

37. OTDK Biológia Szekció

A tesztisz-specifikus proteaszóma genetikai és molekuláris jellemzése

Drosophila melanogasterben

Lepár Dávid

V. évfolyamos biológia-kémia osztatlan tanárszakos hallgató

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Genetikai Tanszék

Témavezető:

Dr. habil. Sinka Rita

tanszékvezető, egyetemi docens

SZEGED

2024

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	4
1.1. A <i>Drosophila melanogaster</i> mint modellorganizmus	4
1.1.1. A <i>Drosophila melanogaster</i> alkalmazása modellszervezetként	4
1.1.2. A <i>Drosophila melanogaster</i> spermatogenezise	4
1.2. A proteaszómális fehérjelebontás	7
1.3. A proteaszóma felépítése	8
1.4. A testisz-specifikus proteaszóma felépítése	9
1.5. A PA200 proteaszóma regulátor	11
2. CÉLKITŰZÉSEK	13
3. ANYAGOK, ESZKÖZÖK, MÓDSZEREK	14
3.1. Klasszikus <i>Drosophila</i> genetikai módszerek	14
3.1.1. Felhasznált törzsek	14
3.1.2. Fertilitási teszt	14
3.2. Molekuláris biológiai módszerek	14
3.2.1. Felhasznált oldatok	14
3.2.2. Polimeráz láncreakció (PCR)	15
3.2.3. DNS izolálás egy légyből	16
3.2.4. Agaróz gélelektroforézis	16
3.2.5. PCR termék klónozása	16
3.2.6. Kolónia PCR	17
3.2.7. Plazmid DNS izolálás	18
3.2.8. Restrikciós emésztés	18
3.2.9. Mikroszkópia, immunfestés	18
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESÜK	21
4.1. Homozigóta <i>Prosβ5R2⁴²⁵</i> mutánsok létrehozása CRISPR/Cas9 technológiával	21
4.2. A deléciós mutánsok molekuláris ellenőrzése PCR-ral	23
4.3. Homozigóta <i>Prosβ5R2⁴²⁵</i> mutáns fenotípusának vizsgálata	24
4.4. A β5R1 gén redundáns szerepének vizsgálata a spermatogenezisben	27
4.5. Az állatok korának változásával a sejtmag fenotípusok változása	29
4.6. Hiszton-protamin átmenet vizsgálata homozigóta <i>Prosβ5R2⁴²⁵</i> mutánsban	30
4.7. Kaszpáz-3 jelenlétének vizsgálata a cisztikus hólyagban immunfestéssel	31
4.8. A hímsteril mutáns fenotípusának menekítése β5R2-GFP-t hordozó transzgénnel	32
4.9. A katalitikus β5R2 alegység lokalizációja	33

4.10. Rpn12R lokalizációjának vizsgálata homozigóta <i>Prosβ5R2^{A25}</i> mutánsban immunfestéssel.....	34
5. ÖSSZEGZÉS, KONKLÚZIÓ	36
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	38
IRODALMI HIVATKOZÁSOK	39
TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS.....	40

1. BEVEZETÉS

1.1. A *Drosophila melanogaster* mint modellorganizmus

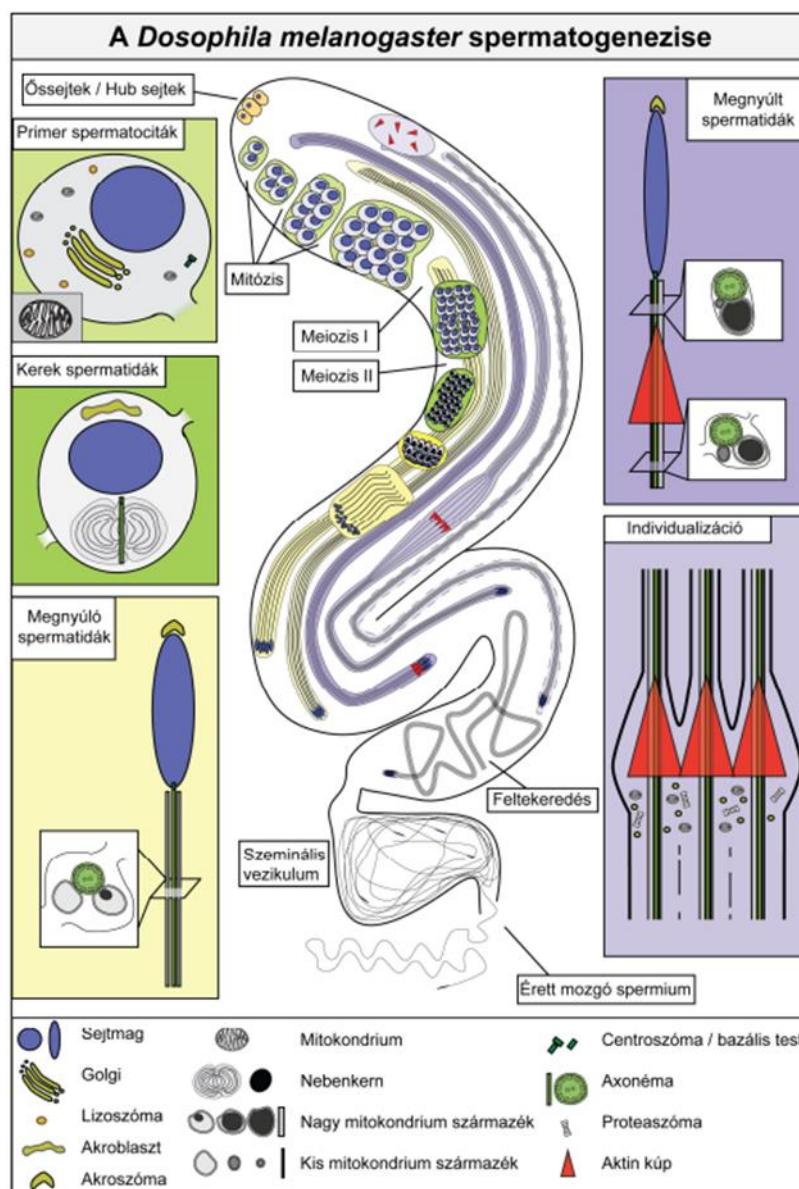
1.1.1. A *Drosophila melanogaster* alkalmazása modellszervezetként

A *Drosophila melanogaster*, vagy ecetmuslica (gyümölcslégy) kulcsfontosságú modellszervezete mind a genetikai, fejlődésbiológiai és sejtbiológiai kutatásoknak. Modellszervezetként való alkalmazása visszavezethető mindazon kedvező tulajdonságaira, miszerint könnyen szaporítható laboratóriumi körülmények között, csupán 4 kromoszómája (három testi és egy nemi) van, és gyorsan hoz új utódnemzedéket. A *Drosophila* genomja 60%-ban megegyezik az emberével, míg a humán betegségek kialakításában szerepet játszó gének 75%-ának van homológja ecetmuslicában.¹ A *Drosophila* genetikai eszköztárának kulcsfontosságú elemei a balanszer kromoszómák, amelyek domináns markerek révén lehetővé teszik a kromoszómák nyomonkövetését az egyes utódnemzedékekben, így lehetővé téve a megfelelő geno- és fenotípusok elkülönítését, valamint lehetőséget biztosítanak recesszív letális mutációk törzsben való fenntartására.

Az ivarsejtek, így a hímivarsejtek kialakulása is egy evolúciósan konzervált folyamat, amely nagyon hasonlóan történik az ecetmuslicában, mint az egérben, vagy az emberben. Továbbá számos olyan emberi sterilításban azonosított gént ismerünk, amelyek megtalálhatók ecetmuslicában.²

1.1.2. A *Drosophila melanogaster* spermatogenezise

A különböző állatcsoportok esetén nagyfokú egyezést mutat a spermiumok szerkezete, azaz kompakt haploid sejtmagot, a mozgásért felelős axonémát és az energiát szolgáltató mitokondriumot tartalmazza. Az ecetmuslica 1,8 mm hosszú spermiummal rendelkezik, mely extrém spermium hosszúság általánosságban jellemző a *Drosophila* fajokra. A *Drosophilát* a spermatogenezis tanulmányozására kiválóan alkalmassá teszi, hogy az utótestéből könnyen izolálható a páros, feltekeredett csőre emlékeztető here, melyben a spermatogenezis minden lépése nyomon követhető (1. ábra). A spermatogenezis korai szakaszai, azaz a mitotikusan osztódó spermatociták a testisz apikális részén, a meiotikus sejtek és a kerek spermatidák a testisz középső kanyarulatában, míg a testisz bazális vége felé haladva a poszt-meiotikus fejlődés – megnyúlás és individualizáció – lépései figyelhetők meg. A spermatogenezisre jellemző, hogy a fejlődő hímivarsejtek a kezdetektől kiindulva cisztában fejlődnek és plazmahidakkal összeköttetésben vannak, szinkronizáltan fejlődnek. Az érett, differenciálódott spermiumok a szeminális vezikulumban tárolódnak a megtermékenyítésig.³



1.ábra: A *Drosophila melanogaster* spermatogenezisének sematikus ábrázolása a stádiumokra specifikus sejszervecskék feltüntetésével.³

A tesztisz apikális régiójában figyelhetők meg a spermatogenezis korai stádiumai, melynek első lépéseként az ősvarsejtekből mitotikus osztódások révén primer spermatociták, keletkeznek a szomatikus "hub" sejtek szomszédságában. Ezt követően a primer spermatociták négy mitotikus osztódást követően létrehozzák a 16 sejtes cisztákat, melyeket egyenként kettő szomatikus cisztasejt határol. A 16 sejtes ciszták spermatocitái meiotikus sejtosztódás révén létrehozzák a 64 darab spermatidát tartalmazó cisztát. A meiózist követően a kerek spermatidákban kialakulnak a spermiumok sejszervecskéinek előalakjai. A centroszómákból bazális test alakul ki, ami citoplazmatikus mikrotubulusokkal kapcsolódik a sejtmag felé történő mozgása során, ahol az ún. „centriolar adjunct” által lesz körülveve, amely a centroszómákban található pericentrioláris anyaghoz (PCM) hasonlóan elektrondenz struktúra.

Miután a bazális test beágyazódik a sejtmagmembránba, onnantól kezdve mikrotubulus organizáló központként funkcionál, ami a flagelláris axonéma és perinukleáris mikrotubulusok összeszerelődését iniciálja. A pericentrin szerves részét képezi a centroszómának és a bazális testnek is, amely multifunkcionális vázként szolgál számos fehérje, illetve fehérje komplex rögzítésében.⁴ Az axonéma kialakulása a bazális testből kiindulva kezdődik el.⁵

A sejtmag közelében a mitokondriumok fúziójával, hagymahéjszerű rétegződésével kialakul a Nebenkern. A bazális test beágyazódik a sejtmag membránjába, ahonnan az axonéma fog kialakulni. Ebben a régióban alakul ki a mikrotubulusokban és aktinban gazdag struktúra, az ún. *dense body* is, mely fontos szerepet játszik a transzportfolyamatokban és a sejtmag morfológiájának megváltozásában. A sejtmag bazális testtel ellentétes oldalán létrejön a Golgi-készülékből az akroblaszt, amely az akroszóma előalakja.⁵

A poszt-meiotikus fejlődés első szakasza a megnyúlás, amely a korábbi szakaszokhoz hasonlóan szinkronizáltan zajlik. A 64 spermatida mindegyikének megnyúlása a cisztán belül történik. A megnyúlás korai fázisában a ciszta polarizálttá válik, azaz a ciszta egyik végére a sejtmagok, míg másik végére a spermiumok farki részei lokalizálódnak.⁵ A spermatidákban a sejtmagok kompakt szerkezetet vesznek fel, majd megnyúlnak, míg az akroblasztból kialakul az akroszóma. A spermiogenezis során a hisztonok többsége átmeneti fehérjékre, majd később protaminokra cserélődik.⁶ Ennek során a hisztonok által meghatározott nukleoszóma-alapú kromatinból a hisztonok poszttranszlációs módosításai és átmeneti fehérjék közreműködésével protamin-alapú, kompaktabb kromatin szerkezet jön létre a megnyúlás során.⁷ Az axonéma szinte teljes hossza mentén ER membránnal van körülhatárolva a megnyúlását követően, amely a nebenkernből kialakuló két mitokondrium származékkal kapcsolódik.⁵ Az axonéma keresztmetszeti képére a csillókra jellemző 9X2+2 mikrotubulus szerkezet jellemző. A megnyúlás végén a ciszták még mindig plazmahidakkal vannak összekapcsolva.⁵ A poszt-meiotikus fejlődés második szakasza az individualizáció, amely során a spermatidák egyedivé válnak, a közöttük lévő plazmahidak megszűnnek. A megnyúlt spermatidákat tartalmazó cisztában a sejtmagok körül kialakul az individualizációs komplex (IC), a tű alakú aktin kúpok, az individualizációs komplex felépítésében vesznek részt. Az aktin kúpok ezt követően elkezdnek szinkronizáltan vándorolni a ciszta bazális vége felé, ezzel kiszorítva a feleslegessé vált sejtalkotókat és a citoplazmát. A spermatidák mentén kialakulnak a folyamatos egyedi sejtmembránok.⁵ A cisztikus hólyag az IC körül alakul ki, amely együtt vándorol a komplexszel. A cisztikus hólyagban két fehérjelebontó folyamatot azonosítottak, a kaszpázok és a proteaszóma által irányítottat. Az apoptózis során az egyik kulcsfontosságú esemény a cisztein proteázok egy specifikus osztályának, a kaszpázoknak az aktiválása, amely aktivitás

szükséges a spermatidák individualizációjához.⁸ A tesztisz-specifikus proteaszóma alegységeknél nagy valószínűséggel fontos szerepe van az individualizáció szabályos lefolyásában. Az individualizáció végén a cisztikus hólyag cisztáról való lefűződése mellett a vándorlás során kiszorított sejtalkotók és bomlástermékek a waste-bag-be kerülnek.⁵

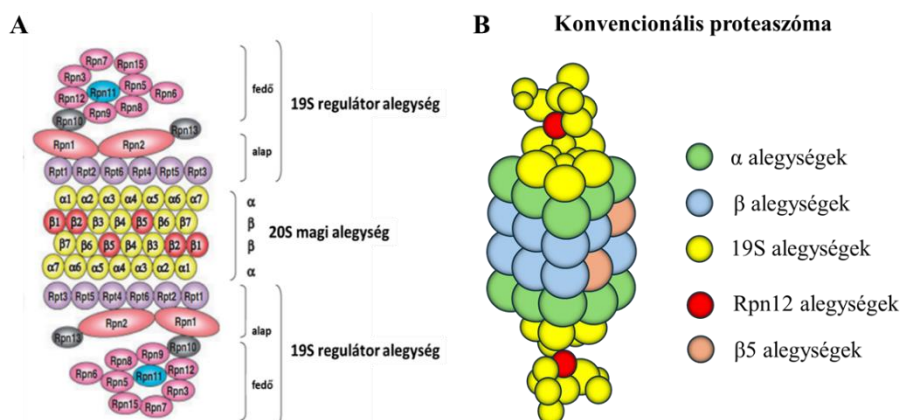
1.2. A proteaszómális fehérjelebontás

Az ubiquitin-proteaszóma rendszer (UPS) kulcsfontosságú szerepet játszik a fehérjedegradáció szabályozásában, valamint néhány esetben a fehérje aktivitásban is. Az ubiquitinről tudjuk, hogy egy 76 aminosavból álló polipeptid. Az UPS működését egy három lépésű enzim kaskád indítja, amely a következő enzimekből áll: ubiquitin-aktiváló enzim (E1), ubiquitin-konjugáló enzim (E2) és ubiquitin-ligáz (E3). A proteolízishez és degradációhoz a poliubiquitilált szubsztrátokat a proteaszóma képes felismerni.⁹ Az ubiquitin kapcsolódása a molekula glicin maradékának ATP-függő aktivációja révén kezdődik meg. Az Ub ezt követően aktivált részként kerül át az E2-be. A szubsztrát ubiquitilációjának utolsó lépése az Ub-töltött E2 és a specifikus E3 által felépített komplex kialakulása, amelyhez a szubsztrát fehérje kapcsolódik. Ezt követően ez az E2-ről vagy közvetlenül a szubsztrát lizin maradékához szállítódik, ha az E3 gyűrű-ujj (RING-finger) típusú, vagy az E3-ban egy belső cisztein maradékhoz, amennyiben az enzim HECT-domén típusú, majd végül kapcsolódik a szubsztráthoz. Ugyanazon kaskád mechanizmus alapján további ubiquitin molekulák adódnak a szubsztráthoz, ezzel létrehozva az Ub láncot.¹⁰

Az ubiquitin proteaszóma rendszer (UPS) központi szerepet játszik a fehérje homeosztázis precíz szabályozásában, ezzel biztosítva bizonyos fehérje csoportok stabilitását és mennyiségét a sejtciklus egyes stádiumaiban, illetve az inaktivációjukat az adott stádiumot követően. Számos UPS komponensről kiderült, hogy szerepet játszanak a spermatogenezis folyamatának szabályozásában. Továbbá számos olyan tesztisz-specifikus gént írtak le, amelyek esszenciálisak és egyedi szerepet töltenek be a spermatogenezis során. Az UPS spermatogenezisben betöltött funkciójának feltárásával átfogó képet kaphatunk a proteom dinamikáról a hímivarsejtek fejlődése során.⁹

1.3. A proteaszóma felépítése

A 26S proteaszóma funkciója a poliubiquitilált fehérjék lebontása a citoplazmában és a sejtmagban (<https://flybase.org/reports/FBgg0000208.html>). A 26S proteaszóma egy hengeres katalitikus magi 20S proteaszómából és ennek mindkét végét sapkaszerűen fedő regulátor 19S alegységekből áll (2. ábra). *Drosophilában* a 32 proteaszómát alkotó fehérjék harmadának van paralóg gének által kódolt tesztisz-specifikus változata.¹¹ A 20S magi alegység (CP) és az egy, vagy kettő regulátor alegység (RPs) központi végrehajtói az UPS-nek (ubiquitin proteaszóma rendszer) és a fehérje degradációnak. A 20S CP egy 28 alegységből álló komplex, amelynek molekulatömege kb. 750 kDa. Ezek az alegységek 4, egymáson elhelyezkedő gyűrűben rendeződnek (két azonos külső α , és két azonos belső β gyűrű), ezzel hordószerű szerkezetet kialakítva. Az α és β gyűrűk is hét evolucionárisan konzervált alegységet tartalmaznak, az α 1- α 7 és β 1- β 7 alegységeket. A β 1, β 2 és a β 5 alegységek rendelkeznek kaszpázszerű, tripszinszerű és kimotripszinszerű proteolitikus aktivitással. A két belső gyűrű hét béta alegységből épül fel, amelyek egy belső üreget formálnak, amelyben a fehérjék lebontásáért felelős proteolitikusan aktív helyek találhatók.⁹

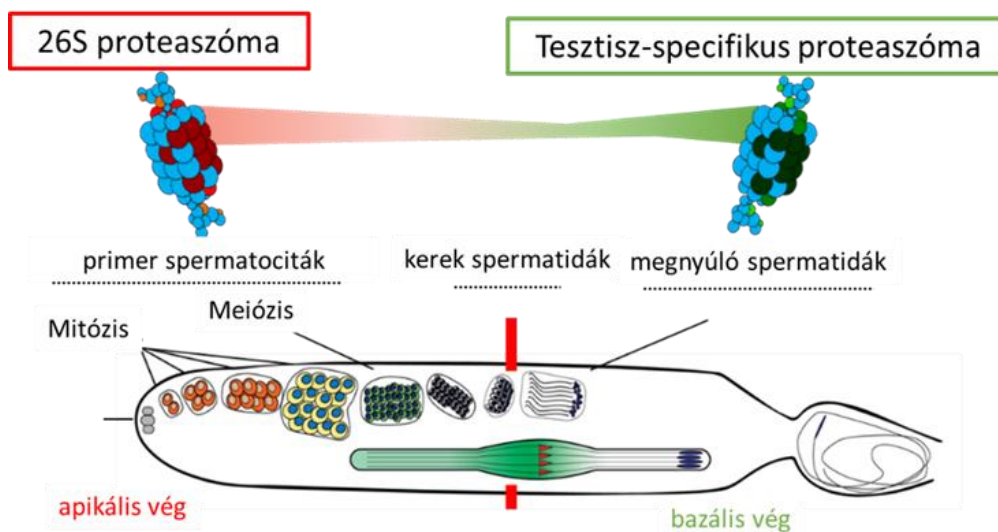


2. ábra: A 26S proteaszóma alegységeinek sematikus ábrázolása. A: CP, magi alegység (20S proteaszóma); RP, 19S regulátor alegység, amely alap- és fedő szubkomplexekből áll. Az ábra a ¹² hivatkozás alapján módosított. B: A konvencionális proteaszóma sematikus ábrázolása a katalitikus és regulátor alegységekkel.

A 19S regulátor alegység felismeri, letekeri, és transzlokálja az ubiquitinált fehérjéket a katalitikus alegységbe ATP-függő módon (<https://flybase.org/reports/FBgg0000208.html>). A 19S alegység egy fehérjéből álló bonyolult komplex, amely két fő részből áll: egy alapkompexből és egy fedőkomplexből. A fedőkomplex eddig szomatikus sejtekben ismert fő feladata a megkötött szubsztárok deubiquitilálása, amely folyamatban az Rpn11 metalloizopeptidáz funkciója teszi lehetővé az ubiquitin újrahasznosítását.¹²

1.4. A testisz-specifikus proteaszóma felépítése

A proteaszómák testisz-specifitása nagymértékben azok egyedi RP és CP alegységeinek összetételétől függ. *Drosophilában* a 20S CP alegységek közel harmada rendelkezik alternatív paralóg génekkel, amelyeknek többsége kizárólag a testiszben expresszálódik (pl. az $\alpha 6$ paralógja a Pros $\alpha 6$ T). Ezek a testisz specifikus 20S paralógok kizárólag a *Drosophila* testiszben fejeződnek ki a spermatogenezis meiotikus stádiumától kezdődően a poszt-meiotikus stádiumain keresztül (3. ábra). Feltételezhető, hogy fokozatosan helyettesíti a kanonikus proteaszómát a testisz-specifikus forma.⁹ Az emlős spermatoproteaszóma az α -alegységek szintén egyedi kombinációjával rendelkezik, ugyanis az SP katalitikus részéhez képest a spermatoproteaszóma α -gyűrűje tartalmaz egy alternatív $\alpha 4$ alegységet, az $\alpha 4s$ -t, amely nem a proteaszóma katalitikus aktivitását változtatja meg. Előfordulását tekintve megtalálható az emlősök testiszében, pontosabban a fejlődő hímivarsejtekben. Az $\alpha 4s$ alegység továbbá fontos szerepet játszik a megfelelő spermatoproteaszóma kialakulásában testiszekben. A spermatoproteaszóma feladata a magi hiperacetilált hisztonok lebontása a spermatocitákban, valamint a meiózis megfelelő szabályozásában van.¹³

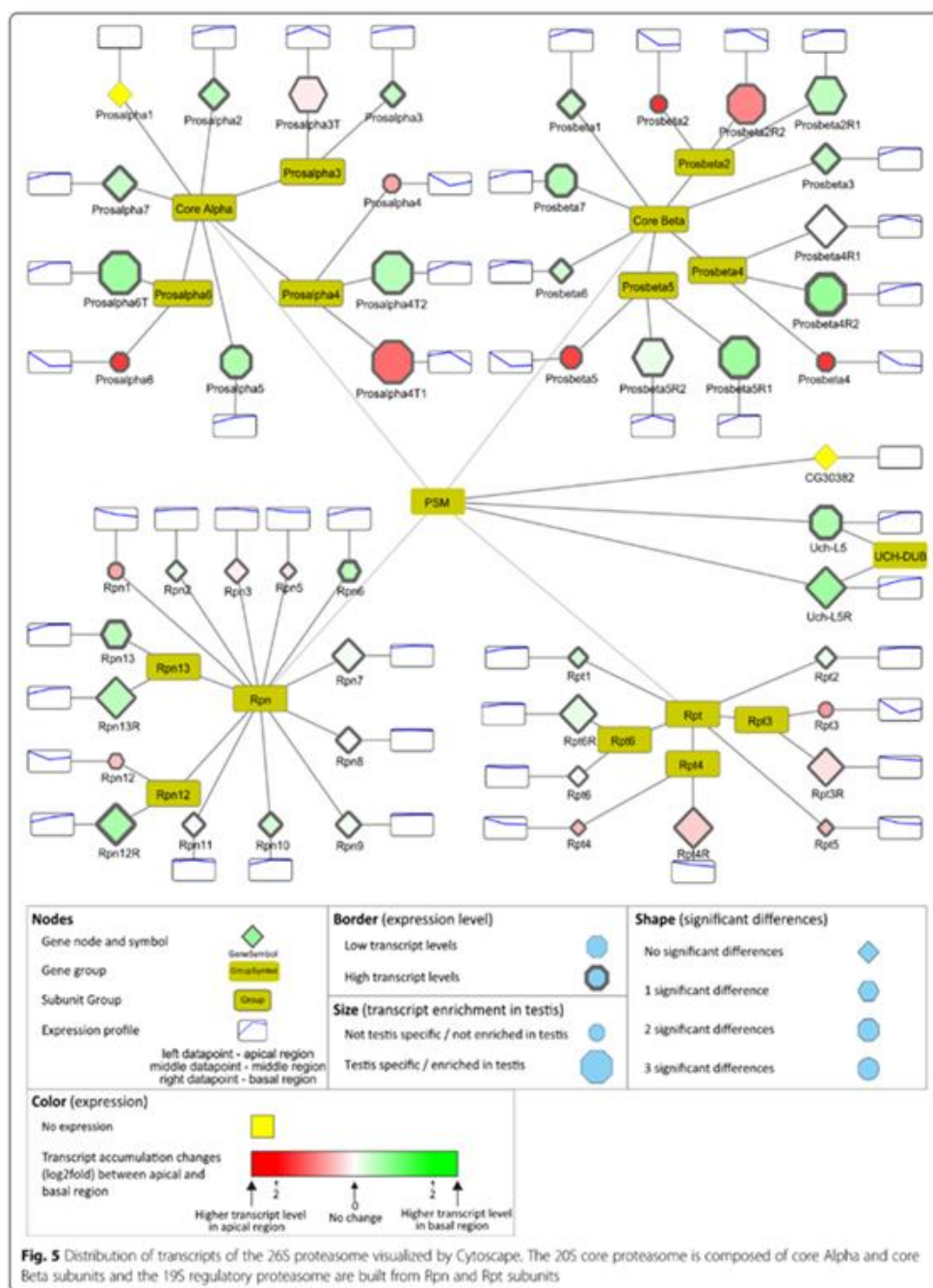


3. ábra: A *Drosophila* spermatogenezise alatt a 26S proteaszóma testisz-specifikus alegységekkel kiegészülve hozza létre a spermatoproteaszómát a meiózist követően.

A proteaszóma alegységek összetételének legkiterjedtebb szövet-specifikus változatát a testiszben, és különösképp a meiózist követően a spermatidákban figyelték meg. A testisz-specifikus proteaszóma alegységek létezését először *Drosophila melanogaster*ben írták le az 1990-es évek közepén. Belote és munkatársai két α 4-típusú alegységről is beszámoltak (α 4T1, α 4T2), amelyek paralóg gének által kódoltak, és amelyek kizárólag a hím csíravonalban expresszálódnak.¹⁴ Későbbi vizsgálatok során nyilvánvalóvá vált, a proteaszóma alegység gén duplikációk széleskörben elterjedtek a *D. melanogaster*ben, a mai napig a 33 26S proteaszóma alegységből 12 olyan alegységet azonosítottak, amelyek kettő, vagy akár három különböző paralóggal is rendelkeznek (4. ábra). A proteaszóma alegységek konvencionális formái minden szövetben és minden vizsgált fejlődési stádiumban kimutathatók, míg az összes további paralóg specifikusan a testiszben fejeződik ki. Néhány alternatív alegységet részletesebben is vizsgáltak riporter transzgének segítségével.¹¹ Ezek a vizsgálatok a hím csíravonal sejtjeire korlátozódó expressziós mintázatot mutattak a spermatogenezis középső és késői szakaszában, miközben a korai szakaszban csak a kanonikus proteaszóma alegységek fejeződnek ki (5. ábra).

	Proteaszóma alegység	Testisz- specifikus paralóg		Proteaszóma alegység	Testisz- specifikus paralóg		Proteaszóma alegység	Testisz- specifikus paralóg
Mag	α 1	-	Alap	Rpt1	-	Fedő	Rpn3	-
	α 2	-		Rpt2	-		Rpn4	-
	α 3	α 3T		Rpt3	Rpt3R		Rpn5	-
	α 4	α 4T1		Rpt4	Rpt4R		Rpn6	-
		α 4T2		Rpt5	-		Rpn7	-
	α 5	-		Rpt6	Rpt6R		Rpn8	-
	α 6	α 6T		Rpn1	-		Rpn9	-
	α 7	-		Rpn2	-		Rpn11	-
	β 1	-		Rpn10	-		Rpn12	Rpn12R
	β 2	β 2R1		Rpn13	Rpn13R		Uch37	Uch37R
		β 2R2						
	β 3	-						
	β 4	β 4R1						
		β 4R2						
	β 5	β 5R1						
		β 5R2						
	β 6	-						
	β 7	-						

4. ábra: A magi és a regulátor (alap- és fedő komplex) proteaszóma alegységek, valamint az egyes alegységek testisz-specifikus paralógjai.



5. ábra: A 26S proteaszóma transzkriptomikai analízise. A 26S proteaszóma transzkriptjeinek eloszlása Cytoscape-vel vizualizálva. A 20S magi proteaszóma az Alfa- és Béta alegységekből, míg 19S regulátor proteaszóma Rpn és Rpt alegységekből épül fel. (Vedelek et al. 2018)¹⁵

1.5. A PA200 proteaszóma regulátor

Emlősökben a PA200 fehérje a proteaszóma szabályozásában résztvevő fehérje, amely kupolaszerűen épül rá a 20S proteaszómára. A PA200 monomerjei a 20S proteaszóma egyik vagy mindkét végéhez kapcsolódhatnak, valamint az $\alpha 7$ alegység kivételével az összes α -alegységgel kölcsönhatnak. A PA200 a C-terminális YYA (tirozin-tirozin-alanin) motívumot használja az 20S proteaszóma α -alegységek átrendeződésének indukálásához. A PA200 hiányos egerek életképesek, a PA200 hiánya a hímek fertilitását befolyásolja, más

rendellenességet nem mutatnak. A PA200 minden emlős szövetben megtalálható, de a legnagyobb mértékben a tesztiszben fejeződik ki ami arra enged következtetni, hogy a PA200 fontos és kizárólagos szerepet játszik a spermatogenezis folyamatában.¹³ A hisztonok poliubiquitin-független degradációját az aktivátor PA200-al rendelkező proteaszómák katalizálják. A PA200 delécióna megszünteti a szomatikus magi hisztonok acetiláció-függő lebomlását.¹⁶ *Drosophilában* nincs a PA200 fehérjének megfelelője, feltételezzük, hogy a tesztisz-specifikus alegységek proteaszómába épülése eredményezi a módosított spermatoproteaszómát.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A célunk az emlősökben lejártszódo spermatoproteaszóma általi fehérjelebontás jobb megértése a *Drosophila melanogaster*ben megtalálható, az emlősökhöz hasonló tesztisz-specifikus proteaszóma alegységeinek vizsgálatán keresztül.

Célunk a katalitikus Pros β 5R1 és Pros β 5R2, valamint a regulátor Rpn12R alegységek spermatogenezisben betöltött szerepének vizsgálata mutáns törzsek előállításán keresztül, valamint az alegységek részletes genetikai és molekuláris jellemzése. Ennek megvalósításához a CRISPR/Cas9 technológiát felhasználva deléciót tartalmazó mutánst szeretünk volna létrehozni a Pros β 5R2 génben. Ezt követően szeretünk volna feltárni a homozigóta Pros β 5R2^{*Δ25*} mutánsok fenotípusát.

Célunk volt a mutánsok fertilitásának és részletes spermatogenezis fenotípusának az összevetése a már a csoport által jellemzett tesztisz-specifikus regulátor alegység mutánsok fenotípusával.

Célunk volt a tesztisz-specifikus proteaszómális fehérjék spermatogenezisen belüli eloszlásának jellemzése a fehérjék fluoreszcens fehérjével történő jelölésén keresztül.

Eredményeinkkel szeretnénk közelebb jutni a tesztisz-specifikus katalitikus (Pros β 5R2, Pros β 5R1) és regulátor (Rpn12R) alegységek vizsgálatán keresztül a proteaszómális fehérjelebontás spermatogenezisben betöltött funkciójának jobb megértéséhez.

3. ANYAGOK, ESZKÖZÖK, MÓDSZEREK

3.1. Klasszikus *Drosophila* genetikai módszerek

A megfelelő mutáns törzseket keresztezéssel, azaz az állatok ivaros szaporításával hoztuk létre. A keresztezési sémák az Eredmények és értékelésük pontban találhatók.

A törzseket kukoricadarás élesztős táptalajon tartottuk fenn vattával lezárt fiolákban. A keresztezések fenntartása 25 °C-os termosztátban, míg a törzsek fenntartása 18 °C-on történt az állatházban.

3.1.1. Felhasznált törzsek

Felhasznált törzsek

$$\begin{array}{l} \frac{w^{1118}}{w^{1118}/y}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+} \\ \frac{w}{w/y}; \frac{+}{+}; \frac{\beta 5R2 \text{ gRNS } 1}{TM6, Sb / \beta 5R2 \text{ gRNS } 1} \\ \frac{w}{w/y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Protamine-GFP}{MKRS, Sb} \\ \frac{nos-Cas9}{nos-Cas9}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+} \\ \frac{w}{w/y}; \frac{SM6b}{Sco}; \frac{+}{+} \\ \frac{w}{w/y}; \frac{+}{+}; \frac{\beta 5R2-GFP}{TM6C} \\ \frac{w}{w/y}; \frac{If}{CyO}; \frac{TM6, Tb, Hu}{MKRS, Sb} \\ \frac{w}{w/y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Pericentrin-GFP}{Pericentrin-GFP} \\ \frac{w}{w/y}; \frac{Pros\beta 5R1^{A26}}{SM6b}; \frac{+}{+} \\ \frac{w}{w/y}; \frac{Sp}{SM6b}; \frac{TM3, Sb, Ser}{Cx D} \\ \frac{w}{w/y}; \frac{+}{+}; \frac{Rpn12R^M}{TM3, Sb, Ser} \end{array}$$

Létrehozott mutáns, transzgenikus törzsek

$$\begin{array}{l} \frac{w}{w/y}; \frac{Pros\beta 5R2^{A25}}{SM6b}; \frac{+}{+} \\ \frac{w}{w/y}; \frac{Pros\beta 5R2^{A25}}{CyO}; \frac{Protamine-GFP}{MKRS, Sb} \\ \frac{w}{w/y}; \frac{Pros\beta 5R2^{A25}}{CyO}; \frac{\beta 5R2-GFP}{MKRS, Sb} \\ \frac{w}{w/y}; \frac{Pros\beta 5R2^{A25}}{CyO}; \frac{Pericentrin-GFP}{MKRS, Sb} \\ \frac{w}{w/y}; \frac{Pros\beta 5R1^{A26}, Pros\beta 5R2^{A25}}{SM6b}; \frac{TM3, Sb, Ser/+}{Cx D/+} \end{array}$$

3.1.2. Fertilitási teszt

A különböző hím mutánsok fertilitásának ellenőrzése céljából egy hímet 3-4 w^{1118} vad típusú nőténnyel kereszteztünk. A keresztezéstől számított néhány napon belül megfigyelhető lárvák, bábok, majd kifejlett utódok megjelenése vagy hiánya alapján megállapítható volt, hogy fertilisek-e a mutánsok. Az eredményeket a kontroll csoport legyeivel hasonlítottuk össze.

3.2. Molekuláris biológiai módszerek

3.2.1. Felhasznált oldatok

- TB puffer (Testis Buffer) (50 ml): 7,5 ml 15 mM kálium-foszfát (pH=6,7), 4 ml 80 mM KCl, 160 µl 16 mM NaCl, 250 µl 5 mM MgCl₂, 0,5 g 1% PEG 6000, H₂O

- PBS (1000 ml): 8 g 137 mM NaCl, 0,2 g 2,7 mM KCl, 1,42 g 10 mM Na₂HPO₄, 0,27 g 2 mM KH₂PO₄ (pH= 7,4), 800 ml H₂O
- PBSTX (50 ml): 1500 µl 10% TritonX, 100 µl 50% Tween, 1X PBS
- Fixáló puffer: PBS, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄ (pH=7.4)
- Formaldehydes fixáló oldat (400 µl): 100 µl 16%-os formaldehid, 300 µl fixáló
- SB puffer (Squishing Buffer) (10 ml): 66,6 µl 10 mM TRIS (pH=8,2), 20 µl 1 mM EDTA (pH=8,0), 50 µl 25 mM NaCl, ~9,87 ml H₂O
- 1% BSA-PBST (10 ml): 0,1 g BSA (por), ~10 ml 0,1% PBS-Triton
- 1X TAE (500 ml): 10 ml 50X TAE (24,2 g TRIS, 5,7 ml ecetsav, 10 ml 0,5 M EDTA), 490 ml H₂O
- 2 YT (1000 ml): 16 g Bacto-tryptone, 10 g Bacto-yeast extract, 5 g NaCl, 900 ml H₂O, 5 M NaOH-val a pH beállítása 7-re, feltöltés desztillált vízzel, 15 g agar szilárd táptalaj esetén, a karbenicillint közvetlenül adjuk hozzá felhasználás előtt (100 mg/ml)
- Green Solution: 10 µl 1 M Tris-HCl, 2 µl 50 mM EDTA, 10 µl 10 mg/ml BSA, 10 µl 0,1 M DTT, 1 µl Triton X-100, 964 µl H₂O
- Festékek: Texas Red®-X Phalloidin (1:400), DAPI (1:500)
- Ellenanyagok:
 - elsődleges: Rpn12R (1:300), AXO49 (1:5000), anti-Caspase-3 (rabbit) (1:200);
 - másodlagos: Alexa Fluor 488 (1:400), anti-Mouse Alexa Fluor™ 488 (1:400)

3.2.2. Polimeráz láncreakció (PCR)

A kísérlet során a Thermo Scientific DreamTaq DNS polimerázt használtam, a gyártó által ajánlott körülményeknek megfelelően (1., 3. és 4. táblázat). A PCR során a 2. és a 6. táblázatban feltüntetett forward és reverse primereket alkalmaztam.

Komponensek	Mennyiségek (25 µl-re) [µl]
Dream Taq puffer	2,5
MgCl ₂	0,5
dNTP Mix (10 mM)	0,5
DreamTaq DNS polimeráz	0,1
Forward primer	0,5
Reverse primer	0,5
Templát DNS	0,5
H ₂ O	19,9

1. táblázat: A PCR során elkészített MasterMix komponensei.

Primerek	Szekvencia
β5R2 fw.	TTGTGGTCCTACGGTC
β5R2 rev. (új)	GGGGGCGAGACCCAACCTTG
β5R1 fw.	CAGTGAGTGGTTTCATGTACTC
β5R1 rev.	TACCGTTGCCAGCTTAGTCTG

2. táblázat: A PCR során használt primerek.

Klónozott gén	Hőmérséklet [°C]	Időtartam	Ciklusszám
β5R2	95	2 min	1
	95	30 sec	30
	50	20 sec	
	72	2 min	
	72	10 min	1

Klónozott gén	Hőmérséklet [°C]	Időtartam	Ciklusszám
β5R1	95	10 min	1
	95	30 sec	35
	51	30 sec	
	72	1 min 30 sec	
	72	5 min	1

3. és 4. táblázat: A PCR során alkalmazott körülmények.

3.2.3. DNS izolálás egy légyből

A muslicát PCR csőbe helyezzük, majd jégre tesszük. Az állatokat 50 µl SB puffer és 0,5 µl Proteináz K oldatban homogenizáljuk. A PCR csöveket 30 percig 37 °C-ra, majd az enzim inaktiválására 2 percig 95 °C-ra a PCR gépbe helyezzük. A mintákat -20°C-on tároljuk.

3.2.4. Agaróz gélelektroforézis

A PCR termékek ellenőrzése céljából 1%-os agaróz gélen futtatjuk 1X TAE pufferben. A DNS-t MIDORI Green Xtra DNS festékkel tesszük láthatóvá, amelyet a gélhez keverünk szilárdulás előtt. A megszilárdult gél zsebeibe 10-10 µl mintát töltöttünk be, majd 90 V-on futtattuk 20-25 percig. A DNS méretének meghatározásához a Thermo Scientific MassRuler High Range létráját használtuk.

3.2.5. PCR termék klónozása

A kísérlet során a Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit-et használtuk, és a Sticky-End Cloning Protocol szerint dolgoztunk. A protokoll alapján először 5 percig 70 °C-on inkubáltuk az 5. táblázatban szereplő komponensek oldatát. A mintákat a PCR gépből kivéve jégen hűtöttük. Ezt követően hozzáadtuk a vektort és a ligáz enzimet a rendszerhez, majd 5 percig 22 °C-on inkubáltuk PCR gépben (5. táblázat).

Komponensek	Mennyiségek (20 µl-re) [µl]
2x Reaction Buffer	10
PCR termék (nem tisztított)	1
víz	6
DNA Blunting Enzyme	1
pJET 1.2/blunt Cloning Vector	1
T4 DNA Ligase	1

5. táblázat Tompa végű PCR termék előállítása.

3.2.5.1. Plazmid transzformálása

A transzformálás során 100 µl kompetens sejthez 2 µl-t adunk a ligált termékből, majd 30 percig jégen tartjuk a mintát. Ezt követően a mintákat 45 másodpercre termoblokkba helyezük 42 °C-on, majd visszahelyezzük 2 percre jégre. A mintákhoz 900 µl 2YT folyékony tápoldatot adunk, majd 37 °C-on 1 órán át vízfürdőn inkubáljuk. Híg szélesztés esetén a növesztett kultúrából 100 µl-t szélesztünk szilárd karbenicillines 2 YT táptalajon. Koncentrált szélesztéshez a maradék mintát 3 percig 2500 rpm-en lecentrifugáljuk, majd pipettával leszívunk 800 µl felülúszót és a cső oldalához tapadt pelletet felszuszpendáljuk, végül a megmaradt 100 µl-t szélesztjük. A lemezeket éjszakára 37 °C-ra helyezzük.

3.2.6. Kolónia PCR

A transzformálást követően az antibiotikum rezisztens baktériumtelepekből egyedi telepeket oltunk le 3 ml karbenicillines folyékony 2YT táptalajba. Ezt éjszakára 37 °C-ra helyeztük állandó 250 rpm-es keverést biztosítva. Másnap az egyedi telepekből indított baktériumokat a nagy tisztaságú DNS kitisztítása előtt kolónia PCR-rel ellenőrizzük. Ehhez a templát DNS-t a baktérium kultúrából készítjük úgy, hogy 1 µl-t összekevertünk 9 µl Green Solution-nel, majd a 8. táblázatnak megfelelően PCR reakcióval ellenőrizzük az inszertek jelenlétét a vektorokban. PCR csövekbe 19 µl Mixture-t és 1 µl templátot mértünk össze (7. táblázat).

Primerek	Szekvencia
pJET 1.2. forward	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
pJET 1.2. reverse	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG

6. táblázat: A kolónia PCR során alkalmazott primerek.

Komponensek	Mennyiségek (20 µl-re) [µl]
Dream Taq puffer	2
dNTP Mix	0,5
DreamTaq DNS polimeráz	0,1
pJET 1.2. fw.	0,5
pJET 1.2. rev.	0,5
Templát DNS	1
H ₂ O	16,4

7. táblázat: A kolónia PCR során elkészített MasterMix komponensei és a szükséges mennyiségek.

Klónozott gén	Hőmérséklet [°C]	Időtartam	Ism.
β5R2	95	2 min	1
	95	30 sec	25
	55	20 sec	
	72	1 min	
	72	10 min	1

8. táblázat: A kolónia PCR során alkalmazott körülmények.

3.2.7. Plazmid DNS izolálás

A baktériumból történő DNS izolálása során célunk nagy tisztaságú plazmid DNS kinyerése. A kolónia PCR során készített sejt kultúrából a Thermo GeneJet Plazmid Miniprep Kit segítségével tisztítottuk ki a DNS-t, a gyártó ajánlásának megfelelően.

Az elkészített mintákat -20°C-on kell tárolni. A termékek koncentrációját NanoDrop készülékkel mértük meg.

3.2.8. Restriktációs emésztés

Az inszert beépülésének ellenőrzésére restriktációs enzimekkel történő emésztést alkalmaztunk (9. táblázat).

Komponensek	Mennyiségek (20 µl-re) [µl]
H ₂ O (nukleáz mentes)	14,7
10x Buffer Orange	2
DNS (0,5-1 µg/ µl)	3
BglII. restriktációs enzim	0,3

9. táblázat: A restriktációs emésztéshez használt komponensek és szükséges mennyiségeik.

Ezt követően a mintákat inkubáljuk Termoblokkban 37 °C-on 1,5 órán át, majd agaróz gélelektroforézissel ellenőrizzük a DNS fragmentek méretét és jelenlétét.

3.2.9. Mikroszkópia, immunfestés

3.2.9.1. *Drosophila melanogaster* testtisz izolálás

A testtiszeket a *Drosophila melanogaster* utótestéből lehet izolálni, mely során a legyeket bonccsipesz segítségével TB pufferbe helyezzük, majd boncoljuk sztereomikroszkóp alatt. Ezt követően az izolált testtiszeket Eppendorf csőben lévő TB pufferbe, vagy fixálás

esetén 4%-os formaldehid és fixáló oldat keverékébe (200 µl/minta) helyezzük. A fixált és nem fixált minták ezt követően tárgylemezre helyezhetők, majd fénymikroszkóppal vizsgálhatók.

3.2.9.2. *Drosophila melanogaster* tesztisz aktin-DAPI festés

Ez a festési eljárás a sejtmagok és az individualizáció során kialakuló aktin kúpok festésére alkalmas, mely a következő lépésekből áll:

1. Tesztiszek (10-15 db) izolálása a 3.2.9.1.-ben leírtaknak megfelelően.
2. 15 percre állni hagyjuk a tesztiszeket formaldehydes fixáló oldatban.
3. A formaldehydes fixáló oldatot leszívjuk pipetta segítségével, majd 3-szor átmossuk ~500 µl PBSTX pufferrel. A mosási lépések során 500 µl PBSTX-et a mintára pipetázunk, forgatóra helyezzük, majd 10 perc forgatás után leszívjuk a puffert, és ismételjük az egyes lépéseket.
4. A festékanyagokat hígítjuk PBSTX-ben, majd hozzáadjuk a mintákhoz.
5. A mintákat 30 percre billegetőre helyezzük. A mintákat közben sötétben tartjuk, letakarjuk a festékanyagok fényérzékenysége miatt.
6. Leszívjuk pipettával a hígított festékanyagokat tartalmazó PBSTX puffert, majd kétszer 10 percig PBSTX-xel, egyszer 10 percig PBS oldattal mossuk a mintákat a 3. pontban megfogalmazottaknak megfelelően.
7. A tesztiszeket felszívjuk pipettával és tárgylemezre helyezzük őket sztereomikroszkóp alatt. Eltávolítjuk az esetleges szennyeződéseket, és pipettával leszívjuk a PBS jelentős részét.
8. A mintákhoz egy csepp SlowFade™ Diamond Antifade Mountant-ot adunk. (DAPI festés esetén egy csepp: SlowFade™ Diamond Antifade Mountant with DAPI.)
9. A mintákat lefedjük fedőlemezzel, rögzítjük a sarkait, majd fluoreszcens fénymikroszkóp alatt vizsgáljuk a megfestett tesztiszeket.

3.2.9.3. *Drosophila melanogaster* tesztisz immunfestés

Az immunfestés során a fehérjék sejten belüli elhelyezkedése láthatóvá tehető. A festési eljárás során elsődleges-, és fluorofórral ellátott másodlagos ellenanyagot használunk, mely detektálhatóvá teszi a vizsgálni kívánt fehérjét az adott sejtben, szövetben.

A festési eljárás a következő lépésekből áll:

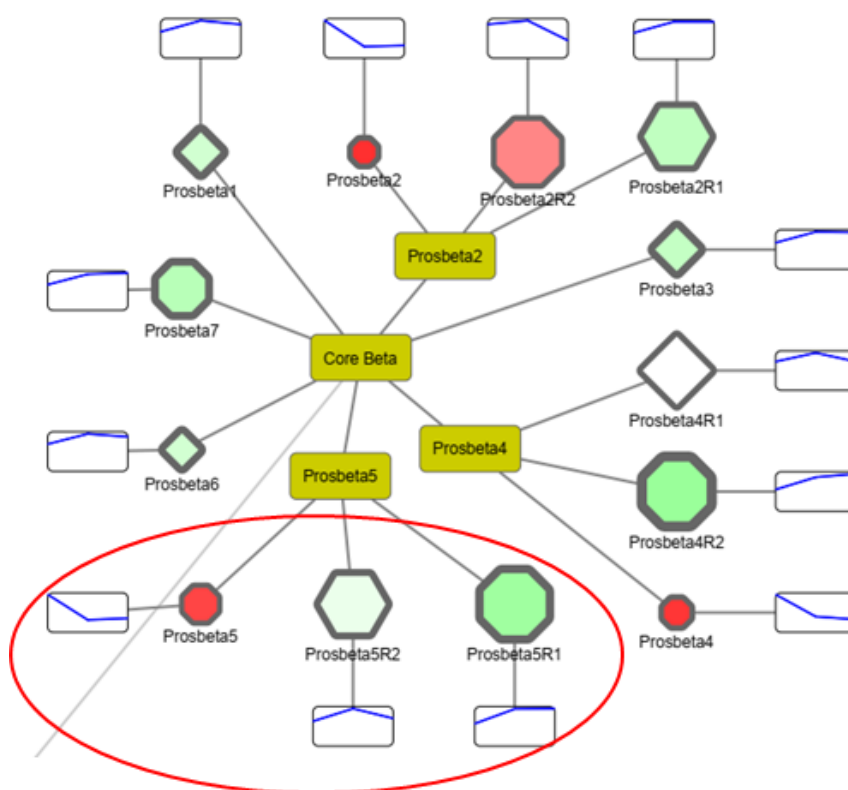
1. Tesztiszek (10-15 db) izolálása a 3.2.9.1.-ben leírtaknak megfelelően.
2. A formaldehydes fixáló oldat kimosása: kétszer 15 perc PBSTX, majd egyszer 10 perc PBS oldattal (500 µl).

3. A PBS leszívása pipettával, majd 10 ml blokkoló (1% BSA PBSTX oldószerben oldva) hozzáadása a mintához. A tesztiszeket 1 órán át a blokkolóban hagyva forgatjuk.
 4. Az elsődleges ellenanyagot hígítjuk PBSTX és BSA oldatában.
 5. Teljes éjszakára 4 °C-ra helyezzük a mintákat.
 6. Háromszor átmoszuk a mintákat 500 µl PBSTX + BSA oldattal.
 7. A másodlagos ellenanyagokat hígítjuk PBSTX + BSA oldatban. A mintákra rámérjük a másodlagos ellenanyagot tartalmazó oldatot, majd 2 órára billegtetőre helyezzük.
 8. Pipettával leszívjuk a másodlagos ellenanyagot tartalmazó oldatot, majd 500 µl PBSTX-xel mossuk a mintát.
 9. A festékanyagokat hígítjuk PBSTX-ben, majd hozzáadjuk a mintákhoz.
 10. A mintákat 30 percre billegtetőre helyezzük. A mintákat közben sötétben tartjuk, letakarjuk a festékanyagok fényérzékenysége miatt.
 11. Leszívjuk pipettával a hígított festékanyagokat tartalmazó PBSTX puffert, majd egyszer 10 percig PBSTX-el, és egyszer 10 percig PBS oldattal mossuk a mintákat.
 12. A továbbiakban a 3.2.9.2. festési eljárásnak a 7., 8. és 9. lépéseit alkalmazzuk.
- A mintákat fluoreszcens és konfokális mikroszkópon vizsgáltuk (Olympus BX51 fluoreszcens mikroszkóp és Olympus Fluoview Fv10i konfokális mikroszkóp). Az elkészített felvételeket GIMP programmal szerkesztettük. Az axonéma hosszának statisztikai vizsgálatát Fiji programmal végeztük.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKEKELÉSÜK

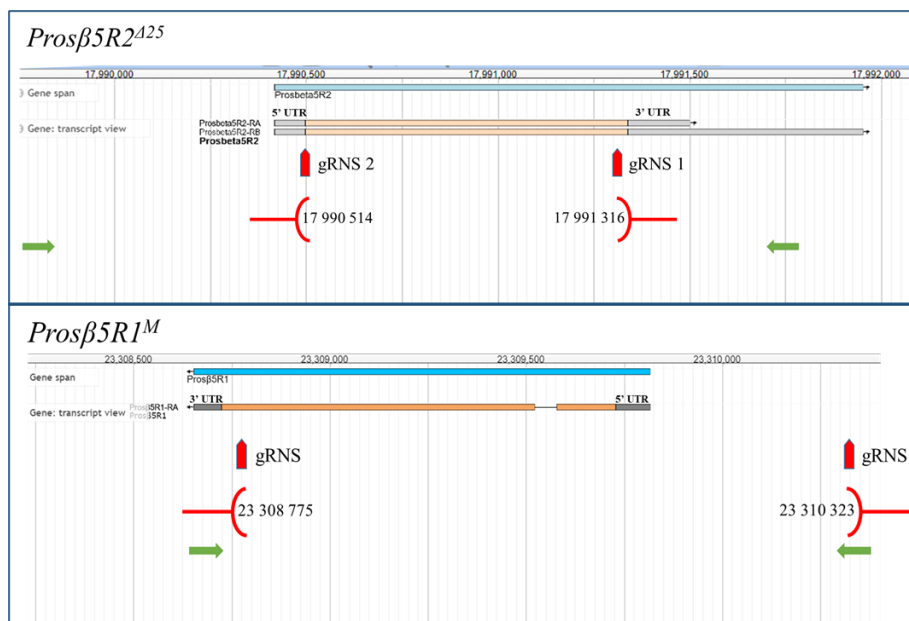
4.1. Homozigóta *Prosβ5R2*⁴²⁵ mutánsok létrehozása CRISPR/Cas9 technológiával

A proteaszóma központi részében a katalitikus β5 alegységnek két tesztisz-specifikus paralógja van, a β5R1 és β5R2. A laboratóriumunk által elvégzett RNS szekvenálási adatok alapján ezek a spermatogenezis késői szakaszában vannak jelen és akkor játszhatnak fontos szerepet (6. ábra).¹⁵ A *Prosβ5R2* gén (hivatalos nevén: Proteasome β5 subunit-related 2) a 2. kromoszóma bal karján lokalizált, egyetlen, 840 bp hosszúságú exonból áll, intront nem tartalmaz. A *Prosβ5R2* gén által kódolt fehérje 279 aminosavból áll. Kifejeződése a szomatikus szövetekben nem számottevő, legnagyobb mértékben a tesztiszben expresszálódik (<https://flybase.org/reports/FBgg0000208.html>).



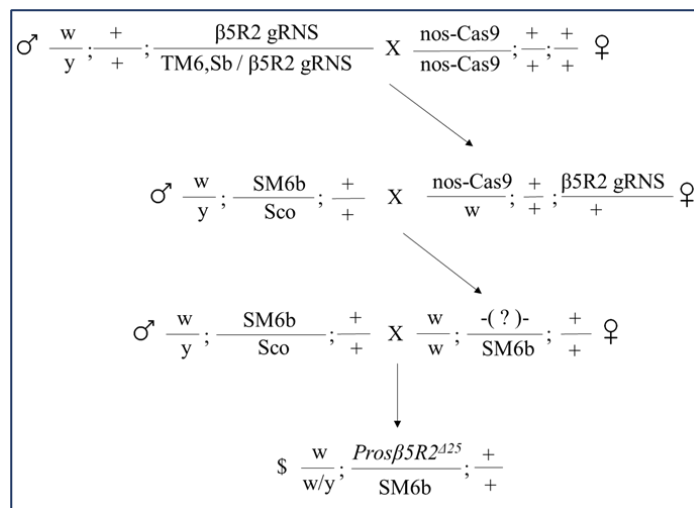
6. ábra: A proteaszóma magi részét felépítő β alegységek transzkriptomikai analízise. A Prosβeta5 tesztisz-specifikus paralógjai a tesztiszben expresszálódnak, mind a Prosβ5R1 és a Prosβ5R2 a spermatogenezis késői stádiumaiban halmozódik fel. Az ábra a ¹⁵-ös hivatkozás alapján módosított.

A célunk az volt, hogy a CRISPR/Cas9 rendszer segítségével deléciót hozzunk létre a β5R2 gén kódoló régióját eltávolítva. A deléció létrehozásához a Cas9 enzim szabályos hasítása szükséges a β5R2 gén kódoló régiójára specifikus gRNS-ek által közrezárt szakaszon. A deléció létrehozása érdekében specifikus gRNS-eket kerestünk a β5R2 gén kódoló régiójában (7. ábra).



7. ábra: A Prosβ5R2 és Prosβ5R1 gén elhelyezkedése a *Drosophila* genomban és a génben létrehozott deléció vizualizálása. A Prosβ5R2 gén a 2. kromoszóma bal karján található (2L:17.990.418 – 17.991.951), míg a delécióhoz használt specifikusan kötődő gRNS-ek kötőhelye pirossal jelölve látható. A deléció során a gén kódoló szakaszának 17.990.514 – 17.991.316 nukleotidja közötti rész esett ki, amely 803 bázispár delécióját jelenti. A Prosβ5R1 gén a 2. kromoszóma jobb karján található (2R:23.308.654 – 23.309.816), míg a delécióhoz használt specifikusan kötődő gRNS-ek kötőhelye pirossal jelölve látható. Zöld nyilak: a deléció ellenőrzésére használt forward és reverse primerek.

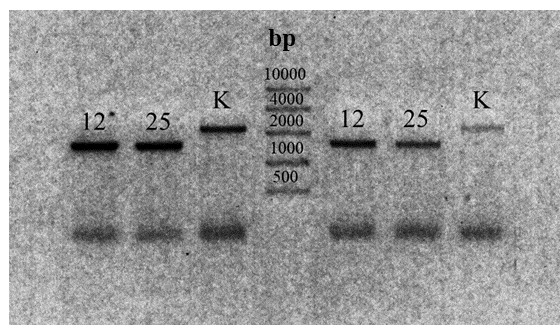
A β5R2 gRNS-eket tartalmazó plazmiddal transzgenikus vonalakat hoztunk létre, amelyet a Cas9 enzimet hordozó állatokkal kereszteztünk az alábbi keresztezési séma alapján (8. ábra).



8. ábra: Prosβ5R2 génben deléciós mutánsok létrehozásához használt keresztezési séma.

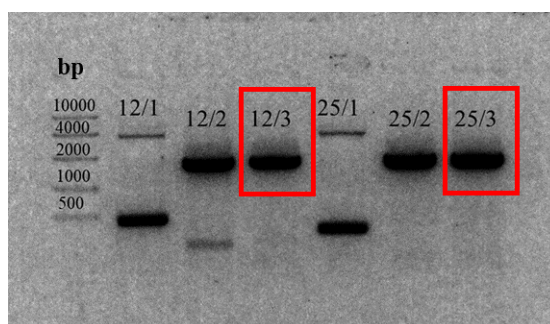
4.2. A deléciók mutánsok molekuláris ellenőrzése PCR-ral

A létrehozott $\beta 5R2$ deléciók jelölt törzseket PCR felhasználásával ellenőriztük. A törzsek egyedi hím állataiból DNS-t izoláltunk és ezt használtuk templátként a PCR reakció során. A vad típusnál egy 2249 bázispár méretű terméket kaptunk. A deléció következtében a mutáns törzsben a vad típusnál kisebb terméket vártunk (9. ábra). A 65 keresztezésből két vonal bizonyult pozitívnak. A deléciók PCR-ral történő megerősítését követően a 25-ös vonalból alapítottunk törzset, és elkezdtük a mutánsok fenotipikus jellemzését.



9. ábra: Agaróz gélelektroforézis a $\beta 5R2$ génen végzett PCR termékeiről. A kontroll 2249 bp értékéhez képest a 12-es és 25-ös minták esetén a PCR termék 1446 bp-os terméket ad, ami a génben történt delécióra utal.

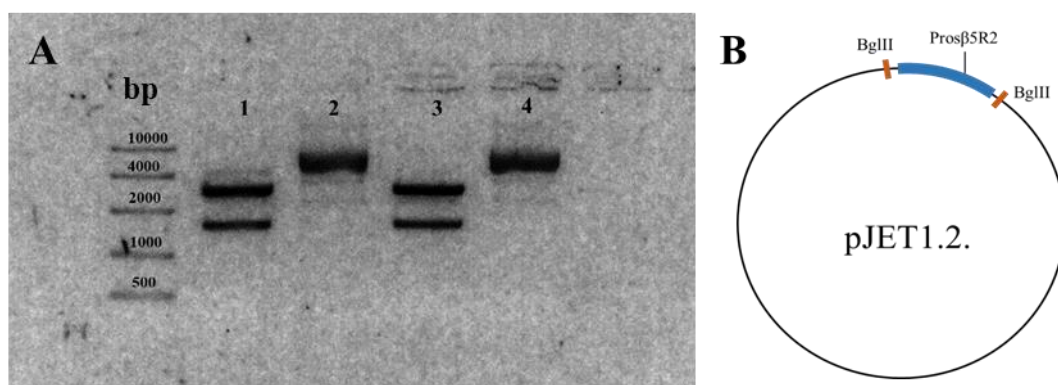
A deléciók pontos méretének és a töréspontok szekvenciájának meghatározására a 12-es és a 25-ös minták PCR termékeit pJet1.2 plazmidba ligáltuk. Az inszert DNS-t tartalmazó plazmidot *E. coli* baktériumokba transzformáltuk és a DNS plazmidba való beépülését kolónia PCR-ral ellenőriztük egyedi baktérium telepekből. Az így pozitívnak bizonyult telepekből miniprepet készítettünk és plazmidot izoláltunk. A tisztított plazmidokat restriktációs emésztéssel ellenőriztük, amelynek termékeit agaróz gélelektroforézis segítségével tettünk láthatóvá. A gélkép alapján a ligálás és a klónozás is sikeres volt, mivel 1500 bázispár körüli terméket kaptunk (10. ábra).



10. ábra: Gélkép a $\beta 5R2$ génen végzett kolónia PCR termékekről. A mintavétel baktériumkolóniákból történt a deléció ellenőrzése céljából. A PCR termékek a további munkálatokhoz kiválasztott 12/3 és 25/3 minták esetén is 1446 bp-os értéket mutatnak, amely a deléció meglétét jelzi.

A plazmidot restrikciós emésztés során BglII enzimmal emésztettük, amely a beépülés két végén hasítva megmutatja a beépült inszert méretét. A 2974 bp-os plazmidtól jól elkülöníthető az 1446 bp inszert agaróz gélelektroforézissel (11. ábra).

A plazmidba épült inszert szekvenálása a 25/3-as plazmid pJet1.2. forward és pJet1.2. reverse primerek felhasználásával történt. Az eredményül kapott nukleotid sorrendet a vad típusú $\beta 5R2$ gén nukleotid sorrendjével hasonlítottuk össze BLAST program felhasználásával.



11. ábra: A plazmid emésztése BglII restrikciós enzimmal. A: A gélképen elkülöníthetők az emésztett minták (1: 12/2, 3: 25/3), melyek esetén a 2974 bp körüli PCR termék a plazmidhoz, míg az 1446 bp-os PCR termék a Pros $\beta 5R2$ génhez tartozik. Az emésztetlen minták esetén csak egy jel detektálható 4000 bp körüli értéknél (2: 12/2, 4: 25/3). B: pJET1.2. plazmid a beépített Pros $\beta 5R2$ génnel és BglII restrikciós hasító helyekkel.

Megállapítottuk, hogy a CRISPR/Cas9 technológiával előállítottunk a $\beta 5R2$ génben a genomi régió 17.990.514-tól 17.991.316-ig terjedő delécióját (7. ábra).

A 25-ös vonal mutáns törzs homozigóta életképesnek bizonyult. A homozigóta Pros $\beta 5R2^{A25}$ állatait megvizsgálva a hímek sterilitását állapítottuk meg, míg a heterozigóták fertilisnek bizonyultak.

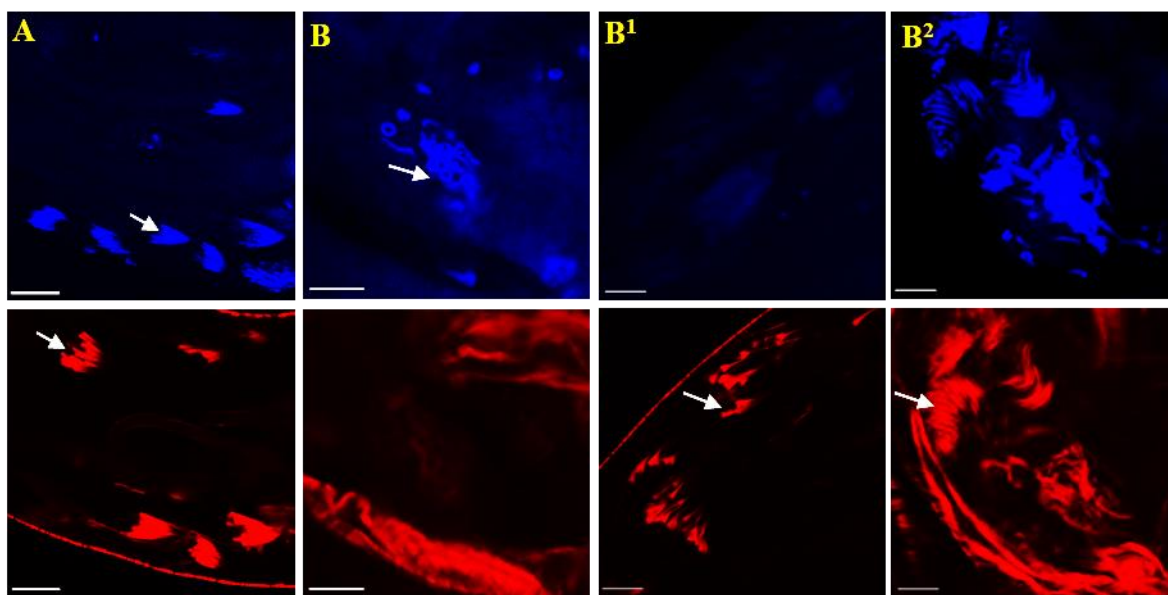
A korábban a Pros $\beta 5R2$ mutánshoz hasonlóan CRISPR/Cas9 technológiával a laboratóriumban előállított Pros $\beta 5R1^{A26}$ mutánt (7. ábra) is megvizsgáltuk. A homozigóta Pros $\beta 5R1^{A26}$ állatok életképesek, és a mutáns hímek fertilisnek bizonyultak. A homozigóta Pros $\beta 5R1^{A26}$ mutánsok testiszében a ciszták megnyúlása normális, a sejtmagok a vad típushoz hasonló, normális morfológiát mutatnak a megnyúlásuk korai és késői szakaszában is (18. ábra).

4.3. Homozigóta Pros $\beta 5R2^{A25}$ mutáns fenotípusának vizsgálata

A homozigóta Pros $\beta 5R2^{A25}$ mutáns vonal sterilnek bizonyult, így a mutáns testiszek részletesebb fenotipikus jellemzésével folytattuk a vizsgálatokat. A testiszekben található különböző sejtoranellumokat fluoreszcens festékekkel tettük láthatóvá. A sejtmagokban található DNS festésére DAPI festéket, míg az individualizáció nyomon követésére az aktin

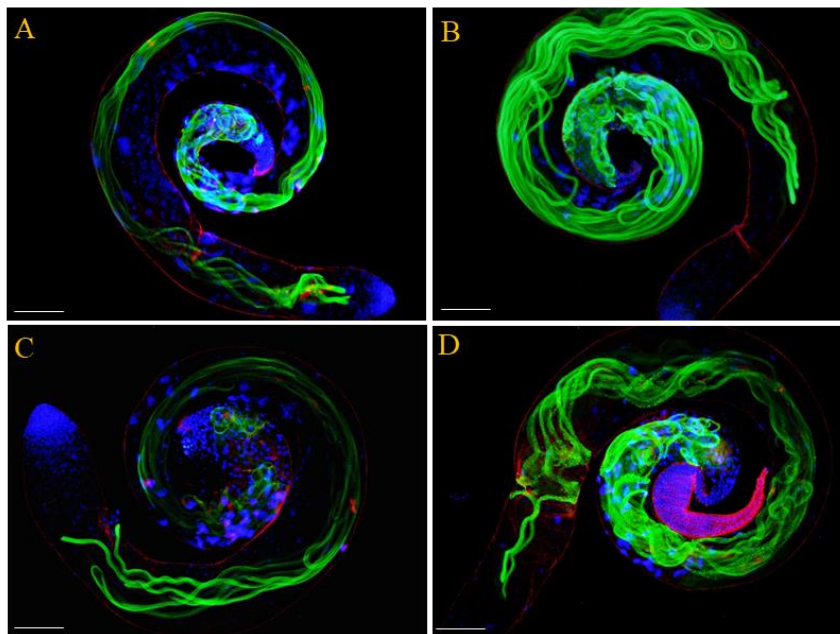
kúpokat fluoreszcensen jelölt Phalloidin segítségével tettük láthatóvá konfokális mikroszkópiát alkalmazva (12. ábra).

A homozigóta *Prosβ5R2^{Δ25}* mutáns testiszének vizsgálata során megállapítottuk, hogy az individualizáció kezdetére a spermatidák sejtmagjai a vad típusban tapasztalt túszerű megnyúlást nem minden esetben mutatják, lekerekednek, és szétszóródhatnak a testiszben. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a sejtmagok megnyúlása nem megfelelően történik meg a *Prosβ5R2^{Δ25}* mutánsban. Az abnormalis ciszták mellett ugyanakkor megfigyelhetők a korábbi fejlődési stádiumban lévő normális, vad típusú ciszták is, melyek esetében a sejtmagok megnyúlása normálisan elindul (20. ábra). Az individualizációs komplex (IC) kialakulása és vándorlása jól nyomon követhető az IC-ben található aktin kúpok követésével Phalloidin festéssel. A vad típushoz képest a homozigóta *Prosβ5R2^{Δ25}* mutánsban kevesebb a kialakuló aktin kúpok száma, a vándorlásuk pedig nem szinkronizáltan történik, amely összhangban van a magmegnyúlási hibából eredő cisztarendellenességekkel.



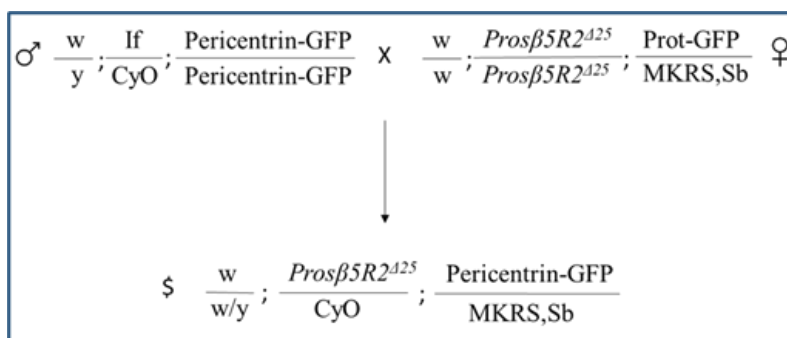
12. ábra: Sejtmagok és IC festése fluoreszcens próbákkal. DAPI fluoreszcens festéssel megfestett sejtmagok (kék), Texas Red®-X Phalloidin fluoreszcens festéssel megfestett aktin kúpok (piros). A: kontroll (vad típusú) testisz, tú alakú megnyúlt sejtmagokat tartalmazó ciszta (fehér nyíl), és szinkronizáltan vándorló IC (aktin kúpok, fehér nyíl); B: homozigóta *Prosβ5R2^{Δ25}* mutáns testisz: abnormalis, kör morfológiájú sejtmagok (fehér nyíl); szétszóródott, nem szinkronizáltan vándorló IC (aktin kúpok, fehér nyíl) (B¹); normálisan kialakuló aktin kúpok (fehér nyíl) (B²). Mérés: A, B¹: 20 μm; B, B²: 10 μm.

Annak érdekében, hogy az axonémát is vizsgálni tudjuk, immunfestést végeztünk testisz preparátumokon poliglicilált Tubulin elleni ellenanyaggal (AXO49) (13. ábra). A homozigóta *Prosβ5R2^{Δ25}* mutánsban az axonéma rövidebb, szignifikáns különbség figyelhető meg a vad típushoz képest, ahogy azt a statisztikai vizsgálat eredményei is mutatják (19. ábra).



13. ábra: Az axonéma kialakulásának és hosszának vizsgálata. DAPI fluoreszcens festékekkel megfestett sejtmagok (kék), Texas Red®-X Phalloidin fluoreszcens festékekkel megfestett aktin kúpok (piros), AXO49 ellenanyaggal jelölt axonéma (zöld). A: kontroll (vad típusú) teljes testisz; B: homozigóta *Prosβ5R2^{Δ25}* mutáns teljes testisz; C: kettős homozigóta *Prosβ5R1^{Δ26}*, *Prosβ5R2^{Δ25}* mutáns teljes testisz; D: homozigóta *Rpn12R^M* mutáns teljes testisz. Mércse: 200 μm.

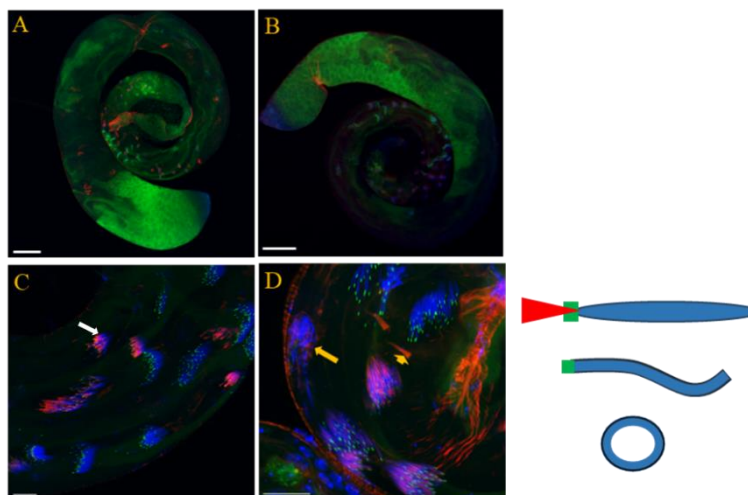
Annak érdekében, hogy megállapítsuk, hogy a *Prosβ5R2* mutánsban megfigyelt magmegnyúlási hiba a bazális test hibájával párosul-e, a Pericentrin-GFP bazális test markert használtuk. Pericentrin-GFP-t hordozó transzgenikus törzset állítottunk elő *Prosβ5R2* mutáns háttéren az alábbi keresztezési séma alapján (14. ábra).



14. ábra: Pericentrin-GFP-t hordozó *Prosβ5R2* mutáns törzs alapítása.

A vad típusú bazális testek konfokális mikroszkóppal történő vizsgálata során a Pericentrin-GFP detektálható volt a korai megnyúlt stádiumoktól kezdve a késői megnyúlási stádiumon át a megnyúlt, tű alakú sejtmagokig a centroszómán és a meiózist követően a bazális testen. A

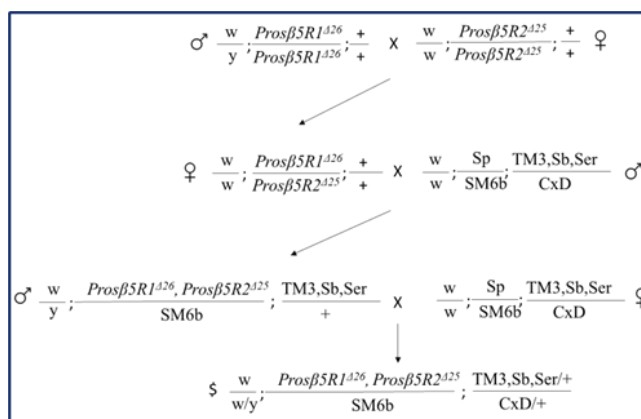
Pericentrin-GFP jel a sejtmagok bazális végén, az akroszómával ellentétes oldalon detektálható a megnyúlt, teljesen érett spermiumokban (15. ábra). A homozigóta *Prosβ5R2^{Δ25}* mutánsokban a Pericentrin-GFP jel a megnyúlt sejtmagok bazális végén általában megtalálható, de az abnormálisan megnyúlt magok esetében nagyon gyengén detektálható, ami a bazális test hiányára, elvesztésére utal ezekben a cisztákban (15. ábra, D).



15. ábra: DAPI fluoreszcens festékekkel megfestett sejtmagok (kék), Texas Red®-X Phalloidin fluoreszcens festékekkel megfestett aktin kúpok (piros), bazális testek jelölése Pericentrin-GFP-vel (zöld). A: kontroll (vad típusú) teljes testisz; B: homozigóta *Prosβ5R2^{Δ25}* mutáns teljes testisz; C: normális, tú alakú sejtmagokat tartalmazó ciszta (fehér nyíl), és normálisan vándorló IC (aktin kúpok) vad típusú testiszben; D: abnormális sejtmagok (sárga nyíl) és aktin kúpok (sárga nyílhegy) homozigóta *Prosβ5R2^{Δ25}* mutáns testiszben. A sematikus ábra a fenotípusok összefoglalását mutatja. Mércé: A, B: 100 μm; C, D: 20 μm.

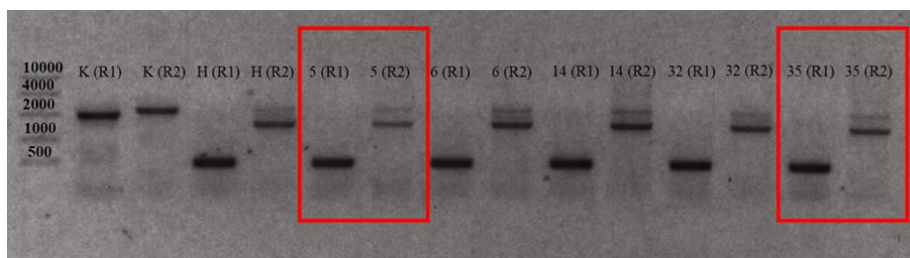
4.4. A β5R1 gén redundáns szerepének vizsgálata a spermatogenezisben

A β5R1 gén mutánsa homozigóta életképes és fertilis. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a két testisz-specifikus β5R gén szerepét, *Prosβ5R1^{Δ26}*, *Prosβ5R2^{Δ25}* kettős mutánst állítottunk elő. Mivel mindkét β5R gén a 2. kromoszómán található, rekombinációval a 16. ábrán látható keresztezési séma alapján hoztuk létre a kettős mutánsokat:



16. ábra: *Prosβ5R1^{Δ26}*, *Prosβ5R2^{Δ25}* kettős mutánsok előállítása rekombinációval.

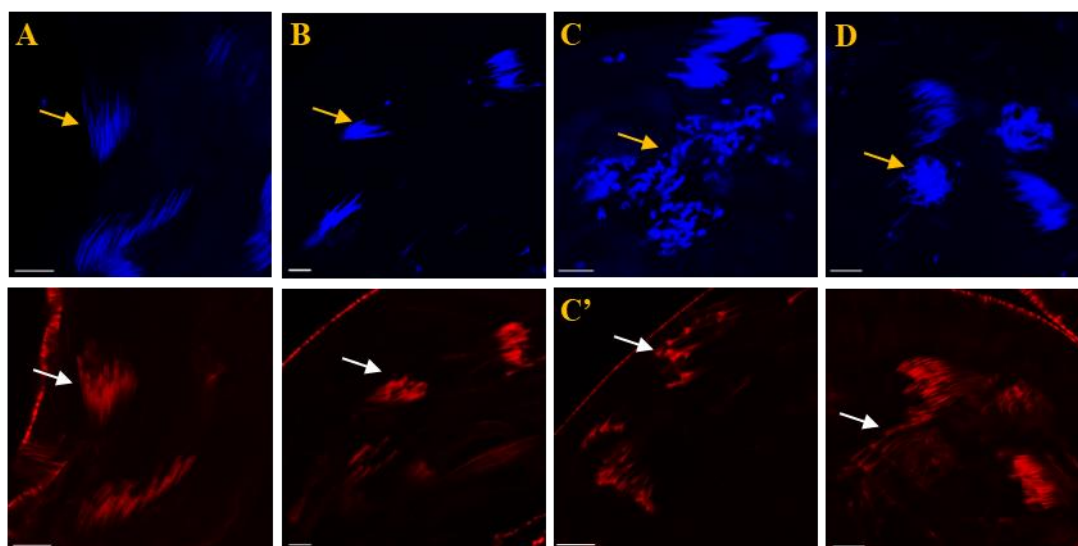
A kettős mutánsok előállításának sikerességét a két génre specifikus PCR segítségével ellenőriztük (17. ábra).



17. ábra: Gélkép a $\beta 5R1$ és a $\beta 5R2$ génen végzett PCR termékeiről. A kontroll 1935 bp (K, R1) és 2249 bp-os (K, R2) értékéhez képest a heterozigóta (H) és homozigóta mutáns (5, 6, 14, 32 és 35-ös vonalak) legyekből származó $\beta 5R1$ minták esetén a PCR termék 500 bp, míg a $\beta 5R2$ minták esetén 1446 bp-os, ami a két gén együttes hiányára utal a kettős mutánsban.

A mindkét mutációt tartalmazó *Prosβ5R1^{Δ26}*, *Prosβ5R2^{Δ25}* törzseket PCR segítségével teszteltük és a mindkét mutációt hordozó 5-, és 35-ös számú vonalakból törzset alapítottunk.

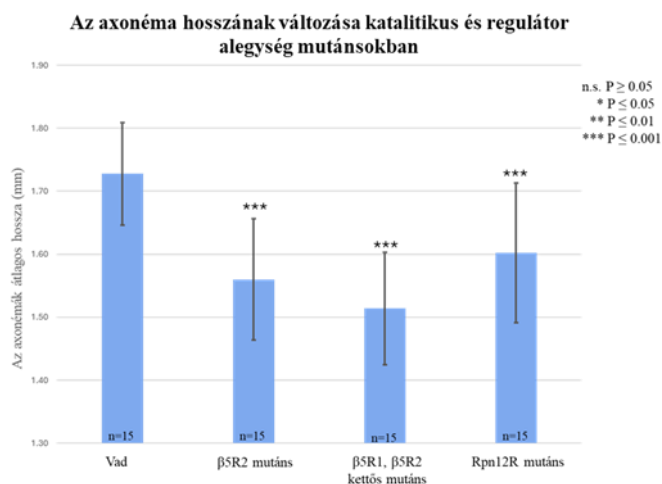
A törzsek homozigóta formában életképesek voltak és hímsterilitást mutattak. A hímsteril fenotípust a továbbiakban a tesztiszek sejtmagi festésével ellenőriztük (18. ábra). A sejtmagok megnyúlása a *Prosβ5R1^{Δ26}*, *Prosβ5R2^{Δ25}* kettős mutáns spermátidákban a homozigóta *Prosβ5R2^{Δ25}* fenotípusához hasonló, azaz abnormalis kör morfológiájú sejtmagok és a hibásan vándorló aktin kúpok voltak megfigyelhetők, valamint a vártaknak megfelelően érett spermiumokat sem tartalmazott a szeminális vezikulum. Mivel további abnormalitást nem mutattak a *Prosβ5R1^{Δ26}*, *Prosβ5R2^{Δ25}* kettős mutánsok, így megerősítést nyert, hogy a *Prosβ5R1* gén redundáns funkciót tölt be a spermatogenezisben.



18. ábra: A sejtmagok és az aktinkúpok vizsgálata fluoreszcens festékekkel. DAPI fluoreszcens festékkel megfestett sejtmagok (kék), Texas Red®-X Phalloidin fluoreszcens festékkel megfestett aktin kúpok (piros). A: kontroll (vad típusú) tesztisz, tú alakú megnyúlt sejtmagokat tartalmazó ciszta (sárga nyíl), és szinkronizáltan vándorló IC (aktin kúpok, fehér nyíl); B: homozigóta *Prosβ5R1^{Δ26}* mutáns tesztisz, normális (vad típusú) morfológiájú sejtmagok (sárga nyíl), és szinkronizáltan vándorló IC

(aktin kúpok, fehér nyíl); C: homozigóta *Prosβ5R2^{Δ25}* mutáns testisz, abnormalis kör morfológiájú sejtmagokat tartalmazó ciszták (sárga nyíl), és nem szinkronizáltan vándorló IC (aktin kúpok, fehér nyíl); D: kettős homozigóta *Prosβ5R1^{Δ26}*, *Prosβ5R2^{Δ25}* mutáns testisz, abnormalis kör morfológiájú sejtmagokat tartalmazó ciszták (sárga nyíl), és nem szinkronizáltan vándorló IC (aktin kúpok, fehér nyíl). Mércse: A, B, C, D: 10 μm; C': 20 μm.

A statisztikai vizsgálatok alapján nyilvánvalóvá vált, hogy az egyszeres mutánsokban (homozigóta *Rpn12R^M*, és homozigóta *Prosβ5R2^{Δ25}* mutáns), és a homozigóta kettős mutánsban is szignifikáns különbség van az axonéma hosszában a vad típushoz képest (19. ábra). Az *Rpn12R* és *Prosβ5R2* gének, valamint a *Prosβ5R1* és *Prosβ5R2* gének együttes hiánya is befolyásolja az axonéma kialakulását, szerveződését, ezáltal hatással lehetnek a spermatidák megnyúlására.



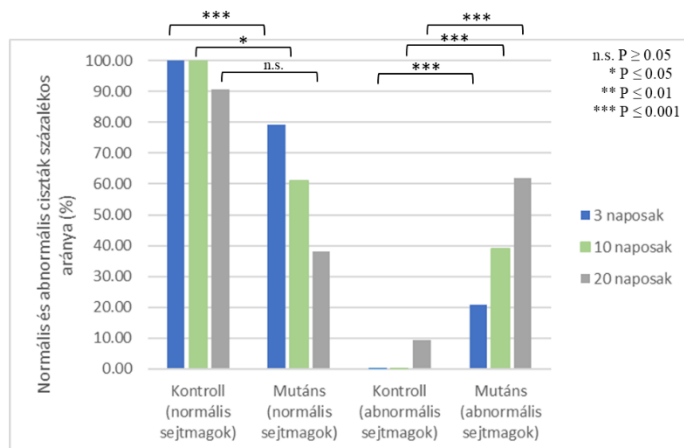
19. ábra: Az axonéma hosszának változása katalitikus és regulátor alegység mutánsokban. A vad típusú (kontroll) testiszben mért axonémák hosszához viszonyítva szignifikáns különbség tapasztalható a homozigóta *Prosβ5R2^{Δ25}* és a kettős homozigóta *Prosβ5R1^{Δ26}*, *Prosβ5R2^{Δ25}* mutáns, valamint a homozigóta *Rpn12R^M* mutánsban jelenlévő axonémákhoz képest. A P értéke minden esetben ≤ 0.001 .

4.5. Az állatok korának változásával a sejtmag fenotípusok változása

A sejtmagi abnormalitást különböző korú hím állatokban is megvizsgáltuk, hiszen irodalmi adatokból tudjuk, hogy a kor előrehaladtával az állatok fertilitása csökken és a tapasztalt fenotípusok felerősödnek.¹⁷ 3, 10 és 20 napos állatokat használtunk a korfüggő fenotípus változás megállapítására. Azt tapasztaltuk, hogy a kor előrehaladtával a vad típushoz viszonyítva megnő az abnormalis ciszták aránya a homozigóta *Prosβ5R2^{Δ25}* mutánsban (20.

ábra). A homozigóta *Prosβ5R2⁴²⁵* mutánsok életkorával korrelálva nő az abnormális sejtmagokat tartalmazó ciszták száma.

Az abnormális sejtmagokat tartalmazó ciszták számának változása az életkorral 3, 10 és 20 napos homozigóta *Prosβ5R2⁴²⁵* mutáns legyekben.

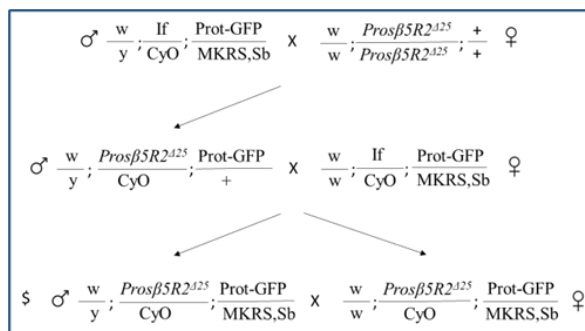


20. ábra: Az abnormális sejtmagokat tartalmazó ciszták számának változása az életkorral. 3, 10 és 20 napos vad típusú (3 napos n= 110 ciszta, 10 napos n= 101 ciszta, 20 napos n= 54 ciszta) és homozigóta *Prosβ5R2⁴²⁵* mutáns (3 napos n= 134 ciszta, 10 napos n= 133 ciszta, 20 napos n= 123 ciszta) tesztszekben a megnyúlt ciszták sejtmagjait számoltuk.

4.6. Hiszton-protamin átmenet vizsgálata homozigóta *Prosβ5R2⁴²⁵* mutánsban

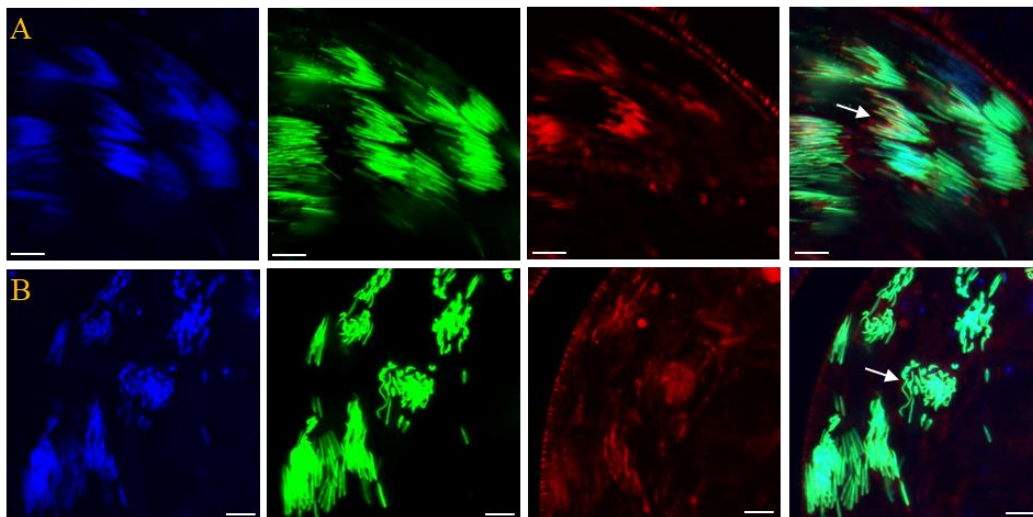
A magasabbrendű szervezetekben a spermium kromatinja nagy mértékben kondenzált protamin-alapú szerkezetbe szerveződik. A hiszton-protamin csere kondenzált, szorosabb kromatin struktúrát eredményez, mely a poszt-meiotikus fejlődés első szakaszában, a megnyúlás során történik.

Annak érdekében, hogy vizsgálni tudjuk létrejön-e a hiszton-protamin csere, homozigóta *Prosβ5R2⁴²⁵* mutánsokat kereszteztünk Protamin-GFP-t hordozó transzgenikus törzsszel (21. ábra).

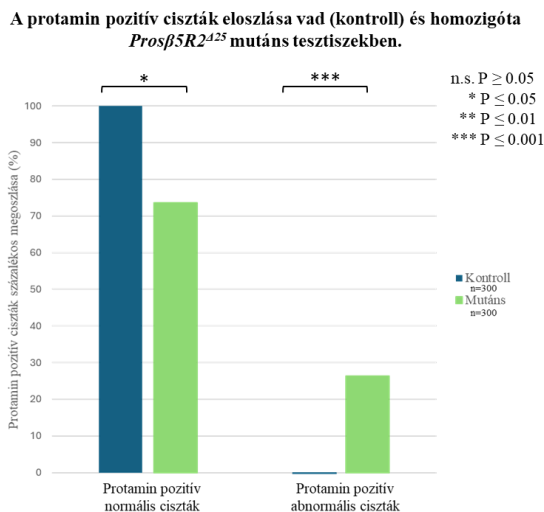


21. ábra: Protamine-GFP-t hordozó *Prosβ5R2⁴²⁵* törzs előállítása.

A hiszton-protamin csere a *Prosβ5R2⁴²⁵* mutánsok esetében megtörténik, ugyanis a GFP jel detektálható volt az abnormális, szétszóródott sejtmagokban (22. ábra). A homozigóta *Prosβ5R2⁴²⁵* mutánsban a ciszták közel 26%-a abnormális, de ezek mindegyikében megtörténik a hiszton-protamin csere (23. ábra).



22. ábra: A hiszton-protamin átmenet vizsgálata. DAPI fluoreszcens festékkel megfestett sejtmagok (kék), Protamin-GFP (zöld), Texas Red®-X Phalloidin fluoreszcens festékkel megfestett aktin kúpok (piros). A: kontroll (vad típusú) tesztisz megnyúlt sejtmagokkal, a protamin-GFP jel a sejtmagokban (fehér nyíl) detektálható; B: homozigóta *Prosβ5R2⁴²⁵* mutáns tesztisz, az abnormális, kör morfológiájú sejtmagokban is detektálható a protamin-GFP jel (fehér nyíl). Mérce: A, B: 10 µm.

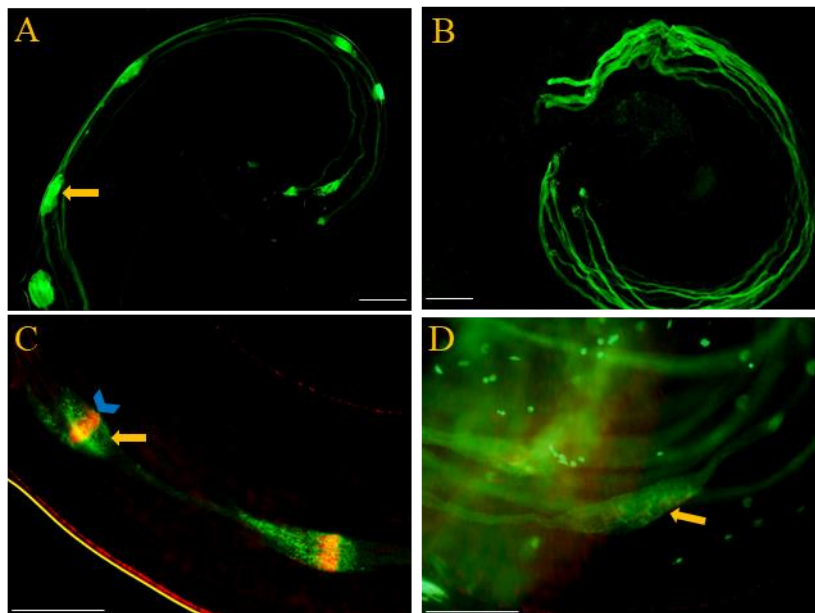


23. ábra: A protamin pozitív ciszták eloszlása vad (kontroll) és homozigóta *Prosβ5R2⁴²⁵* mutáns tesztiszekben.

4.7. Kaszpáz-3 jelenlétének vizsgálata a cisztikus hólyagban immunfestéssel

A cisztikus hólyagban két különböző fehérje lebontó folyamatot azonosítottak, egyrészt a proteaszóma, másrészt a kaszpázok által irányítottat. Annak érdekében, hogy a kaszpáz aktivitást vizsgálni tudjuk, immunfestettük a vad típusú és a *Prosβ5R2⁴²⁵* mutáns tesztiszeket Caspase-3 elsődleges, és fluoreszcensen jelölt másodlagos ellenanyaggal (24. ábra).

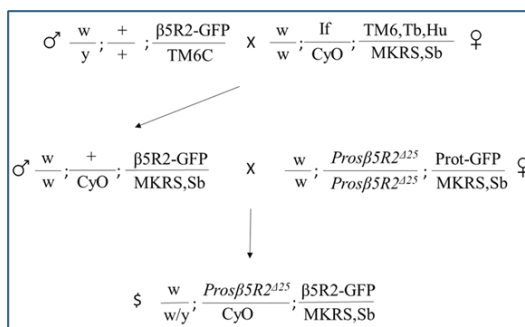
A vad típusban a nem apoptotikus kaszpázok a cisztikus hólyagban az IC környezetében halmozódik fel, míg a homozigóta *Prosβ5R2⁴²⁵* mutáns testiszben bár a kaszpázok aktiválódnak az individualizáció kezdetén, azok nem halmozódnak fel a cisztikus hólyagban, a ciszták teljes hosszában megfigyelhetők. A mutánsban a cisztikus hólyagok többsége abnormalis morfológiát mutat, vagy teljesen hiányzik (24. ábra).



24. ábra: A fehérjedegradáció detektálása a kaszpáz aktivitás követésével. Kaszpáz-3 jelölése α -rabbit Alexa Fluor 488 másodlagos ellenanyaggal (zöld), illetve Phalloidin festés (piros). A: kontroll (vad típusú) teljes testisz cisztikus hólyagokkal (sárga nyíl); B: homozigóta *Prosβ5R2⁴²⁵* mutáns teljes testisz cisztikus hólyagok nélkül/abnormalis cisztikus hólyagokkal; C: normális cisztikus hólyagok (sárga nyíl) az IC-vel (kék nyílhegy) vad típusú testiszben; D: abnormalis cisztikus hólyag (sárga nyíl) mutáns testiszben. Mércse: A, B: 200 μ m; C, D: 100 μ m.

4.8. A hímsteril mutáns fenotípusának menekítése β5R2-GFP-t hordozó transzgénnel

A hímsteril mutáns fenotípusának menekítése során azt vizsgáltuk, hogy az érintett gén vad típusú kópiáját tartalmazó transzgén menekíteni tudja-e a homozigóta *Prosβ5R2⁴²⁵* mutáns sterilitását. Ennek megvalósítására a 3. kromoszómás β5R2-GFP-t hordozó transzgenikus törzs és a β5R2 mutáns törzset kereszteztük egymással (25. ábra).



25. ábra: A homozigóta *Prosβ5R2⁴²⁵* mutáns menekítése β5R2-GFP transzgénnel.

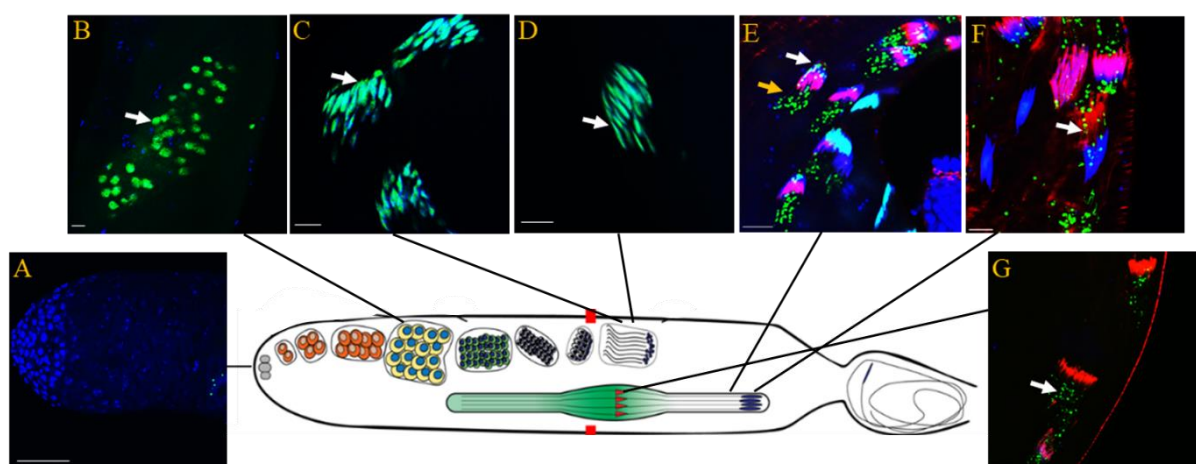
A $\beta 5R2$ -GFP-t hordozó *Pros\beta 5R2^{A25}* mutáns törzs fertilitását megvizsgáltuk fiolánként és azt a vad típussal megegyezőnek tapasztaltuk (10. táblázat), ami azt jelenti, hogy a jelölt transzgén funkcióképes és alkalmas lehet a sejten belüli lokalizáció meghatározására.

A vizsgált genotípus	Eredmények (fiola/fiola)
w/y; <i>Pros\beta 5R2^{A25}/Pros\beta 5R2^{A25}</i> ; $\beta 5R2$ -GFP/ $\beta 5R2$ -GFP	15/15 fertilis
w/y; <i>Pros\beta 5R2^{A25}/Pros\beta 5R2^{A25}</i> ; $\beta 5R2$ -GFP/ MKRS,Sb	15/15 fertilis
w/y; <i>Pros\beta 5R2^{A25}/Pros\beta 5R2^{A25}</i> ; +/+	15/15 steril
w ¹¹¹⁸ /y; +/+; +/+	15/15 fertilis

10. táblázat: Fertilitási tesztek.

4.9. A katalitikus $\beta 5R2$ alegység lokalizációja

A $\beta 5R2$ lokalizációját a $\beta 5R2$ -GFP transzgénnel menekített törzsben vizsgáltuk meg, annak érdekében, hogy a transzgénnek az endogén géntermékkel ne kelljen a komplexbe történő beépülésért versenyezni. A $\beta 5R2$ -GFP a spermatogenezis korai és a meiózist követő magmegnyúlási szakaszában a sejtmagokba lokalizálódik, majd az individualizáció során a magi lokalizáció mellett a cisztikus hólyagban kisebb partikulumok formájában is felhalmozódik (26. ábra). Az individualizáció kezdetére, az aktin kúpok vándorlásának megkezdését megelőzően a $\beta 5R2$ alegység a cisztikus hólyagban, az aktin kúpok előtt, valamint a sejtmagok bazális végénél is megtalálható. Az aktin kúpok vándorlása során a proteaszóma az aktin kúpok mögé rendeződik a cisztikus hólyagban.

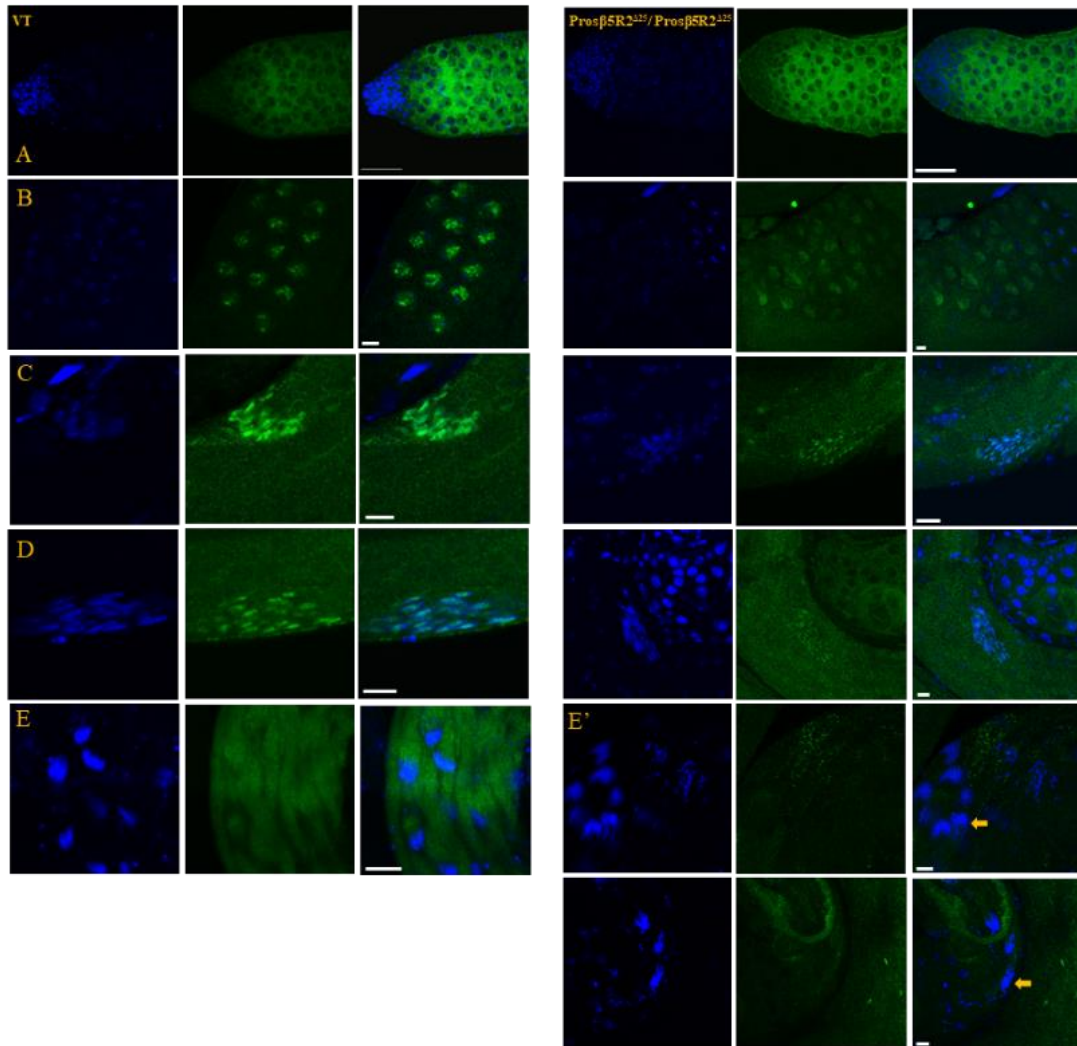


26. ábra: $\beta 5R2$ -GFP transzgén lokalizációja a spermatogenezis során. Homozigóta *Pros\beta 5R2^{A25}*; $\beta 5R2$ -GFP testiszeket fixálás után DAPI-val és Phalloidinnel (IC) festettük és konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk. $\beta 5R2$ -GFP (zöld), DAPI fluoreszcens festékkel megfestett sejtmagok (kék), Texas Red®-X Phalloidin fluoreszcens festékkel megfestett aktin kúpok (piros). A: apikális régió; B, C és D: a $\beta 5R2$ -GFP a sejtmagokban lokalizálódik a spermatocitákban (B), a korai megnyúló (C és D) stádiumokban; E: a $\beta 5R2$ -GFP a késői stádiumokban cisztikus hólyagban, az aktin kúpok előtt (sárga nyíl), valamint a sejtmagok bazális végénél lokalizálódik (fehér nyíl), F: kezdetben a sejtmagtól elváló aktin kúpok (fehér nyíl), G: az aktin kúpok vándorlásával a proteaszóma az aktin kúpok mögé rendeződik (fehér nyíl). Mérce: A, E, G: 20 μ m; B, C, D, F: 10 μ m.

4.10. Rpn12R lokalizációjának vizsgálata homozigóta *Prosβ5R2^{Δ25}* mutánsban immunfestéssel

Az Rpn12 a proteaszóma regulátor alegységének a része. A *Drosophila melanogaster*-ben két *Rpn12* gén található, az általánosan kifejeződő *Rpn12* és a tesztisz-specifikus *Rpn12R*, melyek a humán PSMD8 génnel ortológok. Célunk a tesztisz-specifikus Rpn12R fehérje lokalizációjának megállapítása és annak a katalitikus alegységek lokalizációjával történő összehasonlítása. Az *Rpn12R* mutáns törzset a kutatócsoport korábbi munkája során azonosították és jellemezték. A homozigóta *Rpn12R^M* mutáns hímek sterilek, a sejtmagok megnyúlása normálisan megtörténik, de a spermatidák megnyúlása és egyedivé válása hibás (13., 19. ábra).

Az Rpn12R lokalizációját az Rpn12R-re specifikus ellenanyag segítségével vizsgáltuk immunfestést követően fluoreszcens- és konfokális mikroszkóppal vad típusban és homozigóta *Prosβ5R2^{Δ25}* mutáns tesztiszben. A vad típusban kezdetben a tesztisz apikális régiójában található 4-16 sejtes cisztákban az Rpn12R a citoplazmában található. A meiózistól kezdődően az Rpn12R a sejtmagban lokalizálódik, majd a megnyúlást követően a cisztákban tovább már nem detektálható. A Prosβ5R2-GFP jelölt katalitikus alegység esetében tapasztalt cisztikus hólyag specifikus festési mintázatot az Rpn12R fehérje esetében nem tapasztaltuk. A homozigóta *Prosβ5R2^{Δ25}* mutánsban a vad típussal azonos lokalizációs mintázatot mutat az Rpn12R. Következtetésként levonható, hogy a Prosβ5R2 gén hiányában a vad típushoz hasonlóan a regulátor alegység (Rpn12R) jelen van a korai stádiumokban, valamint a késői stádiumokban a sejtmagi jel már nem detektálható (27. ábra). Ez azt sugallja, hogy vad típushoz hasonlóan a homozigóta *Prosβ5R2^{Δ25}* mutánsban a proteaszóma a fedőkomplexxel együtt összeszerelődik, stabil marad, és a meiózistól kezdődően már a sejtmagban lokalizálódik (27. ábra).



27. ábra: Vad típus (VT) és homozigóta *Prosβ5R2^{Δ25}* mutáns testiszéről készült felvételek; Rpn12R elsődleges és α -rabbit Alexa 488 másodlagos ellenanyag (zöld), DAPI fluoreszcens festékekkel megfestett sejtmagok (kék). A: apikális régió, a 4-16 sejtes cisztákban az Rpn12R a citoplazmában lokalizálódik; B, C és D: az Rpn12R a sejtmagokban lokalizálódik a meiotikus stádiumoktól kezdődően (B), a „leaf”(C) és korai kenu (D) stádiumokban; E: az Rpn12R eltűnik a megnyúlt, valamint az abnormalis sejtmagokból (sárga nyilak). Mércé: A: 50 μ m; B, C, D, E’: 10 μ m; E: 20 μ m.

5. ÖSSZEGZÉS, KONKLÚZIÓ

Célunk volt a tesztisz-specifikus proteaszóma jellemzése klasszikus mutánsok előállításán, jellemzésén és a fehérjék spermatogenezis során történő elhelyezkedésének vizsgálatán keresztül. A vizsgálatok kiterjedtek mind a katalitikus (Pros β 5R1, Pros β 5R2), mind a regulátor alegység (Rpn12R) egy-egy tesztisz-specifikus tagjára. A kísérletek során a Pros β 5R2 gén kódoló régiójának eltávolítása CRISPR/Cas9 technológiával történt, majd ezt követte a létrehozott deléciós mutánsok vizsgálata klasszikus genetikai és molekuláris biológia módszerekkel, valamint fenotípusuk jellemzése mikroszkópiával. A korábban a Pros β 5R2 mutánshoz hasonlóan CRISPR/Cas9 technológiával előállított Pros β 5R1 és a P elem segítségével előállított Rpn12R mutánsok fenotípusát is megvizsgáltuk. A fertilitási teszt alapján a homozigóta Pros β 5R1⁴²⁶ mutánsok fertilisnek, míg a homozigóta Pros β 5R2⁴²⁵ és Rpn12R^M mutáns hímek sterilnek bizonyultak. A kettős homozigóta Pros β 5R1⁴²⁶, Pros β 5R2⁴²⁵ mutánsok szintén hímsterilnek bizonyultak. Mivel a hímsteril mutáns fenotípusok menekíthetők a β 5R2-GFP, illetve a vad típusú Rpn-12R transzgénnel, így megállapítottuk, hogy a β 5R2-GFP transzgén kifejeződési mintázata, illetve az Rpn12R transzgénnel átfedő Rpn12R ellenanyagias festés hűen tükrözi az endogén expressziós mintázatot.

A Pros β 5R2⁴²⁵ mutánsoknál a spermatogenezis korai stádiumai normálisan megtörténnek és a meiózt követően jellegzetes sejtmagi fenotípust mutatnak. A sejtmagok nem képesek a vad típusnak megfelelően megnyúlni, lekerekednek. A sejtmagi hiba mellett a ciszták hosszában is jelentős abnormalitás figyelhető meg. A fenotípusok az életkor függvényében erősödtek, a mutánsok életkorával korrelálva nő az abnormális sejtmagokat tartalmazó ciszták száma. Immunhisztokémia módszereket alkalmazva az egyes proteaszómális alegységek hiányában kialakuló fenotípusokat vizsgáltam, valamint jelentős figyelmet fordítottam az Rpn12R fehérje mennyiségi és lokalizációs vizsgálatára immunfestési technikákat alkalmazva.

A Pros β 5R2⁴²⁵ mutáns sejtmagi fenotípusának jellemzéséhez a Protamin-GFP riportert használva megállapítottuk, hogy Pros β 5R2 gén a hiszton-protamin átmenethez nem, de a sejtmagok megnyúlásához elengedhetetlen. A homozigóta Pros β 5R1⁴²⁶, Pros β 5R2⁴²⁵ kettős mutánsokon végzett vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy míg a Pros β 5R2 gén esszenciális a normális fertilitáshoz, addig a Pros β 5R1 gén redundáns funkciót tölt be a spermatogenezisben, mivel hiánya a kettős mutánsban sem erősítette a mutáns fenotípust. A homozigóta Pros β 5R2⁴²⁵ mutánsban a sejtmagok megnyúlása hibás, sok esetben a bazális testek a sejtmagoktól eltávolodnak, az axonémák kialakulnak, de hosszuk nem éri el a vad típusban található hosszt. Feltehetően a bazális testek magi beágyazódása hibás a Pros β 5R2⁴²⁵ mutánsban. Fluoreszcens riportergének segítségével megállapítottuk a Pros β 5R2 pontos

lokalizációját, mely során nyilvánvaló vált, hogy $\beta 5R2$ -GFP a spermatogenezis korai és magmegnyúlási szakaszában a sejtmagokban lokalizálódik, majd az individualizációs komplexhez a cisztikus hólyagokban. A regulátor alegység Rpn12R tagjának vizsgálatával megállapítottuk, hogy a Pros $\beta 5R2$ gén hiányában a regulátor komplex bár jelen van a korai stádiumokban, de jelenléte a késői stádiumokban már jelentősen csökken. A regulátor alegység hiánya nem befolyásolja a magok megnyúlását, de esszenciális a spermatogenezishez. Eredményeink alapján megerősítést nyert, hogy a specializálódott proteaszómának, azaz a tesztisz-specifikus proteaszómának kulcsfontosságú szerepe van a spermatogenezis poszt-meiotikus stádiumában.

Az emlősökben a spermatogenezis során jelenlévő konstitutív ubikvitilációs útvonal ellenére a hiszton degradáció a here-specifikus PA200-proteaszóma által valósul meg acetiláció-függő módon.¹⁶ Ismert, hogy a PA200 egy acetil-lizin-kötő bromodomént (BRD) tartalmaz, amely képes felismerni az acetilált hisztonokat. A PA200 C-terminális része a 20S katalitikus alegység $\alpha 1$ - $\alpha 2$ határfelületén lévő kötőzsebhez kötődnek, PA200-20S vagy PA200-20S-PA200 mintázatban. *Drosophilában* sem a PA200-nak nincs homológja, valamint az $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -nek sincs tesztisz-specifikus megfelelője. Ez azt sugallja, hogy a hiszton-protamin átmenet megvalósító folyamatok nem feltétlenül konzerváltak a spermatogenezisben. Ezt erősíti az a megfigyelés is, hogy a vizsgált hímsteril mutánsokban (Pros $\beta 5R2$, Rpn12R) a hiszton-protamin átmenet megtörténik. Ugyanakkor a spermatoproteaszóma magi lokalizációja konzervált, megfigyelhető a rovaroktól az emlősökig. A sejtmagban található polimerázok, transzkripció faktorok, valamint a sejtmagon belüli transzportfolyamatokat irányító fehérjék a spermatogenezis előrehaladtával degradálódnak, amely folyamatban a sejtmagi tesztisz-specifikus proteaszómák jelentős szerepet tölthetnek be. Az általunk létrehozott mutánsok és eszközrendszer lehetőséget nyújt a spermatogenezis késői stádiumaiban jelen lévő sejtmagi proteaszómális aktivitás vizsgálatához és jelentőségének megértéséhez.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni hálámat Dr. habil. Sinka Ritának, a kutatócsoport és a tanszék vezetőjének, hogy lehetőséget adott bekapcsolódni a kutatócsoport munkájába, mely során egy fantasztikus csapat tagjává válhattam. Köszönöm a folyamatos támogatását, a bizalmát, az útmutatást és a rengeteg szakmai segítséget is, valamint a lehetőséget, hogy rendkívül érdekes és változatos kísérletek lebonyolításában vehettem részt. Köszönöm Dr. Vedelek Viktornak a végtelen segítőkészségét, valamint hogy hasznos szakmai tanácsokkal látott el a kutatási munkám során. Továbbá szeretném megköszönni Dosztig Mónikának, Hajdúné Tóth Melindának és Bodroginé Török Anikónak, hogy a labormunkák lebonyolításában mindig készségesen segítettek, és hogy bármikor bizalommal fordulhattam hozzájuk egy-egy felmerülő probléma okán. Köszönjük Lipinszki Zoltánnak az Rpn12R ellenanyagot.

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

1. Mirzoyan, Z. *et al.* *Drosophila melanogaster*: A Model Organism to Study Cancer. *Front. Genet.* **10**, 51 (2019).
2. Yu, J. *et al.* Identification of seven genes essential for male fertility through a genome-wide association study of non-obstructive azoospermia and RNA interference-mediated large-scale functional screening in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 1493–1503 (2015).
3. Vedelek V. A *Drosophila melanogaster* poszt-meiotikus spermatogenezisében szerepet játszó gének vizsgálata. in 3111 (Szegedi Tudományegyetem, Szeged, Hungary, 2017). doi:10.14232/phd.3111.
4. Delaval, B. & Doxsey, S. J. Pericentrin in cellular function and disease. *J. Cell Biol.* **188**, 181–190 (2010).
5. Fabian, L. & Brill, J. A. *Drosophila* spermiogenesis: Big things come from little packages. *Spermatogenesis* **2**, 197–212 (2012).
6. Rathke, C., Baarends, W. M., Awe, S. & Renkawitz-Pohl, R. Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1839**, 155–168 (2014).
7. Rathke, C. *et al.* Transition from a nucleosome-based to a protamine-based chromatin configuration during spermiogenesis in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* **120**, 1689–1700 (2007).
8. Arama, E., Agapite, J. & Steller, H. Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in *Drosophila*. *Dev. Cell* **4**, 687–697 (2003).
9. Xiong, Y., Yu, C. & Zhang, Q. Ubiquitin-Proteasome System-Regulated Protein Degradation in Spermatogenesis. *Cells* **11**, 1058 (2022).
10. Cohen-Kaplan, V., Livneh, I., Avni, N., Cohen-Rosenzweig, C. & Ciechanover, A. The ubiquitin-proteasome system and autophagy: Coordinated and independent activities. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **79**, 403–418 (2016).
11. Zhong, L. & Belote, J. M. The testis-specific proteasome subunit Prosalpha6T of *D. melanogaster* is required for individualization and nuclear maturation during spermatogenesis. *Dev. Camb. Engl.* **134**, 3517–3525 (2007).
12. Tanaka, K. The proteasome: overview of structure and functions. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **85**, 12–36 (2009).
13. Abi Habib, J., Lesenfans, J., Vigneron, N. & Van den Eynde, B. J. Functional Differences between Proteasome Subtypes. *Cells* **11**, 421 (2022).
14. Belote, J. M., Miller, M. & Smyth, K. A. Evolutionary conservation of a testes-specific proteasome subunit gene in *Drosophila*. *Gene* **215**, 93–100 (1998).
15. Vedelek, V. *et al.* Analysis of *Drosophila melanogaster* testis transcriptome. *BMC Genomics* **19**, 697 (2018).
16. Qian, M.-X. *et al.* Acetylation-mediated proteasomal degradation of core histones during DNA repair and spermatogenesis. *Cell* **153**, 1012–1024 (2013).
17. Tovey, C. A. *et al.* γ -TuRC Heterogeneity Revealed by Analysis of Mozart1. *Curr. Biol.* **28**, 2314–2323.e6 (2018).