP mix (10mM)	0,5µl
Forward primer (10uM)	0,5µl
Reverse primer (10uM)	0,5µl
Templát DNS	1µl
DreamTaq DNS polimeráz (1U)	0,3µl
H ₂ O	19,7µl

1. Táblázat: A PCR-hoz használt MasterMix komponensei és mennyiségük

Használt primerek	Szekvencia
Grip163test_fw.	ATGCAATCACAGCGTCCTCG
Grip163test_rev.	GCCAGATGGAGCTCAACAGG
Grip163test_fw2.	CCGCCAGAAAAGCTAATTCC
Grip163test_rev2.	AGCAACCCTAATCGATCACCT
GFP Grip163_fw.	GAAACCCCTGATGGTGAGCAAGGGCGAG
GFP Grip163_rev.	GCTGTAGTTGCTTGTACAGCTCGTCCATG

2. Táblázat: PCR során használt primerek és szekvenciájuk

Primer párosítások	Hőmérséklet (°C)	Időtartam	Ciklusok
Grip163test_fw2. Grip163test_rev2.	95	2 min	1
	95	15 sec	35
	52	15sec	
	72	20sec	
	72	5min	1
GFP Grip163_fw. GFP Grip163_rev.	95	2 min	1
	95	15 sec	35
	65	15sec	
	72	1min	
	72	5min	1
GFP Grip163_fw. Grip163test_rev2.	95	2 min	1
	95	15 sec	35
	58	15sec	
	72	70sec	
	72	5min	1
Grip163test_fw. Grip163test_rev2.	95	2 min	1
	95	15 sec	35
	52	20sec	
	72	90sec	
	72	5min	1

3.

4. Táblázat: PCR során alkalmazott beállítások

3.2.4. Agaróz gélelektroforézis

A PCR termékeket 1%-os, illetve 2%-os agaróz gélben futtatva ellenőriztem. A gélhez 30ml, 60ml vagy 80 ml mennyiségű 1xTAE puffert mértem ki attól függően hány mintát futtatunk meg, majd a megfelelő méretű Erlenmeyer lombikba öntve hozzáadtam a megfelelő mennyiségű (0,3g, 0,6g és 0,8g) agarózt. Mikrohullámú sütőben az agaróz teljes feloldódásáig melegítettem az elegyet, majd hozzáadtam a megfelelő mennyiségű (1,5 µl, 3 µl vagy 4 µl) Midori Green Xrta festéket, amely megfesti a DNS-t. A gél megszilárdulása után 5 µl ThermoScientific FastRuler Low Range DNS létrát mértem az első zsebbe a méret meghatározásához és 10µl mintát mértem az egyes zsebekbe. A gél 90V-on futtattam 20 percig. A futtatás eredményét kék fénnel megvilágításnál készített képpel dokumentáltam. A pozitívnak vélt mintákat speciális 4%-os Metaphor agaróz gélben futtatva is ellenőriztem. Ehhez 30ml, 60ml vagy 80ml mennyiségű (a minták mennyiségétől függően) 1xTAE pufferbe folyamatos keverés mellett a kimért 1,2g, 2,4g vagy 3,2g Metaphor agarózt hozzáadtam. 15

percig állni hagytam a keveréket. A lombikba mágneses keverőt helyeztem, lefedtem és folyamatos keverés mellett forrásig melegítettem, majd 10 percig forrásban tartottam a keveréket. Ezután hozzáadtam a Midori Green Xrta festéket. A gél megszilárdulása után 5 µl Low Range DNS létrát mértem az első zsebbe és 10 µl mintát az egyes zsebekbe. A gél 70V-on futtattam 40-50 percig. A futtatás eredményét UV megvilágításnál készített képpel dokumentáltam.

3.2.5. Szekvenciaanalízis

Az agaróz gélelektroforézis alapján jelöltnek bizonyuló mintákból kiválasztottakat elküldtünk szekvenáltatni, ehhez először kitisztítottuk a mintául szolgáló DNS-t. Ehhez a Macherey-Nagel NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit-et használtuk.

A PCR termékből 20 µl-hez 30 µl H₂O-t adtunk, majd 100 µl NTI Puffert. Ezt a mixet mértük rá egy tiszta Eppendorfba helyezett oszlopra. A mintákat 30 másodpercig 11000xg centrifugáltuk. A cső aljában összegyűlt folyadékot leöntöttük. Hozzáadtuk a 700 µl NT3 puffert és újra centrifugáltuk 30 másodpercig 11000xg-n. Ismét leöntöttük az alul összegyűlt folyadékot és újra centrifugáltuk 1 percig 11000xg-n. Új Eppendorf csövet rakva az oszlop alá ráértük a 16 µl NE puffert és szobahőmérsékleten inkubáltuk egy percig. Ezután ismét centrifugáltuk 1 percig 11000xg-n. Az oszlopon átfolyt mintáknak ellenőriztük a tisztaságát. A megfelelő tisztaságú mintákból 3 µl-hez a megfelelő primert és H₂O-t hozzámérve, felcímkézve elküldtük a Microsynth céghez szekvenálásra. A kapott szekvenciákat a SnapGene, Flybase és NCBI Blast programok segítségével értékeltük ki.

3.2.6. Tesztisz izolálása, fixálása és festése

A vizsgálni kívánt *Drosophila melanogaster* törzsekből gyűjtött hímeket boncoltunk hideg Tesztisz pufferben hegyes anatómiai csipesszel. A kiboncolt tesztiszeket jégre helyezett Tesztisz puffert tartalmazó Eppendorf csövekbe helyeztük. Az izolált tesztiszeket vagy rögtön tárgylemezre helyeztük és fixálás után fénymikroszkóppal vizsgáltuk, vagy immunfestettük őket.

Aktin- DAPI festés

A kiboncolt tesztiszeket formaldehides fixáló oldatba helyeztük (200 µl) 15-20 percre. Ezt követően mostuk háromszor PBSTX oldattal 10-10 perc szünetet tartva az egyes mosások között. Mosásásonként 400-600 µl oldatot használtunk. A mosások után mintánként összemértük a következőket: 100 µl H₂O + 0,2 µl Dapi festék+ 0,25 µl Phalloidin festék. Az

összeállított mixet 30 percig állni hagytuk a mintán. A festési lépés után újra mostuk a mintákat PBSTX oldattal szintén háromszor. Végezetül a tesztszövetet PBS-be helyeztük, majd onnan tárgylemezre. Mountain Medium rácseppentése és a fedőlemez ráhelyezése után fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

Immunfestés

A kiboncolt tesztszövetet formaldehides fixáló oldatba helyeztük (200 µl) 15-20 percre. Ezt követően mossuk egyszer PBSTX oldattal és kétszer PBST oldattal, a mosások között 10-10 percet várva egy-egy mosásnál 500 µl oldatot használtunk). A blokkoláshoz PBSTX+BSA(1%) oldatot használtunk, ebben 1 órán át inkubáltuk a minták folyamatos mozgatása mellett. A blokkolás után hozzáadtuk az elsődleges ellenanyagot tartalmazó oldatot, és egy éjszakán át 4°C-on tároltuk. Másnap újra mostuk a tesztszövetet háromszor PBSTX+BSA(1%) oldattal. Ezután hozzáadtuk a másodlagos ellenanyagot tartalmazó oldatot és folyamatosan mozgatva 1,5 órán át hagytuk benne a tesztszövetet. Az utolsó mosási fázisban szintén háromszor PBSTX+BSA(1%) oldattal mostuk a mintákat. Végül PBS-es mosás után tárgylemezre helyeztük a mintákat és Mountain Medium (DAPI-t tartalmazó) oldatot cseppentve rá lefedtük fedőlemezzel és konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

Elsődleges ellenanyagok
Gamma Tubulin mouse (1:500)
ANAI rabbit (1:500)
Asl rabbit (1:300)
Másodlagos ellenanyagok
Alfa mouse ALEXA488 (1:400)
Alfa rabbit ALEXA546 (1:400)
Alfa rabbit ALEXA633 (1:400)

4. Táblázat: Immunfestés során használt ellenanyagok

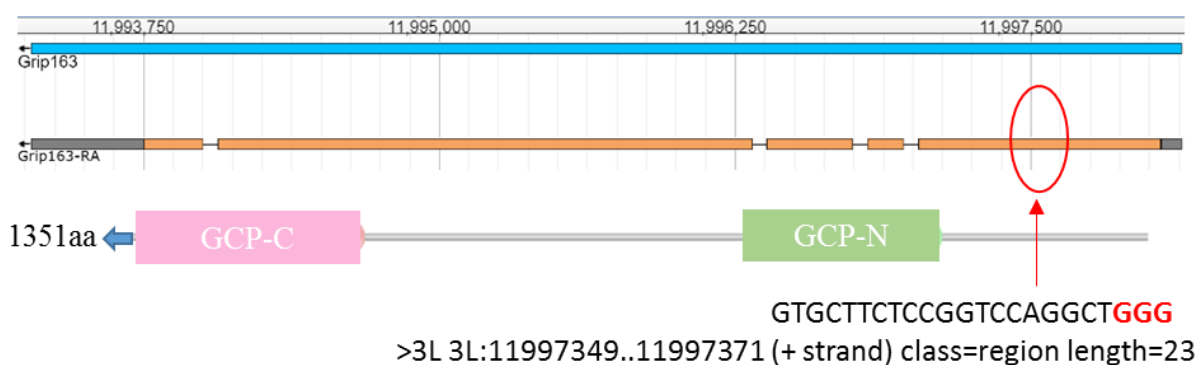
4. Eredmények

4.1. Grip163 mutáns törzsek CRISPR/Cas9 rendszerrel való létrehozása és molekuláris ellenőrzése

A Grip163 gén a 3. kromoszóma bal karján a 68F1 térképpozícióban, a genom 1993274-11998138 szekvenciái között helyezkedik el (6. Ábra). A gén 5 exonból és 4 intronból áll és egy 1351 aminosavból álló fehérjét kódol. A fehérje N- és C-terminálisán megtalálhatók a konzervált gamma-Tubulin kötésért felelős GCP domének.

Célunk a Grip163 gén részletes vizsgálata volt, ehhez először deléciós mutáns allélok létrehozását szeretnénk volna megvalósítani a CRISPR/Cas9 módszer alkalmazásával.

A megfelelő gRNS-t a FlyBase adatbázisában megtalálható lehetőségek közül választottuk ki, figyelembe véve, hogy ne érintse a konzervált doméneket és az exonikus régióban helyezkedjen el (7. Ábra).



7.ábra A Grip163 gén szerkezete és az alkalmazott gRNS pozíciója és szekvenciája (Flyabase adatbázis alapján módosítva)

A kiválasztott (GTGCTTCTCCGGTCCAGGCTGGG) szekvenciát a *Drosophila* CRISPR technológiára kifejlesztett pCFD5 vektorba klónoztuk és szekvenálással ellenőriztük a gRNS jelenlétét. A létrehozott Grip163-gRNA-pCFD5 vektort a *Drosophila* genom 2. kromoszómájára injektáltattuk. Az injektált törzsekből 6 független törzset alapítottunk a *white* szemszín markergén követésével és a 2. kromoszómájára balanszíroztuk az alapított törzseket. A Grip163-gRNA törzsek homozigóta életképesnek bizonyultak és a homozigóta állatokat vittük a CRISPR-Cas9-es keresztezésekbe (8. Ábra).

$$P: \quad \text{♀} \quad \frac{\text{VasCas9}}{\text{VasCas9}} \frac{+}{+} \frac{+}{+} \quad \text{X} \quad \frac{\text{w}}{\text{y}} \frac{\text{gRNA-Grip163}}{\text{gRNA-Grip163}} \frac{+}{+} \quad \text{♂}$$

$$F1: \quad \text{♀} \quad \frac{\text{VasCas9}}{\text{w}} \frac{\text{gRNA-Grip163}}{+} \frac{+}{+} \quad \text{X} \quad \frac{\text{w}}{\text{y}} \frac{+}{+} \frac{\text{TM2, Ubx, e}}{\text{TM6, Sb, e}} \quad \text{♂}$$

$$\text{♂} \quad \frac{\text{VasCas9}}{\text{y}} \frac{\text{gRNA-Grip163}}{+} \frac{+}{+} \quad \text{X} \quad \frac{\text{w}}{\text{w}} \frac{+}{+} \frac{\text{TM2, Ubx, e}}{\text{TM6, Sb, e}} \quad \text{♀}$$

$$F2: \quad \frac{\text{w}}{\text{w/y}} \frac{+}{+} \frac{\text{---(?)---}}{\text{TM6, Sb, e}} \quad \text{X} \quad \frac{\text{w}}{\text{w/y}} \frac{+}{+} \frac{\text{TM2, Ubx, e}}{\text{TM6, Sb, e}}$$

PCR ellenőrzés

$$F3: \quad \text{♀} \quad \frac{\text{w}}{\text{w}} \frac{+}{+} \frac{\text{---(?)---}}{\text{TM6, Sb, e}} \quad \text{X} \quad \frac{\text{w}}{\text{y}} \frac{+}{+} \frac{\text{---(?)---}}{\text{TM6, Sb, e}} \quad \text{♂}$$

$$\frac{\text{w}}{\text{w/y}} \frac{+}{+} \frac{\text{---(Grip163Δ)---}}{\text{---(Grip163Δ)---}}$$

8.Ábra: A CRISPR-Cas9 rendszerrel létrehozott Grip163 deléciós mutáns keresztezési sémája

Az ivarvonalban történő genomszerkesztés eléréséhez az X. kromoszómán található vas-Cas9 törzset használtuk, amely homozigóta életképes és a szemben expresszáldó GFP markergént hordozza. A Cas9 enzim hatására a gRNS felismerő hely környezetében vártuk kis méretű deléció keletkezését (6.ábra). Mivel a gRNS a kódoló régióra specifikus, ezért akár egyetlen nukleotid kiesése is megváltoztathatja a leolvasási keretet, ezzel megakadályozva a funkcionális géntermék képződését.

A szülőként szolgáló törzsekből 10 keresztezést raktunk össze. A kikelt F1 utódnemzedékből gyűjtött legyekből pedig 100 keresztezés lett összeállítva.

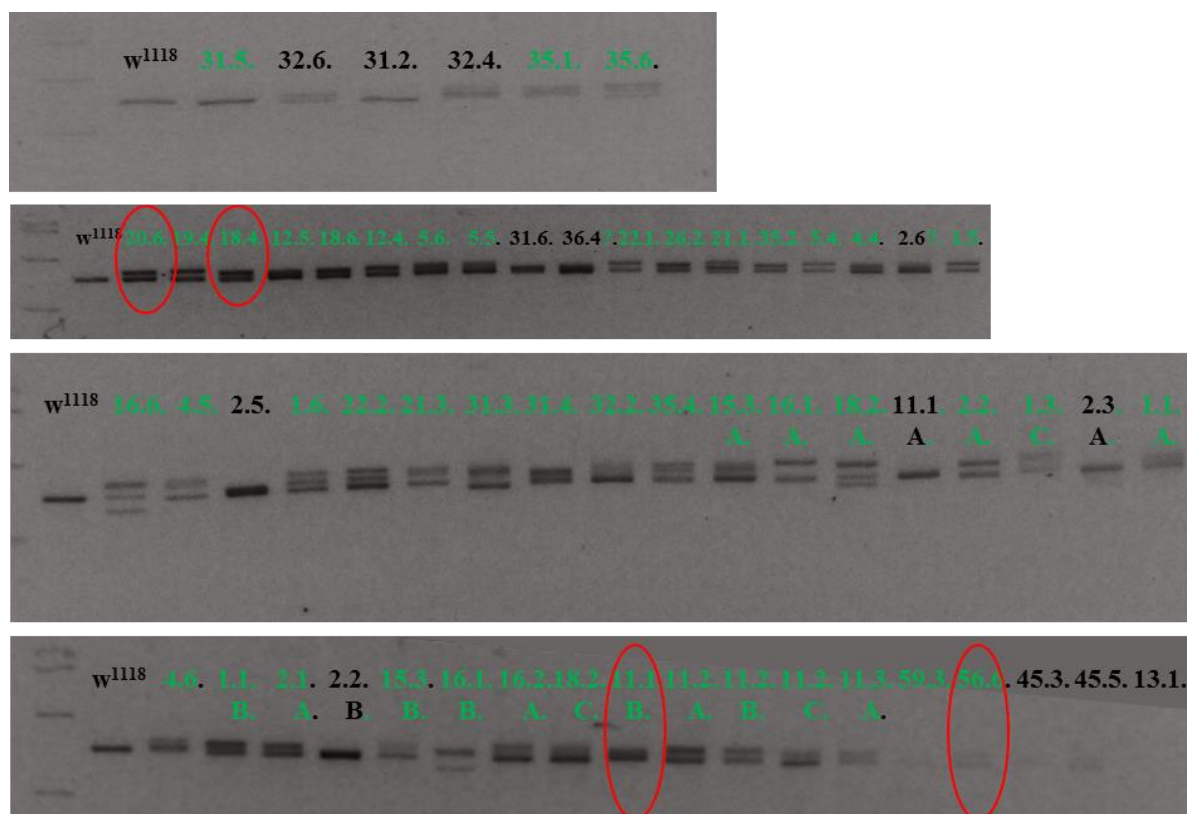
Az F2 utódnemzeteket a szemszín alapján a Cas9 forrásban található GFP marker elvesztésére valamint a gRNS elvesztésére szelektáltuk és a 3. kromoszómáját balanszíroztuk. 90 egyedi keresztezés lett összeállítva.

Az F2 generáció molekuláris szűrésével elkezdjük vizsgálni a deléciók jelenlétét. Az F2 generációban a mutáció heterozigóta formában van jelen. 200-300bp-os PCR termék

amplifikálásával lehetőség volt a PCR során annak utolsó ciklusában keletkező heteroduplex termékek kimutatására 4%-os agaróz gélelektroforézis alkalmazásával(17.). A markerek alapján azonosított állatokat egyedileg bekeresztettük balanszeres állatokkal és a keresztezést követő 5. napon a lárvák megjelenésével a keresztezést sikeresnek értékeltük és az F2 szülőket eltávolítottuk. Az F2 mutáns, jelölt állatokból DNS-t izoláltunk és a gRNS környezetében a Grip163test_fw2. és Grip163test_rev2. primerekkel egy 296 bp-os fragmentumot amplifikáltunk. A vad típusban egy egyedi sávban futott a DNS, míg a mutáns jelöltekben létraszerű megjelenése volt a futtatott DNS-nek a keletkezett heteroduplexeknek köszönhetően (17.) (9.Ábra).

Közel 70 jelölt törzs molekuláris ellenőrzésével 41 törzset alapítottunk. Ezeket a törzseket a balanszírozás után további molekuláris ellenőrzésnek vetettük alá.

15 deléciós jelölt homozigótából a gRNS kötőhely környezetében lévő genomi régiót felamplifikáltuk és a PCR terméket tisztítás után megszekvenáltattuk.

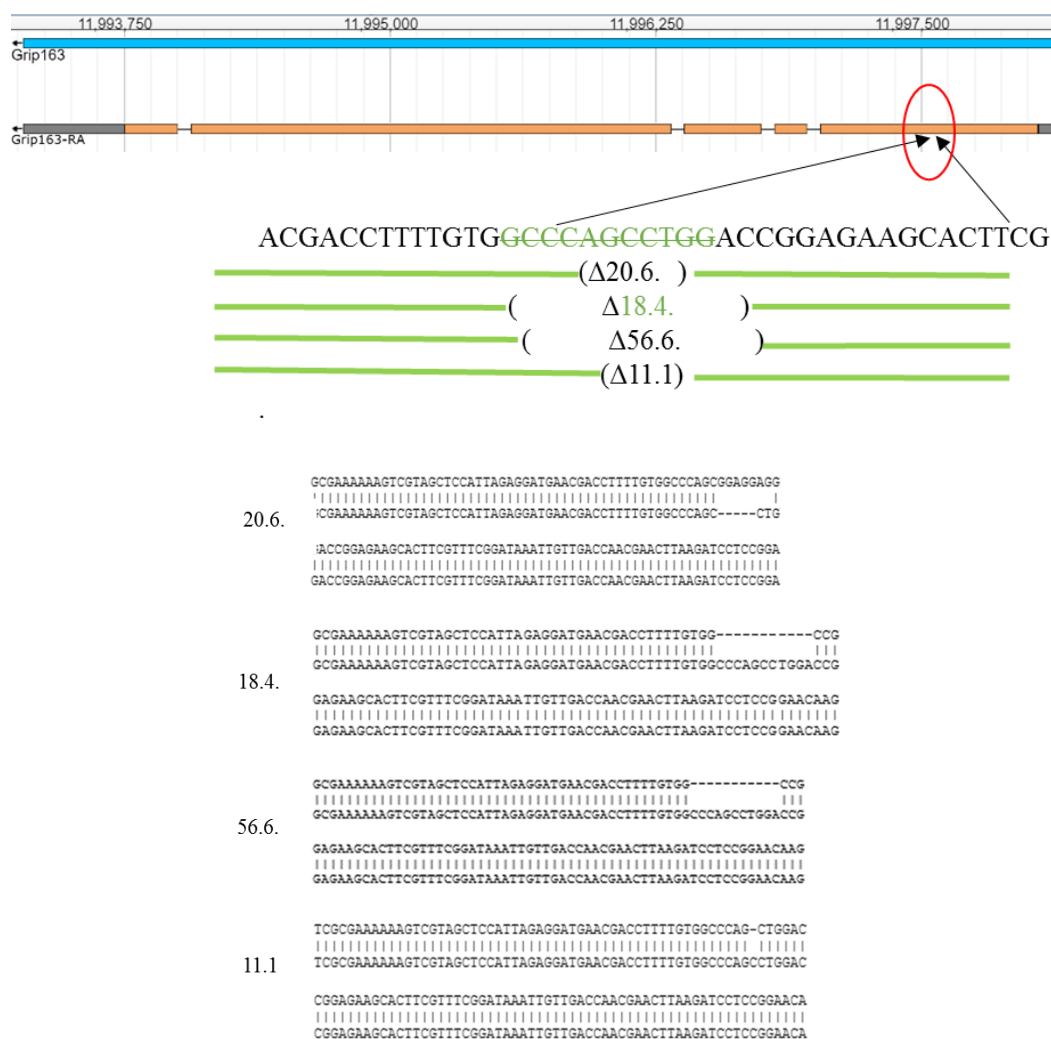


9. Ábra: Reprezentatív példa a deléciós heterozigótákból amplifikált PCR termékben jelenlévő heteroduplex vizsgálatára agaróz gélelektroforézis segítségével. A szekvenáltatott vonalak zölddel vannak kiemelve, míg a deléciós mutánsok pirossal vannak bekarikázva.

A szekvenálás kiértékelését a szekvenciák referencia genomhoz történő illesztésével végeztük el. Eltérő számú bázis deletálódott a különböző törzsekben, amely lehetőséget adott különböző méretű deléciók vizsgálatára. Ennek alapján a 15 vizsgált vonalból 11 esetben a deléció nem változtatta meg a leolvasási keretet, un. indel mutációt hozott létre, míg 4 esetben a leolvasási keret megváltozott és ezzel funkcióvesztéses mutációkat sikerült létrehozni.

4 olyan törzset választottunk ki, amelyekben a deléció megváltoztatta a leolvasási keretet és ezáltal a csonka, csupán 234 aminosavas fehérjében (*Grip163^{Δ18.4}*), egy korai STOP kodont idézett elő (10. Ábra). A továbbiakban a négy frameshift mutációval rendelkező vonalból egyet a *Grip163^{Δ18.4}*-t választottuk ki további részletes fenotípusos jellemzésre.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a kiválasztott gRNS alkalmas volt a Grip163 génben kis méretű deléció előidézésére. A mutáns jellemzésén kívül ez előre jelezte, hogy *in vivo* genomi jelölésre is alkalmas lehet a kiválasztott gRNS.



10. Ábra: A Grip163 génben indukált deléciók helyzete. A mutánsok szekvenálása után a kapott szekvenciákat a referencia genomhoz illesztettük. (szaggatott fonal mutatja a deléció helyét)

4.2. Grip163 mutáns törzsek fenotípusának jellemzése

4.2.1. A mutánsok fertilitásának tesztelése

Miután molekuláris módszerekkel is bizonyítottuk a deléció meglétét a leolvasási keret eltolódást előidéző deléciós *Grip163^d* mutáns vonalakban, azok fenotípusos jellemzését végeztük el. Megállapítottuk, hogy minden vonal esetében a mutáció homozigóta formában életképesnek bizonyult.

A keresztezések során elsőként az állatok fertilitását teszteltük. A homozigóta mutáns hímeket és nőstényeket egyenként fertilitási tesztben vizsgáltuk.

A nőstények minden törzsben homozigóta formában fertilisnek bizonyultak, nem mutattak eltérést az utódszámban a vad típushoz képest.

A homozigóta hímek szintén fertilisnek bizonyultak, kivéve a leolvasási keret eltolódási mutációt hordozó *Grip163^{A11.1}*; *Grip163^{A20.6}*, *Grip163^{A18.4}*, és a *Grip163^{A56.6}* vonal esetében, ahol a homozigóta hímek teljesen sterilnek bizonyultak (5. Táblázat). A fertilitási tesztekben a heterozigóta testvéreket, illetve vad típusú hímeket használtuk kontrollként.

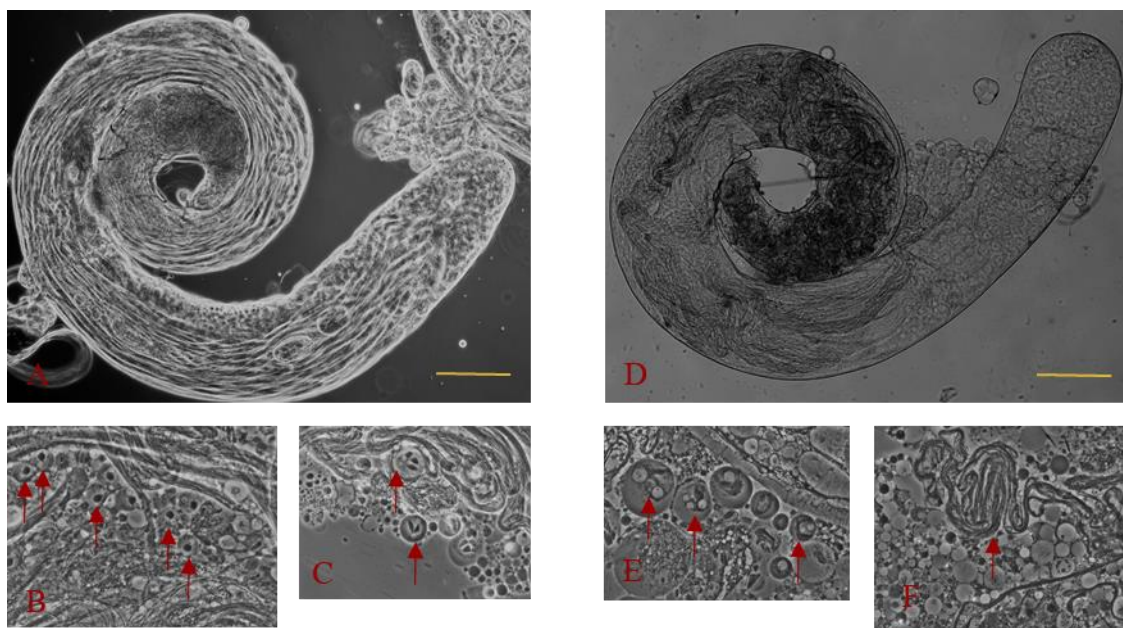
Gén	Mutáns allél	Deléció(bp)	Homozigóta formában
Grip163	<i>Grip163A11.1.</i>	1	Hím steril
	<i>Grip163A20.6.</i>	5	Hím steril
	<i>Grip163A18.4.</i>	11	Hím steril
	<i>Grip163A56.6.</i>	11	Hím steril

5. Táblázat:A fertilitási tesztek eredménye a leolvasási keret eltolódási mutációt tartalmazó törzseknél

4.2.2. A mutánsok testiszének morfológiai jellemzése

A mutáció okozta sterilitás további jellemzésére a spermatogenezis stádiumainak részletes analízisét végeztük el a *Grip163^{A18.4}* jelű törzs esetében. A homozigóta *Grip163^{A18.4}* hímek testiszének boncolását és fáziskontraszt mikroszkópiás vizsgálatát követően megállapítottuk, hogy a szeminális vezikulumok nem tartalmaznak érett mozgó spermiumot. Vizsgáltuk továbbá a mitokondriumok szerkezetét a korai és késői stádiumokban (11. Ábra). A kontroll mintában a kerek spermatidákban a sejtmag:Nebenkern arány 1:1 volt, ami jelentősen eltért a *Grip163^{A18.4}* mutánsokban tapasztalt arányoktól (11. Ábra). Sok esetben a mitokondrium származékok nem

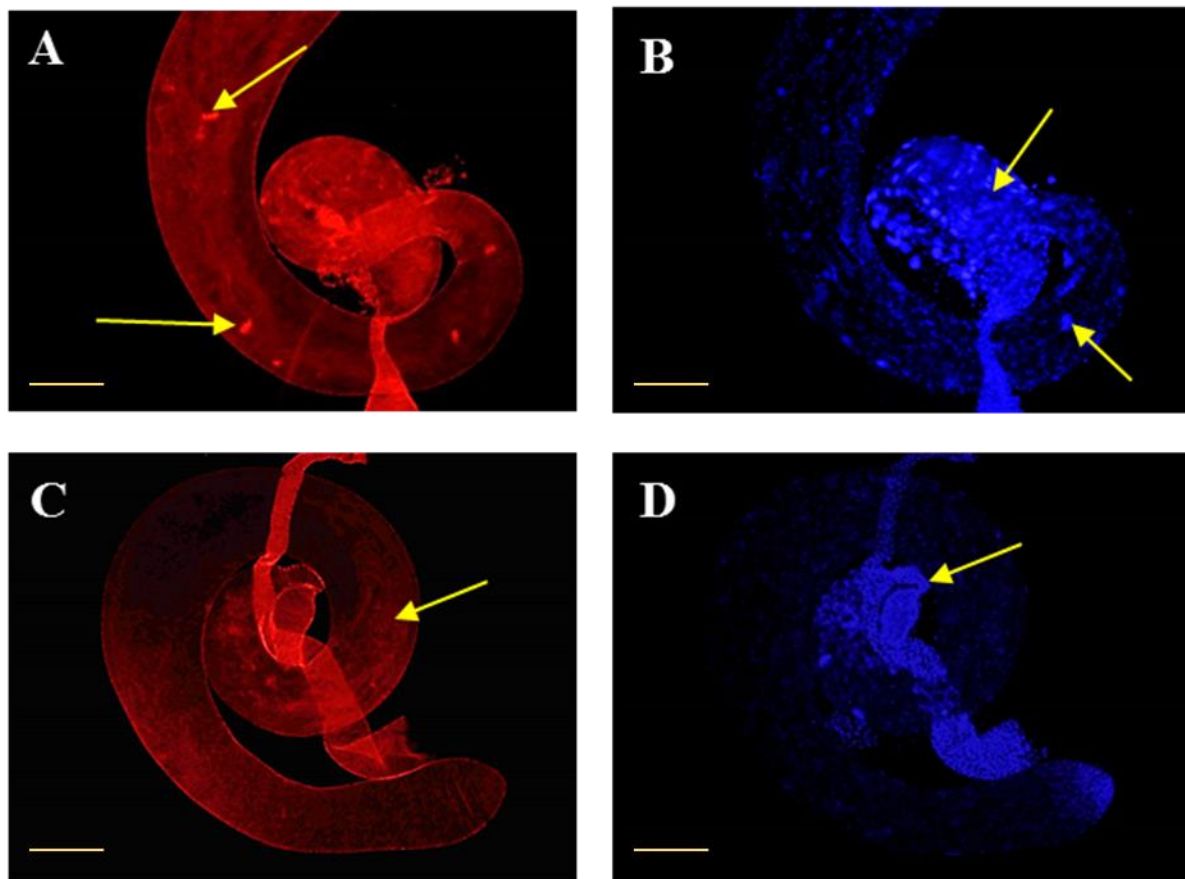
alakultak ki és a ciszták rendezetlenek voltak. Ez a korai fenotípus nem figyelhető meg a t- γ -TuRC gének mutánsainál.



11.Ábra Tesztisz fáziskontraszt mikroszkópos vizsgálata vad típusú (A, B, C) és *Grip163^{A18.4}* (D, E F) mutánsban vizsgálva. Vörös nyilak jelzik a kerek spermatidákat és azokban a mitokondrium származékokat (Nebenkern), illetve a megnyúlt spermatidákat (F). Lépték: 50 μ m.

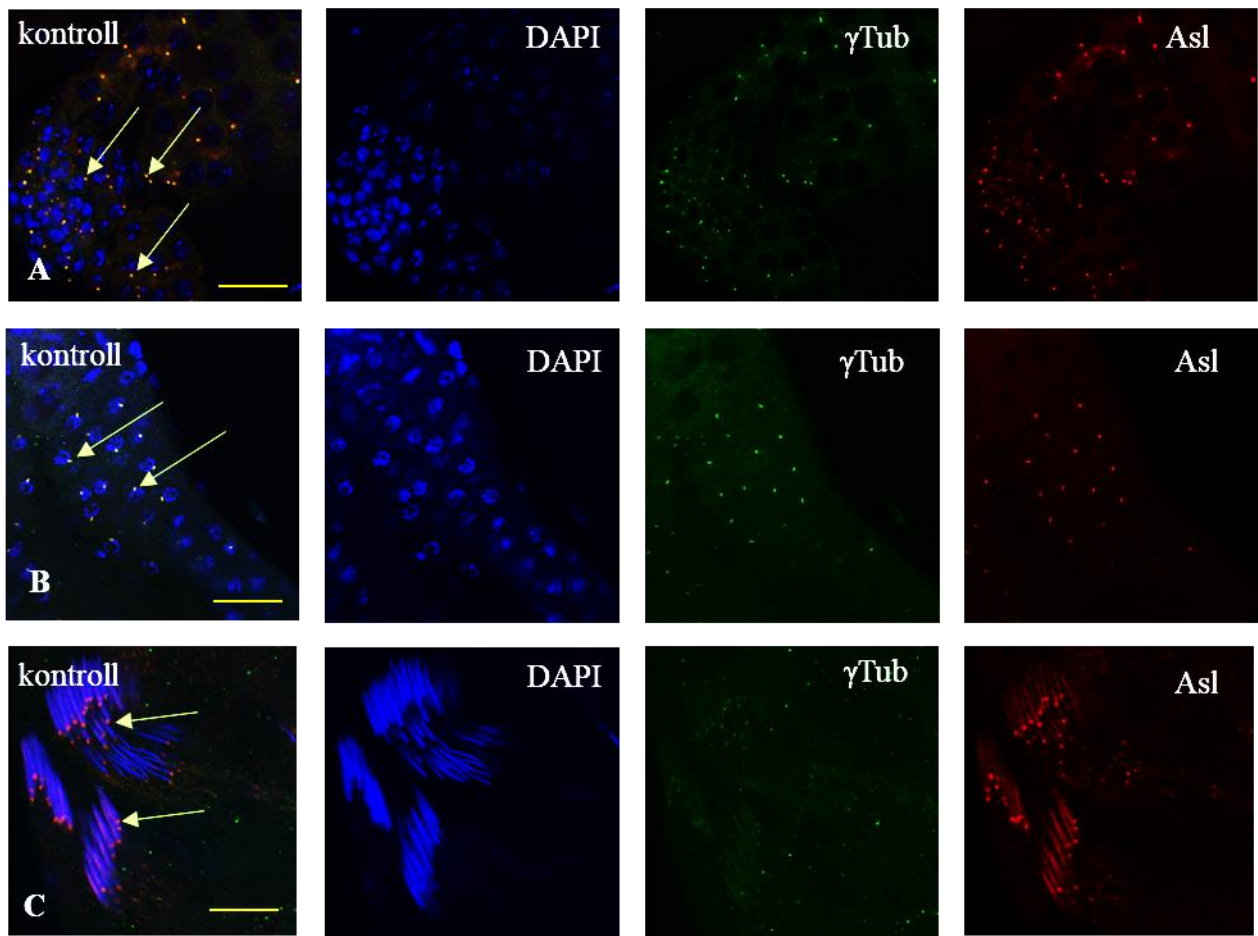
A további jellemzés céljából a sejtmagok (DAPI) és az aktin citoszkelton (Phalloidin) vizualizálásával kívántuk a részletesebb analízist folytatni.

A festés során használt DAPI az adenin és timin gazdag sejtmagokat festi, míg a Phalloidin az F-aktinból álló aktinkúpokat, mely a *Drosophila* spermium cisztáiban a bazális vég felé találhatóak. A kontrollban a sejtmagok megnyúlása, az aktinkúpok kialakulása és az érett spermiumok jelenléte a szeminális vezikulumban is megfigyelhető (12. Ábra). A *Grip163^{A18.4}* mutáns esetében a meiózist követően a sejtmagok rendezett megnyúlása nem volt megfigyelhető és az aktin kúpok sem alakultak ki. Ez az eredmény azt sugallja, hogy a *Grip163^{A18.4}* mutáns esetében már a meiótikus stádiumok is érintettek lehetnek (12. Ábra). Míg a t- γ -TuRC mutánsok esetében késői, poszt-meiotikus fenotípusok figyelhetők meg, ahol a ciszta megnyúlása, és az aktin kúpok kialakulása normális, addig a *Grip163^{A18.4}* esetében egy korábbi stádiumokat érintő hiba miatt áll le a spermatogenezis.



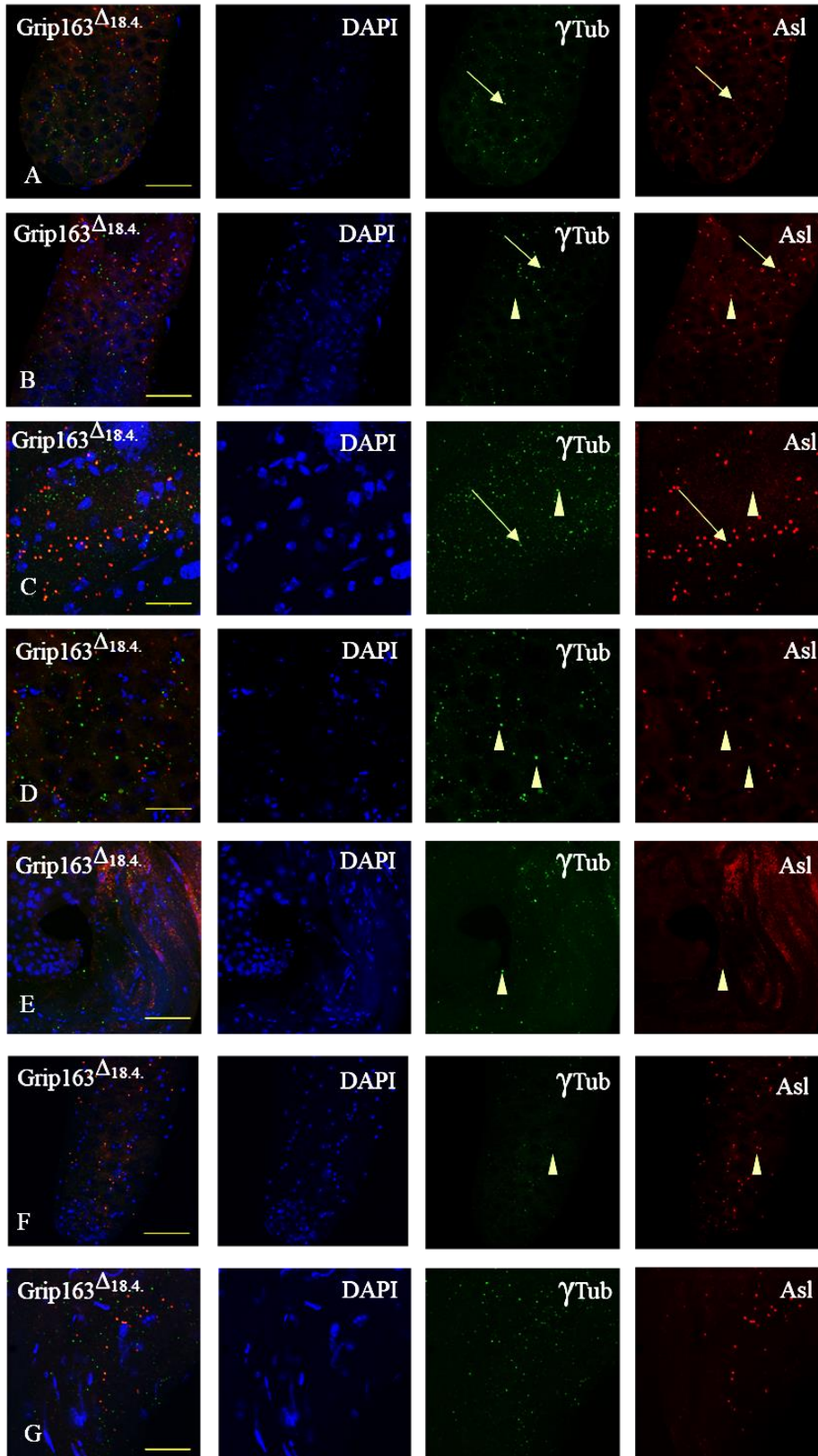
12.Ábra Aktin (A,C) és sejtmag (B,D) festés vad típusú és *Grip163^{Δ18.4}* mutáns testiszeken, DAPI és Phalloidin festékekkel. Az aktin kúpok és a megnyúlt sejtmagok, illetve azok hiánya sárga nyíllal van jelezve Lépték: 50 μ m

A γ -TuRC fehérjéről kutatócsoportunk megállapította, hogy képesek kötni a gamma-Tubulint és mutánsaikban annak bazális testről, mitokondriumokról történő disszociációja volt megfigyelhető. Szerettük volna megvizsgálni, hogy vajon a *Grip163^{Δ18.4}* mutáns esetében a gamma-Tubulin lokalizációja érintett-e. Vad típusú és *Grip163^{Δ18.4}* homozigóta mutáns hímekből testiszeket izoláltunk és fixáltunk, majd gamma-Tubulinra és az Asterless (Asl) centroszómális fehérjére immunfestettük őket, valamint a sejtmagot DAPI-val tettük láthatóvá, majd konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk a mintákat (13.ábra)



13.Ábra:Kontrollként szolgáló vad típusú izolált Drosophila tesztiszek gamma-Tubulin és Asterless immunfestéssel és DAPI-val festve, (A) Tesztisz apikális régiója a lokalizálódó gamma-Tubulin és centroszómákkal (zöld nyíl), (B) Meiotikus szakasz kerek spermatidái, lokalizációk zöld nyíllal, (C) Poszt-meiotikus stádium vándorló aktinkúpjai (zöld nyíl), Lépték:10 μ m

Vad típusban a spermatogenezis során a tesztisz apikális részén , a szomatikus γ -TuRC Grip fehérjék nagy mennyiségben vannak jelen, jól látható a gamma-Tubulin lokalizációja a centroszómákhoz (13. ábra: (A) , sárga nyilak). Az apikális csúcstól távolodva a kerek spermatidák esetében, a gamma-Tubulin a bazális testhez lokalizálódik (13.ábra: (B) , sárga nyilak). A poszt-meiotikus megnyúlási szakaszban az individualizációs komplex kialakulása során láthatjuk az F-aktinból álló kúpokat, amelyek a ciszták sejtmagjai körül jönnek létre (13.ábra (C) sárga nyilak). Ezek az aktinkúpok szinkronizáltan vándorolnak a tesztisz bazális vége felé.



14.Ábra: Homozigóta *Grip163^{Δ18.4}* tesztiszek immusfestése gamma-Tubulin és Asterless ellenanyaggalvalamint DAPI-val. (A) Apikális tesztisz régió részben lokalizálódó gamma-Tubulinokkal, (B, C) Korai stádiumok részben lokalizálódó gamma-Tubulinnal, (D,E,F,G) Bazális rész felé közeledve a lokalizáció hiánya valamint hiányzó aktin kúpok(zöld nyíl:lokalizáció, zöld nyílhegy: nem lokalizálódó sejt Lépték: 10 μm

A *Grip163* ^{$\Delta 18.4$} deléciós mutáns esetében a csúcsi részen részleges a gamma-Tubulinok lokalizációját tapasztaltuk (14. ábra A). Ez arra utalhat, hogy a gyűrűkomplex csak részlegesen kezdett összeszerelődni. A meiotikus stádiumban azonban az eltérés már jelentős mutat a vad típushoz képest. A sejtmagok rendezett megnyúlása elmaradt és aktinkúpok sem alakultak ki a *Grip163* ^{$\Delta 18.4$} mutánsban (14. Ábra C,D). Ez a megfigyelés azt bizonyíthatja, hogy ellentétben a t-Grip génekkel, ahol meiotikus stádiumokban a vad fenotípus volt megfigyelhető a *Grip163* valószínűleg már a meiózist előtti gyűrűkomplexekben is fontos szerepet tölt be. A poszt-meiotikus stádiumokban mind a ciszták megnyúlása elmarad és az aktinkúpok sincsenek jelen a *Grip163* ^{$\Delta 18.4$} deléciós mutánsban.

Összefoglalva elmondható, hogy a *Grip163* gén hiánya nem okozta az állatok letalitását, de a homozigóta hímek sterilnek bizonyultak. A *Grip163* ^{$\Delta 18.4$} mutánsban bár a spermatogenezis korai stádiumai lezajlanak, a késői stádiumok nem alakultak ki, a bazális test komponensei jelentős abnormalitást mutattak.

4.3. *Grip163 in vivo* GFP jelölt törzsek létrehozása és molekuláris ellenőrzése

A *Grip163* gRNS sikeresnek bizonyult a genom módosítására, ezért ennek segítségével a gén *in vivo* GFP jelölését tűztük ki további célul. Ennek megvalósításához először létre kellett hozni a gRNS környezetére specifikus homológ karokat és a leolvasási keretbe illeszkedő GFP-t tartalmazó vektort. Ebben a vektorban a PAM szekvenciák mutáltatva voltak, hiszen csak a genomban található gRNS felismerő helyen kívántuk a DNS vágását előidézni (Függelék). Csoportunk munkatársai állították elő ezt a vektort és teljes szekvenálását követően rendelkezésemre bocsájtották.

Az *in vivo* jelöléshez az embrióban egyszerre kell a gRNS-nek, a Cas9-nek, valamint a homológ karokat és GFP-t tartalmazó vektornak jelen lenni, hogy a genom módosítása megtörténhessen. A gRNS törzset és a vas-Cas9 törzset összekeresztezve 210 embrióit injektáltak az ELKH, SZBK, Genetikai Intézetének injektáló szolgálatánál, az általunk adott pJet-*Grip163*-GFP vektorral.

A kapott embriókból kikelt állatokat a 15. ábrán látható keresztezési séma alapján állítottuk törzsbe.

$$P: \quad \text{♀} \quad \frac{\text{vasCas9}}{\text{vasCas9}} \frac{+}{+} \frac{+}{+} \quad \times \quad \frac{w}{y} \frac{\text{gRNA-Grip163}}{\text{gRNA-Grip163}} \frac{+}{+} \quad \text{♂}$$

A keresztezés embrióiba injektálták a pJet-GFP-Grip163 vektort

$$F1: \quad \frac{\text{vasCas9}}{w/y} \frac{\text{gRNA-Grip163}}{+} \frac{?(GFP-Grip163)-?}{+} \quad \times \quad \frac{w}{w/y} \frac{+}{+} \frac{\text{TM3, Sb, Ser}}{\text{TM6, Tb, Hu}}$$

$$F2: \quad \text{♀} \quad \frac{w}{w} \frac{+}{+} \frac{-(GFP-Grip163)-}{\text{TM3, Sb, Ser}} \quad \times \quad \frac{w}{y} \frac{+}{+} \frac{\text{TM3, Sb, Ser}}{\text{TM6, Tb, Hu}} \quad \text{♂}$$

$$\text{♂} \quad \frac{w}{y} \frac{+}{+} \frac{-(GFP-Grip163)-}{\text{TM3, Sb, Ser}} \quad \times \quad \frac{w}{w} \frac{+}{+} \frac{\text{TM3, Sb, Ser}}{\text{TM6, Tb, Hu}} \quad \text{♀}$$

PCR ellenőrzés

$$\text{♀} \quad \frac{w}{w} \frac{+}{+} \frac{-(GFP-Grip163)-}{\text{TM6, Tb, Hu}} \quad \times \quad \frac{w}{y} \frac{+}{+} \frac{-(GFP-Grip163)-}{\text{TM6, Tb, Hu}} \quad \text{♂}$$

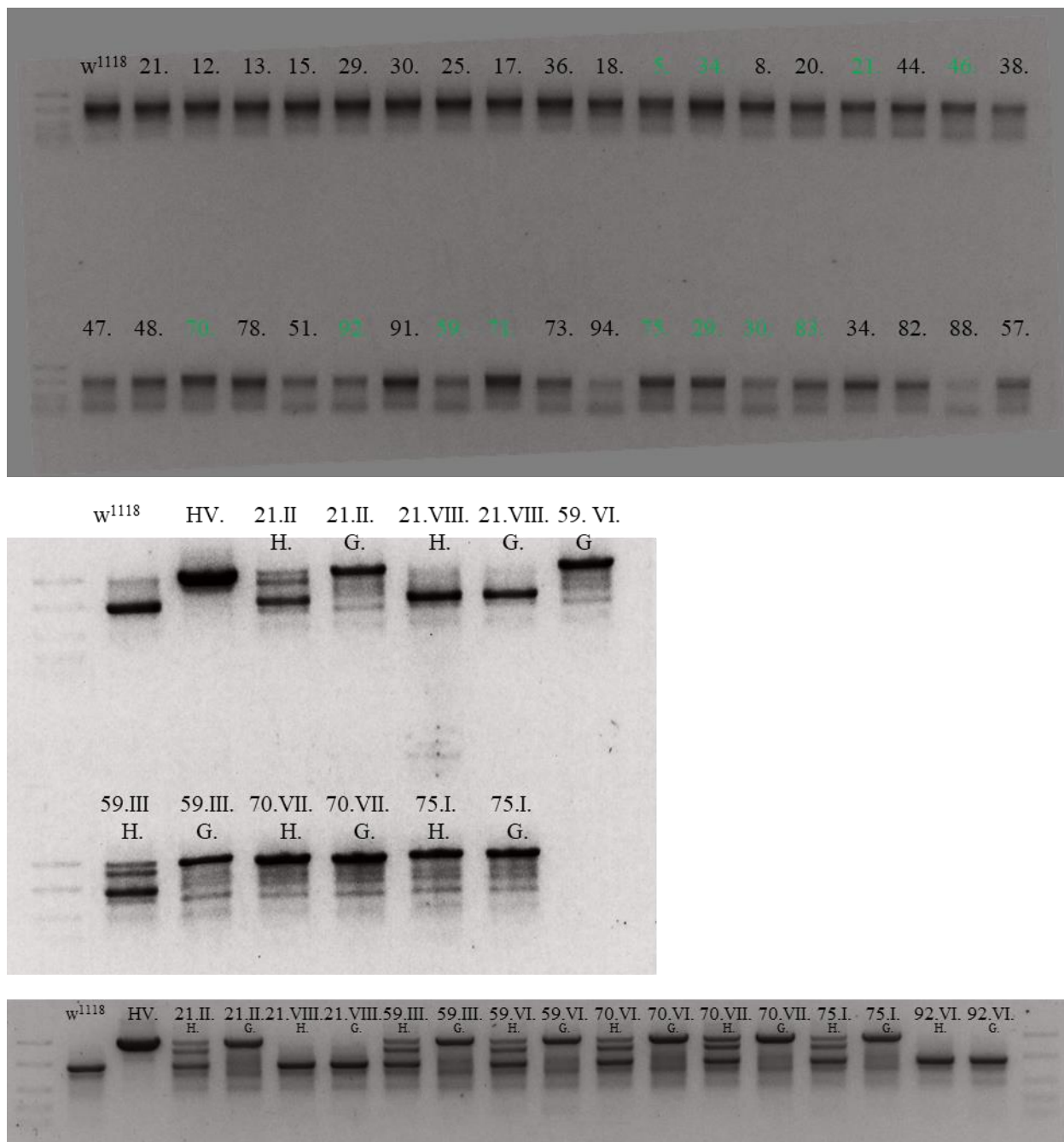


$$\frac{w}{w/y} \frac{+}{+} \frac{-(GFP-Grip163)-}{-(GFP-Grip163)-}$$

15. Ábra: *in vivo* jelölt GFP törzsek létrehozásának keresztezési sémája

Az F1-ben összeállított 140 egyedi keresztezésből kikelt F2 utódnemzedékben fluoreszcens sztereomikroszkóppal szelektáltunk a Cas9 eltűnésére. A Cas9 transzgén egy szemben expresszálódó GFP markert tartalmaz, így ennek hiányára, valamint a gRNS plazmidban található mini-white marker eltűnésére szűrve válogattuk ki azokat az állatokat, amelyeket a balanszeres törzzsel történt keresztezést követő 5. napon PCR segítségével teszteltük.

A GFP Grip163 génbe történő beépülését a GFP-Grip163_fw. és rev. primerrel PCR ampilifikációval döntöttük el. A PCR termékeket 1% és 2%-os agaróz gélben futtattuk (16. Ábra).



16. Ábra: GFP jelölt legyek PCR-val való tesztelése. A várt termék egy 1500 bp hosszúságú termék volt. Az első futtatás alapján pozitívnak bizonyuló jelöltek(első gélképen zöld színnel) a továbbiakban ellenőrzések céljából lettek újra futtatva. (HV.: Homológ kart tartalmazó vektor plazmid, H.: Heterozigóta, G.: Homozigóta)

A közel 40 db PCR ellenőrzés során pozitívnak bizonyult törzsből stabil vonalakat alapítottunk. 8 db homozigóta jelölt vonalból a beépülés helyének környezetét ismét amplifikáltuk és a PCR terméket megszekvenáltattuk.

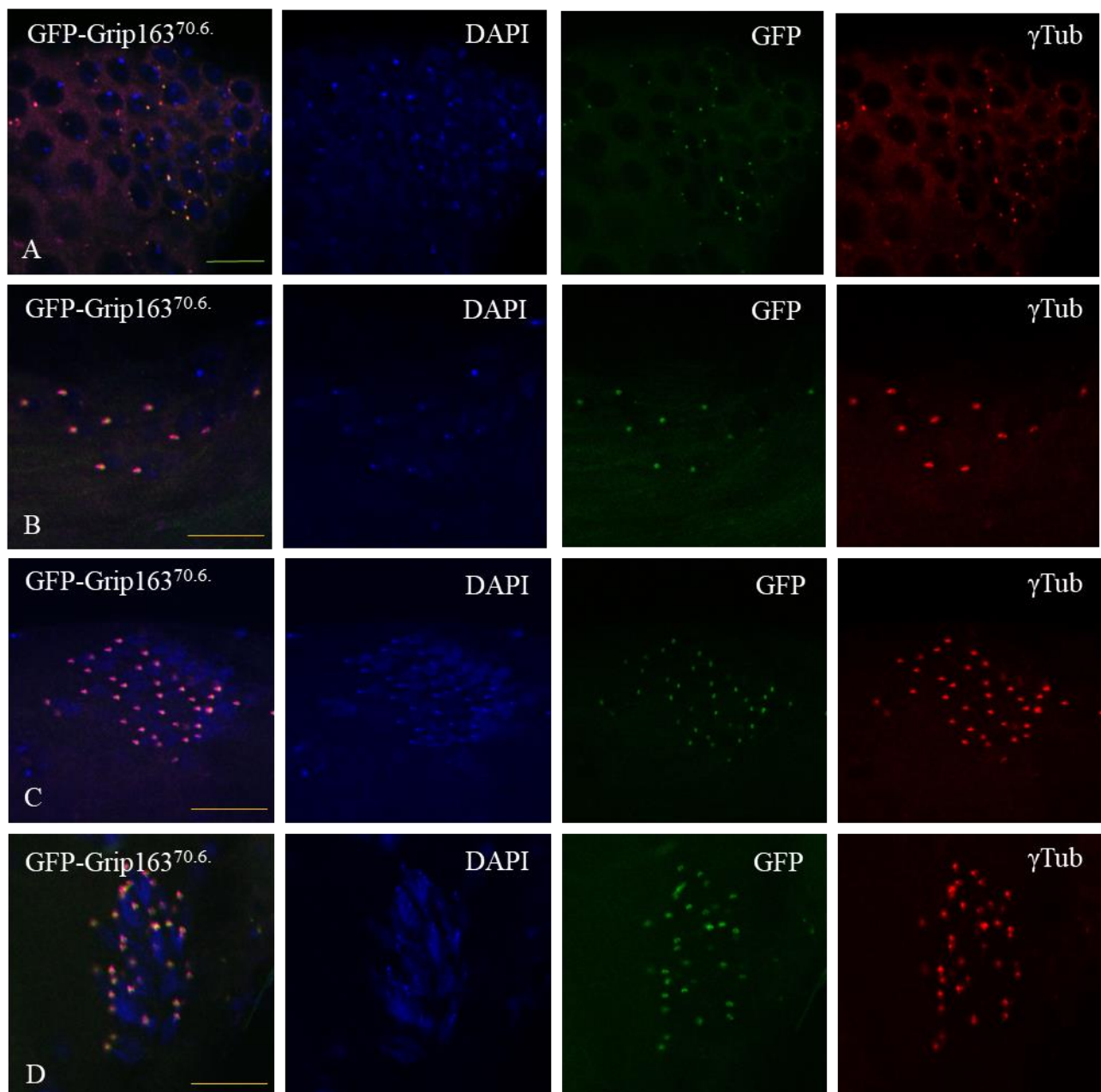
A szekvenálás kiértékelése után a beépült GFP-t tartalmazó vonalakból törzseket alapítottunk a 16. ábrán látható keresztezési séma alapján. 6 független vonalat alapítottunk, amelyeket várt beépülés környezetére specifikus szekvenálással is ellenőriztünk. Stabil GFP-Grip163 törzseket alapítottunk.

4.4. Grip163 *in vivo* GFP jelölt törzsek fenotípusának jellemzése és kifejeződési mintázatának leírása

A Grip163-GFP vonalak jellemzését a homozigóta állatok fertilitásának tesztelésével ellenőriztük. Abban az esetben, ha a GFP beépülése nem zavarja meg a fehérje képződését és a fehérje működőképes, akkor a homozigóta hímek fertilisek. Mind a 6 vizsgált Grip163-GFP vonalban normális fertilitást és tesztiszmorfológiát tapasztaltunk.

A Grip163-GFP sejten belüli eloszlását fluoreszcens mikroszkópia segítségével vizsgáltuk. A stabil vonalakból tesztiszeket boncoltunk és fixálás után konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk a GFP jel eloszlását. A Grip163-GFP jel bár gyengén, de egyértelműen centroszómális felhalmozódást mutatott a fejlődő ivarsejtekben. A tesztiszeket gamma-Tubulin ellenanyaggal immunfestettük és megvizsgáltuk a Grip163-GFP kolokalizációt. A mikroszkópos felvételeken egyértelműen látszik, hogy a Grip163-GFP és a gamma-Tubulinok a spermatogenezis minden stádiumában átfedő lokalizációt mutattak (17.Ábra). A poszt-meiotikus stádiumok részletes vizsgálata megmutatta, hogy szemben a t- γ -TuRC fehérjékkel, amelyek a meiózist követően három független mikrotubulus szervező központhoz is kapcsolódtak (bazális test, apikális magfelszín, mitokondrium felszíne), a Grip163-GFP csak a bazális testhez lokalizálódott, sem a mag apikális végén, sem a poszt-meiotikus mitokondriumok felszínén nem tapasztaltunk GFP jelet.

Ezek az eredmények felvetik annak a lehetőségét, hogy a szomatikus sejtekre jellemző, tesztisz-specifikus paralóggal nem rendelkező γ -TuRC tagok is jelen lehetnek a spermatogenezis késői stádiumaiban és a t- γ -TuRC fehérjékkel közösen alkothatnak komplexet. A továbbiakban további festési eljárásokkal szeretnénk megbizonyosodni a GFP-Grip163 pontos lokalizációs mintázatáról. Ennek a felvetésnek a biokémiai és hisztokémiai bizonyítása a csoport jelenlegi és jövőbeli kutatásának témája.



17. Ábra: Grip163-GFP^{70.6} homoizgóta hímek tesztiszének immunfestése gamma-Tubulin ellenanyaggal valamint DAPI-val. (A) tesztisz apikális régiója (B) kerek spermatociták (C, D) megnyúlt spermatidák. Lépték: 15µm

5. Összefoglalás

A mikrotubulusok fontos szerepet játszanak a kromoszómák szétválásánál a sejtosztódás során, az intracelluláris transzportfolyamatoknál, a sejtszervecskék lokalizációjában és mozgásában, valamint a sejtek mozgásában. A mikrotubulusok irányított növekedése az evolúciósan konzervált gamma-Tubulin gyűrűkomplexből (γ -TuRC) indul. A sejten belüli változatos mikrotubulus hálózat egy dinamikusan változó, adott esetben specializált γ -TuRC létezését feltételezi. A gyűrűkomplex belső magja egy gamma-Tubulint kötő kisebb komplexből épül fel (γ -TuSC, Grip84, Grip91), amelyhez további fehérjék (Grip128, Grip163, Grip75) kapcsolódnak, létrehozva a γ -TuRC-et. Csoportunknak korábban sikerült azonosítani és jellemezni három testisz-specifikus γ -TuRC paralóg gént (5). A t-Grip84, t-Grip91 és t-Grip128 fehérjék a spermatogenezis poszt-meiotikus stádiumaiban szükségesek a spermátidákban jelen lévő mikrotubulus szervező központok kialakításához a bazális testen, a megnyúló sejtmagok apikális csúcsán, valamint a mitokondriumok felszínén.

A t- γ -TuRC tagjainak jellemzése során felmerült a kérdés, hogy vajon a különböző MTOC-kben lokalizálódó t- γ -TuRC összetétele azonos vagy eltérő lehet. A γ -TuRC fehérjék közül a Grip163 volt egyedülként azonosítva a spermium proteom részeként, sugallva ezzel annak jelenlétét a spermatogenezis alatt. Célul tűztük ki a Grip163 szerepének meghatározását a *Drosophila* spermatogenezisének különböző stádiumaiban.

Célunk megvalósítását egy klasszikus deléciós mutáns előállításával kezdtük. Az utóbbi években nagy sikerrel alkalmazott CRISPR-Cas9 rendszer lehetővé teszi, hogy a kiválasztott génben a specifikus gRNS-ek függvényében indukáljunk kisebb vagy nagyobb deléciókat. A Grip163 génben egy a gén elejére specifikus gRNS-t kiválasztva kis méretű deléciókat idéztünk elő és mutáns törzseket alapítottunk. A homozigóta mutáns vonalak klasszikus genetikai és molekuláris jellemzésével megállapítottuk, hogy a Grip163 null mutánsok életképesek, de a hímek sterilek. Az azonosított 4 mutáns vonal (*Grip163*^{A11.1}, *Grip163*^{A20.6}, *Grip163*^{A18.4}, és a *Grip163*^{A56.6}) közül a *Grip163*^{A18.4} vonalat részletesen jellemeztük. A fenotípusos kiértékelésből arra következtettünk, hogy a *Grip163*^{A18.4} vonal esetében bár a spermatogenezis korai stádiumai lezajlanak, azok hibásak, a meiotikus osztódások során abnormalis ciszták jönnek létre és azok megnyúlása nem történik meg. A sejtmagok és a citoskeleton festésével megerősítettük a *Grip163*^{A18.4} korai spermatogenezis hibáját, valamint bemutattuk, hogy a bazális test komponensei jelentős abnormalitást mutatnak. A t- γ -TuRC mutánsok ezzel ellentétben mind a spermátidák fejlődésének késői stádiumaiban mutattak fenotípust. Ezen eredmények

alapján arra következtettünk, hogy a kiválasztott gRNS alkalmas lehet a CRISPR-Cas9 rendszer felhasználásával a gén *in vivo* saját kromoszómális környezetében történő jelölésére is.

A Grip163 fehérje N-terminális végéhez közel terveztünk egy internális GFP beépítést, ezzel intakt módon hagyva a fehérje N- és C-terminális végét, valamint a benne található GCP doméneket. A homológ karokat és a GFP-t tartalmazó vektort a gRNS-t és Cas9-et egyaránt kifejező embriókba injektáltattuk. Törzsalapítás és molekuláris jellemzést követően megállapítottuk, hogy a GFP a leolvasási keretbe, a kiválasztott pozícióba épült be a Grip163 kódoló szelvénciájába. Az alapított törzsek homozigóta életképeseknek és fertiliseknek bizonyultak, jelezve, hogy a GFP nem zavarja a fehérje funkcióját, ezért hűen tükrözheti annak sejten belüli lokalizációját. A GFP-Grip163 jelet a spermatogenezis korai stádiumaiban a centroszómákon, majd a meiózist követően a bazális testeken detektáltuk. A t- γ -TuRC fehérjéknél tapasztalt apikális magi, valamint a mitokondrium felszíni lokalizáció nem volt megfigyelhető. Eredményeink megmutatták, hogy a tesztisz-specifikus paralóggal nem rendelkező Grip163 γ -TuRC fehérje jelen van a spermatogenezis késői stádiumaiban is, de szemben a t- γ -TuRC fehérjével, a GFP-Grip163 a három lokalizációs fókusz közül csak a bazális testen halmozódik fel. Csoportunk jelenlegi kutatásai az eltérő felépítésű γ -TuRC biokémiai és hisztológiai jellemzésére fókuszálnak. Ezek az eredmények közelebb vihetnek bennünket az alternatív MTOC-k és a bazális test összetételének jobb megértéséhez a spermatogenezis alatt, valamint az embriókban jelenlévő, a spermiumok által szolgáltatott centroszóma-összetétel pontosabb megismeréséhez.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton is szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Sinka Ritának amiért lehetőséget adott, hogy egy ilyen remek hangulatú kutatócsoportban kezdjek dolgozni. Hálával tartozom amiért végig fáradhatatlanul segítette munkámat, szakmai tanácsaival és útmutatásaival megalapozva szakmai fejlődésemet.

Szeretném megköszönni még Dr. Vedelek Viktornak, hogy bármikor fordulhattam hozzá az esetlegesen felmerülő kérdésekkel és mindig készségesen segített ezekben, valamint Dr. Elham Alzyoudnak a szakmai tanácsait és segítségét.

Köszönet illeti még Hajdúné Tóth Melindát és Bodroginé Török Anikót akik megteremtették a laboratóriumi munkához a szükséges háttérrel.

Irodalomjegyzék:

1. „The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions”: Carsten Janke and Maria M. Magiera (Nature Reviews/Molecular Cell Biology , June 2020/Volume 21)
2. „Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes and beyond”: Corinne A. Tovey and Paul T. Conduit (Essays in Biochemistry (2018) 62 765-780)
3. „Characterisation and Reconstruction of Drosophila γ -Tubulin Ring Complex Subunits”: Ruwanthi N. Gunawardane, Ona C. Martin, Kan Cao, Lijun Zhang, Kimberly Dej, Akihiro Iwamatsu and Yixian Zheng (The Journal of Cell Biology, Volume 151,Number 7, December 25,2000, 1513-1523)
4. „Microtubule nucleation controlled by testis-specific γ -TuRC in Drosophila spermatogenesis”: Elham Alzyoud PhD értekezés
5. „Microtubule Organizing Centers Contain Testis-Specific γ -TuRC Proteins in Spermatids of Drosophila”: Elham Alzyoud, Viktor Vedelek, Zsuzsanna Réthi-Nagy ,Zoltán Lipinszki and Rita Sinka, Frontiers in Cell and Developmental Biology, september 2021, Volume 9, Article 727264
6. „ A Drosophila melanogaster poszt-meiotikus spermatogenezisében szerepet játszó gének vizsgálata”: Vedelek Viktor PhD értekezés
7. „The stem cell niche: lessons from the Drosophila testis.”: de Cuevas, Margaret, és Erika L Matunis. 2011, *Development (Cambridge, England)* 138 (14): 2861–69. doi:10.1242/dev.056242.
8. „Sustained elongation of sperm tail promoted by local remodeling of giant mitochondria in Drosophila”: Noguchi, Tatsuhiko, Michiko Koizumi and Shigeo Hayashi, 2010, 21: 1546–55, doi:10.1091/mbc.E09
9. „Class VI unconventional myosin is required for spermatogenesis in Drosophila”: Hicks, J L, W M Deng, a D Rogat, K G Miller and M Bownes, *Molecular biology of the cell* 10 (12): 4341–53.
10. „The centriole adjunct of insects: need to update the definition.”: Dallai, R., Paoli, F., Mercati, D., and Lupetti, P., Tissue Cell 48, 104–113(2016)
11. „Testisspecific bb8 is essential in the development of spermatid mitochondria”: Vedelek, V., Laurinyecz, B., Kovács, A. L., Juhász, G., and Sinka, R., PLoS One 11:e0161289, (2016)

12. „A splice variant of centrosomin converts mitochondria to microtubuleorganizing centers”: Chen, J. V., Buchwalter, R. A., Kao, L.-R., and Megraw, T. L., Curr. Biol. 27, 1928.e–1940.e.(2017)
13. „Sperm-Leucylaminopeptidases are required for male fertility as structural components of mitochondrial paracrystalline material in *Drosophila melanogaster* sperm”: Laurinyecz, B., Vedelek, V., Kovács, A. L., Szilasi, K., Lipinszki, Z., Slezák, C., et al., PLoS Genet. 15:e1007987(2019)
14. “ γ -TuRC heterogeneity revealed by analysis of Mozart1”: Tovey, C. A., Tubman, C. E., Hamrud, E., Zhu, Z., Dyas, A. E., Butterfield, A. N., et al., Curr. Biol. 28, 2314.e–2323.e.(2018)
15. “A large –scale resource for tissue-specific CRISPR mutagenesis in *Drosophila*”: Fillip Port, Claudia Strein, Benedikt Rauscher, Florian Heigwer, et al., eLife2020,9,e53865(2020)
16. *Drosophila* protocols:William Sullivan, Michael Ashburner, R. Scott Hawley
17. “A simple genotyping method to detect small CRISPR-Cas9 induced indels by agarose gel electrophoresis”: Debanjan Bhattacharya1 & erwin G. Van Meir,Nature Scientific Reports (2019) 9:4437

Ábra források:

- 1.Ábra: „Microtubule nucleation controlled by testis-specific γ -TuRC in *Drosophila* spermatogenesis”: Elham Alzyoud PhD értekezés, módosításokkal
- 2.Ábra: „Microtubule Organizing Centers Contain Testis-Specific γ -TuRC Proteins in Spermatids of *Drosophila*”: Elham Alzyoud, Viktor Vedelek, Zsuzsanna Réthi-Nagy ,Zoltán Lipinszki and Rita Sinka, módosításokkal
- 3.Ábra: „Eukaryotic translation initiation factor eIF4E-5 is required for spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*”-Shao et al., módosításokkal
- 4.Ábra: „Microtubule Organizing Centers Contain Testis-Specific γ -TuRC Proteins in Spermatids of *Drosophila*”: Elham Alzyoud, Viktor Vedelek, Zsuzsanna Réthi-Nagy ,Zoltán Lipinszki and Rita Sinka, módosításokkal
- 5.Ábra: „Microtubule Organizing Centers Contain Testis-Specific γ -TuRC Proteins in Spermatids of *Drosophila*”: Elham Alzyoud, Viktor Vedelek, Zsuzsanna Réthi-Nagy ,Zoltán Lipinszki and Rita Sinka, módosításokkal

6.Ábra: https://en.wikipedia.org/wiki/CRISPR_gene_editing

7.Ábra: FlyBase alapján módosított szerzői ábra

8.Ábra: Szerzői készítésű ábra

9.Ábra: Szerzői készítésű ábra

10.Ábra: FlyBase alapján módosított szerzői ábra

11.Ábra: Szerzői képek

12.Ábra: Szerzői képek

13.Ábra: Szerzői képek

14.Ábra: Szerzői képek

15.Ábra: Szerzői készítésű ábra

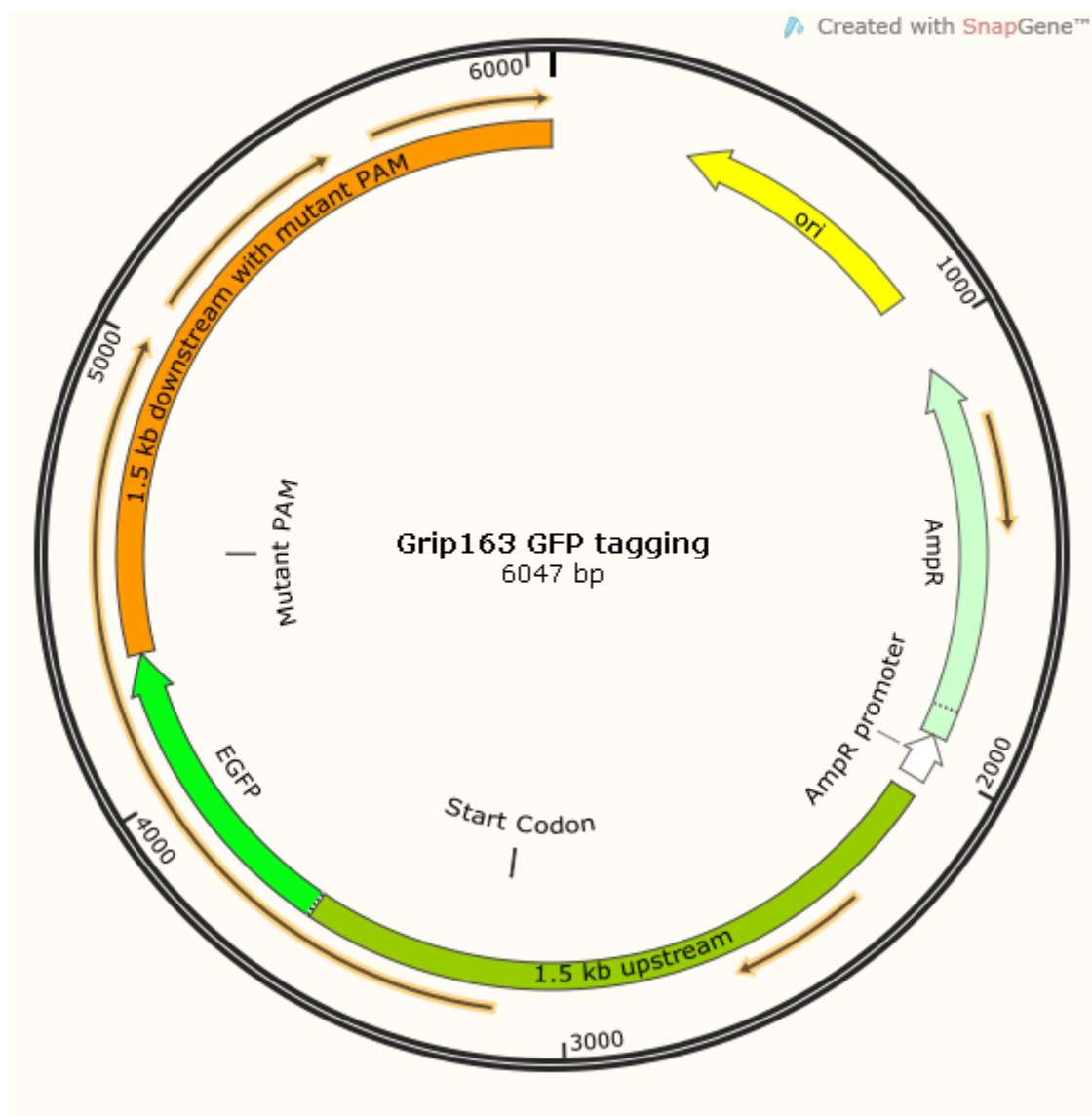
16.Ábra: Szerzői készítésű ábra

17.Ábra: Szerzői képek

Egyéb forrásként vagy munka folyamán használt programok, honlapok:

- <https://flybase.org/>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- SnapGene
- Gimp 2.0.

Függelék



6. A Grip163 gén homológ karjait és GFP-t tartalmazó pJet vektor térképe

Nyilatkozat

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott **Németh Dóra** nyilatkozom, hogy a 36. OTDK-ra benyújtott „**A tesztisz-specifikus gamma-tubulin gyűrűkomplex funkciójának és összetételének vizsgálata *Drosophila melanogaster*ben**” című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Részfeladat	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán [#] jellemezve)
Drosophila törzsek fenntartása, klasszikus genetikai kísérletek tervezése, kivitelezése.	5
A pályamunkában bemutatott keresztezési sémák tervezése/összeállítása.	5
A Drosophila tesztisz preparátumok előkészítése, fixálása, immunhisztokémiai festése	5
A pályamunkában leírt immunhisztokémiai festések mikroszkópizálása.	5
A pályamunkában bemutatott mikroszkópi felvételek illesztése, ábrák elkészítése.	5
Szekvencia analízisek elvégzése.	5

Kelt: Szeged, 2022 november 14



Németh Dóra

Aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Dr. Sinka Rita (SZTE TTIK, Biológia Intézet, Genetikai Tanszék)

Aláírása