



A tesztisz-specifikus proteaszóma genetikai és molekuláris jellemzése *Drosophila melanogaster*ben



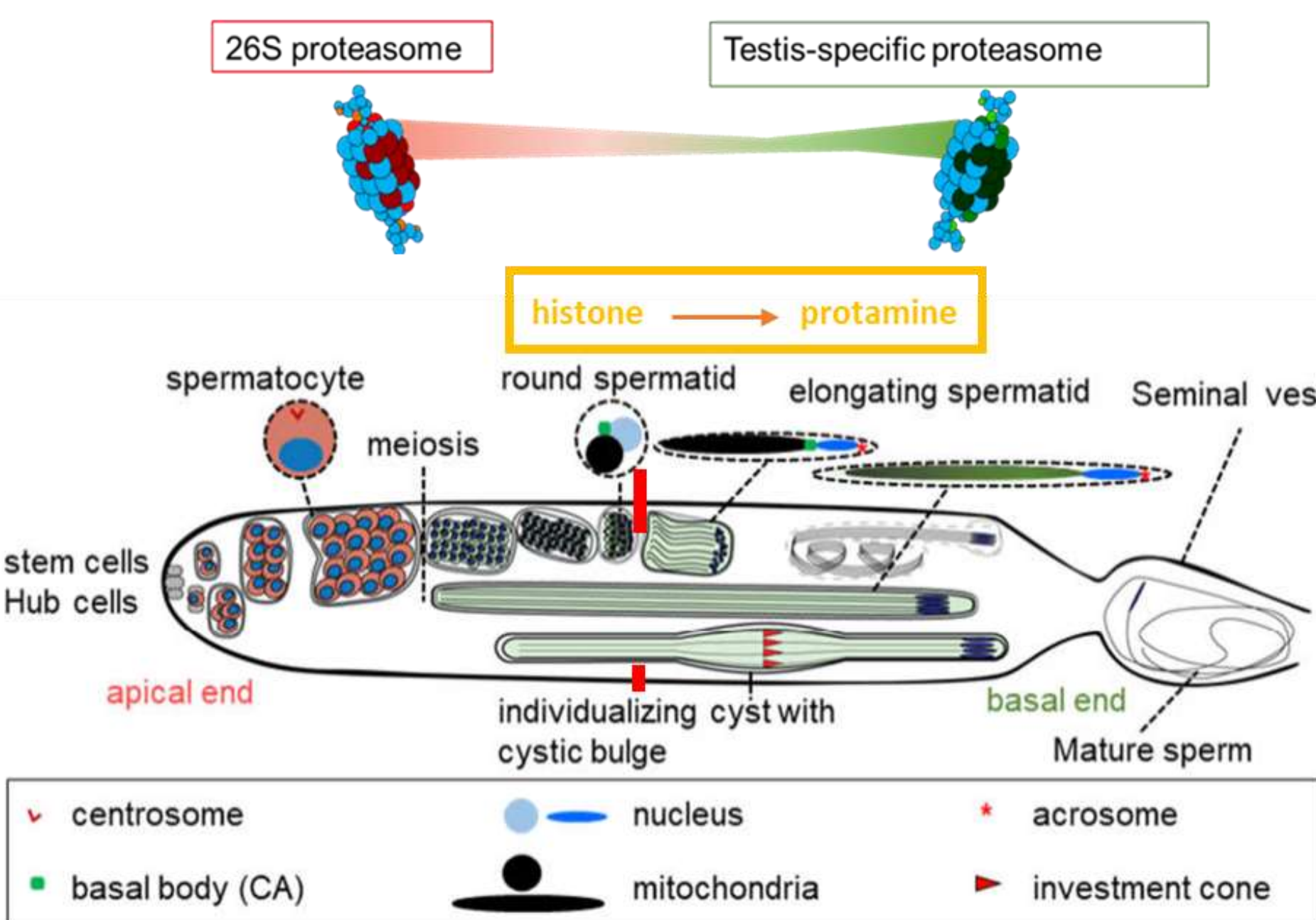
Lepár Dávid¹, Krecsmarik Mónika¹, Lipinszki Zoltán², Vedelek Viktor¹ és Sinka Rita¹

¹ Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Genetikai Tanszék, Szeged

² Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet, Szeged

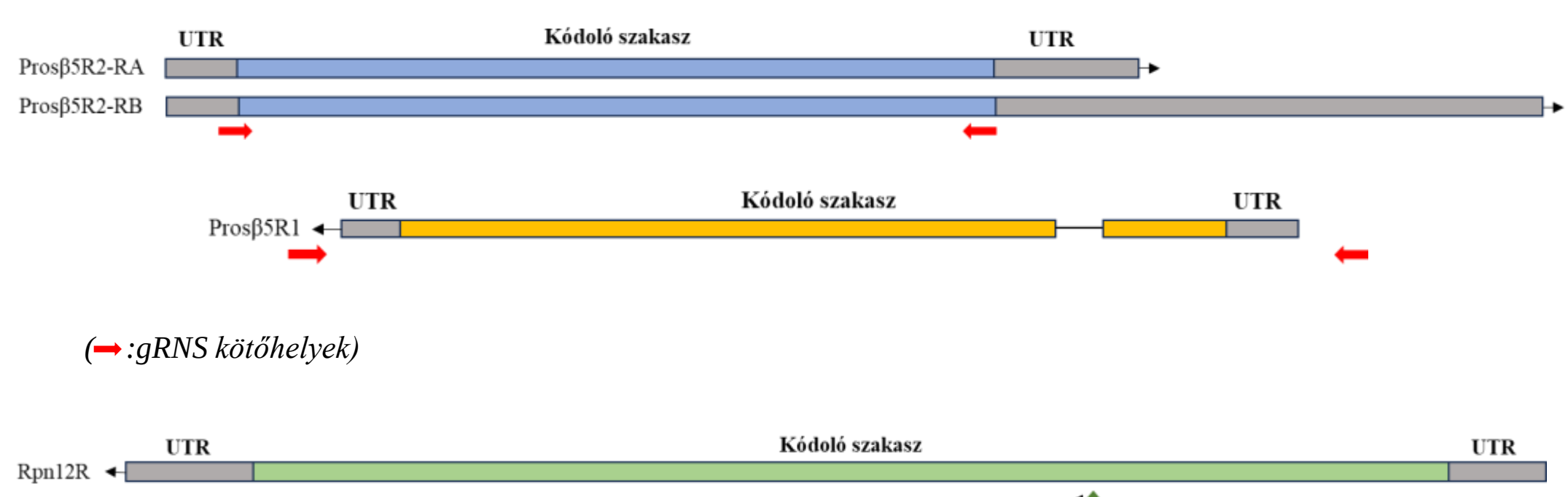
A célunk az emlősökben lejátszódó spermatoproteaszóma általi fehérjelebontás jobb megértése a *Drosophila melanogaster*ben megtalálható, az emlősökéhez hasonló tesztisz-specifikus proteaszóma alegységeinek vizsgálatán keresztül. Célunk a katalitikus Pros β 5R1 és Pros β 5R2, valamint a regulátor Rpn12R alegységek spermatogenezisben betöltött szerepének vizsgálata, valamint azok részletes genetikai, molekuláris és biokémiai jellemzése.

A *Drosophila melanogaster* spermatogenezisének sematikus ábrázolása és a proteaszómák típusai a különböző fejlődési stádiumokban.



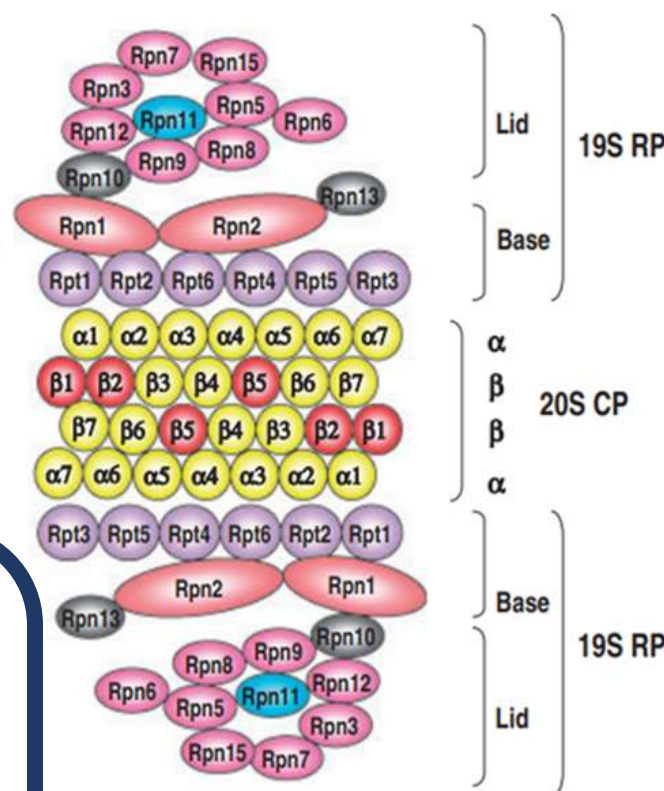
A Pros β 5R1 és Pros β 5R2 mutánsok előállítás

A Pros β 5R1 és Pros β 5R2 mutánsok előállítása CRISPR/Cas9 technológiával, míg az Rpn12R mutáns előállítása P elem segítségével történt.



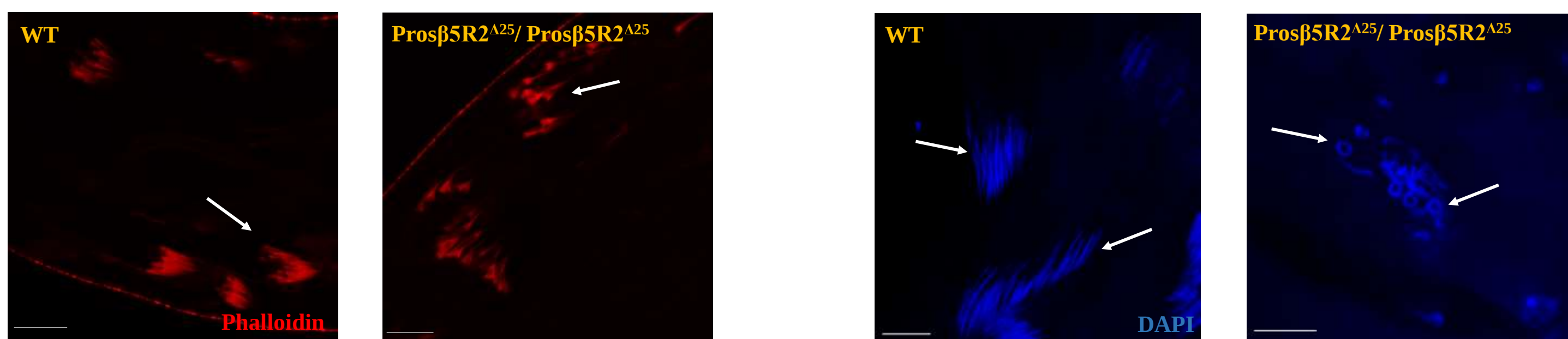
A fertilitási teszt alapján a homozigóta Pros β 5R1 mutánsok fertilsnek, míg a homozigóta Pros β 5R2^{Δ25} és Rpn12R^M mutáns hímek sterilnek bizonyultak. A kettős homozigóta Pros β 5R1;Pros β 5R2 mutánsok szintén hímsterilnek bizonyultak. A hímsteril mutáns fenotípusok menekíthetők a β 5R2-GFP illetve az vad típusú Rpn-12 transzgénnel.

	Protea- szóma alegység	Funkció	Testisz- specifikus izotoma	Aminosav egyeztés		Protea- szóma alegység	Funkció	Testisz- specifikus izotoma	Aminosav egyeztés		Protea- szóma alegység	Funkció	Testisz- specifikus izotoma	Aminosav Egyezés
Mag	α 1		-	-	Alap	Rpn1	ATPáz	-	-	Feelő	Rpn3	DUB aktivitás	-	-
	α 2		-	-		Rpn2	ATPáz	-	-		Rpn4		-	-
	α 3		α 3T	58%		Rpn3	ATPáz	Rpn3R	77%		Rpn5		-	-
	α 4		α 4T1	74%		Rpn4	ATPáz	Rpn4R	62%		Rpn6		-	-
	α 5		α 4T2	54%		Rpn5	ATPáz	-	-		Rpn7		-	-
	α 6		α 6T	64%		Rpn6	ATPáz	Rpn6R	58%		Rpn8		-	-
	α 7		-	-		Rpn7	-	-	-		Rpn9		-	-
β 1	proteolízis	-	-	-		Rpn10	Ub receptor	-	-		Rpn11		-	-
β 2	proteolízis	β 2R1	62%	-		Rpn12		-	-		Rpn13		-	-
		β 2R2	36%	-							Uch37	aktíválás	Uch37R	56%
β 3		-	-	-										
β 4		β 4R1	43%	-										
		β 4R2	55%	-										
β 5	proteolízis	β 5R1	53%	-										
β 6		-	-	-										
β 7		-	-	-										



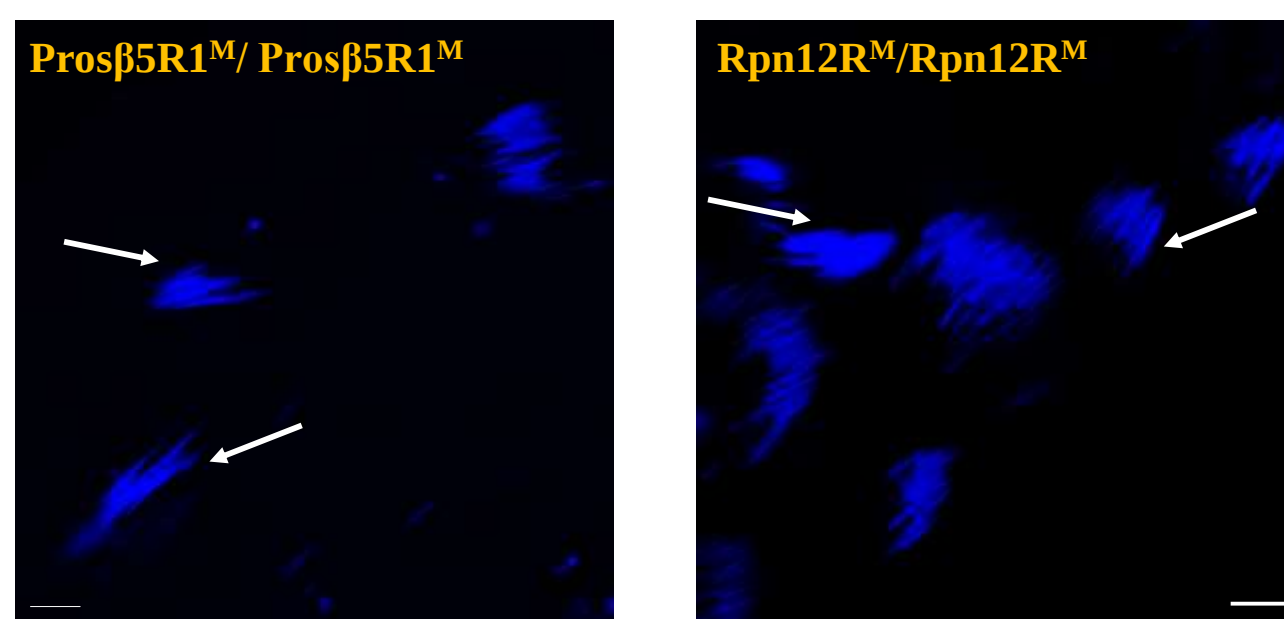
Tanaka K. (2009)

A sejtmagok megnyúlása hibás a katalitikus, de normális a regulátor alegység mutánsokban

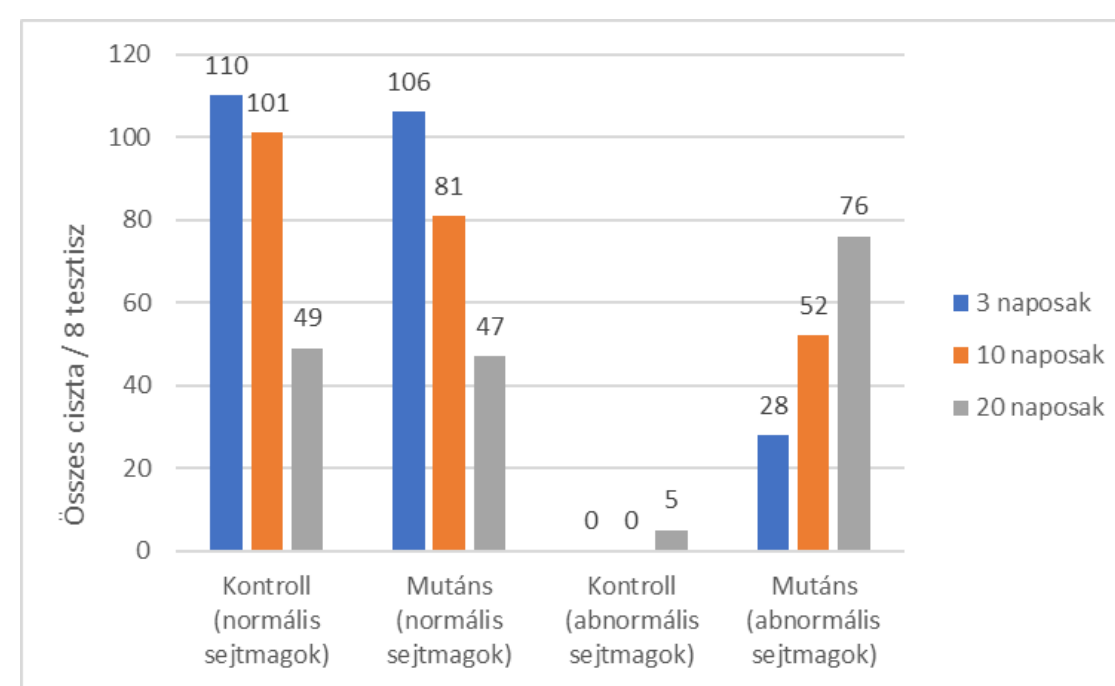


A Pros β 5R2^{Δ25} mutánsban a korai spermatogenezis normálisan zajlik, míg az individualizáció során az individualizációs komplex (IC) kialakulása és vándorlása is hibát szenved, ugyanis kevesebb az aktin kúpok száma, a vándorlásuk nem szinkronizáltan történik.

A megnyúlt cisztákban a sejtmagok abnormálisak, jellegzetes fánk/kör alakú morfológiát mutatnak.

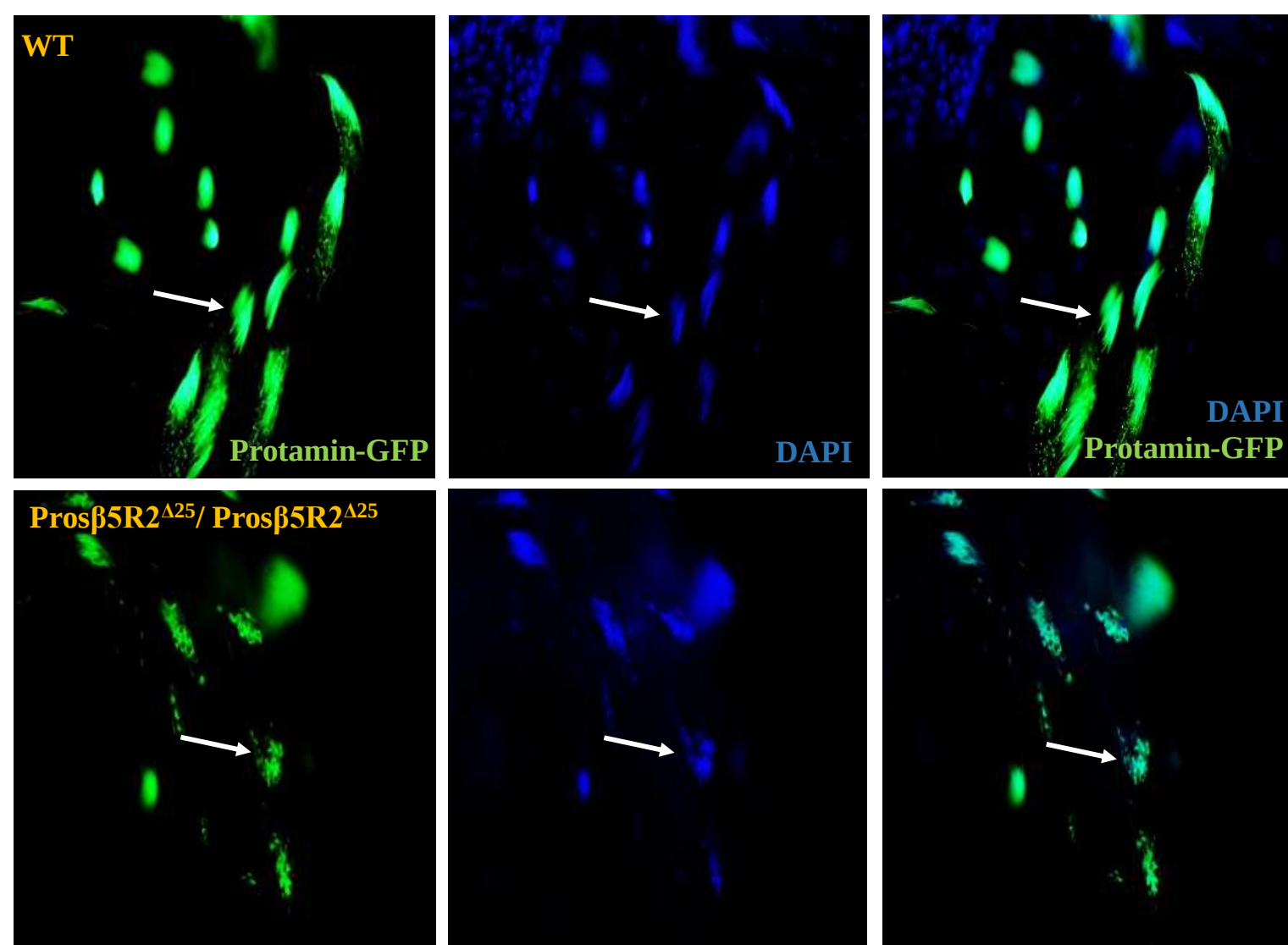


A homozigóta Pros β 5R2^{Δ25} mutánsok fertilitásának változása az életkorral



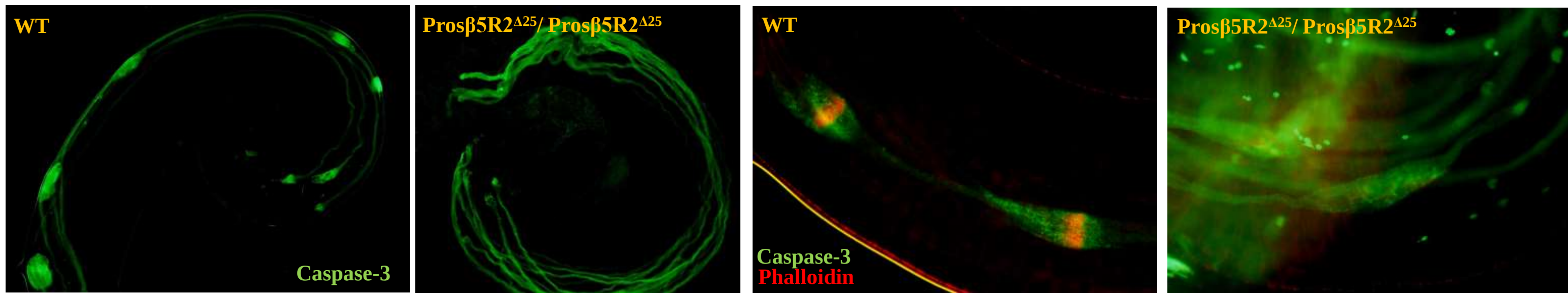
A mutánsok életkorával korrelálva nő az abnormális sejtmagokat tartalmazó ciszták száma.

A hiszton-protamin csere vizsgálata



A hiszton-protamin csere megtörténik a Pros β 5R2^{Δ25} mutánsban, de a magi abnormalitások jelen vannak.

A kaszpáz aktivitás vizsgálata a cisztikus hólyagban fluorezcens mikroszkóppal

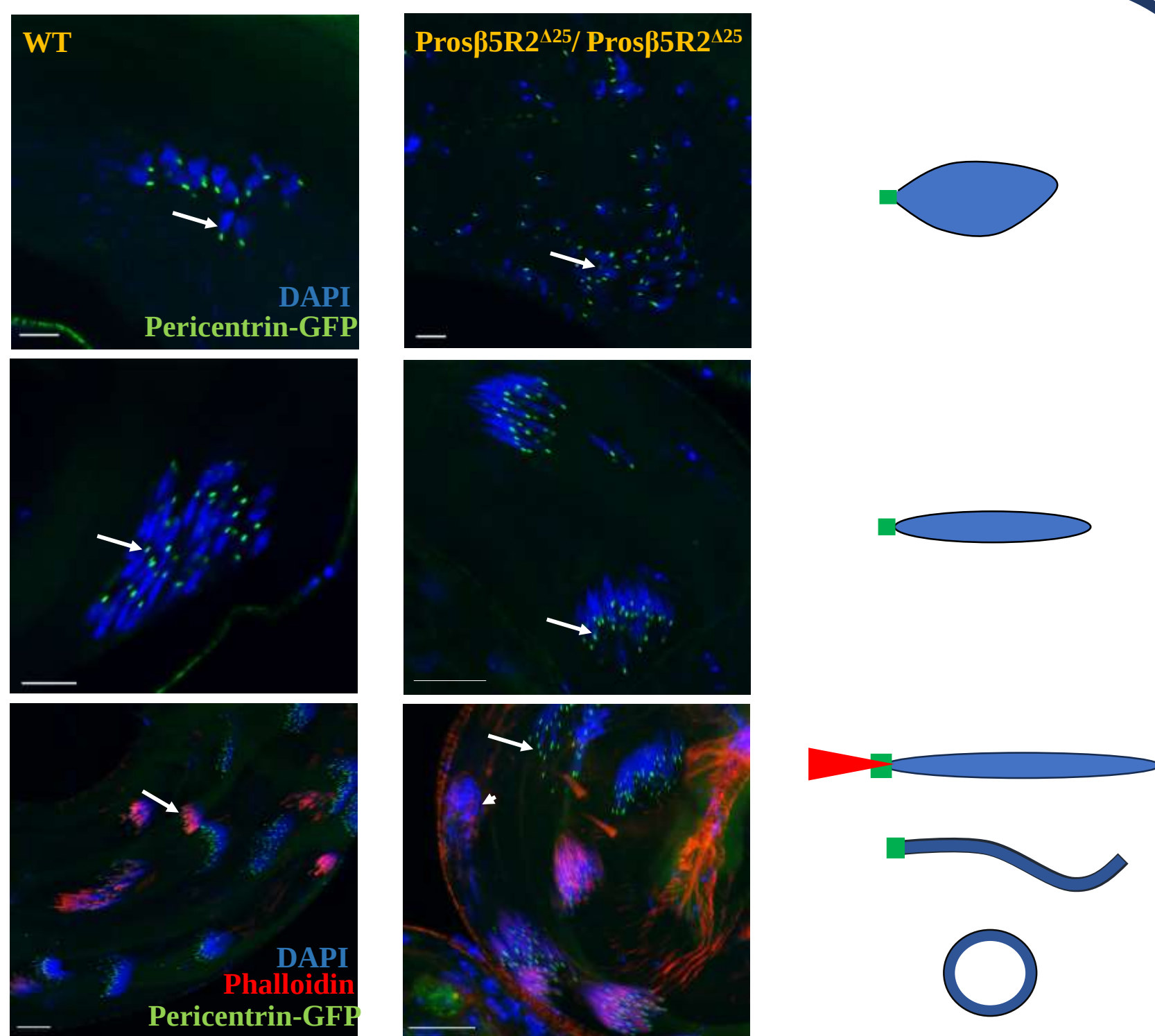


A nem apoptotikus kaszpázok (Kaspáz-3) aktiválódnak az individualizáció kezdetén, de nem halmozódnak fel a cisztikus hólyagban. A mutánsban a cisztikus hólyagok többsége abnormális morfológiát mutat, vagy teljesen hiányzik.

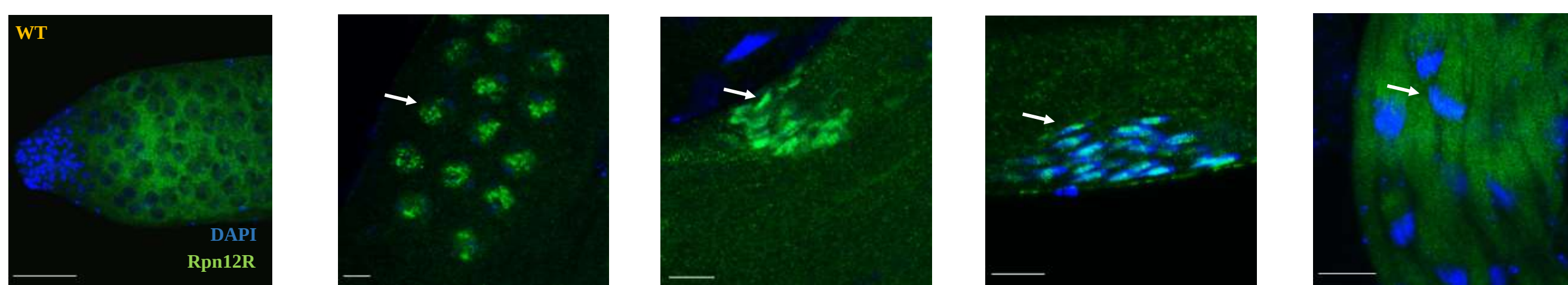
A bazális testek vizsgálata Pericentrin-GFP-t hordozó transzgenikus törzsekben

A Pericentrin-GFP a sejtmagok bazális végén található bazális testhez lokalizálódik (nyíl).

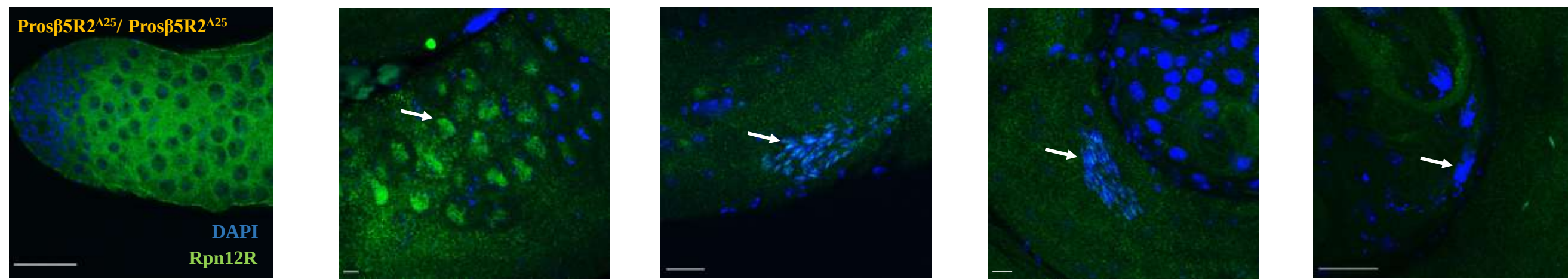
A Pros β 5R2^{Δ25} mutánsokban a Pericentrin-GFP jel a megnyúlt sejtmagok bazális végén általában megtalálható, de az abnormálisan megnyúlt magok esetében nagyon gyengén detektálható, ami a bazális test hiányára utal ezekben a cisztákban (nyílhegy).



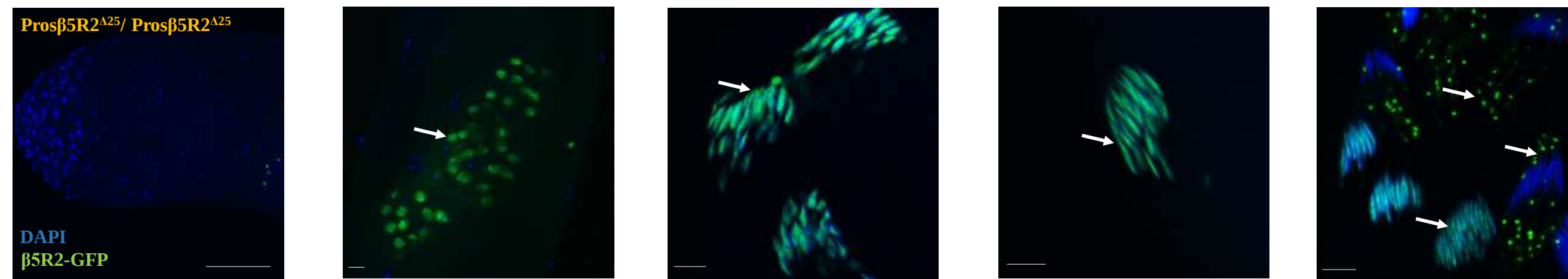
A regulátor Rpn12R és a katalitikus β 5R2 alegység lokalizációja



Az Rpn12R a 4-8 sejtes cisztákban a citoplazmában található. Ezt követően a 16 sejtes cisztákban, a spermatocitákban, a „leaf” (levél) és korai kenu stádiumokban a sejtmagban lokalizálódik, majd a késői kenu és tő stádiumban a sejtmagi jel eltűnik.



A Pros β 5R2 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.



A β 5R2-GFP a spermatogenezis korai és magmegnyúlási szakaszában a sejtmagokban lokalizálódik, majd az individualizációs komplexhez a cisztikus hólyagokban.

Konklúzió

A Pros β 5R2 gén hiányában a regulátor komplex bár jelen van a korai stádiumokban, a jelenléte jelentősen csökken a késői stádiumokban. A homozigóta Pros β 5R2^{Δ25} mutánsban a sejtmagok megnyúlása hibás, sok esetben a bazális testek a sejtmagoktól eltávolodnak, de az axonémák nem mutatnak morfológiai elváltozást. Feltehetően a bazális testek magi beágyazódása hibás a Pros β 5R2^{Δ25} mutánsban.

A regulátor alegység hiánya nem befolyásolja a magok megnyúlását, de esszenciális a spermatogenezishez. A Pros β 5R1 gén redundáns funkciót tölt be a spermatogenezisben. A Pros β 5R2 gén fehérje terméke a hiszton-protamin átmenethez nem, de a magok megnyúlásához elengedhetetlen. Eredményeink alapján megerősítést nyert, hogy a tesztisz-specifikus proteaszómának kulcsfontosságú szerepe van a spermatogenezis poszt-meiotikus stádiumaiban. Az általunk létrehozott mutánsok és eszközrendszer lehetőséget nyújt a sejtmagi proteaszomális aktivitás további vizsgálatához a spermatogenezis során.

Funding:

NKFIH_OTKA K 132155

NKFIH_OTKA PD 137914