

MTA Doktori értekezés

**A sejtorganellumok identitását szabályozó gének
azonosítása és funkciójuk meghatározása**

Dr Sinka Rita



Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Genetikai Tanszék
2024

Tartalomjegyzék

Irodalmi áttekintés	3
<i>Drosophila melanogaster</i> modell használata a sejtbiológiában.....	3
<i>Drosophila</i> , mint membrántranszport modell	4
A <i>Drosophila</i> spermatogenezise.....	5
Eredmények	14
Sejtbiológiai folyamatok tanulmányozása	14
A spermatogenezis és a membrántranszport kapcsolata.....	21
A lipidbioszintézis vizsgálata a spermatogenezis alatt.....	24
A poszt-meiotikus szabályozás elemeinek azonosítása transzkriptomikával..	29
A spermatidák specializált mitokondriumainak felépítése és működése	36
A citoskeletonális változások modellezése a spermatogenezis késői stádiumaiban	54
Anyagok és módszerek	75
Összegzés	83
Az új eredmények összefoglalása.....	83
Kitekintés.....	88
Közlemények	90
Köszönetnyilvánítás	92
Hivatkozási lista	94

Irodalmi áttekintés

Drosophila melanogaster modell használata a sejtbiológiában

A *Drosophila melanogaster*, ecetmuslica több mint száz éve használt modellszervezet a klasszikus genetikában és a sejtbiológiában. Az öröklődés törvényszerűségeinek megismerése mellett a fejlődésbiológia, sejtbiológia, immunológia, élettan és evolúciobiológia egyik gyakran használt modellszervezete lett (1. ábra) (Yamaguchi M. 2018). Széleskörű felhasználhatóságát bizonyítja az is, hogy 2017-ig nyolc esetben ítelték oda az élettudományi Nobel-díjat olyan kutatásokért, melyekben az ecetmuslicát használták modellszervezetként. A sejtbiológia és fejlődésbiológiai folyamatok nyomkövetéséhez az ecetmuslica tanulmányozása jelentősen hozzájárult, hiszen a genetikai szabályozási útvonalakat térben és időben elkülönítve tudjuk vizsgálni. A Gal4-UAS rendszer segítségével szövetspecifikus transzgén kifejeződést és genetikai mozaikok előállítását tudjuk megvalósítani. A nagyszámú klasszikus mutáns és a reverz genetikai módszerek, azon belül is az RNS interferencia és a CRISPR technológia elterjedésével lehetőség nyílt tetszőleges genomi régiók módosítására illetve azok *in vivo* jelölésére kis fehérjét kódoló riportergének beépítésével (1. ábra A).

A rendelkezésünkre álló modern genetikai, molekuláris biológiai, biokémiai és mikroszkópi technikák lehetővé tették a fejlődésbiológiai és sejtbiológiai folyamatok komplex tanulmányozását.

A sejtciklus szabályozásáért felelős gének felfedezésében nagy jelentősége volt az ecetmuslicának, hiszen az anyai hatásnak köszönhetően legtöbb sejtciklus mutáns a lárvális stádiumokig életben marad, ezáltal a lárvális szervezetben tanulmányozható a mutáns fenotípus. A lárvális agy a benne lévő osztótó sejteknek köszönhetően egy kiváló szerv a sejtosztódási, mitotikus hibák azonosítására. Az ecetmuslicát sikeresen használták mind kémiai, mind transzpozonok által indukált mutagenizálási kísérletek során, amelyekkel nagyon nagyszámú mitotikus gént sikerült azonosítani (Gatti and Baker 1989). A későbbi kutatások azt is bebizonyították, hogy az azonosított gének konzerváltak, megtalálhatók a magasabbrendűekben és sokszor kapcsolatba hozhatók sejtburjánzással, tumorképződéssel. A *Drosophila* genom teljes szekvenálása és annotálása lehetővé tette géncsoportok azonosítását. A genomannotálással egy időben felfedezett RNS interferencia megalapozta és lehetővé tette a genom és géncsalád szintű változatos reverzgenetikai módszerek alkalmazását. Az ecetmuslica esetében nemcsak az egyes fejlődési stádiumok és az ott kialakult testrészek, szervek vizsgálhatók, hanem rendelkezésre állnak sejtvonalak, melyekben az RNS interferenciával

történő géncsendesítés és egyéb sejtbiológia módszerek jól alkalmazhatók. A sejtciklus egyes lépései (G1, S, G2, M) klasszikus mutánsok analízise mellett sejttenyészetekben is vizsgálható az RNS interferenciát követő sejtszortírozással (FACS) vagy immunhisztokémiával.

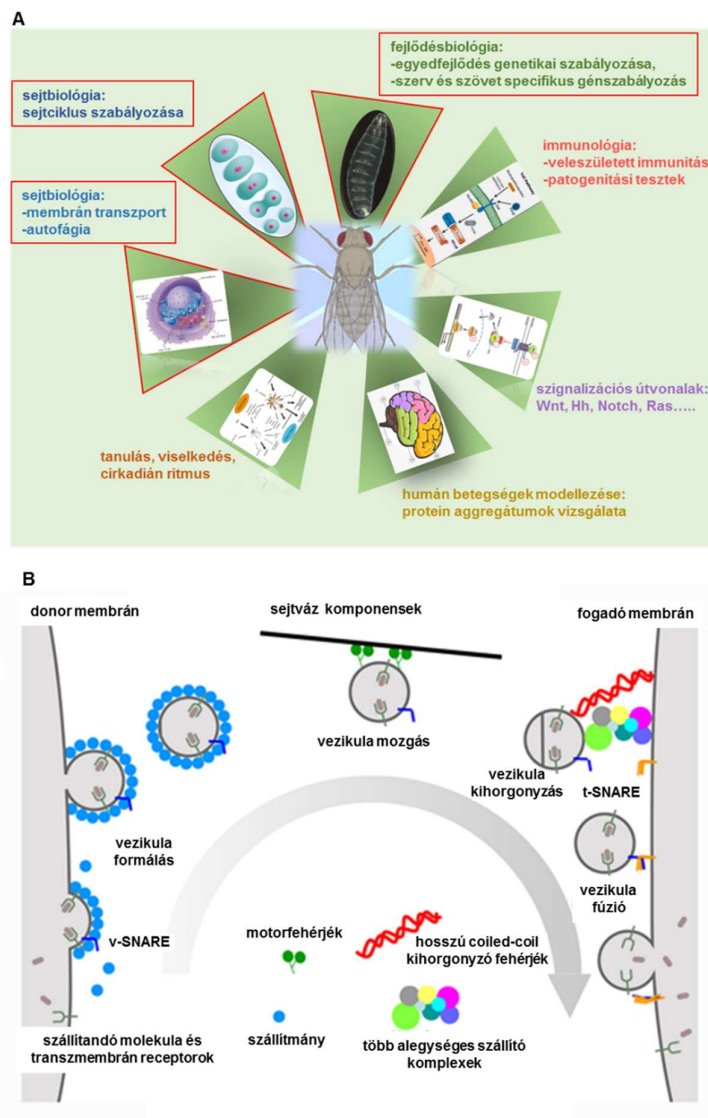
***Drosophila*, mint membrántranszport modell**

Az endoplazmatikus retikulum (ER) ER-Golgi határfelület szerveződése eltéréseket mutat a kiváló különböző fejlettségű szervezetekben. A hasadó élesztőkben, a protozoákban és a növényekben a Golgi-zsákocskák az ER kilépési felület (ERES) közelében, az ERES-Golgi egységek kialakításával az egész citoplazmában elszórtan helyezkednek el (Brandizzi és Barlowe, 2013; Glick és Nakano, 2009). A muslica esetében szintén (Kondylis és Rabouille, 2003; Ripoché és mtsai., 1994) a különálló ERES-Golgi egységekben történő szerveződés jellemző. Ezzel szemben a gerincesekben a szétszórt ERES-ekből származó vezikulák egy ER-Golgi-intermediér kompartment (ERGIC) kialakításában egyesülnek, amelyen keresztül a szállított fehérjék a centroszóma mellett elhelyezkedő egyetlen juxtanukleáris Golgiba jutnak. Az élesztő sok éven át a kiváló genetikai manipulálhatósága miatt remek modellnek bizonyult a membrántranszport folyamatainak, az endocitózis, exocitózis és a sejten belüli transzportfolyamatok kutatásában (Barlowe és Miller, 2013; Schekman, 2010)

A vezikulatranszportnak a membránok által határolt organellek közötti sejtkomponensek, fehérjék szállításában van fontos szerepe. Általánosságban a folyamat során egy, a donor membránról lefüződő vezikula tartalmazza a szállítandó anyagokat, amely a sejtvázon keresztül motorfehérjék és citoskeletális fehérjék segítségével a fogadó membrán közelébe kerül. A fogadó membrán felszínén található hosszú coiled-coil kihorgonyzó fehérjék és nagy kihorgonyzó komplexek segítségével a vezikula a membrán közelében a SNARE fehérjék segítségével fúzionál a fogadó membránnal és tartalma a fogadó membrán által határolt térbe kerül (1. ábra B).

Párhuzamosan az élesztő modellekkel, a *Drosophila melanogaster*t is elkezdtek az állati sejtek membrántranszport folyamatainak vizsgálatához felhasználni (Littleton 2000; Rabouille et al. 1999; Kondylis and Rabouille 2009). Ennek oka, hogy a gének szintjén lévő redundancia kisebb problémát jelent a *Drosophila* esetében, mint az emlős modellekben. A klasszikus mutánsok mellett az RNS interferencia technika nagymértékben hozzájárult a sejten belüli transzportfolyamatok szisztematikus tanulmányozásához, mind szövettenyészetekben, mind teljes állatban. A *Drosophila* S2 sejtekben lehetőség van RNS interferencia segítségével a

csendesített gének fenotípusának tanulmányozására. Stabil transzformánsok létrehozásával riportergének lokalizációját és mennyiségét tudjuk követni a membránkompartmentumok között.



1. ábra (A) A *Drosophila melanogaster* modell használata a kutatásban. (B) A membrántranszport folyamatok során történő vezikula transzport mechanizmusának sematikus összefoglalója az általános komponensek feltüntetésével.

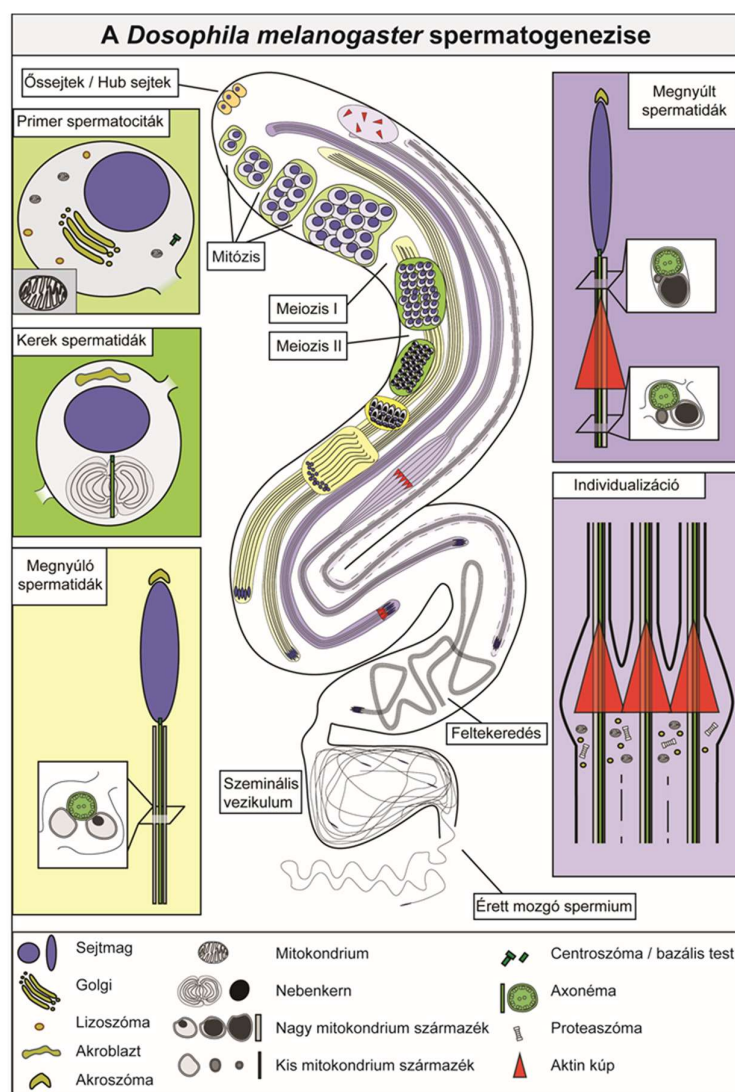
A *Drosophila* spermatogenezise

A hímivarsejtek szerkezete, működése és differenciálódása nagyfokú hasonlóságot mutat az állatvilágban. A *Drosophila melanogaster* spermiuma ugyanazokból a sejtorganelumokból épül fel, mint az emlősöké vagy az emberé. A spermiumok az erősen kondenzált kromatinba

csomagolt örökítőanyagot tartalmazó sejtmagból, a proteázokat tartalmazó akroszómából, a mozgást biztosító axonémából, és az energiát szolgáltató mitokondriumokból épülnek fel, minimális citoplazmával körülvéve. A *Drosophila* fajokra általában jellemző, hogy extrém hosszúságú spermiummal rendelkeznek. A *Drosophila bifurca* esetében ez a méret az állatvilágban eddig ismert leghosszabb, 58,29 mm, míg a *Drosophila melanogaster* esetében 1,8 mm hosszúságú. A *Drosophila melanogaster* kifejlett spermiuma a humán spermium hosszának 32-szerese. A *Drosophila* tesztisze egy tompa végű, feltekert csőszerű szerv, amelyben a spermiumok folyamatosan termelődnek a kifejlett állat egész élete során. A folyamatos ivarsejtképződés a tesztisz apikális végén indul el az osztódó összejt niche-ből kiindulva. Itt az ivarvonal összejt aszimmetrikusan osztódnak, és a keletkezett két sejt közül az egyikből összejt lesz, a másik pedig egy goniálblasztá alakul, amely elmozdul a niche-től bazális irányba és differenciálódik. Minden goniálblasztot két szomatikus cisztasejt vesz körül, amelyek ciszta összejtekből származnak. Ezek szintén aszimmetrikusan osztódnak, egy összejtet és egy differenciálódó cisztasejtet hoznak létre (Fuller 1993). A *Drosophila* spermatogenezisében keletkezett két diploid cisztasejt a spermatogenezis minden stádiumában körbeveszi az ivarsejtkezdeményeket és csak az egyedivé válást követően, a feltekeredés során szűnik meg a kapcsolat a két sejtípus között. A szomatikus cisztasejtek a csírasejtek differenciálódását támogató sejteknek tekinthetők, mivel a szomatikus „hub” struktúra bizonyítottan az ivarvonal összejt és ciszta összejt fenntartásának és megújulásának a niche-je. A *Drosophila* cisztasejtek a humán herék Sertoli-sejtjeinek funkcionális analógjai, amelyek részt vesznek a csírasejtek differenciálódásának minden szakaszában. A szomatikus és csírasejtek közötti szoros kölcsönhatások az állati spermatogenezisben nagyfokú konzerváltságot mutatnak (2. ábra).

Egy goniálblaszt négy mitotikus osztódáson megy keresztül, így egy 16 spermatocitából álló ciszta keletkezik. A citokinézis ezeket az osztódásokat követően nem teljes, amelynek eredményeképpen a 16 sejtet stabil, sejtek közötti citoplazmahidak, úgynevezett gyűrűcsatornák kötik össze. A 16 sejtes spermatocita a premeiotikus S fázist követően átvált a spermatocita növekedési és génexpressziós programjára. A spermatociták és spermatidák fejlődéséhez szükséges géntermékek többsége ekkor íródik át. A primer spermatocitákban képződő transzkriptek többsége nem transzlálódik azonnal a sejtmagból való kilépés után. Ezek az mRNS-ek ribonukleoprotein fehérje komplexekben hosszú ideig, egészen a spermatidák megnyúlási szakaszáig transzláció nélkül tárolódnak és a spermatidák megnyúlása és individualizációja során töltik be funkciójukat (White-Cooper 2010).

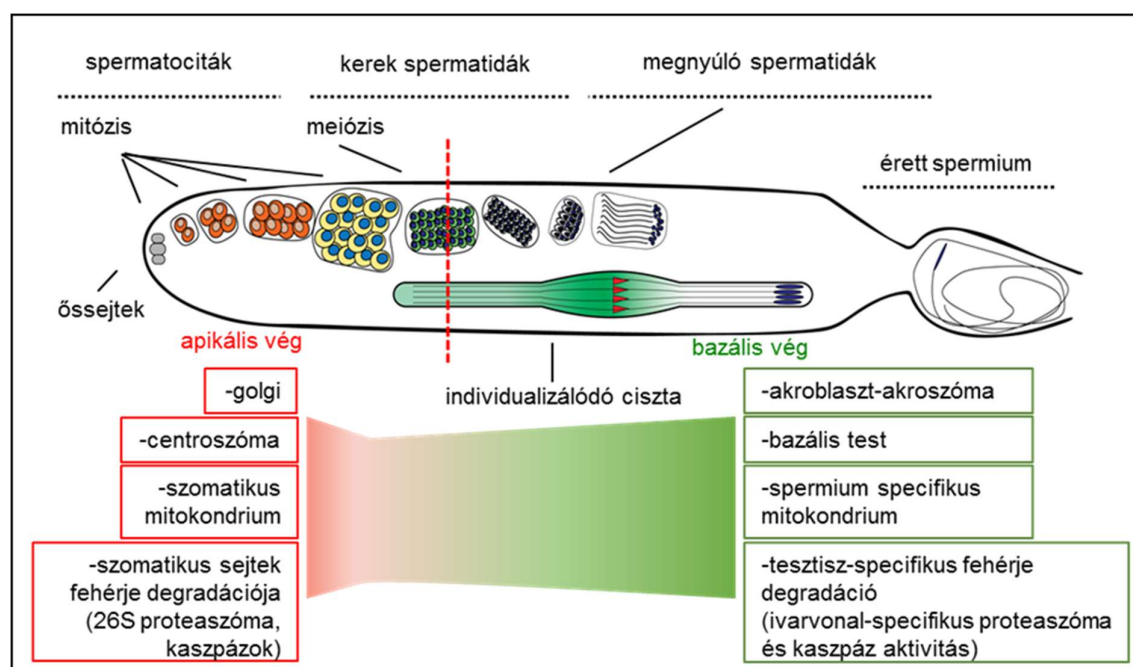
Az ivarvonalsejtek mitotikus osztódását követően a meiotikus osztódás egy 64 sejtet eredményez, ahol a spermatidák szinkronizáltan fejlődnek (2. ábra). A meiózis alatt szemben a nőstényekkel, a *Drosophila* hímekben nem játszódik le homolog rekombináció, mert hiányzik a szinaptonemális komplex. Ez a tulajdonsága a hímeknek megkönnyíti a genetikai keresztezések kivitelezését és egyben modellrendszert szolgáltat az akiazmatikus kromoszómaszegregáció megértéséhez. A meiotikus sejtekben szerveződő osztódási orsó segítségével kiválóan tudjuk az orsó-összeszerelődés mechanizmusát tanulmányozni klasszikus mutások null és hipomorf alléljaiban, illetve letális mutációk esetében ivarvonal klónokban (Giansanti and Fuller 2012).



2. ábra A *Drosophila* spermatogenezisének főbb stádiumai és jellemző sejtípusai, sejtszervecskái (Vedelek 2017)

A premeiotikus S fázist követően intenzív génátírás történik, megszintetizálódnak mindazok a transzkriptek, amelyek a meiózist követő stádiumokhoz szükségesek (Demarco et al. 2014). A meiózist követően csupán néhány lókusztól mutatták ki, hogy transzkripcionálisan aktív (Fabian and Brill 2012; Demarco et al. 2014). A kromatin túlnyomó többsége mind a 4 kromoszóma esetében kompakt heterokromatinizált állapotban van a meiózis után. A differenciálódott 64 sejt a cisztában szinkronizáltan fejlődik tovább.

A meiózist követően a spermatidákban lévő sejtorganellek (mitokondriumok, centroszóma/bazális test, Golgi, lizoszómák, endoplazmatikus retikulum) jelentős morfológiai változáson esnek át (Fabian and Brill 2012) (3. ábra). A folyamat végén minden spermatida egyedi bazális testtel rendelkezik, amely hozzájárul az axonéma szerveződéséhez (Lattao et al. 2017).



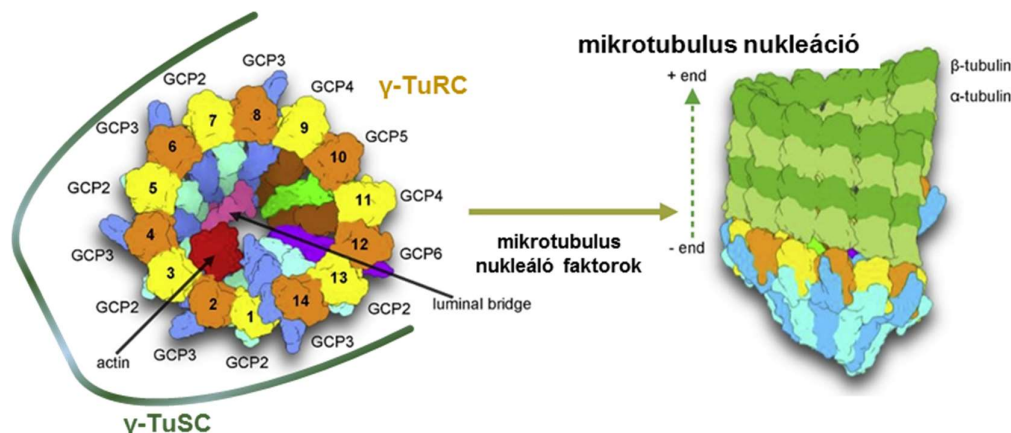
3. ábra Sejtszervecske átalakulások a *Drosophila* tesztiszben a spermatogenezis során

A meiózis végére a bazális testek a sejtmag felé mozognak, hozzákötődnek a sejtmagmembránhoz, és a flagellum axonémájának nukleálásával MTOC-ként kezdenek működni (Galletta et al. 2020). Miközben a sejtmag felé mozog a bazális test a citoplazmatikus mikrotubulusokhoz kapcsolódik, kialakítva a centriólum tartalmú speciális struktúra (centriole adjunct, CA), amelyek főként a centroszómák és a pericentrioláris anyag (PCM) fehérjeit (pl. γ -tubulin, és Cp190) illetve herespecifikus fehérjéket (pl. Mozart1) tartalmaznak (Tates 1971; Riparbelli et al. 2012; Fabian and Brill 2012; Lattao et al. 2017; Tovey et al. 2018).

A centroszóma és a csillók biogenezéséhez szükséges legtöbb *Drosophila* fehérje konzervált az eukarióták között. Az emberi centroszómához és a csillók működésének hibájához köthető betegségekben, mint például tumorok kialakulásában, a mikrokefáliákban, a ciliopátiákban is számos olyan gén hibáját azonosították, amelyek előzőleg az *ecetmuslica* centroszóma biogenezeise során lettek részletesen jellemezve (Nigg and Raff 2009; Godinho and Pellman 2014). A centroszómális gének jelentős hányada nem esszenciális vagy a null allélok mellett hipomorf allélok is a rendelkezésünkre állnak, így könnyen tanulmányozható a centroszómális gének szerepe az érző neuronokban vagy a spermiumfejlődés során. A mikrotubulusok szervezésében kulcsfontosságú centroszómák jelentős átalakuláson esnek át a spermatociták fejlődése során. A legtöbb osztódó sejtnek egy centroszómája van, kettő centriólummal a sejtciklus nyugalmi fázisában, amelyek a replikációt követően megkettőződnek. A centroszómák és a bazális testek centriólumai változatos hosszúsággal és külső mikrotubulus szerveződéssel rendelkeznek. A spermatociták centroszómái négy hosszú centriólummal rendelkeznek, amelyek a meiózist követően mind a négy meiotikus termékben egy-egy bazális testé alakulnak. A spermatocita növekedési fázisa előtt a centroszómák magját alkotó centriólumok 0,9 μm hosszúak, 9+1/0 mikrotubulus szerkezettel, de a növekedési fázisban a centriólumok mérete megnő, elérve a ~2,3 μm -t (Lattao et al. 2017). A centroszóma-bazális test átmenet már a primer spermatocitákban elkezdődik, amikor a centriólumok a sejtfelszín felé álló disztális végükön kis méretű ciliumszerű struktúrát alakítanak ki. A meiózis során a megnyúlt centriólumokból bazális testek fejlődnek, amelyek plazmamembránnal együtt lefűződnek, internalizálódnak, és a sejtpólusok felé mozognak minden spermatocitában szinkronizáltan. A bazális testek itt már mikrotubulus szervező központokként (MTOC) működnek és az asztrális mikrotubulusokat nukleálják (Fuller 1993). A gyűrűszerű centriolum további ismert elemei olyan centroszómális fehérjék, mint az Unc és a Chibby (Baker et al. 2004; Enjolras et al. 2012).

A bazális testekben lévő centriólumokat 9, egyenként 3 mikrotubulusból felépülő külső gyűrű és egy központi mikrotubulus jellemzi. Ez a szerkezet az axonéma kialakulásával átalakul és az axonémákra jellemző 9+2-es mikrotubulus párokat tartalmaz (Carvalho-Santos et al. 2012). A bazális test elengedhetetlen a normális méretű és mozgású axonéma kialakulásához. A mikrotubulusok alapvető fontosságú citoszkeletális komponensek, amelyek számos funkciót töltenek be a sejtek kompartmentalizációjában, a kromoszómák szegregációjában, a sejtmozgásban és az intracelluláris szállításban szomatikus és ivarsejtekben egyaránt. A mikrotubulusok *de novo* képződnek a mikrotubulus nukleációnak nevezett folyamat során. Ennek a folyamatnak a térbeli és időbeli szabályozásához nagymértékben hozzájárulnak a γ -

tubulin komplexek, amelyek a γ -tubulinból és a hozzá kapcsolódó γ -tubulin-gyűrűkomplex fehérjéiből (GCP-2,3, 4, 5, 6) állnak (Moritz et al. 2000). A legtöbb eukariótában a mikrotubulusok egy előre összeállított γ -tubulin gyűrűkomplex (γ -TuRC) segítségével növekednek meghatározott irányban. Az alfa és béta tubulinok magához a γ -tubulinhoz kapcsolódnak és együttesen határozzák meg a mikrotubulusok növekedésének helyzetét és irányát (4. ábra) (Liu et al. 2021).

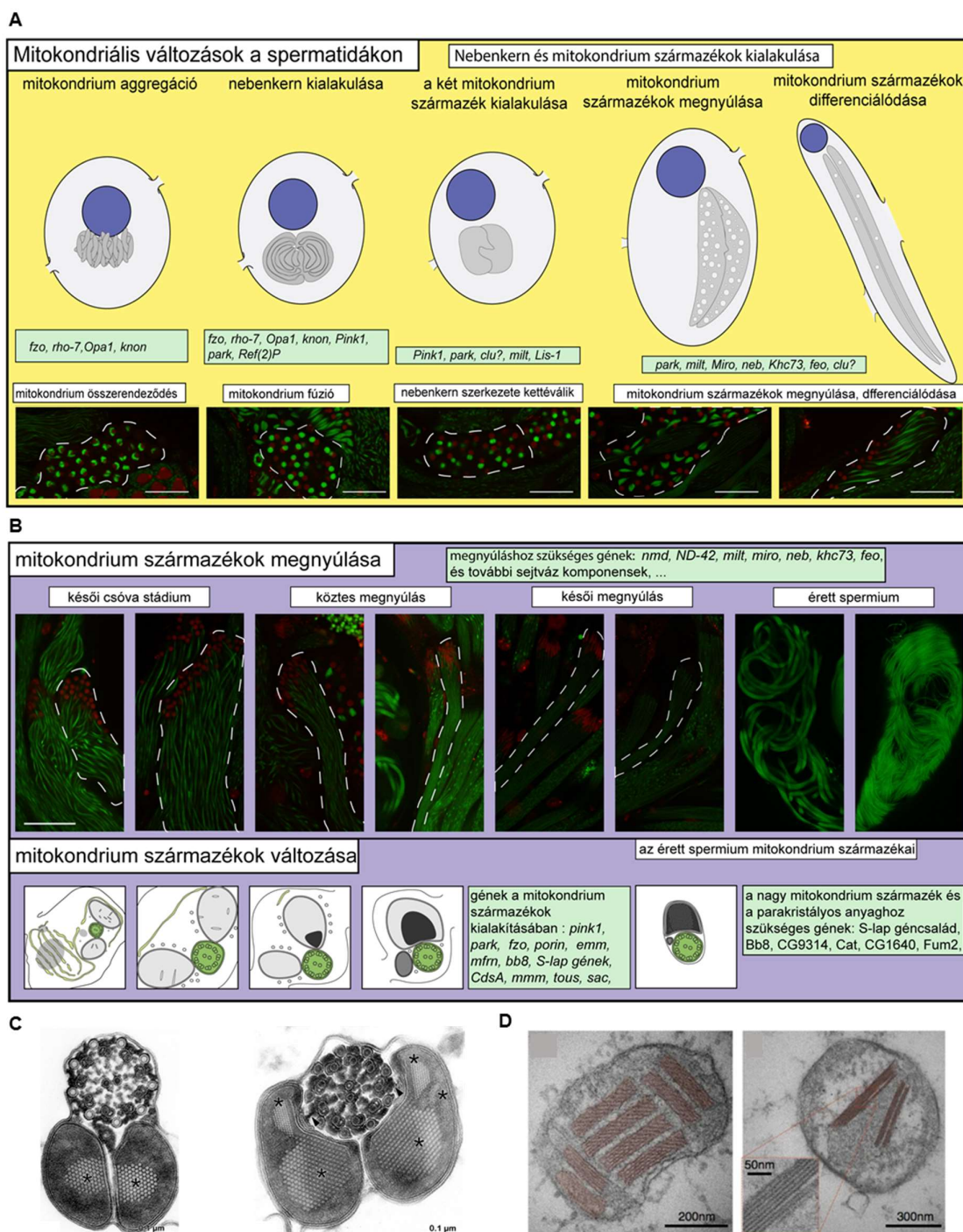


4. ábra A γ -TuRC felépítése és a mikrotubulus nukleáció mechanizmusa (Liu et al. 2021) **alapján módosítva.** A γ -TuSC tagjai (GCP2, GCP3) a felülnézeti modellen zöld vonallal vannak kiemelve.

A sok évtizedes kutatások ellenére a mikrotubulus nukleáció pontos molekuláris mechanizmusa és a pontos molekuláris komponensei nem teljes mértékben ismertek. A közelmúltban, a krioelektronmikroszkópiai és szerkezetbiológiai kutatásoknak köszönhetően lehetségessé vált a γ -TuRC működési mechanizmusának modellezése. A γ -TuRC egy aszimmetrikus, balmenetes spirált formál, amelyet 14 GCP- γ -tubulin heterodimer alkot, amelyeket küllőknek is neveznek. Az egyenletes sorrendbe rendezett egységek mindegyike egy-egy példány γ -tubulinból és a GCP fehérjék egyikéből (GCP2, 3, 4, 5, 6) áll. Leírták azt is, hogy γ -TuRC belsejében egy lumenális hídnak nevezett redő található, amely meglepő módon egy aktin molekulát is tartalmaz (Liu et al. 2021; Consolati et al. 2020; Würtz et al. 2022; Wieczorek et al. 2020). Ez az aktin kötés bár konzervált, a molekuláris szerepe nem tisztázott.

A meiózist követően a mitokondriumok un. nebenkerné szerveződnek és szorosan a sejtmag mellett találhatóak a kerek spermátidákban. A nebenkernben a mitokondriumok elvesztik az a szomatikus sejtekre jellemző, egyedi klasszikus mitokondriális struktúrájukat, egyesülnek és hagymahéjszerűen egymásra rétegződnek, majd két félre válnak. Ez a két mitokondrium származék a bazális testtel szoros kapcsolatban marad a fejlődés további stádiumaiban (5. ábra

A, B). A ciszta megnyúlásával mindkét mitokondrium származék megnyúlik a spermium teljes, 1.8mm-es hosszában, az axonémától független mikrotubulusok segítségével (Noguchi et al. 2011).



5. ábra Mitokondrium specializáció a spermatogenezisben és humán miopátiákban. (A, B) A *Drosophila* spermatogenezis poszt-meiotikus stádiumaiban a mitokondriumok morfológiai változásai. (C) *Forficula auricularia* és *Pyrrochoris apterus* spermium keresztmetszeti képe. A parakristályos

anyag a spermiumok mindkét mitokondrium származékában jelen van (Dallai 2014). (D) Parakristályos anyag felhalmozódás krónikus mitokondriális miopátiás izomsejtekben (Vincent et al. 2016).

Kimutatták, hogy a rendellenes nebenkernképződést okozó mutációk, mint például a Dinamin típusú GTPáz *fuzzy onion* vagy a Diszlokáz *no mitochondrial derivative (nmd)* mutációja a mitokondrium származékok csökkent hosszát eredményezik (Hales and Fuller 1997; Noguchi et al. 2011). Hasonló megnyúlási hibákat figyeltek meg a Drp1 mikrotubulus motorfehérje mutánsaiban (Aldridge et al. 2007).

A megnyúlás után az egyik mitokondrium származék elkezd felhalmozni az un. parakristályos anyagot, ez lesz a nagy mitokondrium származék. A parakristályos anyag nélküli mitokondrium származék a megnyúlást követően méretében csökken, de mindvégig jelen marad az érett spermiumok farki részében (5. ábra B). Összefoglalóan parakristályos anyagnak nevezik mindazon anyagokat, amelyek bár rendelkeznek kristályszerkezettel, de az a szabályos kristályoktól eltérnek, nem egyöntetűen szabályos, hanem változatos egységekből épülnek fel, viszont az amorf anyagokhoz képest nagyfokú rendezettséget mutatnak. A parakrisztallin anyag gyakran előfordul a rovarok spermiumának mitokondrium származékaiban (5. ábra C) (Dallai 2014). Már az 1970-es évektől kezdődően ismert volt számos rovar spermiumának részletes szerkezete, ahol az elektronmikroszkópos vizsgálatok rámutattak, hogy a parakrisztallin anyag változatos módon szerveződhet a mitokondriumokban. Jelen lehet mind a kettő mitokondrium származékban (*Forficula auricularia*, *Pyrochoris apterus*, *Notonecta glauca*) vagy csak az egyikben (*Drosophila melanogaster*, *Ceratitis capitata*) (Dallai 2014). A mitokondriumokban felhalmozódó parakristályos anyag korántsem korlátozódik a rovarok spermiumaira, megfigyelték patkány szívmag sejtekben is a mitokondriális kreatin-kináz túltermelésnek köszönhetően kialakuló myopátia modellben vagy a sérült izomsejtek mitokondriumaiban (5. ábra D) (Vincent et al. 2016; Stadhouders et al. 1994). A megnyúlási folyamatok a sejtmag esetében is megfigyelhetők, ahol a folyamattal párhuzamosan a hisztonok lecserélődnek protaminra, ami egy kompaktabb kromatinszerkezetet biztosít és így kialakul az érett spermiumokra jellemző túszerű sejtmag (3. ábra). A mag megnyúlását a bazális test és az un. akroblaszt között kialakuló mikrotubulusok irányíthatják, de ennek pontos mechanizmusa nem ismert.

Az akroblaszt a spermatogenezis során az ivarvonal sejteiben a meiózist követően összeszerveződött Golgi apparátus, amely a lizoszómákkal együtt alakul át az un. akroszómává, amely a mag csúcsi részén található. Az akroszóma az állatvilágban általánosan jelenlévő membránnal határolt sejtszervecske a spermiumok csúcsi részén. A lumenében proteázokat

tartalmaz, melyeknek a megtermékenyítésnél van fontos szerepük (Alavi et al. 2014; MEIZEL 1984). Az ecetmuslicában az akroszóma a megtermékenyítést követően, a spermium petesejtbe jutása után aktiválódik és elősegíti a pronukleuszok egyesülését (Wilson et al. 2006) (2, 3. ábra). A megnyúlást követően a cisztákban a magoktól disztális irányban kialakul az un. individualizációs komplex, melynek a fő strukturális elemei az aktinből felépülő aktin kúpok (2. ábra). Az individualizációs komplex összeszerveződését követően az aktin kúpok disztális irányba haladnak a ciszták hossza mentén. Az individualizációs komplex előrehaladását követően a cisztikus hólyagban megindul a citoplazmatikus fehérjék degradációja, aktivált kaszpáz fehérjék közreműködésével. A kaszpázok aktivációja nem jár együtt apoptózissal a poszt-meiotikus cisztákban (3. ábra) (Muro et al. 2006). Az individualizáció során a cisztában található citoplazmatikus hidak eltűnnek, folyamatos egyedi plazmamembrán borítja a spermatidákat a folyamat végére. A citoplazma maradékai az un. „waste bag” nevű membránnal határolt zárványba kerülnek, amely az individualizáció végén lefűződik a cisztáról. Az egyedi spermiumok feltekerednek, és a szeminális vezikulumba kerülnek, ahonnan a megtermékenyítés során a szeminális folyadékkal együtt jutnak át a nőtényekbe (Fuller 1993) (2-3. ábra).

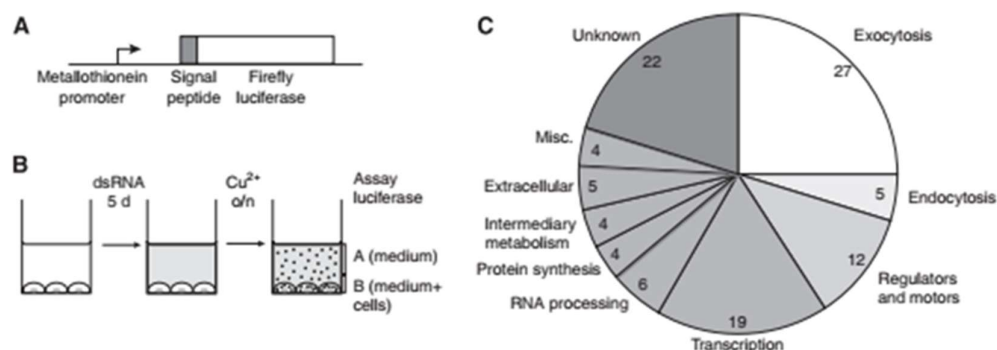
Eredmények

Sejtbiológiai folyamatok tanulmányozása

Közismert, hogy a sejtosztódás során a fehérjék aktív-inaktív állapotának szabályozásában kulcsfontosságúak a foszforiláció általi poszttranszlációs módosítások. A fehérjék foszforilációját a protein kinázok végzik. A reverz genetikai megközelítések sikerességének demonstrálására jó példa a protein kinázok szisztematikus vizsgálata. 228 kináz sejtciklusban betöltött szerepét *Drosophila* S2 sejtekben a kinázokra specifikus RNS interferencia felhasználásával jellemeztük. Mintegy 80 esetben találtunk a sejtciklus folyamatában hibát az adott protein-kináz csendesítésének eredményeként. A már ismert sejtciklus regulátorok mellett (*polo*, *auroraB*) azonosításra kerültek új, addig nem jellemzett gének, mint a mitotikus fenotípussal rendelkező *SAK*, *fray*, *gwl*, *CG10522*. Megkülönböztettünk orsó összeszerelődési hibát, centroszóma hibát és citokinezis hibát eredményező fenotípusokat. Azonosítottunk szignáltranszdukcióban szerepet játszó protein-kináz géneket is mitotikus fenotípusuk alapján, mint a *pvr*, *for*, *nmo*. A reverz genetikai RNS interferencia megközelítés bizonyította, hogy a géncsoportok szisztematikus vizsgálatával lehetőség van az alapvető sejtbiológiai folyamatok részletesebb jellemzésére és új szabályozó elemek azonosítására. Hasonlóan a kinázok sejtciklusban betöltött szerepének vizsgálatához, 117 protein-foszfátáz esetében is elvégeztük az RNS interferencia utáni részletes fenotipikus jellemzést. Megállapítottuk, hogy a JNK MAP-kináz gátló foszfátáza, a Puckered, szükséges a G2-M átmenethez. A Cdc25 homológ *string* mellett a PP2C szintén a G2-M átmenethez szükséges. A PP1-Flapwing esetében kromoszóma összerendeződési és szegregációs hibát tapasztaltunk a csendesítést követően. Megállapítottuk, hogy a PP2A foszfátáz komplexnek számos szerepe van a mitózis során. Szerepet játszik a kromoszómák metafázisban történő egyenlítői síkba rendeződésében és az anafázisban történő szétválásában. A protein foszfátázok erős konzerváltsága azt sugallja, hogy a *Drosophilában* azonosított funkciók a magasabbrendűekben is jelen lehetnek.

Az RNS interferencia géncsendesítési technika lehetővé tette a sejten belüli transzportfolyamatok szisztematikus tanulmányozását magasabbrendűekben. A *Saccharomyces cerevisiae* élesztőben elvégzett genetikai szűrések számos, a szekréciós útvonalban résztvevő sejtservecske specifikus fehérjét azonosítottak, amelyek többségének ortológjai magasabbrendű eukariótákban is jelen vannak. Annak vizsgálatára, hogy vannak-e további a szekrécióhoz szükségesek fehérjék a metazoákban, amelyek az élesztőben nincsenek jelen, genom szintű RNS-interferencia szűrést alkalmaztunk. A *Drosophila* S2 sejtekben

lehetőség van stabil transzformánsok létrehozására, majd ezt követően RNS interferenciával a csendesített gének fenotípusának tanulmányozására. S2 sejtekben egy rekombináns luciferáz transzgén segítségével annak szekrécióját követve azonosítottunk transzportfolyamatokat befolyásoló géneket. A szekréciós útvonalak tanulmányozására a szekretált luciferáz fehérje mennyiségét mértük egy genomi szintű géncsökkentés során S2 sejtekben. A luciferáz riportert egy methallothionein promóter szabályozta, amelyet CuSO₄ hozzáadásával tudtunk indukálni. 384 lyukú tenyészedények és pipettázórobotok felhasználásával tudtuk 24000 egyedi kettős szálú RNS hatását vizsgálni a luciferáz szekréciójára (6. ábra).

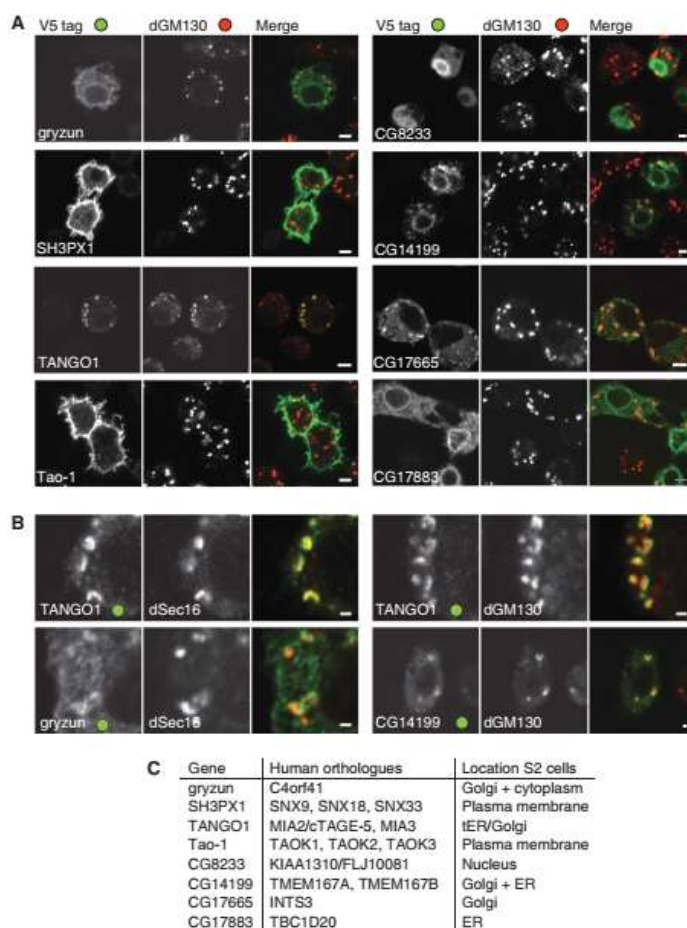


3. ábra A szekrécióhoz szükséges gének genom-szintű RNSi szűrése *Drosophila* S2 sejteken. (A) A szűréshez használt stabil S2 sejt vonal előállításához használt riporterkonstrukció sematikus ábrája. Az indukálható metallothionein promóter és a BiP szignálpeptid (*Drosophilából* származik) a luciferáz génnel van fuzionáltatva. (B) A szűrés protokoll összefoglalása. A dsRNS-sel történő S2 sejt transzfecciót követően a szekréciós útvonal működését a metallothionein promótert CuSO₄-tal indukáltuk és a teljes luciferáz-aktivitás azon hányadát határoztuk meg, amely szekretálódott a tápfolyadékba (azaz A/A + B). (C) A szűrésből származó 108 találat génfunktó szerinti eloszlása. (Wendler et al. 2010).

A szűrés a szekrécióhoz nélkülözhetetlen élesztőgének közel 60%-ának *Drosophila* ortológját is azonosította, amely a vizsgálati módszer sikerességét mutatja. Sikert a szekréciós útvonal két, az embertől a növényekig konzervált, új komponensét azonosítanunk. Az egyik a TRAPP komplex egyik alegysége a Grysun, a másik pedig egy Kish nevű fehérje. A fehérjék pontos sejten belüli lokalizációját egy kis méretű jelzőmolekulával a V5-tel tettük láthatóvá, és megállapítottuk, hogy az azonosított fehérjék a Golgi komplexhez és az endoplazmatikus retikulumhoz lokalizálódnak (7. ábra). A sejtekben tapasztalt fenotípus alapján a Grysun és a Kish fehérjék szükségesek a sejtek szekréciójához. Ennek az *in vivo* tesztelésére a *Drosophila* lárvális nyálmirigyet használtuk, amely egy jelentős szekrécióval rendelkező szerv. A szekretálódó CD8-GFP riportert és az indukálható dsRNS-eket kifejező transzgenikus törzsek segítségével az RNS interferencia hatására megvalósuló szekréciót monitoroztuk

nyálmirigyben. A Gryzun és a Kish fehérjék hiányában a CD8-GFP szekréció sérült a nyálmirigyben. Megállapítottuk, hogy mind a két konzervált fehérje szükséges a normális szekrécióhoz.

Tekintettel az RNS interferencia szűrésben vizsgált gének nagy számára, az azonosított új komponensek kis száma arra utal, hogy a korábbi feltételezésekkel ellentétben a szekréciós útvonal esszenciális, fő komponensei nincsenek sokkal nagyobb számban a metazoákban, mint az élesztőben. Ez az elemzés arra is felhívta a figyelmünket, hogy a szekrécióban és a membrántranszportban szerepet játszó fehérjék kevesebb homológgal vannak reprezentálva Drosophilában, mint emberben. A Drosophilát használva így lehetőség van a membrántranszport folyamatok egyszerűbb modellezésére.



4. ábra A szűrés során azonosított jelöltek egy csoportjának szubcelluláris lokalizációja. (A, B) Konfokális mikroszkópos felvételek transzfektált S2 sejtekről, ahol a jelzett géneket C-terminálisán V5 riporterrel fúzionáltattuk. Immunfestésben a dGM130 Golgi markert vagy az ER kilépési hely komponens dSec16-ot használtuk a kolokalizáció megállapítására. Mércse: 5 μ m (A) vagy 1 μ m (B). (C) A lokalizációs adatok összefoglalása a nyolc kiválasztott génre vonatkozóan, a humán ortológok feltüntetésével.

Az evolúciósan konzervált, az élesztőtől az emberig megtalálható Golgi lokalizált kihorgonyzó fehérjék (GRIP domén tartalmú Golgin fehérjék) membrántranszportban betöltött szerepének megállapítását genetikai és sejtbiológiai módszerekkel valósítottuk meg. A Golginok nagy méretű kihorgonyzó fehérjék, amelyek coiled-coil doméneket tartalmaznak és kis GTP-ázokon (Rab, Arl vagy Arf) keresztül kapcsolódnak a rájuk jellemző membránfelületekhez. A kihorgonyzó fehérjék a Golgi apparátus kialakításában és a Golgi-endoplazmatikus retikulum, valamint az endoszómák közötti vezikulatranszportban nagyon fontosak. Hozzájárulnak a szállított vezikulák fogadásához, membránhoz történő rögzítéséhez. A *Drosophila* Golgi hasonlít az emlősök Golgi-készülékéhez, azzal a különbséggel, hogy a zsákok nem formálnak egy szalagszerű struktúrát a mikrotubulus szervező központ körül, hanem szétszórtan helyezkednek el a szomatikus sejtek citoplazmájában. A legtöbb sejtípusban a Golgi a cisz és transz végeken lévő markerek (GM130, Lava lamp, Golgin fehérjék, COG, GARP komplexek) segítségével már fénymikroszkópiával is könnyen elkülöníthetők, vizualizálhatók (Kondylis and Rabouille 2009; Farkas et al. 2003; Fári et al. 2016a; Jones et al. 2008). A perifériális membrán fehérjék hozzájárulhatnak az adott sejtorganellum vagy vezikula mozgásához, a membrántranszport irányának és módjának meghatározásához. Az eukarióta sejtekben nagyon fontos a vezikulák pontos szortírozása és azok szállítása a különböző sejtorganellumok között, beleértve az endocitózissal felvett és a szekrécióval kijuttatott vezikulákat is.

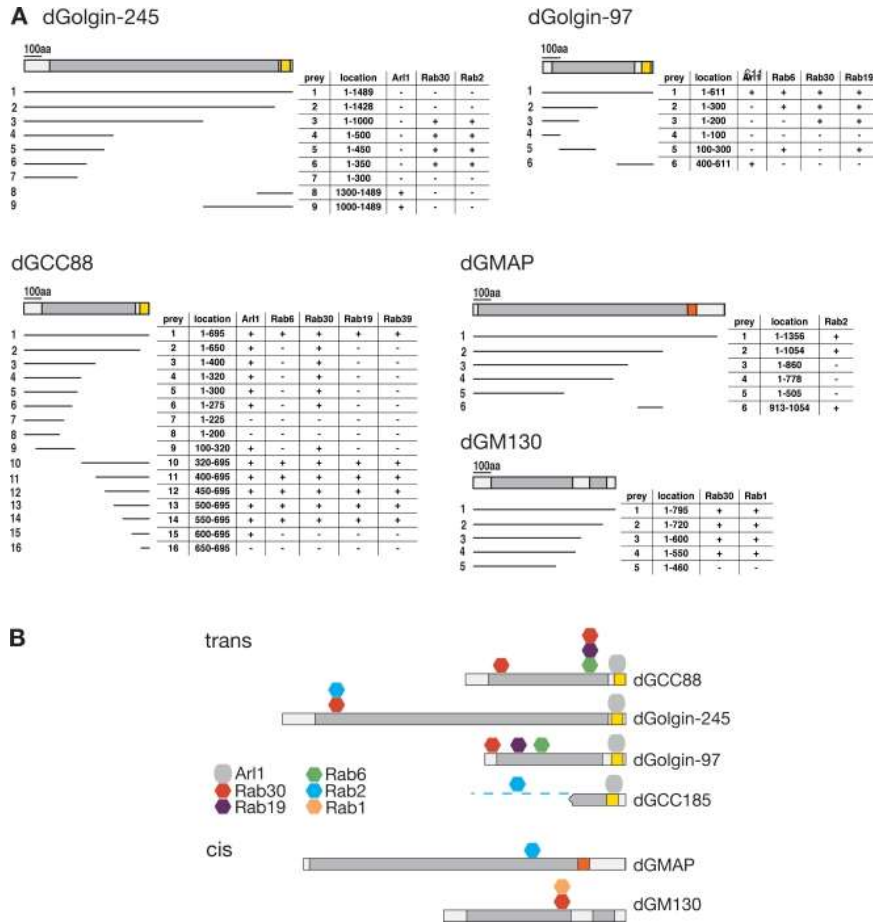
A GRIP domén tartalmú hosszú coiled-coil fehérjék szisztematikus vizsgálatát, a sejten belüli pontos lokalizációjuk megállapításával kezdtük. Kísérleteinkben azonosítottuk a négy Golgi asszociált GRIP domén tartalmú kihorgonyzó fehérje kis GTP-áz partnereit.

A fehérjék ellen termeltetett specifikus ellenanyagok segítségével megállapítottuk, hogy a *Drosophila* GRIP domén tartalmú hosszú coiled-coil fehérjék (dGolgin245, dGolgin97, dGCC88, dGCC185) a Golgi apparátus transz felszínéhez lokalizálódnak, mind fénymikroszkópos, mind immuno-gold elektronmikroszkópos vizsgálatokkal, hasonlóan az élesztő és a humán fehérjékhez. Ismert volt, hogy a Golginok kis GTP-ázokat kötnek és feltételeztük, hogy ez a reverzibilis kötés teszi lehetővé a vezikulák dinamikus mozgását a Golgi és az endoszómák között. A Rab/Arl fehérjék dinamikusán aktív GTP kötött és inaktív GDP kötött állapotban találhatók. Az inaktív állapotú Rab/Arl fehérjéken a GDP GTP-re cserélést a GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) fehérjék valósítják meg, míg az inaktiválást specifikus GAP (GTPase Activator Protein) fehérjék hajtják végre. A GEF-ek és a GAP-ek is perifériális membrán fehérjék, amelyek akár más Rab/Arl fehérjék segítségével kapcsolódhatnak a kötőpartnerhez. A kötési helyek pontos feltérképezésére kihasználtuk, hogy

ezek a kis GTPázok GDP (inaktív) és GTP (aktív) kötött formában is vizsgálhatók élesztő két hibrid rendszerben. Elkészítettünk egy 27 tagból álló GTPáz panelt, amely reprezentálta a Golgi apparátuson és az endoszómákon jelenlévő kis GTPázokat. Minden fehérje esetében előállítottuk a stabilan GTP és a GDP kötött változatot. Teljes hosszúságú és csonkolt fehérjékkel is megvizsgáltuk a Golginok és a kis GTPázok kölcsönhatását.

Megállapítottuk, hogy a Golgi lokalizált Arl1 kis GTPáz GTP kötött formája képes mind a négy GRIP fehérje C-terminális részéhez kötődni. A Rab6, Rab19 GTP kötött formája a dGCC88-hoz és a dGolgin97-hez, míg a Rab30 GTP kötött formája a dGCC88, dGolgin97 és a dGolgin245-tel mutatott kapcsolatot. A dGolgin245 az Arl1 mellett a Rab2 GTP kötött formájához is kötődött. Az élesztő két-hibridben kapott eredményeket GST pull-down kísérletekkel is megerősítettük, felhasználva a specifikus Golgin ellenanyagokat. Az emlős rendszerekben a Rab19 és a Rab30 GTPázok partnerei nem voltak ismertek, így ezekben az esetekben fontos eredmény volt a dGrip245, dGrip97 és a dGCC88 kapcsolatok bizonyítása. A GRIP domént tartalmazó Golginokon kívül megvizsgáltuk a cisz-Golgihoz lokalizálódó dGMAP210 és dGM130 fehérjék kis GTP-áz kötését és megállapítottuk, hogy a dGM130 kapcsolódik a Rab30 GTP kötött formájához, míg a dGMAP210 a cisz-Golgi lokalizált Rab2 GTP kötött formájához kötődik. A kis GTP-ázok partnereinek azonosítása céljából tömegspektrometriai módszerekkel a GRIP domén tartalmú fehérjéken kívül számos eddig nem jellemzett Rab30 partnert sikerült azonosítanunk, többek között a dp115 és a BicD fehérjéket is, amelyek szintén coiled-coil fehérjék. (8. ábra).

Összességében ezek az eredmények egy olyan modell megalkotását tették lehetővé, ahol a Golgi lokalizált coiled-coil fehérjék kis GTPázokon keresztül kapcsolódnak a Golgi felszínéhez. Feltételezhetően, ezek a nagy méretű flexibilis fehérjék képesek a Golgiról lefűződő vezikulumokat a transzport útjára bocsájtani, míg a retrográd transzport által a Golgi apparátushoz szállított vezikulákat megkötni a vezikul felszínén található kis GTPázokon keresztül. A hosszú fehérjék coiled-coil szakaszának flexibilitása lehetővé teszi a fehérjéknek, hogy a vezikulákat az egyes Golgi kompartmentek között áthelyezzék, illetve a fehérjék hajlékonysága lehetővé teszi a vezikulumok legördülését a belső kötőhelyek segítségével. A folyamat dinamikusságát a GTPázok reverzibilis GTP kötése szabályozhatja. Mivel jelentős átfedést tapasztaltunk az egyes Golginok GTPáz kötő képessége között, feltételezünk egy jelentős funkcionális redundanciát a fehérjék között.



5. ábra A Rab-kötőhelyek feltérképezése a GRIP-domén fehérjéken. (A) A jelzett kis GTPáz fehérjék (valamennyi konstitutívan aktív GTP kötött forma) és a dGCC88, dGolgin-245 és dGolgin-97 GRIP domén fehérjék, valamint a dGMAP és dGM130 cisz-Golgi coiled-coil fehérjék fragmentumai közötti élesztő két-hibrid kölcsönhatások összegzése. A préda fragmentumokat a Gal4 aktiváló domén C-terminálisához fuzionáltuk és teszteltük a GTP-ázokkal történő kölcsönhatásukat szelektív lemezekben. **(B)** Az A panelen bemutatott kölcsönhatások összefoglalása. A Rab2 a GCC88-hoz és a GCC185-höz is kötődik, de az előbbi kölcsönhatást két hibriddel nem sikerült kimutatni, az utóbbit pedig teljes hosszúságú cDNS-klón hiányában nem térképeztük fel. A színek jelölik a túlnyomórészt coiled coil (szürke) vagy a GRIP domének (sárga) régióit. A narancssárga a GRAB (GRIP-related Arf-binding) domént jelöli.

Ezt támasztja alá az is, hogy például a dGolgin245 mutációja nem befolyásolja az *ecetmuslica* életképességét vagy fertilitását, valószínűleg a többi Golgin helyettesítő funkciójának köszönhetően. *In vitro* kísérletekkel megállapították, hogy jelentős átfedés van a Golginok által befogott vezikulákban lévő fehérjék tekintetében, ami a kölcsönös helyettesíthetőséget sugallja. Ez a megállapításunk megerősítést nyert az egyszeres és többszörös mutánsok vizsgálatával, amelyekkel bebizonyosodott, hogy a Golginok képesek egymás feladatát ellátni. Kizárólag a többszörös mutánsok lettek letálisak, csak azok mutatták a membrántranszport folyamatok sérülésének jeleit a vizsgált szövetekben (Park et al. 2022).

A Golginok vizsgálata rámutatott, hogy a perifériás membránfehérjék gyakran kapcsolódhatnak kis GTPázokon keresztül. A hosszú coiled-coil fehérjéken található változatos GTPáz kötőhelyek biztosítják a Golgi közelébe érkező vezikulák pontos célbajuttatását, szortírozását. Ugyanakkor a Golginokon kívül viszonylag korlátozott számban ismerünk a Rab GTPázokhoz kapcsolódó egyéb effektor fehérjéket, fehérje komplexeket. A *Drosophila melanogaster* genom 27 Rab fehérjét tartalmaz, melyek közül 23-nak van emlős homológja. Ez a 23 *Drosophila* fehérje a 66 humán Rab fehérjéből 50 fehérjének a *Drosophila* ortológja.. Elkészítettük mind a 23 *Drosophila* Rab fehérje baktériumban expresszállható, GST fúziós változatát és helyspecifikus mutagenézissel előállítottuk az aktív GTP kötött és az inaktív GDP kötött változatukat. GST pull-down kísérletekben *Drosophila* S2 sejtek lizátumát használtuk a Rab partnerek azonosítására. A kölcsönható fehérjéket tömegspektrometriai analízissel azonosítottuk. A módszer tesztelésére a korai endoszómákhoz lokalizálódó Rab5 fehérjét használtuk, amellyel bizonyítottuk, hogy a módszer alkalmas az ismert kötőpartnereken (Rabankyrin-5, Rabaptin-5, Rabex-5 stb.) kívül új partnerek (Hook, Cbx, CG3558, CG6607, CG11490 (TBC1D15) stb.) azonosítására is. Érdekes, addig nem jellemzett fehérje kapcsolatokat találtunk a Rab2 esetében is, amelynek a Golgihoz kötődő, Golgi-ER (endoplazmatikus retikulum) közötti transzportban betöltött funkcióját ismertük addig. Az aktív Rab2 kötődött a HOPS és a CORVET komplexek alegységeihez is kötődött. Feltételezhető, hogy a Rab2 un. szállító komplexeken utazik a Golgi és az endoszómák között és a GTP hidrolízisével válik le az endoszóma membránjáról. Említésre méltó még a Rab2 BicD-hez való kötődése, amely egy dinein adaptor fehérje, melynek szerepe lehet a mikrotubulusok mínusz vége felé irányított motorfehérjék valamint a Golgihoz történő szállításban. Érdekes interakciókat azonosítottunk a transz-Golgihoz lokalizálódó Rab6 esetében is, melynek szerepe a retrográd transzportban volt ismeretes. Újonnan azonosított coiled-coil fehérjéken kívül a Rab6-ról kiderült, hogy a TRAPP-II komplex alegységeivel is kapcsolódik. Hasonlóan meglepő volt, hogy a Rab4 interakcióba lépett a retrográd transzportban fontos GARP komplex ismert tagjaival, valamint egy eddig nem jellemzett, a Vps54-hez hasonló fehérjével, a CG4996-vel. A CG4996 fehérje konzerváltsága magasabbrendűekben felvetette annak a lehetőségét, hogy a GARP komplexnek egy evolúcionárisan konzervált alternatív formája is létezik, ahol a VPS54 helyett a CG4996 kapcsolódik a komplexbe. A pontos biológiai relevanciája ennek az alternatív komplexnek még nem tisztázott. A GARP-on kívüli egyéb úgynevezett pányvázó komplexek is specifikusan kötődtek bizonyos Rab fehérjékhez (COG-Rab2, -Rab6, -Rab30, -Rab39, Exocyst-Rab6, -Rab11, -Rab30, HOPS-Rab2, -Rab5, RZZ-Rab6, -Rab18, TRAPP-Rab6) bizonyítva ezzel, hogy a membránok közötti különbség meghatározásában valószínűleg

közösen vehetnek részt. Összességében a jellemzett 23 aktív Rab kötőpartnereinek azonosítása és a 11 Rab fehérje partnereinek validálása bizonyította, hogy az affinitáskromatográfia egy jó módszer a kis GTPázok intakt fehérje partnereinek azonosítására, valamint közelebb vihet bennünket a membrántranszport folyamatok jobb és árnyaltabb megértéséhez. Az interakciók részletes analízise kapcsán jobban megérthetjük a szekrécióra képes polarizált nyálmirigy sejtek működését. A GTPáz fehérjepartnerek azonosítása a sejtes krinofágia molekuláinak feltárásában is segíthet, de az exocitózis utolsó lépéseihez szükséges fehérjék megismeréséhez is hozzájárulhat (Thomason et al. 2017; Prince et al. 2019; Csizmadia et al. 2018).

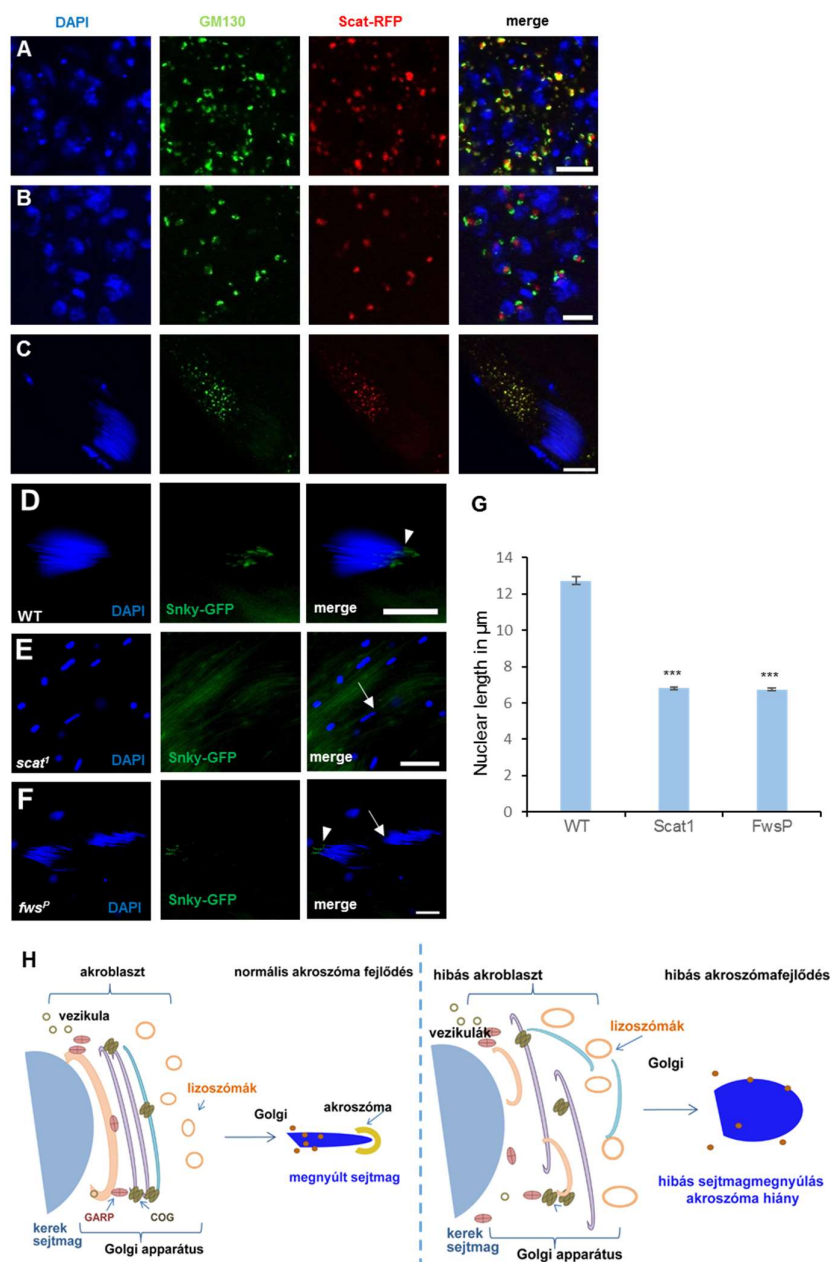
A szövetspecifikus, specializált transzportfolyamatok tanulmányozására a többsejtű modellszervezetek alkalmasak. A Golgi esetében is bizonyítást nyert, hogy a lárvális diszkuszkban a sejtekben apikális-bazális irányban a Golgihoz lokalizálódó fehérjék eloszlása eltérő, ami nem meglepő annak ismeretében, hogy a szignalizációs útvonalak aktivitásai is eltérőek apikális-bazális irányban (Yano et al. 2005). A szignalizációs útvonalak segítségével szállítódó receptorok és ligandok sejten belüli megfelelő szortírozásához járulhat hozzá az aszimmetrikus eloszlás. A redundanciának köszönhetően a pályvázó komplextagok hiánya általában viszonylag enyhe fenotípust eredményez, attól függően, hogy az alegység mennyire tölt be szerkezeti szerepet a komplex kialakításában (Cheung and Pfeffer 2016). A COG komplex esetében az egyik alegység (lobe A) mutánsai súlyos fejlődési rendellenességekkel rendelkeznek, míg a másik (lobe B) alegység fehérjeinek hiánya enyhébb, pl a Cog5 esetében pszichomotoros betegség kialakulását eredményezi (Chaves 2011). *Drosophilában* a Cog5 mutáció hímsterilitást eredményez (Farkas et al. 2003).

A spermatogenezis és a membrántranszport kapcsolata

A GARP komplex, a transz-Golgihoz történő retrográd transzportban fontos protein komplex, fehérjei interakciót mutattak a Rab fehérjecsalád több tagjával (Gillingham et al. 2014). Klasszikus genetikai vizsgálatokkal a GARP komplex egyik tagjánál, a *Drosophila* Vps54 (*scat*) gén mutánsánál hímsterilitást tapasztaltunk (Fári et al. 2016a; Wakimoto et al. 2004). A mutánsok fenotipikus jellemzése kiderítette, hogy a spermatogenezis a késői fejlődési stádiumokban áll le, a sejtmagok és egyben a spermatidák megnyúlásánál. A *scat* mutáns cisztákban a sejtmagok lekerekednek, szétszórtnak helyezkednek el és azok megnyúlása nem történik meg, a sejtmagok szétszóródnak a cisztákban. Ismert volt, hogy egérben a Vps54 része az akroszómának (Paiardi et al. 2011). A *Drosophila* Scat fehérje szomatikus sejtekben a

Golgihoz lokalizálódik és az ivarvonal sejtjeiben a kerek spermatidákban az akroblaszthoz. Az akroblaszt egy nagyon speciális formája a *Drosophila* Golgi-készüléknek, hiszen a szomatikus sejtekhez képest, ahol a sejtben elszórtan található zsákocskák vannak, az akroblasztban ezek összeszerveződnek a mag körül. A meiózist követően az akroblaszt kialakulása során a Scat a Golgi transz oldalán halmozódik fel, amely a sejtmaghoz közel, proximálisan helyezkedik el, szemben a cisz-Golgi komponensekkel, amelyek a sejtmagtól távolabb helyezkednek el. Ez az elrendeződés ellentétes a szomatikus sejtekben megfigyelhető Golgi pozicionálásával, amelynél a mag felé a cisz-, míg attól távol a transz-Golgi található. A sejtmag megnyúlását követően a tesztisz-specifikus Golgi lokalizált Sneaky és a lizoszómális Lamp fehérjék kijelölik és részei is az akroszómának, de sem a transz-Golgi lokalizált Scat fehérje, sem a cisz-Golgi lokalizált fehérjék nem találhatók meg az akroszómában (9. ábra).

A Scat fehérjére specifikus ellenanyaggal és riporter génnel jelölt transzgenikus vonalban is a transz-Golgihoz lokalizálódik, amely a sejtmagoktól távolabb az individualizációs komplex környékén halmozódik fel a spermatogenezis előrehaladtával. A *scat* mutánsban a Golgi szerkezete sérül és nem alakulnak ki az akroszómák a magok csúcsi részén, a bazális testtől átellenesen. Egy másik, a retrográd transzportban fontos fehérjekomplex, a COG komplex egy tagját (*fws*) is megvizsgálva szintén az individualizáció elmaradását és az akroszóma kialakulásának hibáját tapasztaltuk. Ezek az eredmények rámutattak, hogy egy erős kapcsolat és egymásra épülés figyelhető meg a vezikula transzport és a Golgi szerkezetének átalakulásában a spermium fejlődése során (9. ábra A-G).

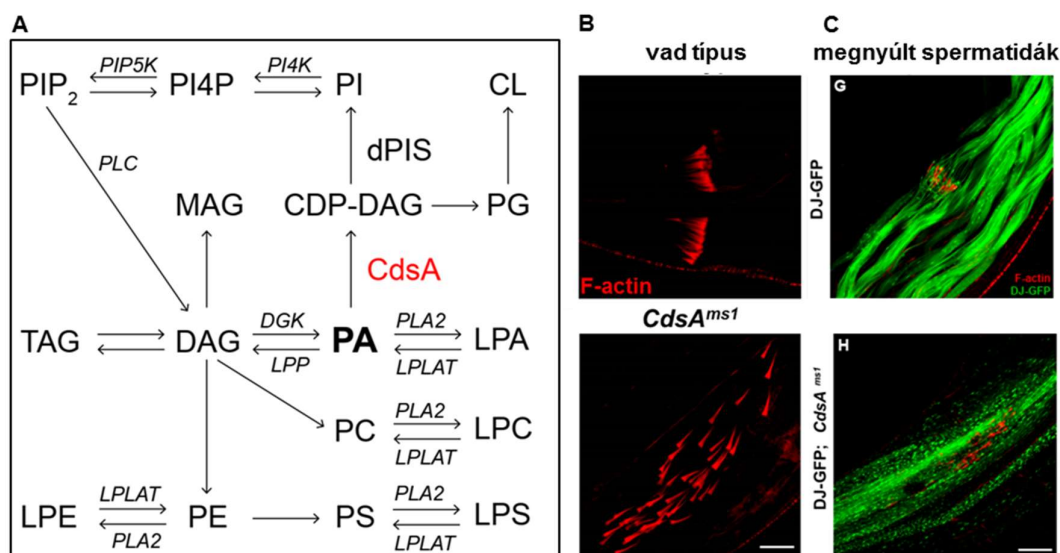


6. ábra A kihorgonyzó-komplexek szerepe az akroblasztok/akroszómák integritásában és az akroszómák kialakításában. (A-C) Konfokális képek a Scat-RFP-t (piros) expresszáló testiszekről, dGM130 (zöld) immunfestéssel. (A) primer spermatociták, (B) meiotikus spermatidák, (C) megnyúlt spermatidák. DAPI-val (kék) a sejtmagokat jelöltük. **(D-F)** Megnyúlt spermatidákban a Snky-GFP jelöli az akroszómákat (D) a vad típusban. A (E) *scat¹* és (F) *fws^P* mutánsokban az akroszómák kialakulása hibás vagy elmarad. A nyílhegyek az akroszómákat jelölik. A nyilak az akroszóma hiányát jelölik a *scat¹* és *fws^P* mutánsban. Mércé: 10 μm . **(H)** Vad típusú spermatidákban (fent) a COG és a GARP komplexek retrográd transzporton keresztül hozzájárulnak az akroblasztként ismert Golgi apparátus megfelelő morfológiájához. Ez a működőképes akroblaszt azután az akroszóma kialakításához járul hozzá. A nem megfelelő retrográd transzport miatt a Golgi hibás, ami az akroblast/akroszóma szerveződés hibáját, magmegnyúlási hibát és sterilitást eredményez.

Eredményeink bizonyították, hogy az akroblaszt kialakulása elengedhetetlen az akroszóma kialakulásához, valamint rámutat a retrográd kihorgonyzó komplexek fontosságára a hím ivarvonalsejtekre specifikus Golgi szerveződésében. A hímsteril mutánsok vizsgálata rámutatott, hogy a retrográd transzport folyamatok elengedhetetlenek a perinukleáris Golgi kialakulásához a meiózist követően (9. ábra H). Ez egybevág azzal az emlős Golgi modellel, ahol a mikrotubulusok segítségével megvalósított anterográd transzport mellett a GARP és COG komplexeket, és ezeken keresztül magát a retrográd transzportot teszik felelőssé a Golgi ciszternák szalagszerű összeszerveződéséért (Bonifacino and Hierro 2011). Annak a kérdésnek a megválaszolása még várat magára, hogy a retrográd transzport során a vezikulák tartalma vagy maga a megfelelő protein homeosztázis szükséges-e a szalagszerű ciszternarendszer kialakulásához.

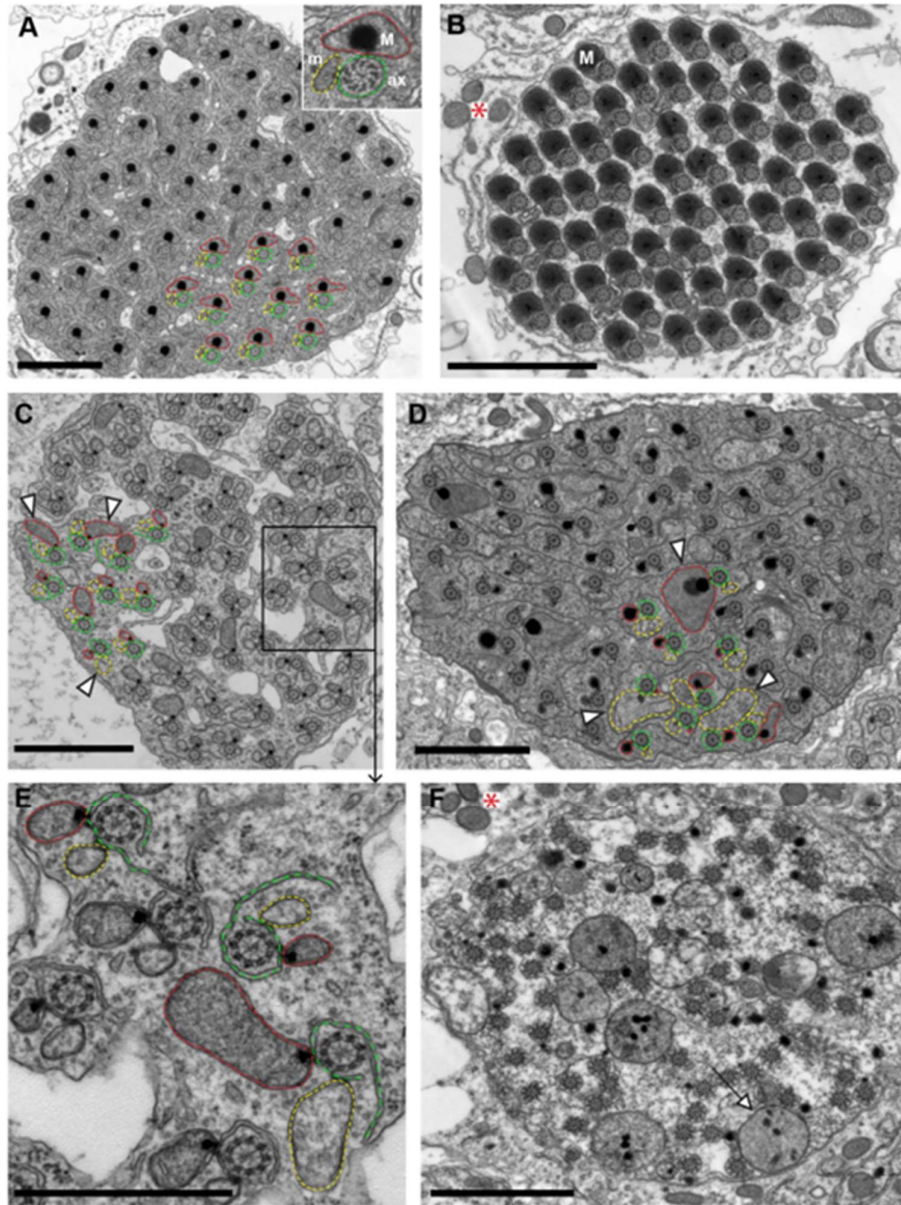
A lipidbioszintézis vizsgálata a spermatogenezis alatt

A *Drosophila* spermatogenezise során fejlődő ciszták nemcsak az ivarsejtfejlődés tanulmányozására, de az egyedfejlődés során jelen lévő sejtbiológiai folyamatok tanulmányozására is alkalmas. Ilyenek például a szabályozott sejten belüli és sejteket határoló membránok dinamikus változásai. A spermatogenezis kezdeti stádiumaihoz képest a ciszták megnyúlása során egy közel 150-szeres méretnövekedés tapasztalható, ami jelentős felületnövekedéssel párosul. A membránok által határolt sejtorganellumok lipidösszetétele jelentős eltéréseket mutat, az általánosan felhalmozódó lipidek mellett a mitokondriumok membránja kardiolipint, nagy mennyiségű foszfatidil glicerolt, valamint foszfatidsavat is tartalmaz (Guan et al. 2013; Laurinyecz et al. 2016). A Golgi-készülék jellemzően szfingomielint is tartalmaz, valamint a többnyire plazma membránra jellemző foszfatidil inozitolt (PI), különböző foszforiláltságú állapotait. A spermatidákban található határoló membránok dinamikusan változnak a spermatidák fejlődésével, a membránok növekedésével a lipid bioszintézisnek is összehangoltan szükséges változni. Talán az egyedfejlődésben és a sejtbiológiai folyamatokban a legsokrétűbben jellemzettek a foszforilált PI típusok, melyek a sejtek proliferációjában, az aktin hálózat szerveződésében, a differenciációban és a sejtvándorlásban is szerepet játszanak (Brill et al. 2016). Ismert, hogy a spermatociták citokinezise érzékeny a PI4P szintjére, hiszen a PI-4-kinase III beta (*fwd*) vagy a PI transzporter (*giotto*) hiányában a folyamat leáll, aktin hibák figyelhetők meg a citokinezis során és az állatok hímsterilitást mutatnak (Giansanti et al. 2006; Polevoy et al. 2009).

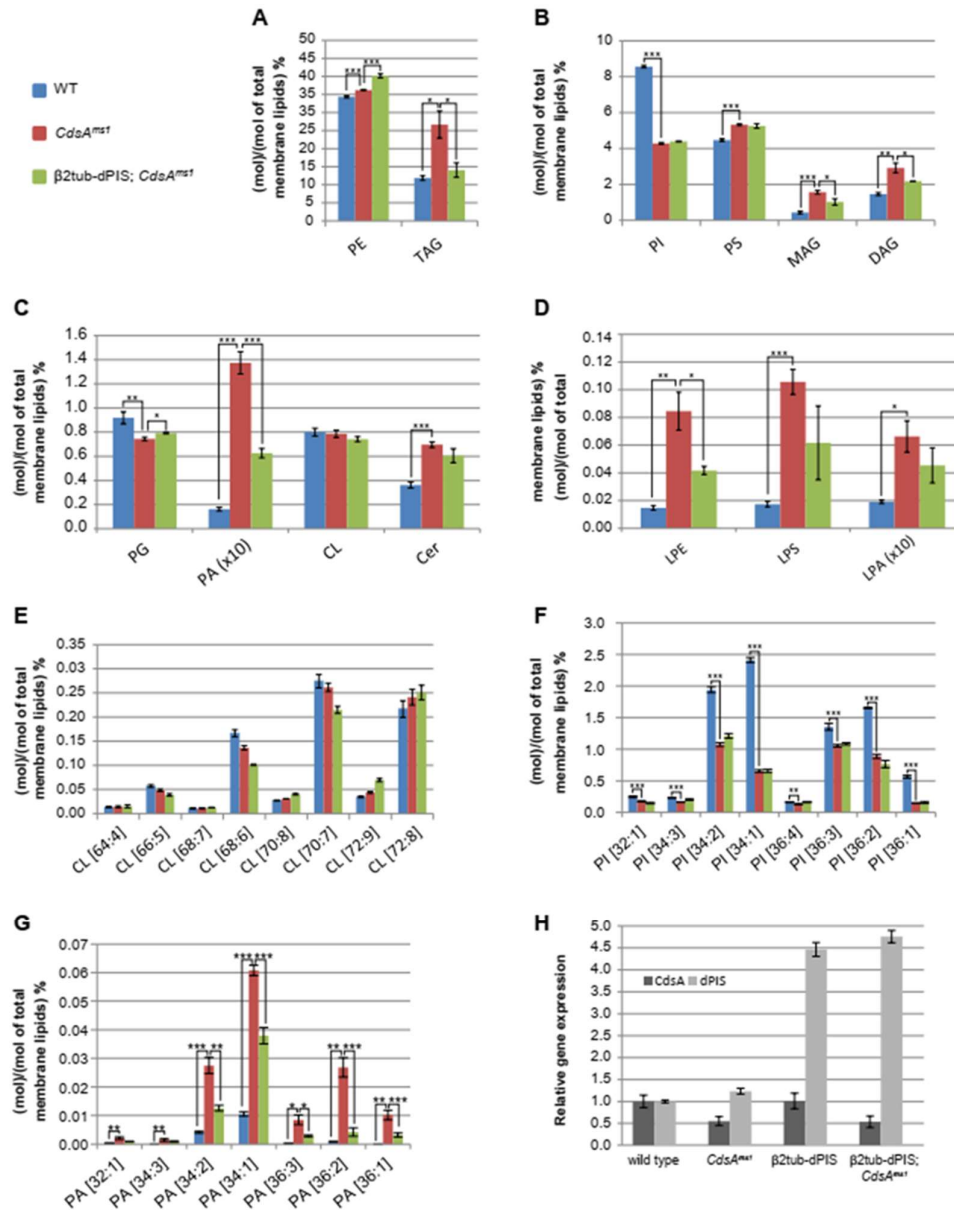


7. ábra A foszfolipidek bioszintézisének útvonala és a *CdsA^{msl}* mutáns fenotípusa. (A) A foszfatidsav, PA az útvonal egyik központi foszfolipide. A PA a diacil-glicerín kináz (DGK) által DAG-gá, vagy a CDP-DAG szintáz (CdsA) által CDP-DAG-gá alakítható. A CDP-DAG a foszfatidil-inozitol-szintáz (PIS) hatására foszfatidil-inozitollá (PI) alakul, ami a foszfoinozitidok szintézisének prekürzora: PI4P és PIP2. A CDP-DAG a foszfatidil-glicerín (PG) és így a kardiolipin (CL) szintézis szubsztátja is. A DAG a MAG, TAG, PC és PE közvetlen prekürzora. A PLA2 és a lizofoszfolipid aciltranszferázok (LPLAT) katalizálják a lizofoszfolipidek előállítását: LPA, LPC, LPS és LPE. A hímsteril *CdsA^{msl}* mutáns individualizációs hibákat mutat, amit az individualizációs komplexekben lévő aktinkúpok Phalloidinnel történő festését követően tudunk vizualizálni. A *CdsA^{msl}* mitokondrium hibáira utal a Dj-GFP transzgen abnormális szakaszos felhalmozódása a mutáns cisztákban. Mércse: 40 μm .

A késői stádiumokban is fontos a megfelelő PIP2 jelenléte, hiszen hiányában a megnyúlás, a bazális test kialakulása és az axonéma szerkezete is hibás (Wei et al. 2008). Egyértelmű volt, hogy a lipid metabolizmus elengedhetetlen a normális spermiumképződéshez, de a membránlipid alkotórészek eloszlása illetve a különböző sejtorganellumok érzékenysége nem volt ismeretes. A lipidek az endoplazmatikus retikulumban keletkeznek, ahonnan transzportfolyamatok révén kerülnek át a megfelelő sejtorganellumokba. A CDP-diacilglicerol szintáz (CDS) egy fontos enzime a lipid bioszintézis útvonalának, ami a foszfatisavból (PA) történő citidine-difoszfát-diacilglicerol (CDP-DAG) szintéziséért felelős. A CDP-DAG fontos köztes terméke a PI foszfolipidnek valamint a foszfatidil glicerolnak (PG) és a kardiolipinnek (CL) (10. ábra A).



8. ábra A spermatidák ultrastruktúrája morfológiai hibákat mutat a *CdsA^{msl}* testiszekben transzmissziós elektronmikroszkópos felvételeken. (A, B) A vad típusú és a *CdsA^{msl}* (C-F) testiszekben lévő megnyúlt spermatidákat tartalmazó ciszták keresztmetszeti képei (A, B) A megnyúlt ciszta 64 szinkronizált spermatidát tartalmaz. Axonémák (ax, zöld vonal), a nagy (M) (piros színnel) és a kis (m) (sárga színnel) mitokondrium származékok az (A) individualizáció előtt és (B) után. (B) A szomatikus sejtek mitokondriumai csillaggal vannak jelölve. (C-E) Az individualizáció előtti, megnyúlt *CdsA^{msl}* ciszták reprezentatív keresztmetszeti képei 64 szinkronizálatlan spermatidát tartalmaznak, amelyek azonos méretű vagy megnagyobbodott mitokondrium származékokkal (nyílhegyek) és axonémáról levált axiális membránnal, annak túlnövekedésével rendelkeznek (nyílak). (F) A *CdsA^{msl}* ciszták rendezetlenek a mitokondriumok túlnövekedése jellemző (nyíl). (B, F) A szomatikus mitokondriumok normális szerkezetet mutatnak (csillag). Mércé: 2 μ m (A–C, E, F) és 1 μ m (D).



9. ábra A lipidosztályok és a lipid molekuláris alosztályok vizsgálata testiszekben. (A-G) Lipidosztályok és -alosztályok változásai vad típusú (WT), *CdsA^{msl}* mutáns és $\beta 2\text{tub-dPIS}; CdsA^{\text{msl}}$ mutáns testiszekben tömegspektrometriás módszerrel mérve. (a) A fő lipidosztályok eloszlása: (A) PE, PC, PE-PI, TAG, (B) PS, PI, PC-O, CerPE, DAG, MAG, (C) kisebb lipidosztályok: CL, PG, PA, Cer, GICer és d) lizofoszfolipid osztályok: LPS, LPE, LPA. A lipid típusok eloszlása: (E) CL, (F) PI, (G) PA. A szinteket az összes membránlipidre normalizáltuk. A hibásávok az átlagot + a középértéktől való eltérést jelzik, n=5. *p , 0,05; **p , 0,01; ***p , 0,001 (Student t-próba). (H) A *CdsA* és *dPIS* transzkriptek relatív expressziós szintjét kvantitatív RT-PCR segítségével számszerűsítettük a vad típusú, *CdsA^{msl}* homozigóta, $\beta 2\text{tub-dPIS}$ és $\beta 2\text{tub-dPIS}$ herékben; *CdsA^{msl}*.

Drosophilában csupán egy CDS enzimet kódoló gén található, a *CdsA*. Előzőleg a rhabdomer kialakulásában írták le a szerepét, illetve hiányában kimutatták a lipid droplet felhalmozódását a lárvális nyálmirigyben (Wu et al. 1995; Raghu et al. 2009). Transzpozonos

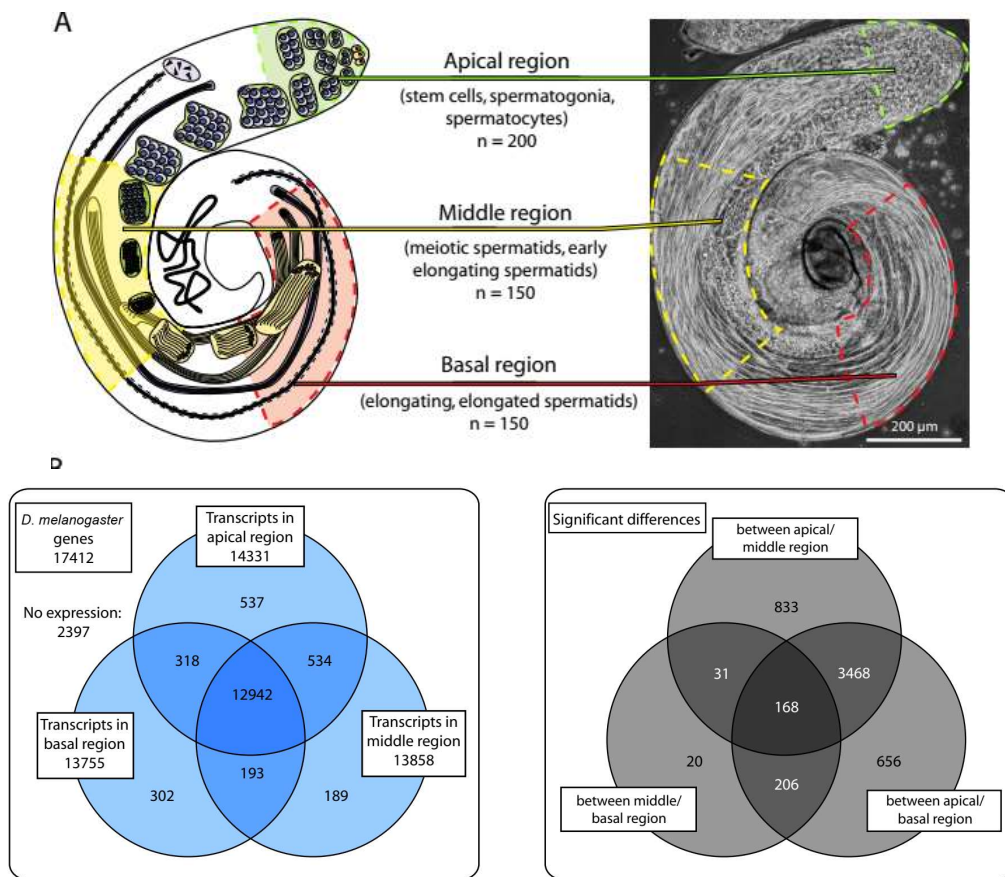
mutánsok szisztematikus vizsgálatával és genetikai jellemzésével egy hipomorf *CdsA^{msl}* allélt azonosítottunk, ami hímsterilitást mutatott. A *CdsA^{msl}* mutánsban a spermatidák egyedivé válása során áll le a spermatogenezis, és az individualizációs komplexek szétcusznak (10. ábra B-C). A megnyúlás, az axonéma kialakulása és az akroszóma szerveződése nem sérül a *CdsA^{msl}* mutánsban. Az individualizáció során a citoplazma alkotói egy nem-apoptotikus kaspáz útvonal segítségével lebomlanak. A *CdsA^{msl}* mutánsban is aktiválódnak a kaspázok és megtalálhatók a cisztákban, de az individualizációs hiba miatt nem halmozódnak fel a cisztikus hólyagban. A megnyúlt ciszták teljes hosszán végigfutó mitokondrium jól láthatóvá tehető a poszt-meiotikusan felhalmozódó DJ-GFP transzgen segítségével (Santel et al. 1998). A vad típusban látható egyenletes szálak lokalizációval szemben, szakaszosan figyelhető meg a DJ-GFP jelenléte a *CdsA^{msl}* mutánsban, ami a mitokondrium hibájára utal. Transzmissziós elektronmikroszkópiával a normális axonémák körül az endoplazmatikus retikulum (ER) eredetű axiális membrán hibáit és megnagyobbodott mitokondrium származékokat figyelhattunk meg, szemben a mutáns szomatikus sejtjeiben megfigyelhető normális mitokondriumokkal (11. ábra). Elképzelhető, hogy a megnövekedett endomembrán rendszer gátolja az individualizációs komplex normális vándorlását. Mivel a CDS enzimatis funkcióval rendelkezik, fontos volt a lipidösszetétel megváltozásának vizsgálata a mutáns tesztiszekben. Megállapítottuk, hogy jelentősen csökkent a PI mennyisége és megemelkedett a PA mennyisége a mutánsokban, ami egybevágott a CDS enzimatis funkciójának hiányából várható változásokkal (12. ábra). A *Drosophila* szövetek lipidomikai elemzése jelentős különbségeket mutatott a különböző szövetek PA tartalmában. Míg a zsírtestben és az agyban alig van mérhető mennyiségű PA, addig a bélben, a szárnydiszkuszban és a tesztiszben jelentős mennyiség található belőle. Feltételezhető, hogy a *CdsA^{msl}* mutánsban felhalmozódó PA a kúpszerű szerkezetének köszönhetően a membránok görbületét megváltoztatva járul hozzá az endomembránok méretbeli változásához. Ismert, hogy maga a CdsA fehérje az ER-hoz lokalizálódik integrális membránfehérjeként. Az ER és a mitokondriumok közötti közvetlen kapcsolat egy evolúcionárisan konzervált jelenség. Feltételezzük, hogy a *CdsA^{msl}* mutánsban az ER eredetű axiális membránról a vele közvetlen kapcsolatban lévő mitokondriális membránra terjed át a CDS enzim hiányában felhalmozódó PA. A mitokondriális membránba épülve a PA a membrán görbületet okozhatja, ami a membránfelület megnövekedését eredményezheti. A PA mellett más lipid osztályok is szignifikánsan megváltoztak, ami a megemelkedett PA-nak lehet a következménye. Ezek a lipidosztályok (PG, LPE, LPS, LPA) szintén hozzájárulhatnak a hibás mitokondrium fejlődéshez és a spermatogenezis leállításához. A *CdsA^{msl}* mutánsban történő PI-szintáz túltermelés a hímsterilitás visszaszorulását

eredményezte, ami azt jelzi, hogy a PI szintáz valahogyan - valószínűleg indirekt módon- a PA szint viaszszorulását okozza a *cdsA* gén túlműködése nélkül (12. ábra H). Ezek a kísérletek egyértelműen bizonyították, hogy egy lipidbioszintézisben szerepet játszó génnek pleiotróp hatása van a lipid metabolizmusban, ami a tesztisz esetében hímsterilitást eredményez. Eredményeink azt is bizonyították, hogy a tesztisz lipidom megváltozása jelentősen befolyásolja a késői stádiumokban az endomembránok struktúráját (Laurinyecz et al. 2016).

A poszt-meiotikus szabályozás elemeinek azonosítása transzkriptomikával

A meiózist követően a spermatidák sejtmagjai transzkripcionálisan inaktívak, ezért nincs lehetőség kompenzációs mechanizmusok beindítására a meiózist követően, a már megszentizált RNS mennyiségből kell az intenzív morfológiai változásokat megvalósítani. A ciszták megnyúlása és a membránspecializációk kialakulása a tesztiszben egy érzékeny rendszernek tekinthető, amely a sejtek alap- és specializált funkcióit érintő fehérjék mennyiségében bekövetkező változásokra a folyamat leállításával reagál. Ide sorolhatók az individualizációt megvalósító fehérjék, az akroszóma alkotók, a késői mitokondrium specializációhoz szükséges géntermékek, a Hiszton-Protamin csere fehérjei és a flagellum felépítésében és működésében résztvevő fehérjék. Ennek az egyedi szabályozásnak a megléte sarkallt bennünket arra, hogy megvizsgáljuk a transzkriptum összetételét a tesztisz egyes régióiban (13. ábra A) (Vedelek et al. 2018).

A spermatogenezis alatti sejt differenciálódás jobb megértése érdekében úgy döntöttünk, hogy összehasonlítjuk a *Drosophila* tesztisz különböző részeinek RNS összetételét. A tesztiszeket kiboncoltuk és három részre vágtuk: apikális, középső és bazális darabokat izoláltunk, amelyek a spermatogenezis előrehaladó egyes szakaszait reprezentáló sejteket tartalmazták, az azokra a sejtekre jellemző RNS összetétellel. A csúcsi részben található az ősvasejtek és a mitotikus osztódással keletkező spermatocitákat tartalmazó ciszták. A középső régióban túlnyomó többségben a meiotikus osztódáson átesett 64 sejtes ciszták találhatók. A tesztisz bazális régiójában található a már megnyúlt poszt-meiotikus ciszták. A tesztiszeket boncolásával három régiót izoláltunk, majd ezekből totál RNS-t tisztítottunk és újgenerációs RNS szekvenálással meghatároztuk az egyes régiók RNS összetételét. A transzkriptom összeállítása és a régió specifikus felhalmozódás vizsgálata lehetővé tette 15015 stádium-specifikus *Drosophila melanogaster* RNS jelenlétének azonosítását az egyes régiókban. Megállapítottuk azt is, hogy 2397 gén nem fejeződik ki a tesztiszben.



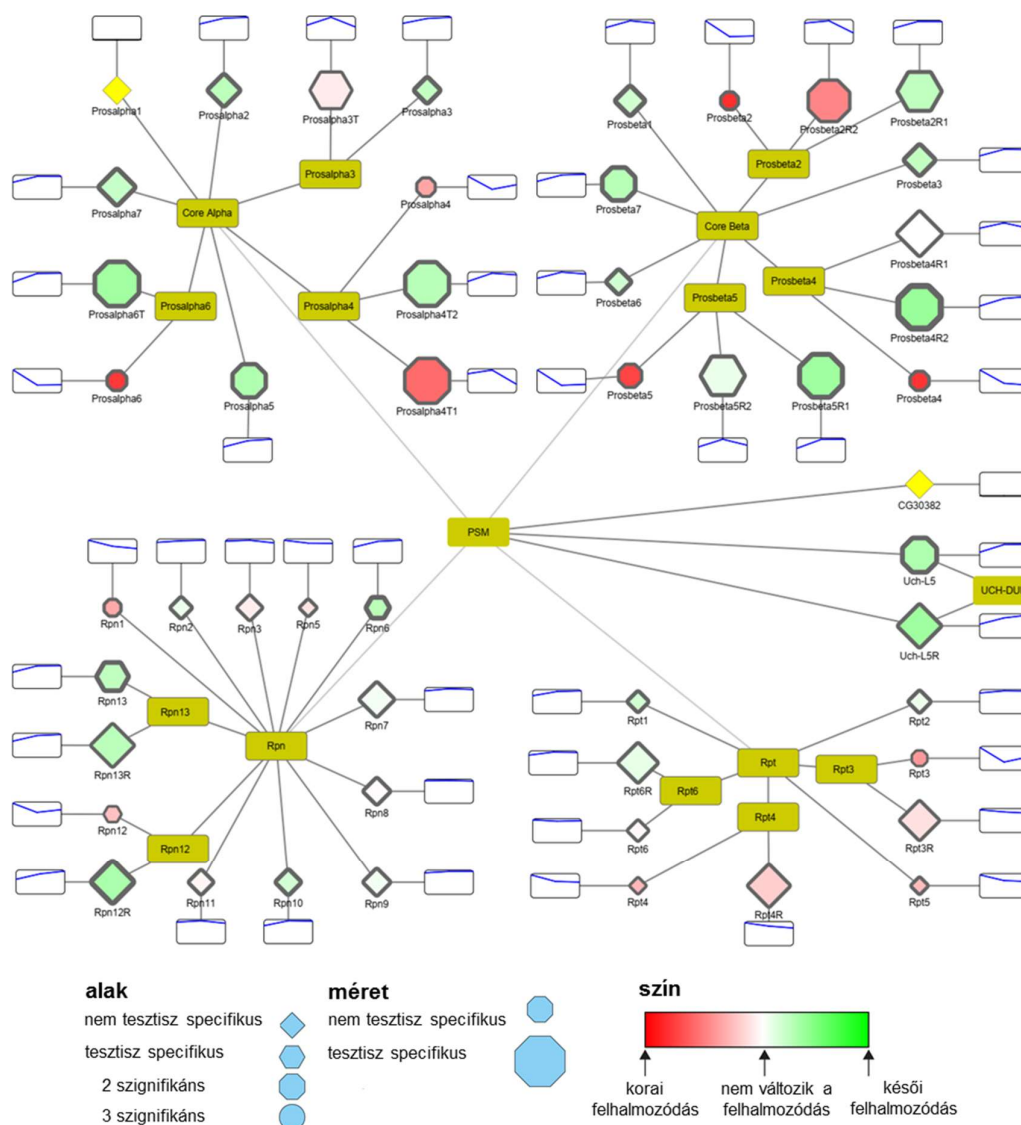
10. ábra A *Drosophila* tesztisz transzkriptomikai anízise. (A) A tesztisz különböző régióiban a transzkriptek meghatározása RNS szekvenálással történt. n= az analízishez felhasznált tesztisz régiók száma. **(B)** Azon gének száma, amelyek azonosítva lettek (kék grafikon) és azon transzkriptek száma, amelyek szignifikáns különbséget mutatnak (szürke grafikon) az egyes vizsgált tesztisz régiókban (FDR-korrigált p-érték < 0,05).

A transzkriptek szintje nem feltétlenül reprezentálja a fehérjék eloszlását a szomatikus sejtekben, hiszen a fehérjék féléletideje és a folyamatos transzkripció árnyalhatja a különbségeket egy szervben, szöveten, sejtípuson belül. Ebben a tekintetben a tesztisz egyedi, hiszen a meiózist követően, néhány kivételtől eltekintve nincs transzkripció, a kromatin kondenzált (Barreau et al. 2008). Az a tény, hogy bizonyos fehérjekódoló gének RNS termékei a késői stádiumokban nagyobb mennyiségben vannak jelen, azt jelzi, hogy feltehetően az átíródo fehérjék is a késői stádiumokban játszhatnak szerepet. A korai stádiumokban felhalmozódó RNS-ek esetében a fehérjék stabilitása befolyásolhatja a fehérjék jelenlétét a későbbi stádiumokban. 14331 géntermék az apikális régióban, 13858 géntermék a középső régióban, míg 13755 géntermék a bazális régióban volt detektálható. Összességében 12942

géntermék mindhárom régióban detektálható volt, 537 géntermék az apikális, 189 géntermék a középső, míg 302 géntermék a bazális régióra volt specifikus (13. ábra B). Az RNS szekvenálás lehetővé tette, a spermatogenezis egyes stádiumaira specifikus, szintén poli-A farokkal rendelkező 2061 hosszú nem kódoló RNS-ek (lncRNS) azonosítását is. A lncRNS-ek szerepe kevésbé tisztázott az egyedfejlődés során, de szerepük lehet a transzláció szabályozásában, az RNS-ek életidejének befolyásolásában. A 203 apikális-bazális irányban szignifikáns eltérést mutató lncRNS közül 167 a bazális régióban, a késői fejlődési stádiumokban halmozódik fel, ahol a transzláció szabályozásáról keveset tudunk. Feltételezzük, hogy a késői stádiumokban az RNS-ek stabilitásában illetve a transzláció finom szabályozásban játszhatnak szerepet ezek a lncRNS-ek. Az RNS szekvenálásból kapott régió-specifikus felhalmozódásokat számos esetben RNS *in situ* hibridizáció segítségével is megerősítettük.

Az irodalmi adatokból már tudtuk, hogy számos tesztisz-specifikus gén génduplikáció eredményeképpen keletkezett (Ding et al. 2010). A génduplikáció olyan alapvető folyamat, amely új gének, géntermékek kialakulásához vezethet, hozzájárul és növeli a biológiai sokféleséget. A retrogén az eredeti gén mRNS-ének reverz transzkripciója révén keletkezett intron nélküli génmásolatok, amelyek a genom részévé válnak (Fablet et al. 2009). A retrogén az inszerciós hely környezetében további exonokkal épülhetnek össze, amely révén növelhetik az eredeti gén komplexitását. Kimutatták, hogy számos retrogén tesztisz-specifikus funkciót nyer főemlősökben és *Drosophila*-ban egyaránt, hozzájárulva a spermatogenezis során végbemenő komplex fejlődési program megvalósításához (Díaz-Castillo and Ranz 2012).

A publikusan elérhető szerv-specifikus *Drosophila melanogaster* RNS szekvenálások eredményeinek a segítségével meghatároztuk a tesztisz specifitási indexét minden, az RNS szekvenálás során azonosított génnek. Megállapítottuk, hogy a magasabb tesztisz specifitási indexszel rendelkező géntermékek általában a késői stádiumokban halmozódnak fel, azokban a stádiumokban, ahol a spermatidákra jellemző speciális sejtorganellek kialakulnak. A transzkriptomikai adatok és a tesztiszspecifitási index vizualizálására a Cytoscape programot használtuk, ahol a géntermékek mennyiségét, azok csökkenését vagy emelkedését az apikális-bazális tengely mentén, valamint a tesztisz specifitási indexet is egyszerre tudtuk megjeleníteni. A teljes transzkriptum analízise mellett, az egyes géncsaládok tagjainak tesztiszben belüli jelenlétét, azok térbeli és mennyiségbeli viszonyait is ábrázolni tudtuk (14. ábra).



11. ábra A 26S proteaszómát transzkriptumainak eloszlása Cytoscape program segítségével vizualizálva. A 20S központi proteaszóma Alpha és Beta alegységekből, a 19S regulátor alegység pedig Rpn és Rpt alegységekből épül fel. A tesztisz-specifikus paralógok jellemzően a késői stádiumokban halmozódnak fel (zöld szimbólumok), míg a kanonikus proteaszóma alegységei kevésbé tesztisz-specifikusak és a korai stádiumokban magas a transzkriptjeik szintje (piros szimbólumok).

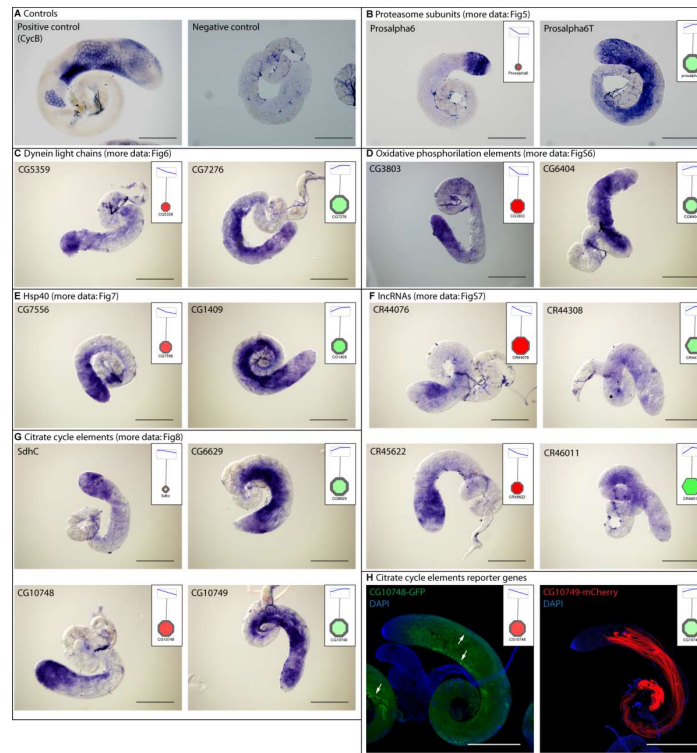
Az irányított fehérjelebontásnak fontos szerepe van nemcsak a mitózisban, de a meiózist követően is a megnyúlt 64 spermatida egyedivé válása során. Megvizsgálva az ubikvitin-proteaszóma rendszer ismert elemeit, megállapítottuk, hogy számos ismert E2-, az E3-enzim az irodalmi adatoknak megfelelő transzkript felhalmozódást mutat a késői stádiumokat reprezentáló bazális régióban. Az E2 enzimek közül 8 mutat magas transzkriptszintet a tesztiszben, többek között az ismert poszt-meiotikus funkcióval rendelkező dBruce, amely a CRL komplex tagja, az individualizáció során van fontos szerepe. Az E3 enzimekre sokkal

nagyobb variabilitás jellemző. Az ismert poszt-meiotikus funkcióval rendelkező E3 fehérjék késői transzkript felhalmozódást mutatnak és számos eddig nem jellemzett E3 esetében is késői funkció jósolható az adatokból.

A *Drosophila* tumorszupresszor *archipelago* (*ago*) egy F-box fehérjét kódol, amely szubsztrátspecifikusságot ad az SCF ubikvitin-ligáz komplexnek. Az Ago humán ortológját az FBW7 tumorszupresszor kódolja. Az Ago-nak központi szerepe van olyan folyamatokban is, mint például a sejtprolifерáció, sejt differenciálódás, vagy a hipoxia által indukált génexpresszió. Kísérleteinkben kimutattuk az Ago egy eddig ismeretlen szövetspecifikus szerepét a spermatidák differenciálódásában. Azonosítottuk az *ago* egy klasszikus mutánsát, amely szemletális és hímsteril. Az *ago* testisz-specifikus funkcióját a meiózist követő spermatidfejlődéshez kötöttük. Megállapítottuk, hogy az Ago a ciszták normális morfológiájának kialakításához, a mitokondriális struktúrák és az individualizáció szabályozásán keresztül járulhat hozzá.

Az általunk elvégzett transzkriptomikai vizsgálatokból azonosíthatók voltak a késői felhalmozódást mutató és egyben testisz-specifikus dezubikvitináló enzimek is. Az irodalomból már ismert volt a testisz-specifikus proteaszóma alegységek léte, de azok pontos lokalizációja és funkciója nem (Belote and Zhong 2009). RNS szekvenálással megállapítottuk, hogy a testisz-specifikus proteaszóma alegységek transzkriptjai a késői fejlődési stádiumokban lévő cisztákat tartalmazó bazális régióban vannak jelen, ami a poszt-meiotikus funkcióját feltételezi a testisz-specifikus proteaszómának (14. ábra). *In situ* hibridizációval és fluoreszcens transzgének segítségével a proteaszómák esetében és mitokondriális funkcióval rendelkező jelöltek esetében is megerősítettük az RNS szekvenálási adatokat, a stádiumokra jellemző RNS felhalmozódást (14, 15. ábra).

A testisz-specifikus proteaszóma alegységek transzkript felhalmozódása is a késői stádiumokat reprezentáló bazális régióra jellemző. A proteaszómák e késői stádiumokra jellemző funkciója konzervált magasabbrendűekben is, hiszen emlősökben azonosítottak egy PA200 fehérjével kapcsolódott katalitikus alegységekből felépülő testisz-specifikus proteaszómát, aminek a meiózist követően a hiper-acetilált hisztonok lebontásában van szerepe (Qian et al. 2013). *Drosophilában* a PA200 fehérje nem található meg, viszont génduplikáció eredményeként a 34 proteaszóma alegységet kódoló gének közül 12 génnek van testisz-specifikus paralógja, többnek akár kettő is. További vizsgálatainkkal tisztázni kívánjuk a testisz-specifikus proteaszóma összeszerelődését és annak funkcióját.



12. ábra A transzkriptomikai adatok validálása *in situ* hibridizációval és riportergének felhasználásával. (A) Pozitív kontroll (CycB) és negatív kontroll (kódoló szál specifikus próba) *in situ* hibridizációja testisz mintákon. **(B-G)** A különböző géncsoportok génjeinek transzkripteloszlása DIG-RNS *in situ* hibridizációval. A jobb felső sarokban a gének RNS-szekvenálás adatait mutatják Cytoscape programmal megjelenítve (piros szimbólum az apikális felhalmozódást, zöld szimbólum a bazális felhalmozódást mutatja). **(H)** A testisz-specifikus malát-dehidrogenázok, a CG10748-GFP és a CG10749-mCherry expressziós mintázata a testiszben. Nyíl: nebenkern. Mércé: 200 μ m

A spermium fejlődése szempontjából a flagellumot alkotó fontos fehérjék a sejtvázf fehérjék csoportjához tartoznak. Ide sorolhatjuk az aktin, tubulin, dinein géneket és az ezekhez kapcsolódó motorfehérjéket kódoló géneket is. Az adatok egyértelműen mutatják, hogy az axonémális külső és belső kart alkotó dineinek a bazális régióban halmozódnak fel, amikor az axonéma kialakulása történik. Nem minden tagja jellemzett ezeknek a fehérjecsaládoknak, de az elemzésünk segítségével azonosíthatók azok a jelöltek, amelyek szerepét a rohamosan fejlődő reverz genetikai eszköztárral közvetlenül is vizsgálni tudjuk (Vedelek et al. 2018). Elemzésünk során kitént, hogy a Hsp fehérjék különböző csoportjai eltérően halmozódnak fel az egyes régiókban. A Hsp60I-es géncsoport tagjai főleg a bazális régióban, míg a Hsp60II géncsoport tagjai az apikális régióban halmozódnak fel. A Hsp90, Hsp70 és Hsp40 család tagjai egyaránt tartalmaznak korai és késői stádiumokra specifikus tagokat, míg a S-Hsp család tagjai jellegzetesen bazális felhalmozódást mutatnak. Megerősíti ezt a megfigyelést az a tény is, hogy a Hsp67Bc fehérje az érett *Drosophila* spermium proteom részeként is azonosítva lett (Wasbrough et al. 2010). A Hsp fehérjék funkciójára vonatkozóan a spermatogenezis során

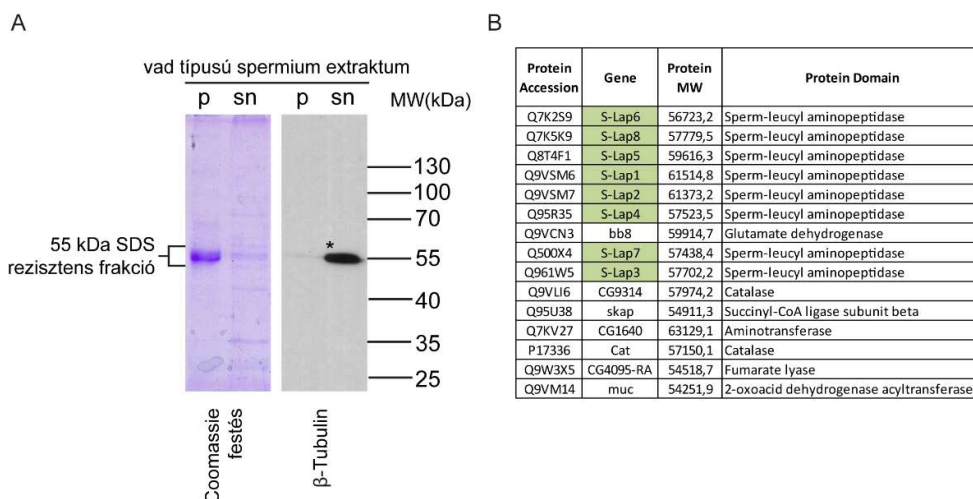
nincs sok adat, de a mennyiségükből ítélve jelentős szereppel bírhatnak (Nowicka-Bauer et al. 2018).

A mitokondriális fehérjék legtöbbje a kromoszómális genomban van kódolva és a fehérjék transzportfolyamatok segítségével jutnak be a mitokondriumba. A transzkriptomikai vizsgálatok alapján tudjuk, hogy a meiózist követően a mitokondriális enzimek tesztisz-specifikus paralógjai a spermatogenezis késői stádiumaiban halmozódnak fel, amikor a mitokondriumok egy jelentős strukturális és méretváltozáson mennek keresztül. A KEGG adatbázis felhasználásával a központi metabolizmust és a mitokondriális elektrontranszportlánc tagjait is azonosítottuk *Drosophila melanogaster*-ben (Goto et al. 1996). A Cytoscape programmal történő vizualizáció egyértelműen elkülönítette a tesztisz-specifikus kifejeződést mutatókat a szomatikus sejtekre jellemző transzkriptektól. Ezek az eredmények valószínűsítik, hogy a spermatidák specializált mitokondriumai egy tesztisz-specifikus enzimkészlettel valószínűsítják meg a specializált mitokondriális működést. Jó példák erre a glutamát dehidrogenázok, ahol a szomatikus sejtek a *gdh* gént expresszálnak, míg a tesztiszben a *gdh* mellett a *bb8* gén terméke látja el a poszt-meiotikus glutamát dehidrogenáz funkciót. A többi mitokondriális enzimnél is megfigyelhető egy tesztisz-specifikus retrogén (Irp-1A és a CG4706 páros, az MDH1, Mdh2, valamint a tesztisz-specifikus CG10748 és CG10749) jelenléte. Analízisünk a szomatikus malát-dehidrogenázok mellett, kettő tesztisz-specifikus gént is azonosított, egyiknek a korai, míg a másinak a késői stádiumokban mutattuk ki a felhalmozódását (*bb8* és *gdh*). A transzgének segítségével a mitokondriumokhoz lokalizáltuk a tesztisz-specifikus malát dehidrogenáz enzimeket. A CG10748-GFP a korai stádiumokban mutatott transzkript felhalmozódásnak megfelelően a meiózis előtti stádiumokban már a mitokondriumokhoz lokalizálódik, de a fehérje még a meiózist követően a nebenkernekekben is felhalmozódik, majd fokozatosan csökken a mennyisége, a megnyúlt mitokondriumokból pedig már hiányzik. A CG10749-mCh a korai stádiumokban nincs jelen, a poszt-meiotikus mitokondriumokhoz lokalizálódik, a transzkriptomikai adatokból kapott késői felhalmozódást alátámasztva és egyben megerősítve a poszt-meiotikus funkcióját a fehérjének (15. ábra). A citrát ciklushoz hasonlóan az elektron-transzportlánc és az oxidatív foszforiláció elemei is a bazális régióban felhalmozódó transzkriptekkel vannak reprezentálva (Vedelek et al. 2018a).

A spermatidák specializált mitokondriumainak felépítése és működése

Az összes sejtszervecske közül a mitokondriumok mennek át a legdrágább változáson a meiózist követően, hiszen nemcsak méretük változik meg, de a belső membránszerkezetük is átalakul, illetve a nagy mitokondrium származékban parakristályos anyag halmozódik fel. A parakristályos anyag gyakran előfordul a rovarok spermiumának mitokondrium származékaiban (5.ábra C) (Dallai 2014). Már az 1970-es évektől kezdődően ismert volt számos rovar spermiumának részletes szerkezete, ahol az elektronmikroszkópos vizsgálatok rámutattak, hogy a parakristályos anyag változatos módon szerveződhet a mitokondrium származékokban. Jelen lehet mind a kettő mitokondrium származékban (*Forficula auricularia*, *Pyrrochoris apterus*, *Notonecta glauca*) vagy csak az egyikben (*Drosophila melanogaster*, *Ceratitis capitata*) (Dallai 2014) (5.ábra C). Ezen példák alapján is érdekesnek találtuk a spermatidák mitokondriumában jelen lévő parakristályos szerkezetű anyag kialakulásának és összetételének részletes vizsgálata.

A spermiumokban található parakristályos anyagot felépítő molekulákra vonatkozóan pontos információk nem voltak elérhetők. Mivel a *Drosophila melanogaster* spermiumában a nagy mitokondrium származék egy jelentős részét tölti ki a parakristályos anyag, ezért célunk volt a molekuláris összetevőinek a meghatározása. A hátonúszó poloska spermiumának vizsgálata rámutatott, hogy a parakristályos anyag rezisztens az SDS kezelésnek (Baccetti et al. 1977). Az elektronmikroszkópos metszeteken 1%-os SDS kezeléssel a fehérjék nagy része kioldódott a spermium metszetekből, az axonémát alkotó fehérjéket is beleértve, de a mitokondriális parakristallin anyag a kezelés után is jelen volt. Ennek a módszernek az adaptálásával tisztítottuk a parakristályos anyagot a szeminális vezikulumból nyert érett *Drosophila* spermiumokból. A fehérjéket akrilamid gél elektroforézissel szeparáltuk és megállapítottuk, hogy az SDS rezisztens frakcióban az 50-60 kDa-os molekulásúly tartományban jelentős mennyiségű fehérje halmozódik fel. Tömegspektrometriai elemzéssel megállapítottuk az 50-60 kDa-os tartomány fehérje összetételét mind az SDS rezisztens, mind a SDS szolubilis fehérjefrakcióban (Laurinyecz et al. 2019). Ezzel a módszerrel 15 fehérjét azonosítottunk, amelyek az SDS rezisztens frakcióban voltak megtalálhatók (16. ábra).

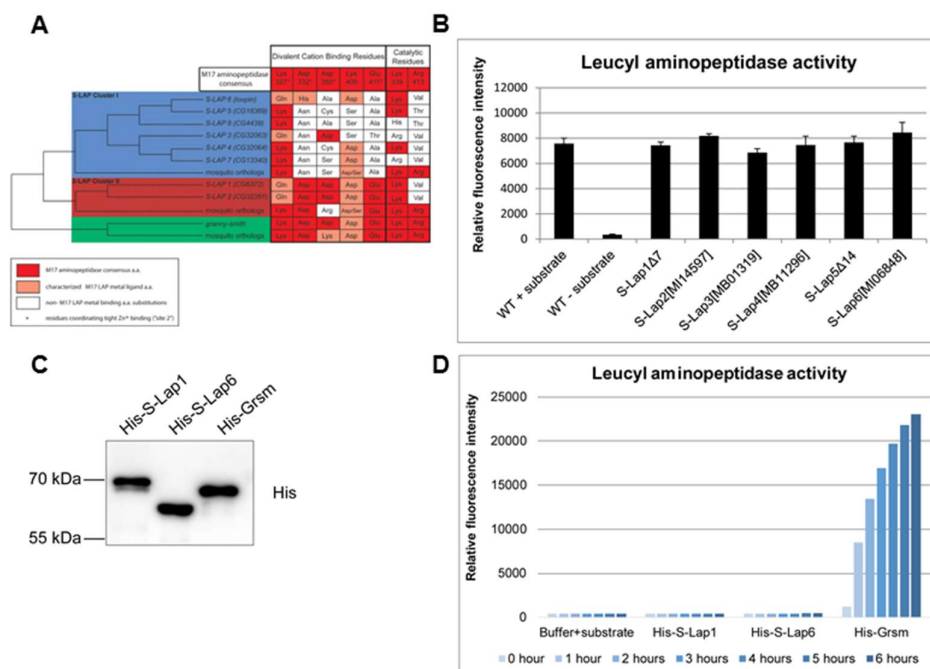


13. ábra A vad típusú spermium SDS-rezisztens frakciójának vizsgálata. (A) SDS-rezisztens pellet frakció (p) és SDS-oldható felülúszó (sn) vizsgálata Coomassie Brilliant Blue festett poliakrilamid gélen valamint immunobloton. *A β -Tubulin főként a lizátum SDS által denaturált fehérjéket tartalmazó felülúszó frakciójában van jelen (anti- β -Tubulin ellenanyag) **(B)** A spermium lizátum SDS-rezisztens pellet 50-60 kDa-os frakciójának tömegspektrometriás elemzése. Az azonosított fehérjék listájában zöld színnel kiemelték a Spermium-Leucin aminopeptidáz fehérjecsalc tagjai.

Közülük 8 fehérje a tesztisz-specifikus Spermium-Leucin-aminopeptidáz (S-Lap) családkhoz tartozott. Kiugróan nagy peptidszámmal mind a 8 tagja az S-Lap fehérjecsalcnak azonosítva lett. Az S-Lap fehérjecsalcán kívül a *CG9314*, *CG4095*, *Bb8* és a *Skap* fehérjék is jelen voltak az SDS rezisztens frakcióban és tudjuk a transzkriptomikai és proteomikai adatokból, hogy ezek a géntermékek is tesztisz-specifikusak. Az S-Lap családk tagjai, a *CG9314*, *CG4095* és a *Bb8* fehérjék a spermium proteom alkotórészeként is azonosítva lettek (Wasbrough et al. 2010). Az S-Lap fehérjecsalc a *Drosophila melanogaster* spermium proteome egyik legnagyobb mennyiségben jelen lévő fehérjecsalcja, 2:1 arányban található meg az axonémát alkotó tubulinnal összehasonlítva (Dorus et al. 2011). Ez tovább erősítette azt a hipotézisünket, hogy egy fontos, akár strukturális szereppel rendelkező fehérjecsalc tagjai lehetnek az S-Lap fehérjék (Laurinyecz et al. 2019). A genetikai jellemzéshez az S-Lap gének klasszikus vagy RNS interferenciával csendesített mutánsait használtuk fel. Az S-Lap fehérjék egyenkénti hiánya hímsterilitást eredményezett. Megállapítottuk, hogy az *S-Lap1^{d7}* mutáns esetében haploelégtelenség is megfigyelhető. Az S-Lap mutánsokban a spermatogenezis normálisan elindul, a meiózis is zavartalanul lejátsszódik, a magok és a ciszták teljes hosszukban megnyúlnak. A mitokondriumok vizsgálata már fénymikroszkóppal is több rendellenességet feltárt. Bár a meiózist követően a mitokondrium származékok kialakulnak és azok megnyúlnak, a mitokondriális markerek, mint a Dj-GFP vagy Mitotracker abnormális eloszlást mutatnak. A

megnyúlt ciszták belső struktúráját transzmissziós elektronmikroszkópia segítségével tanulmányoztuk alaposabban. A keresztmetszeti felvételek alapján megállapítottuk, hogy az S-Lap mutánsokban az axonéma szabályos felépítésű és bár a mitokondrium származékok kialakulnak, a nagy mitokondrium származékban a parakristályos anyag nem szerveződik össze szabályos struktúrává, diffúzan van jelen. Az S-Lap mutánsokra jellemző parakristályos anyag hibája a hosszmetsetek vizsgálatával is megerősítést nyert (Laurinyecz et al. 2019) (18. ábra A-F). Az S-Lap fehérjék szekvenciájának vizsgálata kiderítette, hogy minden S-Lap fehérje tartalmaz egy potenciális mitokondriális lokalizációs szignálszekvenciát. Az S-Lap1 és S-Lap6 esetében a prediktált lokalizációs szignált tartalmazó első 60 aminosavat összeépítettük egy GFP fehérjével és a saját 5' szabályozó régió felhasználásával követtük a fluoreszcens fehérje lokalizációját a tesztiszekben. Mindkét esetben a GFP jel a poszt-meiotikus mitokondriumokban volt megfigyelhető, ami megerősítette az S-Lap fehérjék mitokondriális lokalizációját. Az S-Lap kettős mutánsok domináns genetikai interakciót mutatnak, már heterozigóta formában is jelentősen csökkent fertilitás jellemzi őket. Ez arra utal, hogy az S-Lap fehérjék mennyiségére érzékeny a spermatogenezis folyamata, valamint hogy az S-Lap fehérjék valószínűleg a spermiumfejlődés ugyanazon részében játszhatnak szerepet. Az S-Lap fehérjék és az M17 leucin-aminopeptidáz fehérjék filogenetikai analízise, valamint a funkcionális domének összehasonlítása azt jósolta, hogy bár az M17 leucin-aminopeptidáz családdal mutatnak rokonságot, a bennük található katalitikus és kétértékű kationkötő helyeken található kulcsfontosságú aminosavak nem konzerváltak (17. ábra A), ami felvetette az enzimatisz aktivitás elvesztésének lehetőségét. Az L-Leu-AMC szintetikus szubsztrát segítségével megmértük az S-Lap mutánsokból izolált tesztiszekben az aminopeptidáz aktivitást. Azt tapasztaltuk, hogy a mutánsokban nem változott meg szignifikánsan az összes leucin-aminopeptidáz aktivitás a vad típushoz viszonyítva. Ez valószínűsíti, hogy az S-Lap fehérjék valóban enzimatisz inaktívak. További bizonyítékként baktériumban is megtermeltettük és egyenlő mennyiségben tisztítottuk mind a szomatikus sejtekre jellemző Grsm leucin-aminopeptidáz fehérjét, mind az S-Lap fehérjék közül az S-Lap1 és S-Lap6 fehérjét. A szintetikus szubsztrát jelenlétében csak a Grsm-nek volt enzimatisz aktivitása, mind az S-Lap1, mind az S-Lap6 inaktív volt. Ezek az eredmények tovább erősítették azt a feltevésünket, hogy az S-Lap fehérjék az evolúció során elveszítették enzimatisz aktivitásukat és egy szerkezeti szerepet tölthetnek be a parakristályos anyag kialakításában (17. ábra B-D). Az S-Lap mutánsok jellemzése során menekítési kísérleteket is végeztünk, ahol vad típusú transzgénekkel menekítettük a mutánsokat. Azt tapasztaltuk, hogy az S-Lap1 transzgén kizárólag az *S-Lap1*⁴⁷ mutánt tudta menekíteni, nem volt képes a többi mutáns fertilitásának

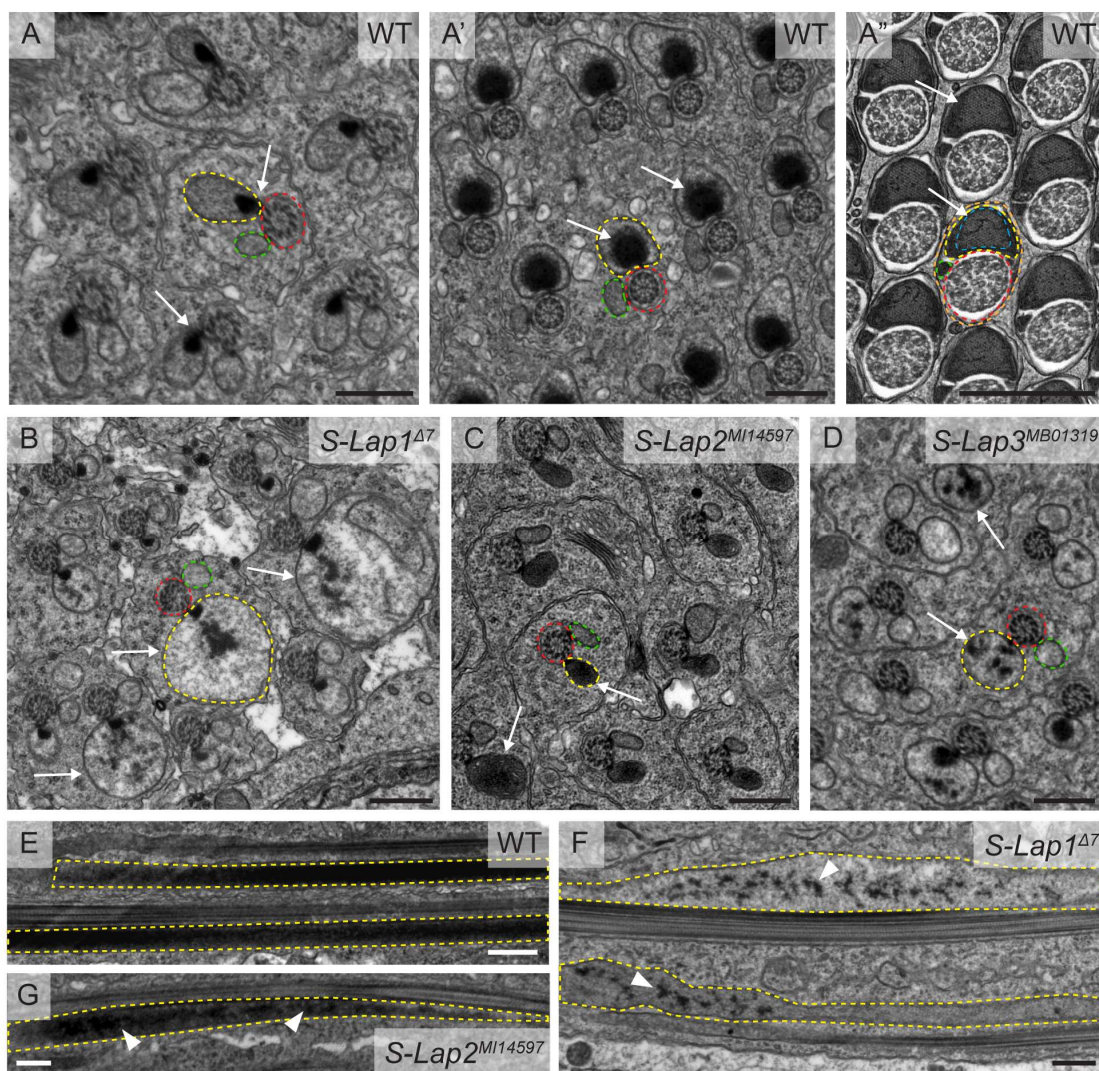
visszaállítására, hasonlóan az S-Lap6 transzgenhez. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az S-Lap fehérjék nem redundánsak, minden S-Lap fehérjére szükség van a normális spermiumképződéshez.



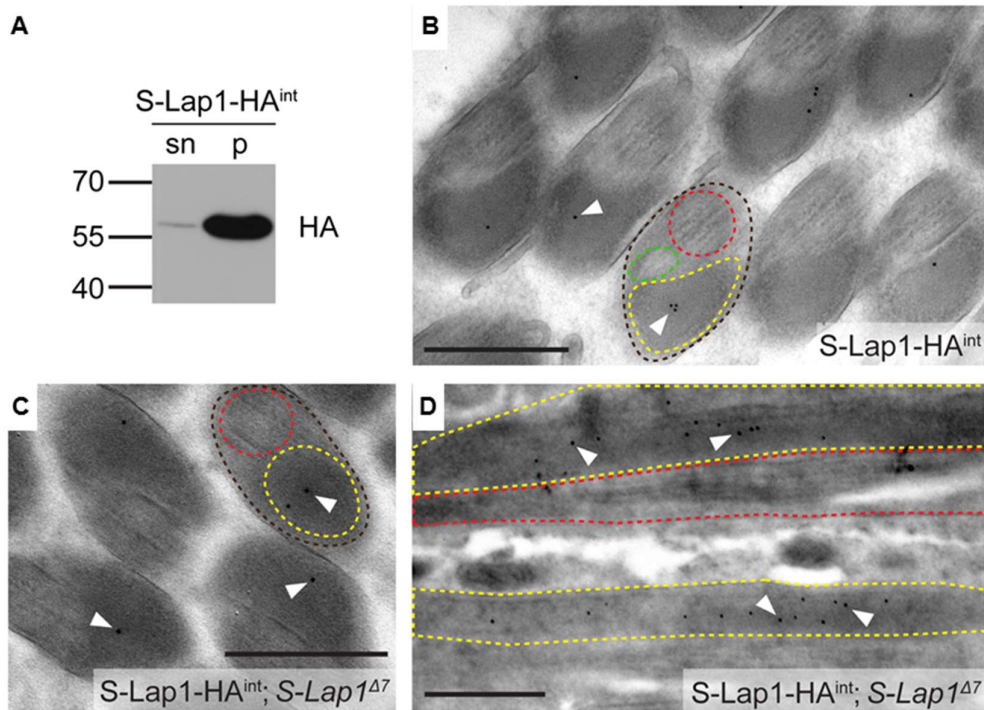
14. ábra Az S-LAP fehérjék enzimatisz aktivitásának vizsgálata. (A) Az M17 típusú leucin-aminopeptidázokban a kétértékű kationok kötésében résztvevő és a katalitikus aktivitásért felelős konzervált aminosavak a LAP típusú fehérjék filogenetikai távolságával ábrázolva. A kationkötő helyek esetében az M17 leucin-aminopeptidáz konszenzussal megegyező aminosavak pirossal vannak kiemelve, az M17 leucin-aminopeptidázok egyéb fémkötő aminosavainak helyettesítését rózsaszínnel, a nem M17 leucin-aminopeptidázok fémkötő aminosavainak helyén lévő aminosavakat fehérrel jelöltük (Dorus et al. 2011 alapján). (B) A homozigóta S-Lap mutánsok tesztiszeiből mért leucin-aminopeptidáz aktivitás. A relatív fluoreszcencia-intenzitás a fluoreszcens szubsztát L-Leu-AMC hozzáadása után mértük. Az S-Lap mutánsokban nem figyelhető meg az aminopeptidáz-aktivitás szignifikáns csökkenése a vad típushoz (WT) hasonlítva. A hibaszávok az átlagot $\pm$ s.e.m. jelzik. $n=3$. (C) Baktériumban expresszálatott His S-Lap1, His-S-Lap6, His-Grsm fehérje ellenőrzése Western blottal, anti-His ellenanyag használatával. (D) A His-S-Lap1, His-S-Lap6 és His-Grsm rekombináns fehérjék azonos mennyiségét vizsgáltuk a leucin-aminopeptidáz-tesztben a fluoreszcens szubsztát L-Leu-AMC relatív fluoreszcencia-intenzitásának mérésével. A His-S-Lap1, His-S-Lap6 fehérjék enzimatisz inaktívnak bizonyultak, míg a His-Grsm fehérjének volt enzimatisz aktivitása.

Az S-Lap fehérjék sejten belüli pontos lokalizációjának megállapítására az S-Lap1 ellen termeltetett ellenanyagot használtunk. Az S-Lap fehérjék nagyfokú hasonlóságának köszönhetően nem tudtunk olyan fehérje szakaszt kiválasztani a rekombináns fehérje termeléshez, ami kizárólag az S-Lap1 fehérjére specifikus, így a teljes hosszúságú fehérje ellen

termeltettük az ellenanyagot, annak a tudatában, hogy az ellenanyag a többi S-Lap fehérjét is azonosíthatja.



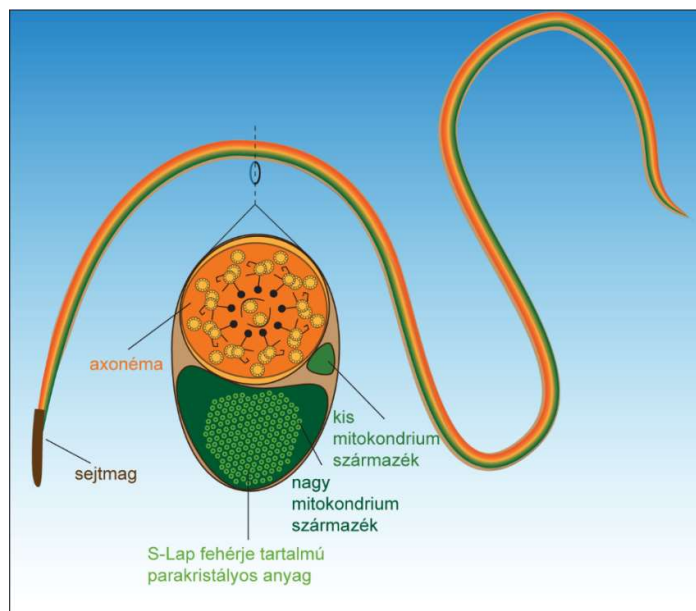
15. ábra Parakristályos anyag képződésének hibái az S-Lap mutánsokban transzmissziós elektronmikroszkópiával vizsgálva. (A) A vad típusú spermatidák mitokondrium származékai szinkronizált fejlődést mutatnak a megnyúló cisztákban. Az axonéma (piros szaggatott vonal) és a nagy mitokondrium származék (sárga szaggatott vonal) találkozásánál kezd kialakulni a parakristályos anyag (nyilak A-ban), majd a növekvő mitokondriumokban egybefüggő sűrű anyagként halmozódik fel (nyilak A'-ban), végül az individualizáció végére szabályos elrendezésű struktúrában tölti ki a nagy mitokondrium származék belső terét (nyilak A''-ban), míg a kis mitokondrium származék (zöld szaggatott vonal) visszafejlődik (A''). **(B-E)** Az S-Lap mutánsok (*S-Lap1 Δ 7*, *S-Lap2^{M114597}*, *S-Lap3^{MB01319}*) szinkronizálatlan mitokondriumfejlődést mutatnak, strukturálatlan parakristályos anyag jelenlétével a nagy mitokondrium származékban (nyilak B, C, D, E). Mércé: 0,5 μ m. **(E-G)** Vad típusú (F), *S-Lap1 Δ 7* (G) és *S-Lap2^{M114597}* (H) mutáns testiszekmegnyúlt spermatidáinak hosszsz metszeti képe. A parakristályos anyag tömör és egységes a fő mitokondrium származékban belül (sárga szaggatott vonal) a vad típusban (F), de az S-Lap mutánsokban strukturálatlan szerkezetben van jelen (G, H, nyílhegyek). Mércé: 0,5 μ m.



16. ábra A parakristályos anyag jellemzése és lokalizálása az S-Lap1-HA^{int} transzgenikus törzs felhasználásával. (A) Immunoblot a S-Lap1-HA^{int} transzgenikus vonal spermium lizátumaiból anti-HA ellenanyag felhasználásával, SDS-oldható felülúszó (sn) és SDS-rezisztens pellet (p) frakciókból. Az S-Lap1-HA^{int} főként a spermium lizátum SDS-rezisztens, oldhatatlan frakciójában van jelen. (B, C, D) A transzgenikus S-Lap1-HA^{int} megnyúlt spermatidák (barna szaggatott vonal) keresztmetszeti képen (B) és hosszsmetszeti (D) képen vad típusú (B) és S-Lap1^{Δ7} mutáns (C, D) háttéren az immuno-elektronmikroszkópos felvétel megmutatja az S-Lap1-HA^{int} fehérje előfordulását (fekete pontok, nyílhegyek) a nagy mitokondrium származékon belül (sárga szaggatott vonal). A HA ellenanyag arany részecskékel volt megjelölve. Az axonéma (piros szaggatott vonal) és a kis mitokondrium származék (zöld szaggatott vonal) szintén látható. Mércé: 0,5 μm.

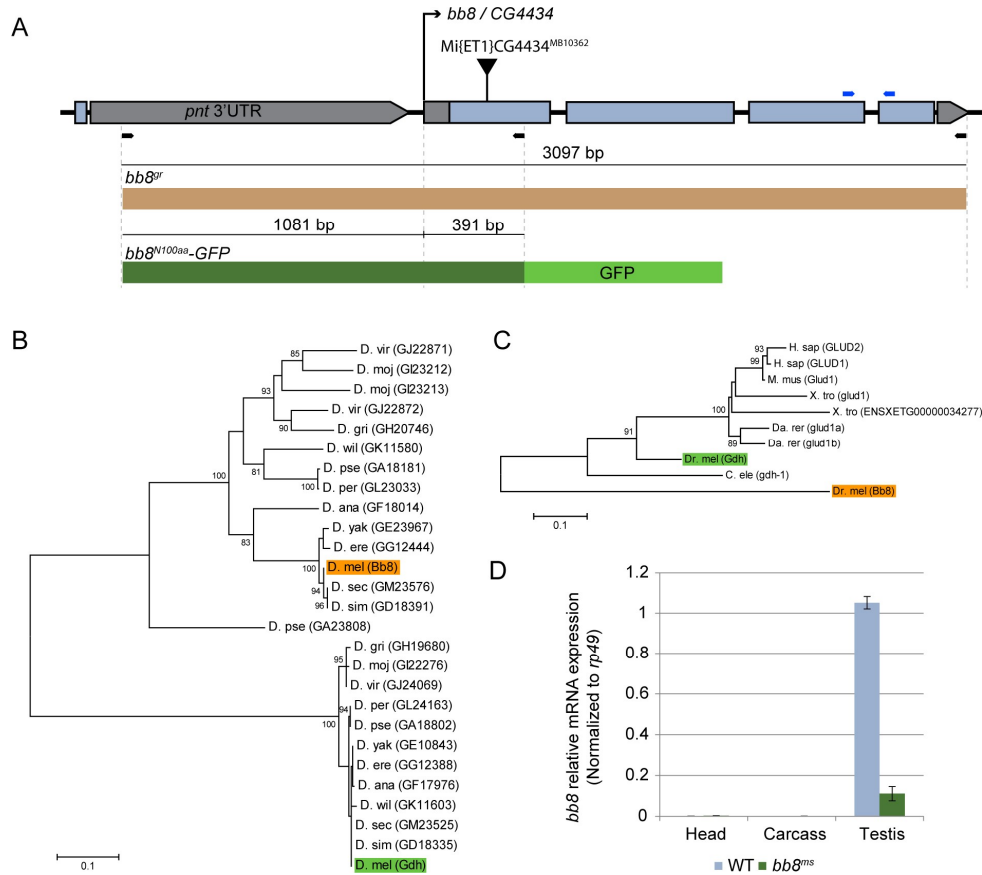
Az S-Lap1 ellenanyag segítségével az S-Lap1 fehérjét a poszt-meiotikus mitokondriumokhoz lokalizáltuk fluoreszcens mikroszkópiával. A lokalizációt tovább pontosítottuk immuno-gold jelöléssel, ahol az S-Lap1 fehérjét a megnyúlt nagy mitokondrium származék parakristályos anyagot is tartalmazó struktúrájához lokalizáltuk. A vad típusú spermium extraktum vizsgálatával az SDS rezisztens pellet frakcióban mutattuk ki az S-Lap1 fehérjét az ellenanyaggal. Annak érdekében, hogy kizárólag az S-Lap1 fehérjét tudjuk nyomon követni, mind vad típusú, mind mutáns háttéren, készítettünk egy hemagglutininnel (HA) fuzionált S-Lap1 transzgent, ahol az S-Lap1 gén saját szabályozó régióját használtuk (S-Lap1^{intHA}). A borjú Lap fehérjék térszerkezeti modelljére illesztve egy olyan felszínhez illesztettük a HA-t ahol az valószínűleg a fehérje szerkezetét nem befolyásolja, hiszen tudtuk, hogy a C-terminális fúziók

nem eredményeztek funkcionális fehérjét. Az S-Lap1^{intHA} transzgén képes volt az *S-Lap1*^{Δ7} mutáns menekítésére, a HA jelző fehérje a parakristályos anyagot tartalmazó SDS rezisztens pellet frakcióban halmozódott fel, így a transzgén funkcionalitása bizonyítást nyert. Mind fluoreszcens-, mind elektronmikroszkópiával a mitokondriumhoz és azon belül is a parakristályos anyaghoz lokalizáltuk az S-Lap1 fehérjét (19. ábra A-D). Megvizsgáltuk az S-Lap1^{intHA} transzgén lokalizációját az S-Lap mutáns háttereken és megállapítottuk, hogy képes minden esetben a mitokondriumba bejutni, de a hímsteril fenotípust csak az *S-Lap1*^{Δ7} mutáns esetében volt képes menekíteni. Ez arra engedett következtetni bennünket, hogy a fehérjék nem tudják egymást helyettesíteni. A biokémiai frakcionálás során is az S-Lap1^{intHA} feldúsulását kizárólag az S-Lap1^{Δ7} háttéren voltunk képesek kimutatni, a parakriszallin anyagot tartalmazó pellet frakcióban. Ez további bizonyítékul szolgált arra vonatkozólag, hogy az S-Lap fehérjék nem redundánsak, azok egyedi jelenléte szükséges a parakristályos anyag megfelelő kialakításához és ez a funkciójuk elengedhetetlen a normális fertilitáshoz (20. ábra).



17. ábra A *Drosophila* spermium sematikus rajza a keresztmetszeti képpel. Az axonéma mellett található nagy mitokondrium származékot kitöltő parakristályos anyag fő alkotóeleme az S-lap fehérjecsalád tagai

A térszerkezeti modell alapján feltételezzük, hogy az egyes S-Lapok által alkotott hexamerek összeépülnek és ezek alkotják a fő vázát a parakristályos anyagnak. Érdekes megjegyezni, hogy a tömegspektrometriai analízis a Bb8 glutamát-dehidrogenázt is azonosította, ami szintén képes hexamer kialakításra.



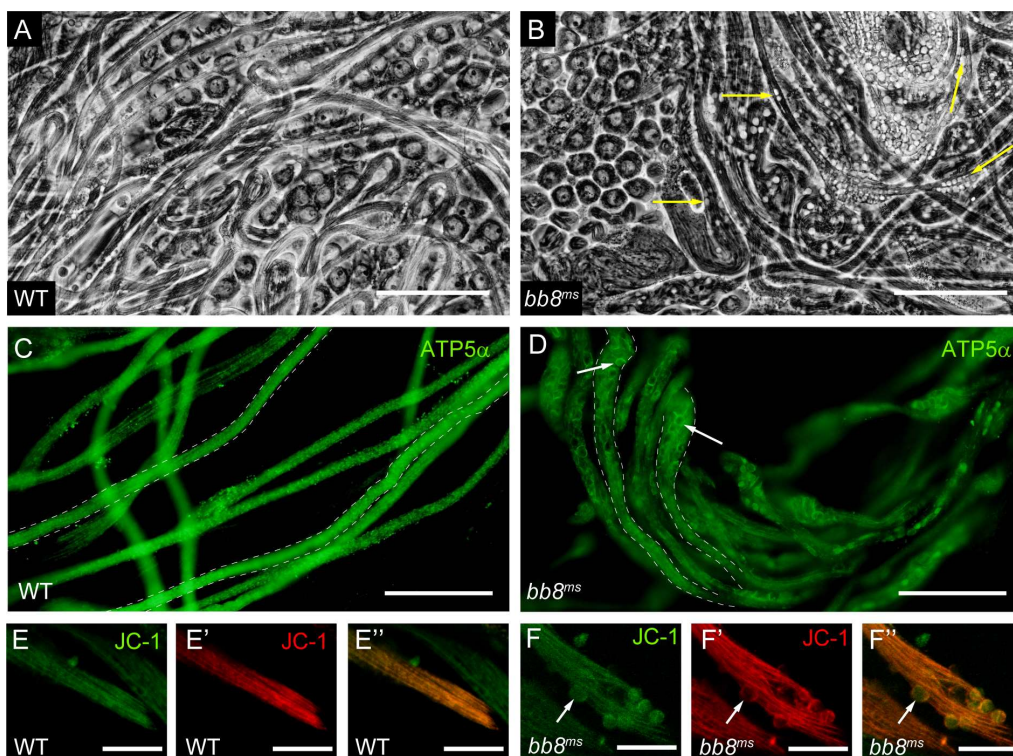
18. ábra A Bb8 tesztisz-specifikus glutamát-dehidrogenáz jellemzése. (A) A *bb8* lókuszt genomi környezete és a Mi{ET1} CG4434^{MB10362} transzpozon inszerciója a *bb8* génben. A vastag szürke sávok az UTR szekvenciákat, a vastag kék sávok a kódoló szekvenciákat, a vékony fekete sávok pedig az intronikus és nem kódoló régiókat jelölik. A génszerkezet alatt a genomi menekítő konstrukciót (*bb8^{sr}*) barna sáv és a GFP riporterkonstrukciót (*bb8^{N100aa}-GFP*) előállításához használt genomi régiót sötétzöld sáv mutatja. A nyílak a transzgének klónozásához (fekete) és a q-RT-PCR-hez (kék) használt primerpárokat nyilak jelzik. **(B-C)** Filogenetika összehasonlítása Bb8 típusú fehérjéknek a *Drosophila* fajokban **(B)** és magasabbrendűekben **(C)**. Maximum-likelihood **(B, C)** módszert használtunk fehérje szekvenciák filogenetika analíziséhez és a genetikai távolság megállapításához. Az un. bootstrap-értékek a megfelelő csomópontok mellett vannak feltüntetve. **(D)** A *bb8* mRNS expressziója a tesztiszre korlátozódik, és erős csökkenést mutat a *bb8^{ms}* mutáns tesztiszekben. A relatív *bb8* expressziót q-RT-PCR segítségével mértük vad típusból (WT) és *bb8^{ms}* mutánsból izolált fej-, test- és tesztisz mintákból *bb8* és *rp49* specifikus primereket használva. A méréseket háromszor ismételtük és referenciagénként az *rp49*-et használtuk.

Feltehetően az S-Lap fehérjék alkotó vázhoz kapcsolódik a többi parakristályos anyagot alkotó fehérje, de ennek pontos modellezése, illetve kísérletes bizonyítása még a jövő kutatásainak feladata. Emlős spermiumokban is kimutatták a Lap fehérje jelenlétét, de annak pontos szerepe nem ismert (Dorus et al. 2010; Skerget et al. 2013). Az emlős spermiumokban a

mitokondriumok a nyaki részben szerveződnek össze, de bennük parakristályos anyag nem halmozódik fel.

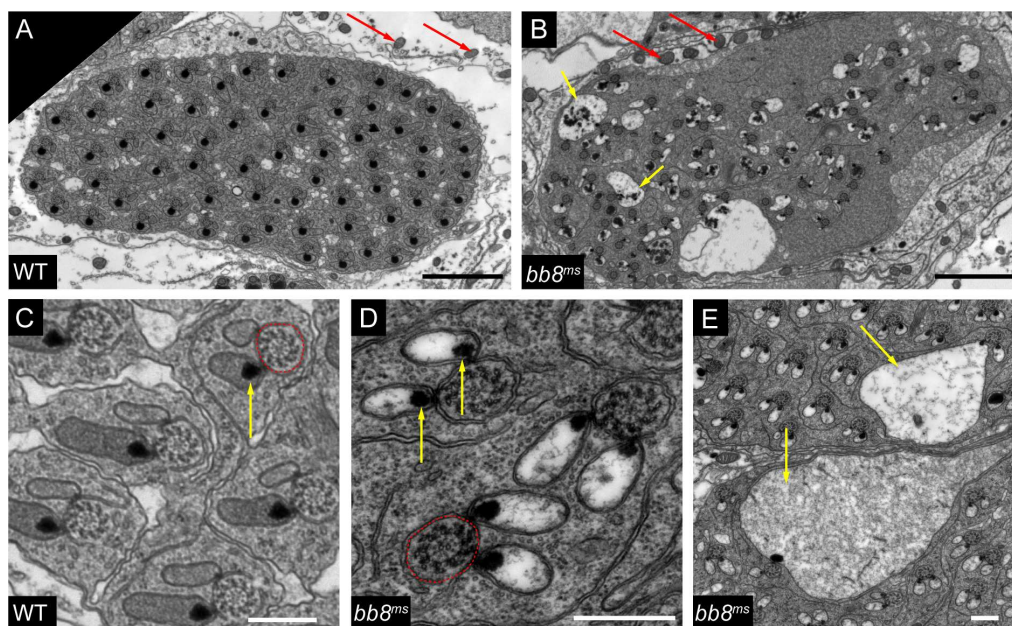
Egyre több eredmény támasztja alá, hogy egyes sejtvez fehérjék és globuláris fehérjék is képesek filament képzésre, ahol szabályozó hatása lehet a filament struktúrájának az enzimek aktivitására. Részletesen a citoplazmatikus CTP-szintáz enzimet vizsgálták, ami képes un. citoophydium képzésére baktériumoktól az élesztőn át *Drosophiláig* (Aughey and Liu 2016; Shen et al. 2016; Liu 2010). A CTP-szintáz alkotta filament az enzimaktivitás szabályozásán túl egy vázat, állványzatot is biztosíthat biokémiai folyamatokhoz. Egyre több anyagcsere enzimről bizonyosodik be, hogy képes filamentképzésre, többek között az élesztő és az emlős glutamát-dehidrogenázról is kimutatták. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a tesztisz-specifikus Bb8 glutamát dehidrogenáz is képes lehet filament képzésre és ezzel közvetlenül hozzájárulhat a parakristályos anyag kialakításához a *Drosophila* spemiumok mitokondriumaiban.

A transzkriptomikai adatokból és a klasszikus genetikai adatokból is tudtuk, hogy a tesztisz-specifikus glutamát-dehidrogenáz is a késői stádiumokban játszhat fontos szerepet. A *Drosophila melanogasterben* a glutamát dehidrogenázokat a *gdh* és a *CG4434 (bb8)* gének kódolják (21. ábra). Evolúcionárisan konzerváltak, a glutamát alfa-keto-glutarát átalakulást katalizálják.



19. ábra A *bb8^{ms}* mutáns testiszekben a poszt-meiotikus, megnyúlt spermatidák hibásan fejlődnek. (A-B) A vad (WT) (A) és a *bb8^{ms}* (B) testiszekben a ciszták megnyúlása elindul, de a *bb8^{ms}* cisztákban és a ciszták között nagy vezikulák figyelhetők meg (nyilak) fáziskontraszt mikroszkópiával. Mércé: 100 μ m. (C, D) ATP5 α antitesttel festett megnyúlt spermatidák mitokondriumai (C) vad típusban és *bb8^{ms}* (D) mutánsokban. A cisztákban lévő nagyméretű vezikulák mitokondriális mivoltát az ATP5 α pozitív festődés jelzi (nyíl). Mércé: 50 μ m. (E, F) A mitokondriális JC-1 festéssel nem tapasztalunk mitokondrium megnagyobbodást (E) a vad típusban, de a (F) *bb8^{ms}* testiszekben nagyméretű mitokondriális struktúrák vannak jelen (nyilak). Mércé: 25 μ m.

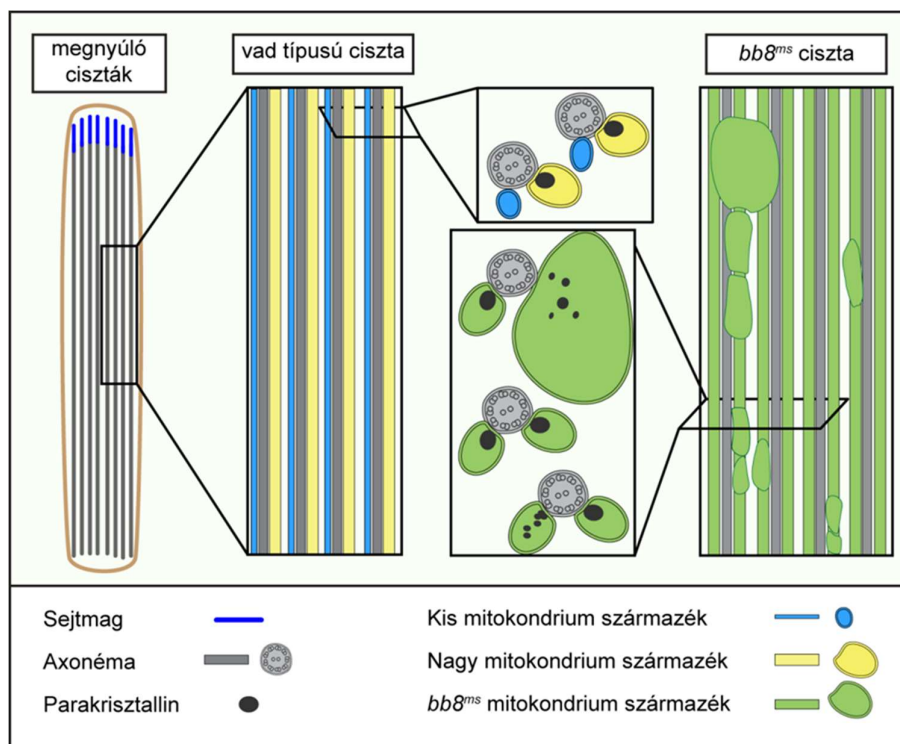
A klasszikus *bb8^{ms}* mutáns hímsterilitást mutat, ahol a spermatogenezis az individualizáció során áll le. Kimutattuk, hogy a fehérje a mitokondriumhoz lokalizálódik. Részletes morfológiai elemzéssel a poszt-meiotikus mitokondriumokban több hibát is felfedeztünk. Megfigyelhető a megnyúlás hibája és megamitokondriumok képződése, amely a ciszták teljes hosszára kiterjed, valamint a parakristályos anyag hibás felhalmozódása mind a kettő mitokondrium származékban (22, 23. ábra). A mitokondriális glutamát-dehidrogenázok (GLUD-ok) az L-glutamát alfa-ketoglutaráttá történő reverzibilis reakciójának központi katalitikus enzimeit, amelyek NAD(P)⁺ és/vagy NAD(P)H⁺ koenzimeket használnak (Mastorodemos et al. 2005). Az irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a megemelkedett glutamát szint megamitokondrium képződést indukál tenyésztett *Drosophila* sejtekben (Shim et al. 2009).



20. ábra Rendellenes parakristályos anyag képződés a *bb8^{ms}* mutánsokban. (A-B) Transzmissziós elektronmikroszkópos keresztmetszeti felvételek (A) vad típusú (WT) és (B) *bb8^{ms}* mutánsok testiszeiről. A szomatikus mitokondriumokat piros nyíl jelzi (A, B). A WT preindividualizált cisztákban (A, C) minden spermatidának (C) két mitokondrium származéka van, a nagy származékban parakristályos (sárga nyíl) és egy axonéma (piros vonal). (B, F) *bb8^{ms}* preindividualizált spermatidák elvesztették szinkronizált fejlődésüket, a mitokondrium származékban lévő parakristályos anyag

gyakran fragmentálódott (sárga nyíl). A (B, E, F) *bb8^{ms}* cisztákban számos megnagyobbodott mitokondrium származék található (sárga nyilak és sárga vonal). A *bb8^{ms}* cisztában mindkét mitokondrium származékban elkezd a parakristályos anyag felhalmozódni (D-F) (sárga nyíl). Mércse: 2 μm (A, B, F) 0,5 μm (C-E).

A *bb8^{ms}* mutánsban a megemelkedett glutamát szintet biokémiaailag is kimutattuk és megállapítottuk, hogy az okozhatja a megamitokondrium képződését (27. ábra). A *bb8^{ms}* mutánsban mind a kettő mitokondrium származékban elkezdődik a parakristályos anyag felhalmozódása, de egyikben sem szerveződik össze szabályos kristállyá. Az eredményeink egyértelműen azt sugallják, hogy a glutamát/glutamin bioszintézis fontos a parakristályos anyag kialakulásának iniciációjában vagy annak gátlásában. A *bb8^{ms}* mutánsban a Bb8 fehérje hiánya beindíthatja a parakristályos anyag kialakulását a kis mitokondrium származékban, feltehetőleg a megemelkedett glutamát szinten keresztül, ami felveti annak a lehetőségét, hogy vad típusban a Bb8 terméke gátolhatja ott a parakristályos anyag kialakulását. Ugyanakkor a *bb8^{ms}* mutánsban a parakristályos anyag mindkét mitokondrium származékban megfigyelhető, ami azt jelzi, hogy a parakristályos anyag további alkotórészei bizonyos mértékig bejutnak mindkét mitokondrium származékba, de ott nem képesek összeszerelődni szabályos szerkezetté (24. ábra). Ez több lehetőséget is felvet a Bb8 funkciójára vonatkozóan.

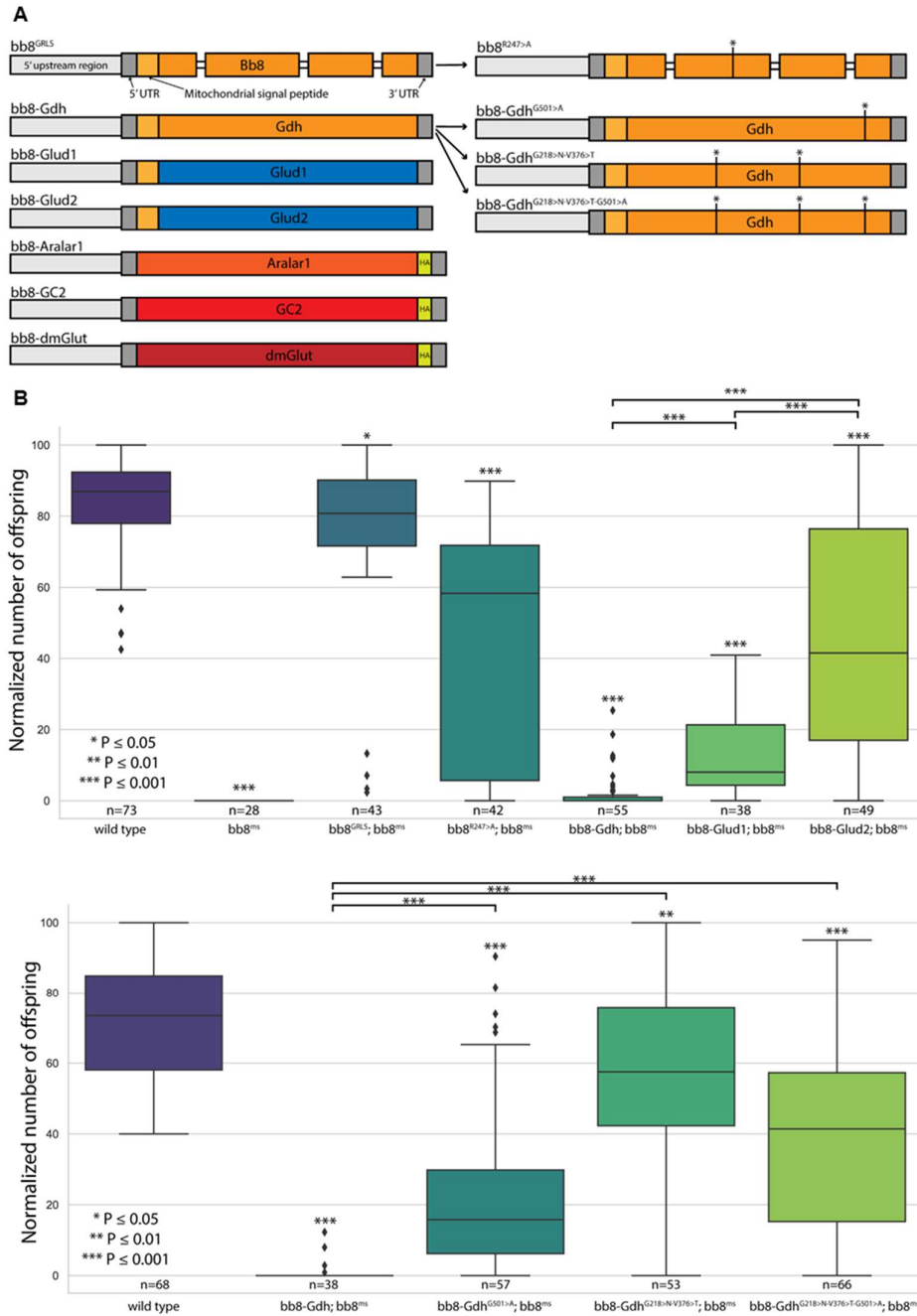


21. ábra A *bb8^{ms}* mutánsok mitokondrium fenotípusai. A vad típusú a spermátidákban a nagy mitokondrium származékban történik meg a parakristályos anyag felhalmozódása a ciszták megnyúlását

követően. A *bb8^{ms}* mutánsban mind a mitokondrium származékok differenciációja, a parakristályos anyag felhalmozódása sérült és jellemző a megamitokondriumok képződése.

Elképzelhető, hogy a Bb8 enzim által katalizált reakció terméke vagy annak hiánya okozza a mitokondrium származékok differenciálódásának zavarát; illetve az is elképzelhető, hogy a Bb8-nak két független feladata lehet, egyrészt a mitokondrium származékok definiálása, másrészt hozzájárulhat a parakristályos anyag szerkezetének kialakításához. Ez utóbbi modellt támogatja, hogy a Bb8 fehérje térszerkezete nagyon hasonlatos a magasabbrendűekben is megtalálható glutamát-dehidrogenázokhoz. Elképzelhető, hogy az enzimatis funkción túl, a Bb8 egy szerkezeti funkciót is betölt a parakristályos anyag kialakításában, de ennek részletei még nem ismertek.

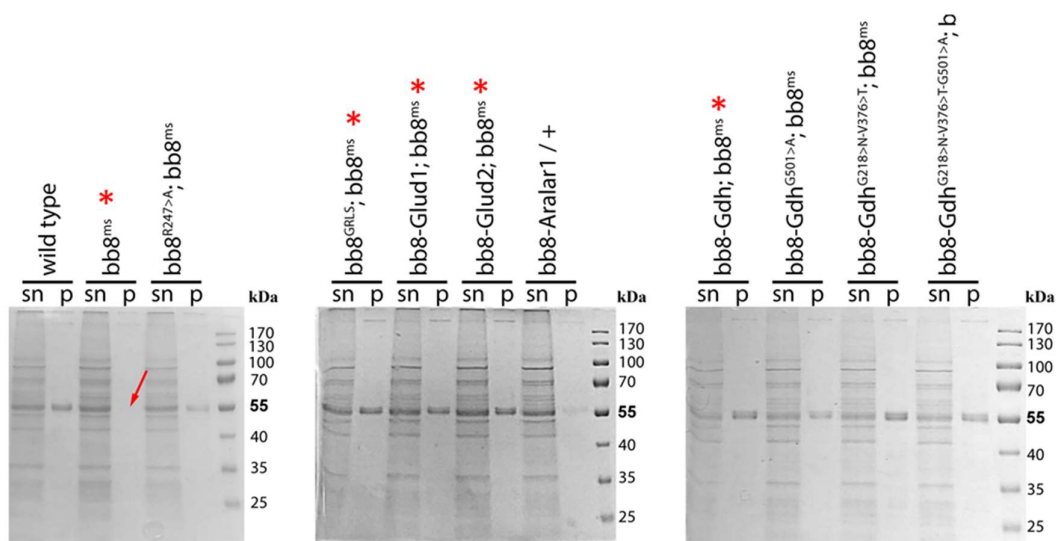
A tesztisz specifikus gének kevésbé konzerváltak, és többre jellemző a neofunkcionalizáció, mint azt láttuk az Slap fehérjék esetében is, így szükségesnek éreztük a Bb8 fehérje enzimatis aktivitásának részletesebb vizsgálatát. A glutámszint mérésével kimutattuk, hogy a Bb8 null mutánsban a glutamát szint megemelkedik, amit a vad típusú genomi transzgénnel menekíteni tudtunk, ami egyértelműen bizonyította, hogy a Bb8 enzimatisan aktív, tehát glutamát-dehidrogenáz aktivitással rendelkezik (27. ábra). Megállapítottuk, hogy bár a háztartási Gdh, és a tesztisz specifikus Bb8 fehérjék között jelentős szerkezeti különbségek vannak, mindkettő enzimatisan aktív.



22. ábra A glutamát-dehidrogenázok enzimatis és szerkezeti tulajdonságainak vizsgálatára létrehozott transzgenek és azok tesztelése. (A) A glutamát-dehidrogenázok vizsgálatához létrehozott transzgenikus konstrukciók sematikus ábrázolása. A vastag sávok exonokat jelölnek, a *Drosophila* gének narancsvörös árnyalattal, a humán szekvenciák pedig kékkel, a szabályozó régiók és az UTR régiók szürkével, míg a Bb8 mitokondriális szignál szekvenciája világos narancssal van kiemelve. A fertilitási vizsgálatokban a boxplotok a (B) glutamát-dehidrogenáz menekítő konstrukciók ($bb8^{GRLS}$, $bb8^{R247>A}$, $bb8-Gdh$, $bb8-GLUD1$ és $bb8-GLUD2$) $bb8^{ms}$ háttérén történő vizsgálatát mutatják. A vad típushoz képest szignifikáns különbségeket az egyes oszlopok tetején jelöljük, és az összekapcsolt oszlopok felett a további szignifikanciaértékek láthatók. A genotípusok felett a fertilitási vizsgálatokban részt vevő egyedek száma van jelölve. (A) $n_{szűz}/keresztelés=5$; (B) $n_{szűz}/keresztelés=3$.

A fehérjék filogenetikai analízise azt is megmutatta, a Bb8 jelentősen különbözik a *Drosophila* Gdh és a humán glutamát-dehidrogenázoktól. A Bb8 44%-os fehérje szekvencia hasonlóságot mutat a humán GLUD1 és GLUD2-vel, valamint 45%-os hasonlóságot a Gdh-val; úgy, hogy a Gdh 64%-os szekvencia hasonlóságot mutat a GLUD1 és GLUD2-vel.

A többi GDH-val való viszonylag alacsony szekvencia-hasonlóság ellenére a Bb8 alfa-ketoglutarát-kötő zsebében (aktív centrum) a glutamát-dehidrogenázokra jellemző, korábban leírt konzervált aminosavak találhatók. A szabályozó doménekben lévő konzervált aminosavak azonban változatosabbak: A NAD-kötő zsebben 13-ból 8, az ADP-kötő zseb(ek)ben 24-ből 13, a GTP-kötő zsebben 14 aminosavból 4 azonos a humán GLUD1 aminosavaival. Érdekes módon a Bb8 konzervált szabályozó NAD-kötő zsebe nagyobb aminosav-szekvencia hasonlóságot mutat a GLUD2-vel.



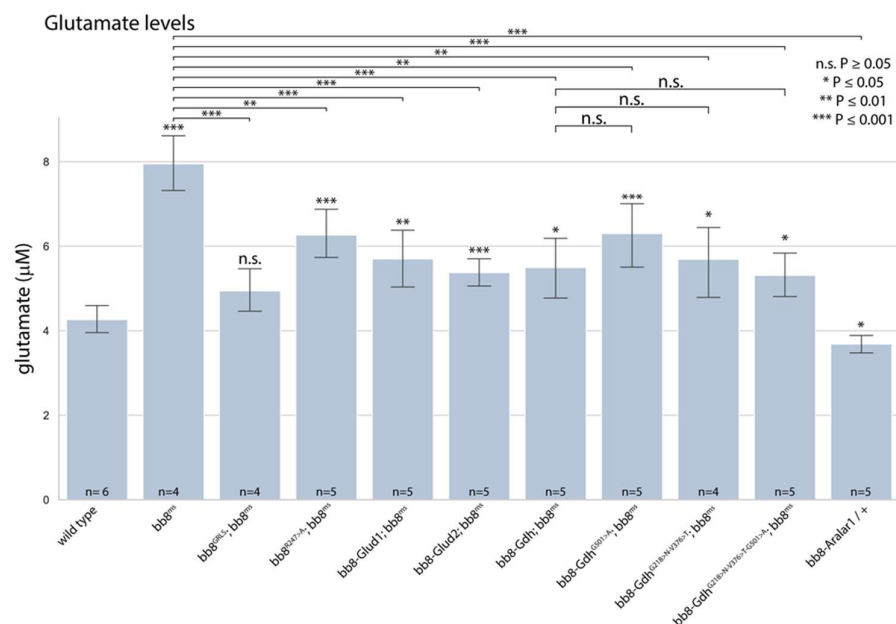
23. ábra A parakristályos anyag stabilitási vizsgálata. A transzgenikus törzsek (* *bb8^{GRLS}*, *bb8^{R247>A}*, *bb8-Gdh*, *bb8-GLUD1* és *bb8-GLUD2*) tesztiszmintáinak 1%-os SDS kezelését követően a lizátumok frakcionálása centrifugálással történt. Az "sn" a felülúszót, a "p" pedig a pelletet jelenti. A vad típusban a parakristályos anyag a pellet frakcióban halmozódik fel. A piros nyíl a *bb8^{ms}* mutáns mintákban hiányzó SDS-rezisztens frakciókat (~55 kDa) mutatja, amely a stabil parakristályos anyag hiányát jelzi.

A fehérjék közötti funkcionális hasonlóság mérésére kiméra transzgéneket készítettünk, ahol a Bb8 5' genomi környezetével, a promoter régiójával és mitokondriális lokalizációs szignáljával fuzionáltattuk a Bb8, Gdh, Glud1, Glud2 kódoló régióját. A transzgenikus törzseket fenotipikus és biokémiai vizsgálatokkal elemeztük (25. ábra A).

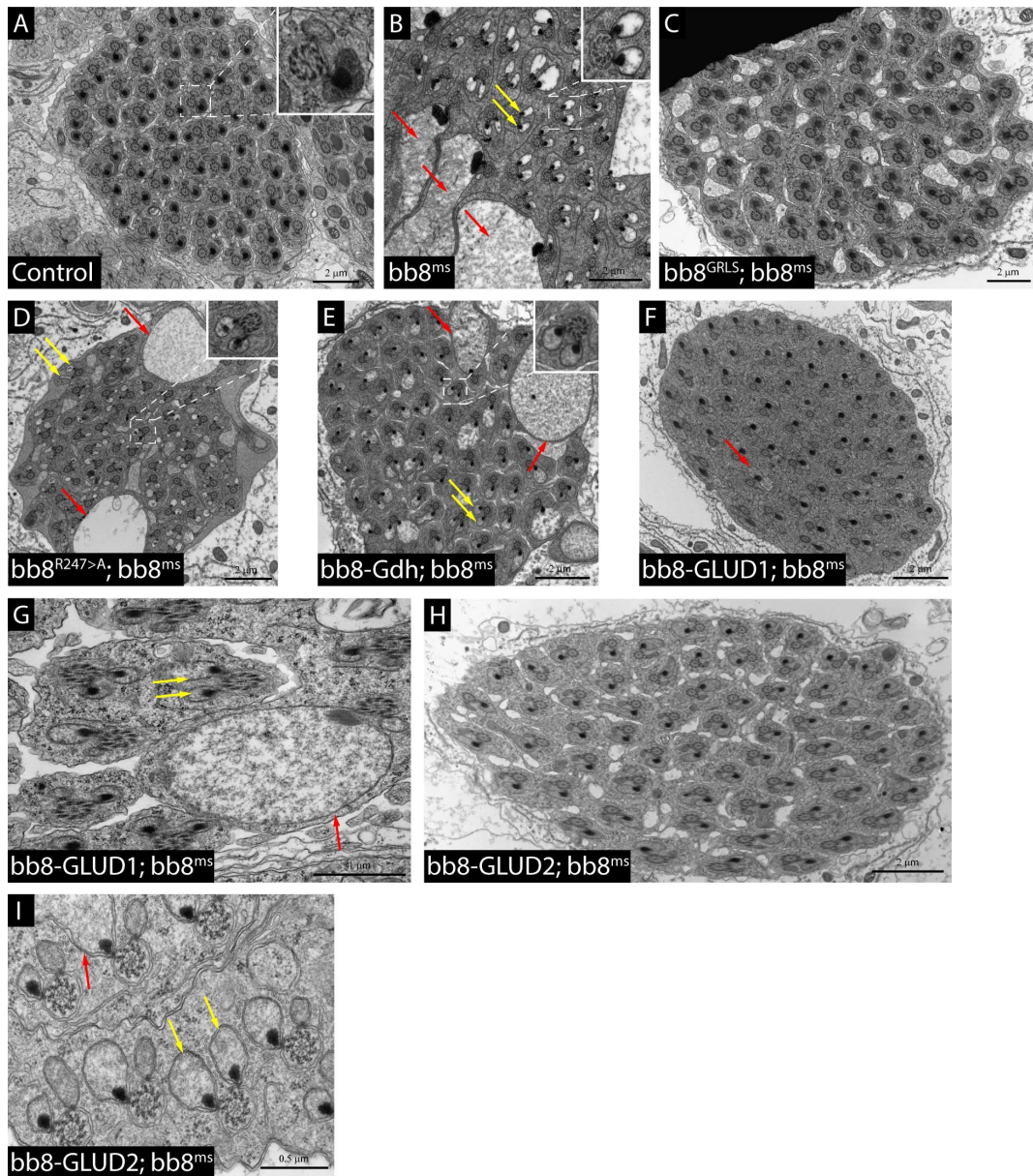
A transzgének funkcionálitását a menekítő képesség vizsgálatával kezdtük. Valamennyi transzgenikus konstrukció képes volt a *bb8^{ms}* sterilitás részleges menekítésére (25. ábra B). Az utódok száma alapján a legjobb menekítési képességet a *bb8* genomi menekítő konstrukcióval figyeltük meg, amelyet a *bb8-GLUD2*, *bb8-GLUD1* és *bb8-Gdh* konstrukciók követtek (25. ábra B). A Bb8 enzimaktivitás funkcionálisan különbözik a háztartási Gdh-aktivitástól, mivel a *bb8-Gdh* transzgenikus menekítés nem volt képes a vad típusú fertilitás helyreállítására.

A Bb8, Gdh, Glud1 és Glud2 fehérjék szerkezeti modellezésével és a már jellemzett kötőfelszínek aminosav összetételének összehasonlításával úgy döntöttünk, hogy megvizsgáljuk a Gdh 231, 389 és 528 pozícióban lévő aminosavainak jelentőségét. A *in vitro* mutagenézissel az említett aminosavakat a Bb8-ban és a Glud2-ben konzervált aminosavakra cseréltük és transzgenikus vonalakban vizsgáltuk a menekítési képességet. Megállapítottuk, hogy az utódszám tekintetében a *bb8-Gdh* < *bb8-Gdh*^{G501>A} < *bb8-Gdh*^{G218>N-V376>T-G501>A} < *bb8-Gdh*^{G218>N-V376>T} sorrendben emelkedik a menekítési képesség (25. ábra). Úgy véljük, hogy a módosított aminosavak vagy megkönnyítik a szubsztrátok kötését, vagy növelik az enzim reakció hatékonyságát az enzim NADH-hoz való affinitásának megváltoztatásával; de a pontos mechanizmus még meghatározásra vár (29. ábra).

A *bb8^{ms}* mutáns és a létrehozott transzgenikus törzsekben a parakristályos anyag SDS-sel szembeni stabilitását is vizsgáltuk, amelyből a parakristályos anyag szerveződésének szintjére tudunk következtetni. Megállapítottuk, hogy a *bb8^{ms}* mutánsokban az SDS-rezisztens frakció nem mutatható ki (26. ábra), ami biokémiai is megerősíti a Bb8 fontosságát a parakristályos anyag képződésben. A *bb8^{ms}* mutánsokban kifejeztetett *bb8* genomi menekítő konstrukció, valamint a *bb8-GLUD2*, *bb8-GLUD1* és a *bb8-Gdh* vonalakban az SDS-rezisztens parakristályos anyag képződése megfigyelhető. A transzgenikus vonalak esetében a parakristályos anyag szerkezetét TEM felvételeken is megvizsgáltuk és megállapítottuk, hogy a vad típussal összehasonlítva számos szabálytalanság figyelhető meg a nagy mitokondrium származékban szerveződő parakristályos anyagban (28. ábra).



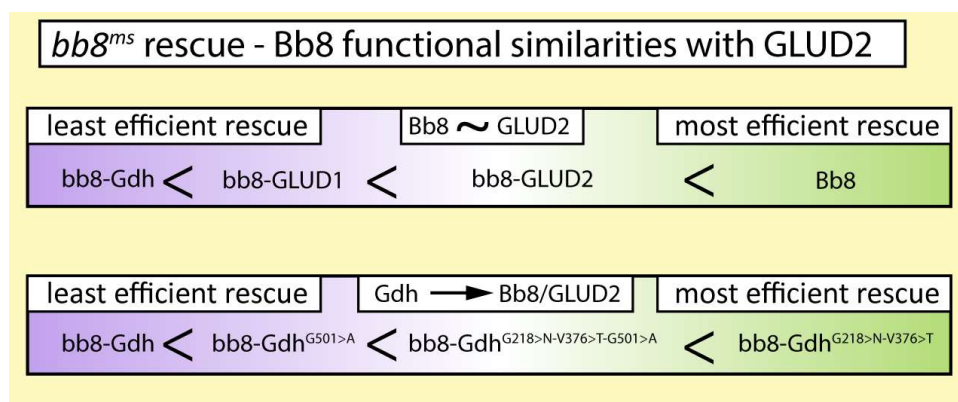
24. ábra A glutamát szint vizsgálatok összefoglalása. A vad típushoz képest a transzgenikus törzsekben mért szignifikáns különbségek az oszlopok felett vannak jelölve. A biológiai ismétlések száma az egyes oszlopok alján található. Minden biológiai ismétlés 20 légyből készült.



25. ábra A parakristályos anyag és a mitokondriumok morfológiai vizsgálata transzmissziós elektronmikroszópiával transzgenikus tűzsekben. A vad típus, a *bb8^{ms}* és a *bb8^{ms}* háttéren expresszáltatott transzgének (*bb8^{GRLS}*, *bb8^{R247>A}*, *bb8-Gdh*, *bb8-GLUD1* és *bb8-GLUD2*) esetében a megnyúló ciszták keresztmetszeti képein a piros nyilak a megamitokondriumokat, a sárga nyilak pedig azokat a spermatidákat jelölik, ahol mindkét mitokondrium származékban parakristályos anyag halmozódik fel. A hosszértékeket a felettük elhelyezett méretarányos sávok mutatják.

Végül a glutamát szinteket is megmértük a transzgenikus vonalak esetében és megállapítottuk, hogy az alacsonyabb volt minden transzgén esetében, mint a *bb8^{ms}* mutáns tesztszekben, bizonyítva ezzel a transzgének glutamát-dehidrogenáz aktivitását (27. ábra).

A humán GLUD1 és GLUD2 enzimek a nagy szekvencia-hasonlóság ellenére eltérő szabályozással rendelkeznek, ami azt is megmagyarázza, hogy a *bb8-GLUD2* miért mutatott jobb menekítési képességet, mint a *bb8-GLUD1*. Ezzel szemben a Gdh és a Bb8 viszonylag alacsony fehérje szekvencia-hasonlósággal rendelkezik, ami arra enged következtetni, hogy ezek akár szerkezetileg is különbözhetnek. A *bb8-GLUD2* transzgén a *bb8-GLUD1*-hez és a *bb8-Gdh*-hoz képest jobb menekítési képessége arra utal, hogy a két szövetspecifikus glutamát-dehidrogenáz, a Bb8 és a GLUD2 között funkcionális hasonlóság van. Ez felveti azt a hipotézist, hogy a Bb8 és a GLUD2 konvergens evolúció eredményeként jött létre azaz hasonló molekuláris szabályozási mechanizmusokkal, hasonló sejten belüli környezetben működhetnek (29. ábra).



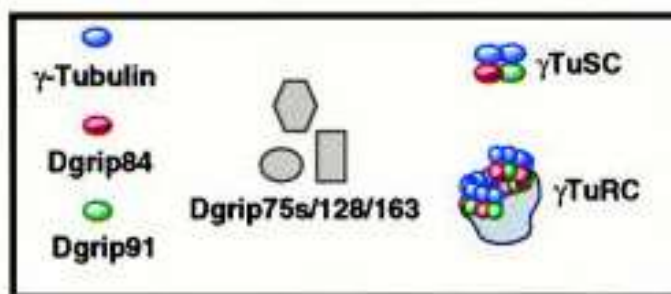
26. ábra A *bb8^{ms}* mutáns kiméra transzgénekkal történő menekítésének összefoglalása

A glutamát nátriumsója a mononátrium-glutamát (MSG), amelyet élelmiszeripari ízfokozóként használnak, az umami ízért felelős. Az emberi fogyasztás szempontjából általában biztonságosnak tekinthető, azonban MSG-allergia előfordulhat az arra érzékeny egyéneknél, és különféle tüneteket okozhat, mint például fejfájás, kipirulás vagy mellkasi fájdalom (Kazmi et al. 2017). Még érdekesebb, hogy az MSG rácsálókban hímivar-sejtek megtermékenyítő képességének csökkenését okozza, míg az MSG emberi szaporodásra gyakorolt hatása még ismeretlen (Kayode et al. 2020). Mindazonáltal a rácsálókon végzett vizsgálatok felvetik annak a lehetőségét, hogy az emelkedett glutamátszintek általában negatív hatással vannak a spermatogenezisre, és hogy a glutamát-anyagcsere kulcsfontosságú a megfelelő spermatogenezishez, nemcsak a *Drosophilában*, hanem valószínűleg az emlősökben is.

A citoskeletális változások modellezése a spermatogenezis késői stádiumaiban

A poszt-meiotikus ciszták megnyúlási irányának és módjának molekuláris szereplői csak részben ismertek. A tesztiszek transzkriptomikai analízisével számos tesztisz-specifikus sejtvázkomponens paralógot sikerült azonosítanunk, amelyek a spermatogenezis poszt-meiotikus stádiumaiban mutatnak jelentős RNS felhalmozódást (Vedelek et al. 2018). Ezeknek a géncsaládoknak a vizsgálatával közelebb kerülhetünk a meiózist követő sejt és sejtszervecske megnyúlási folyamatok során lejátszódó sejtvázk átrendeződések megértéséhez. Ezeknek a faktoroknak az azonosítása hozzájárulhat a közel 150-szeres hossznövekedés molekuláris hátterének megértéséhez. A késői stádiumokban történő felhalmozódást számos kinezin és dinein motorfehérjéről, tubulinokról és mikrotubulus asszociált fehérjékről is kimutattuk.

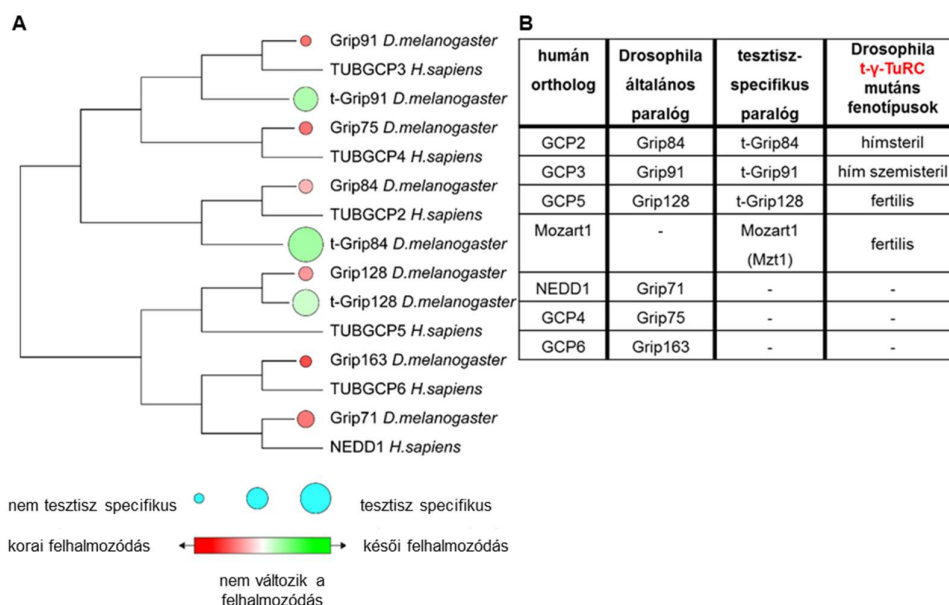
Drosophila-ban is, mint minden magasabbrendűben, a γ -TuRC felelős a mikrotubulusok nukleációjáért, így ennek a géncsoportnak a vizsgálata különösen érdekes volt. A *Drosophila* γ TuRC a γ -tubulin mellett legalább hat fehérje alegységet tartalmaz. Ezek közül a Dgrip84 (humán GCP2) és a Dgrip91(humán GCP3) a γ -tubulint kötve alakítják ki a kis γ -tubulin gyűrűkomplexet (γ TuSC), amely a többi alegységgel (Dgrip128, Dgrip75 és a Dgrip163) kiegészülve formálja a nagyobb γ -tubulin gyűrűkomplexet (γ TuRC-t) (Gunawardane et al. 2000). (30. ábra).



27. ábra A *Drosophila* γ -TuRC-t felépítő fehérjék (Gunawardane et al. 2000, alapján).

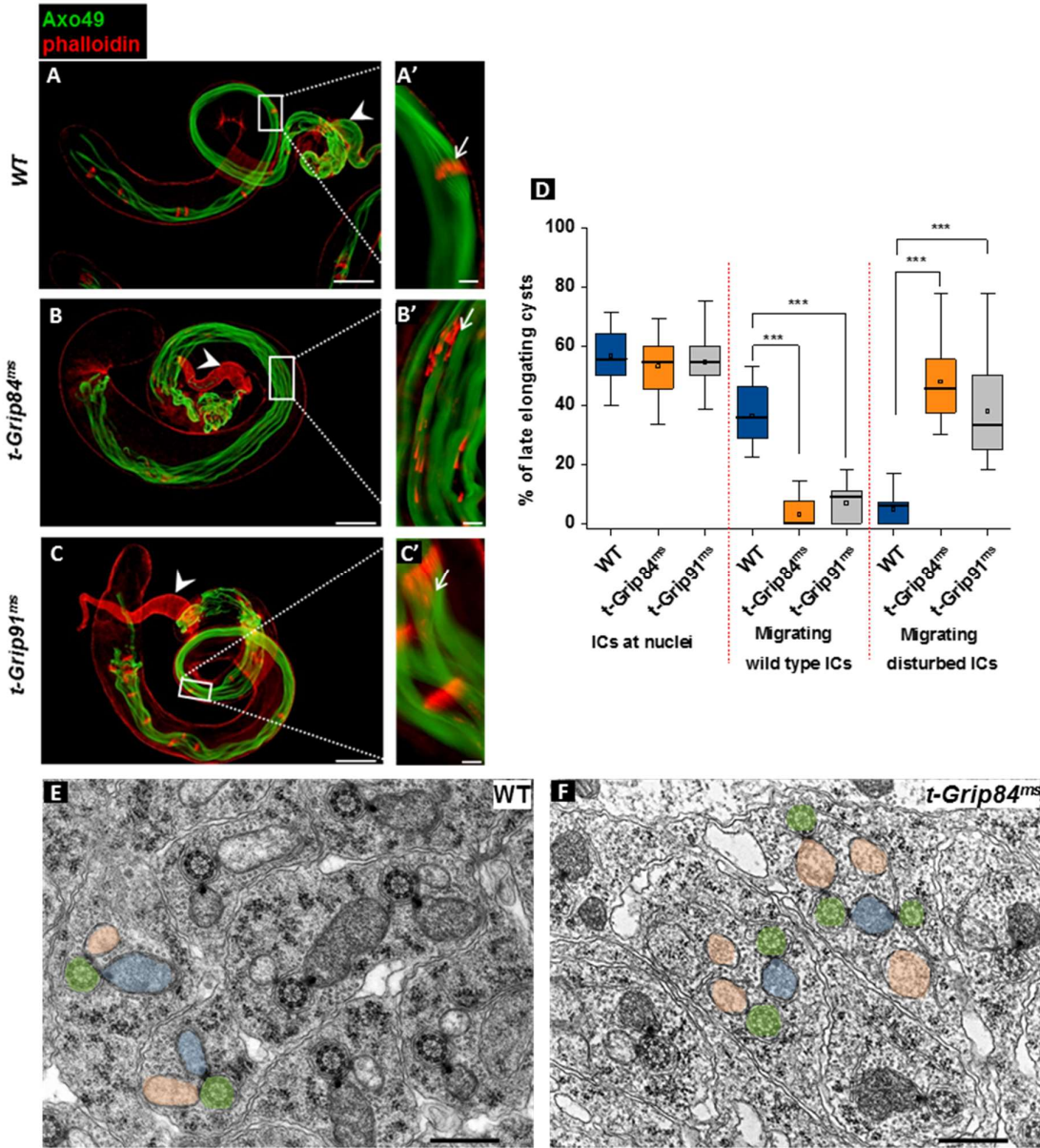
A tesztisz transzkriptomikai analízisével három tesztisz specifikus γ -TuRC paralógot azonosítottunk. A γ -TuSC mindkét tagja reprezentálva van tesztisz-specifikus paralóggal (*t-Grip84*, *t-Grip91*), míg a γ TuRC esetében csak a Grip128 alegységnek van tesztisz-specifikus paralógja (*t-Grip128*) (31. ábra A).

A *t*- γ -TuRC-t kódoló gének funkciójának tisztázására a klasszikus mutánsok analízisét választottuk.



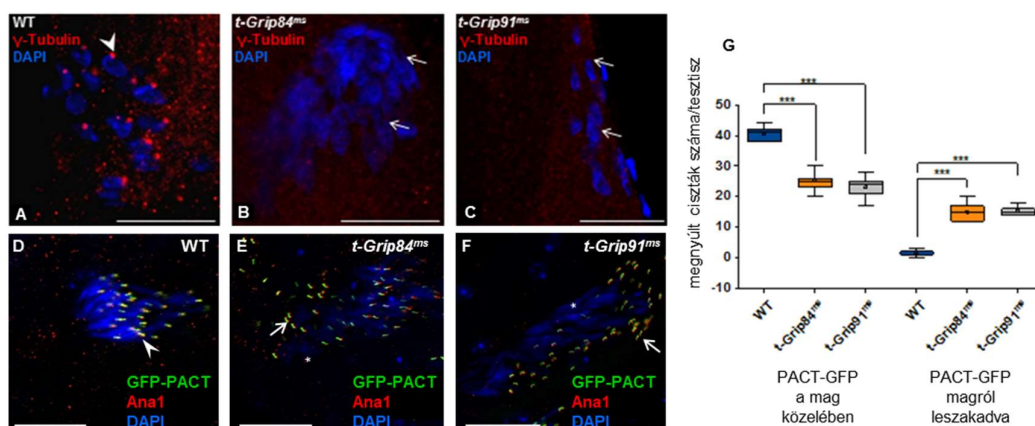
28. ábra A tesztisz-specifikus γ -TuRC azonosítása és a mutánsainak a jellemzése. (A) A kanonikus és a tesztisz-specifikus *Drosophila* γ -TuRC filogenetikai távolsága a megfelelő humán homológok feltüntetésével. Az expressziós mintázat tesztiszen belüli változását RNS szekvenálás alapján szinkódolva ábrázoltuk a filogenetikai fán. Az apikális régióban (piros) a γ -TuRC tagok, a bazális régióban (zöld) t- γ -TuRC tagok mutatnak transzkriptfelhalmozódást. **(B)** A t- γ -TuRC mutánsok fertilitásának vizsgálata során a *t-Grip84^{ms}* hímek sterilnek, míg a *t-Grip91^{ms}* hímek szemi-sterilnek (70%) bizonyultak.

Összegyűjtöttük a rendelkezésre álló klasszikus transzpozon mutagenézisből származó mutánsokat (*t-Grip84^{MB07394}* (*t-Grip84^{ms}*), *t-Grip91^{MI05374}* (*t-Grip91^{ms}*), és null mutáns allélt hoztunk létre a *t-Grip128* génben a CRISPR-Cas9 génszerkesztés módszerével (*t-Grip128^{l65}*) (31. ábra B). A mutánsok molekuláris jellemzése után az állatok fertilitását vizsgáltuk hímekben és nőstényekben. Megállapítottuk, hogy a vizsgált mutáns nőstények fertilitása nem változott, ellenben a hímek esetében *t-Grip84^{ms}* esetben hímsterilitást, míg a *t-Grip91^{ms}* mutánsnál hím szemisterilitást tapasztaltunk. A homozigóta *t-Grip128^{l65}* hímek fertilisnek bizonyultak (31. ábra B). A részletes jellemzés részeként megvizsgáltuk a spermatogenezis egyes stádiumait a sejtorganellelumenokra specifikus transzsgének és immunhisztokémiai módszerek segítségével. Az ultrastuktúrákat transzmissziós elektronmikroszkópia segítségével tettük láthatóvá. Megállapítottuk, hogy a *t-Grip84^{ms}* és a *t-Grip91^{ms}* mutánsok esetében is a spermatogenezis korai stádiumai és a meiózis is normálisan lezajlik, ami vad típusú kerek spermatidákat eredményez, ahol a sejtmag:nebenkern arány (1:1) és méret is megegyező. Kialakulnak a megnyúlt ciszták, a vad típusra jellemző hosszúságú axonémákkal, amelyeket a poliglicilált tubulinra specifikus, Axo49 ellenanyagos festéssel tettünk láthatóvá (32. ábra A-C).



29. ábra A t -g-TuRC mutánsok fenotípusának jellemzése. (A-C) A poliglicilált megnyúlt axonémák AXO49 immunfestéssel (zöld), az individualizációs komplexek (IC) Phalloidin (piros) festéssel vizsgálva. A *t-Grip84^{ms}* és *t-Grip91^{ms}* mutánsok axonéma-megnyúlása hasonló a vad típusúhoz. **(A-A')** Az aktinkúpok mozgása szinkronizált (nyíl) és **(A)** a szeminális vezikulum érett spermiumokkal van tele (nyílhegy) a vad típusú testiszekben. **(B-C')** A *t-Grip84^{ms}* és *t-Grip91^{ms}* mutánsokban szétszórott aktinkúpok (nyilak) és üres szeminális vezikulum (nyílhegy) jellemző. Mércse: C-E 100 μ m, (C'-E') 20 μ m. **(D)** Az IC képződését és mozgását Phalloidin és DAPI festéssel vizualizáltuk vad típusú, *t-Grip84^{ms}* és *t-Grip91^{ms}* mutáns testiszekben (n=30 testisz minden genotípusban). A sejtmagoknál lévő IC-k számát és az IC-k normális vagy zavart migrációját minden genotípusban megszámoltuk. A statisztikai szignifikanciát egyirányú ANOVA-val határoztuk meg ($p < 0,001$). **(E-F)** Transzmissziós elektronmikroszkópiával **(E)** vad típusú spermatidák keresztmetszeti képén a mitokondrium származékok (narancs és kék) és az axonémák (zöld) egymáshoz csatlakoznak. **(F)** A *t-Grip84^{ms}* mutáns cisztákban az axonémák a mitokondrium származékoktól elválnak.

Az individualizáció folyamatát az aktin kúpok követésével vizsgáltuk. A vad típusban tapasztalható szinkronizált, egy vonalban elhelyezkedő aktin kúp megjelenéshez képest a *t-Grip84^{ms}* és a *t-Grip91^{ms}* mutánsokban az aktin kúpok egymástól szétcuszsza helyezkedtek el a megnyúlt cisztákban (32. ábra A-D). A fenotípus penetranciája a *t-Grip84^{ms}* mutánsokban kifejezettebb volt, ezért a tesztszövetet transzmissziós elektronmikroszkópia segítségével is megvizsgáltuk (32. ábra E-F). A *t-Grip84^{ms}* mutánsban a vad típusú axonéma/mitokondrium származék elhelyezkedés mellett az axonémáktól eltávolodott mitokondrium származékokat figyeltünk meg, ami az aktin kúp szétcuszszásához vezethet. Tekintve, hogy a γ -TuRC a mikrotubulus szervező központok egyik kulcsfontosságú fehérje-komplexe, megvizsgáltuk a bazális testek helyzetét a mutánsokban. A γ -tubulin a γ -TuRC-hez kötődő fehérje, amely egyben mind a centroszómák mind a bazális testek egyik kulcsfontosságú fehérjéje. A *t-Grip84^{ms}* és a *t-Grip91^{ms}* mutánsok esetében a poszt-meiotikus cisztákban a γ -tubulin a bazális testeken jelentős mértékben citoplazmatikussá vált, szemben a vad típussal, ahol az a bazális testeken halmozódik fel (33. ábra A-C). Bár a *t-Grip84^{ms}* és a *t-Grip91^{ms}* mutánsok cisztáinak megnyúlása a bazális test jelenlétét feltételezi, ennek bizonyítására két további bazális test fehérje jelenlétét is megvizsgáltuk.



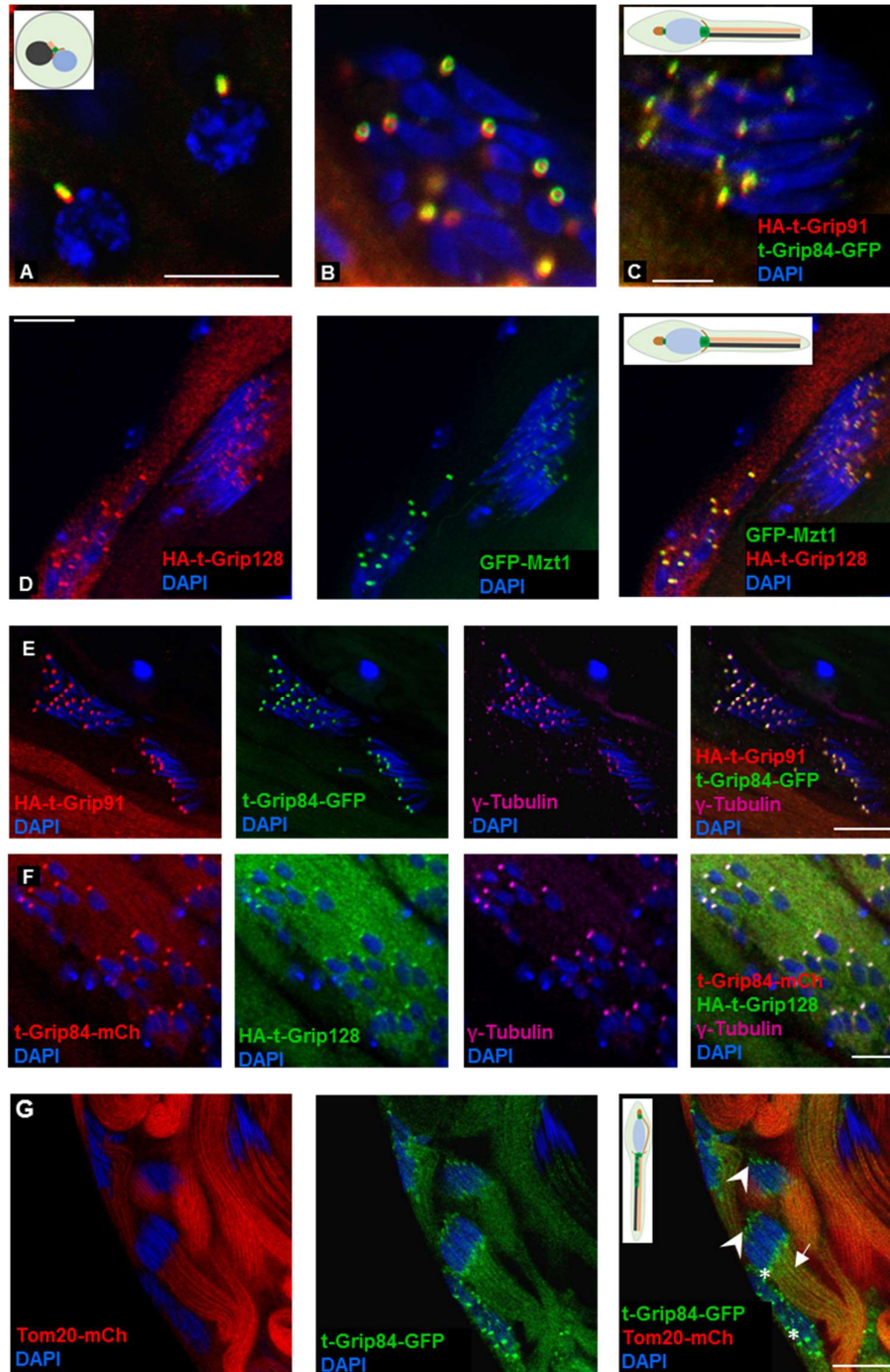
30. ábra A bazális testek vizsgálata a t- γ -TuRC mutánsokban. A γ -tubulin (piros, nyílhegy) a vad típusban a bazális testhez lokalizálódik. (B,C) *t-Grip84^{ms}* és a *t-Grip91^{ms}* mutánsok esetében γ -tubulin nem koncentrálik a bazális testen (nyíl) (D-F) Az Ana1 (piros) és a GFP-PACT (zöld) kolokalizálódik a (D, nyílhegy) vad típusban, (E, F nyílak), de a *t-Grip84^{ms}* és a *t-Grip91^{ms}* mutánsokban a bazális test leválik a sejtmagról. (G) A bazális test specifikus GFP-PACT sejtmaghoz történő asszociációját megszámláltuk a vad típusú és a *t-Grip84^{ms}* és a *t-Grip91^{ms}* mutánsok megnyúlt cisztáiban (n=12 pár tesztisz minden genotípusban). A statisztikai szignifikanciát egyirányú ANOVA-val határoztuk meg (p<0,001). Mércé: 20 μ m.

A centriólum kulcsfontosságú fehérje-komponense, az Ana1, a vad típusban a bazális testen együtt lokalizálódik a pericentrioláris anyag kialakításához szükséges Plp fehérje GFP-PACT doménjével. *t-Grip84^{ms}* és a *t-Grip91^{ms}* mutánsok esetében az Ana1 és a GFP-PACT lokalizáció megmarad, de a sejtmagoktól eltávolodnak, ami a bazális testek és a sejtmagok közötti kapcsolat hibáit jelzi (33. ábra D-G).

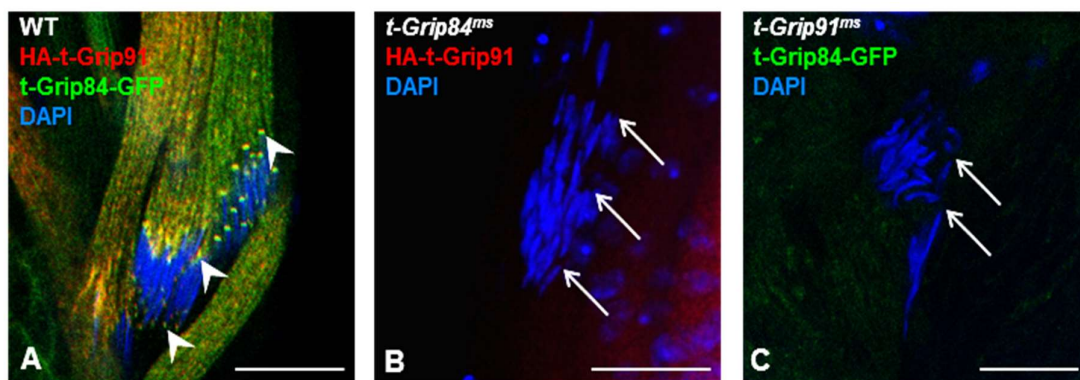
A t- γ -TuRC komponensek expressziós mintázatának és szubcelluláris eloszlásának jobb megértése érdekében különböző riporterfehérjékkel ellátott fúziós transzgéneket hoztunk létre. Minden t- γ -TuRC gén esetében a saját genomi szabályozó régiót használtuk, az endogén kifejeződési mintázat megteremtésére. A transzgének funkcionalitását menekítési kísérletekben bizonyítottuk. A jelölt t- γ -TuRC fehérjék jelenlétét kizárólag a spermatidák meiotikus osztódások utáni stádiumaiban lehetett kimutatni. A t-Grip84-mCh, a t-Grip84-GFP, a HA-t-Grip91 és HA-t-Grip128 szignálok a kerek spermatidákban jelennek meg először, és a centriólum tartalmú tesztisz-specifikus struktúrához (CA) lokalizálódnak a megnyúlás során. A t- γ -TuRC fehérjék CA lokalizációját a t-Grip84-mCh/t-Grip84-GFP, HA-t-Grip91 és HA-t-Grip128 fehérjék és a γ -tubulin egyidejű vizualizálása is megerősítette (34. ábra A-D). A t- γ -TuRC fehérjék CA lokalizációja fennmarad a megnyúló spermatidákban, de csökken a teljesen megnyúlt spermatidákat tartalmazó cisztákban. A jelölt t- γ -TuRC fehérjék a CA-n kívül, a megnyúló magok elülső csúcsán is felhalmozódnak (34. ábra E-F). A munkánkkal párhuzamosan kimutatták, hogy a γ -Tubulin mind a mag csúcsi részéhez, mind a CA-hoz lokalizálódik a megnyúló spermatidákban (Riparbelli et al. 2020). Feltételezték, hogy ez a mag két pólusán történő rögzülés hozzájárulhat a spermatida magjának megnyúlásához. Az általunk tapasztalt t- γ -TuRC lokalizációs mintázat tovább erősíti ezt a hipotézist.

A spermatidák megnyúlásával párhuzamosan a t- γ -TuRC fehérjék lokalizációja a mitokondriumok felszínén is megfigyelhető, amit a Tom20-mCherry fúziós fehérjével történő együttes lokalizációval bizonyítottunk (34. ábra G).

Megvizsgáltuk a jelölt t- γ -TuRC tagok jelenlétét a t- γ -TuRC mutánsokban és megállapítottuk, hogy a t-Grip84-GFP, a HA-t-Grip91 és a γ -Tubulin sem lokalizálódik a poszt-meiotikus MTOC-k egyikéhez sem (35. ábra). Ezek az eredmények a fehérjék között kialakuló komplex jelenlétére utalnak. A t- γ -TuRC fehérjéknek és magának a γ -Tubulinnak a CA és a mag apikális csúcsához történő lokalizációja arra utal, hogy együttesen hozzájárulhatnak a perinukleáris mikrotubulus hálózat szerveződéséhez, valamint az axonéma sejtmaghoz történő rögzítéséhez. Az apikális csúcson szerveződő MTOC hozzájárulhat mind a sejtmagmegnyúláshoz, mind az akroszómát alkotó sejtorganellek összeszervezéséhez.



31. ábra A t- γ -TuRC fehérjék lokalizációja a spermatogenezis során. (A) HA-t-Grip91 (piros) kolokalizációja a t-Grip84-GFP-vel (zöld) kerek spermatidákban, (B) korai megnyúló, (C) korai kenu stádiumú spermatidákban. (D) HA-t-Grip128 kolokalizációlódik a GFP-Mzt1-gyel a megnyúlt sejtmag bazális testénél a centriólum származék közelében. (E) A HA-t-Grip91, t-Grip84-GFP együtt lokalizálódik a γ -tubulinnal. (F) A t-Grip84-mCh és a HA-t-Grip128 együtt lokalizálódik a γ -Tubulinnal. (G) t-Grip84-GFP a sejtmag apikális csúcsához (nyílhegy), a bazális test környéki centriólum származékhoz (csillag) és a megnyúló spermatidák farki részén a Tom20mCh-vel jelölt mitokondriumok (nyíl) közelébe lokalizálódik.

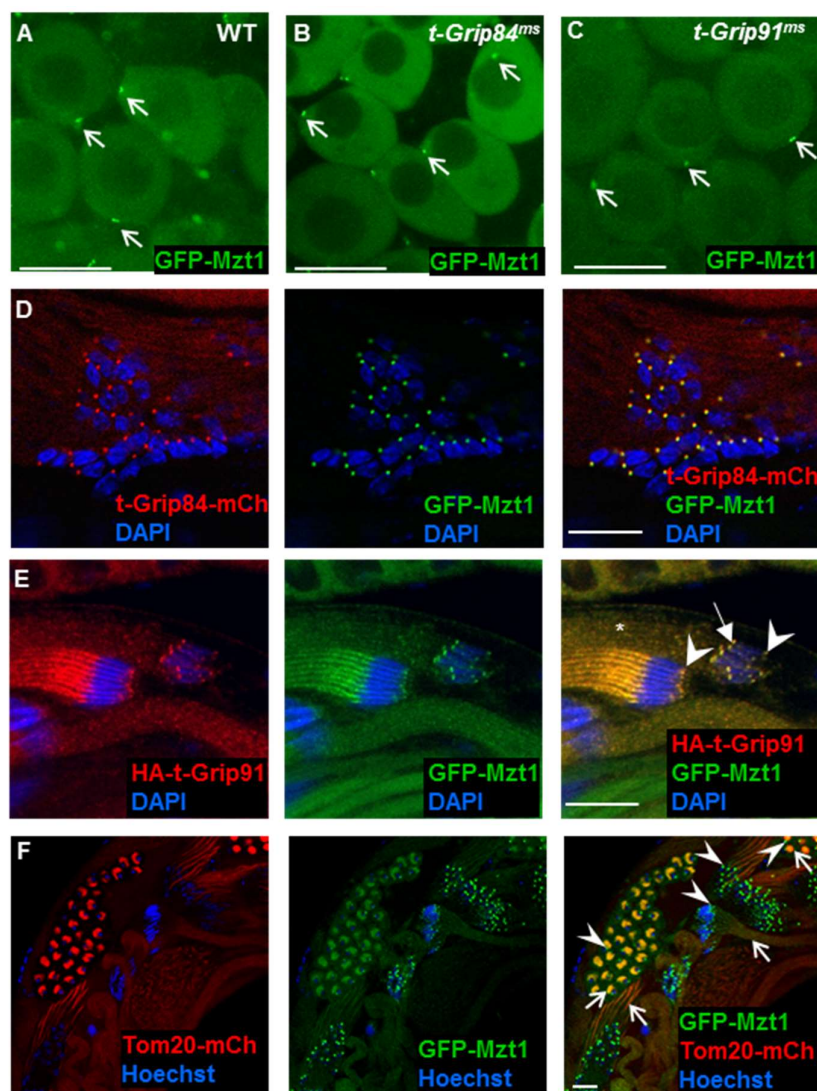


32. ábra A t - γ -TuRC fehérjék egymástól függő lokalizációja. (A-C) A HA- t -Grip91 és a t -Grip84-GFP kolokalizálódik a centriólum származékok közelében, a sejtmagok apikális csúcsán és a mitokondriumok felszínén (nyílhegyek) a vad típusú spermatidákban, míg a HA- t -Grip91 a t -Grip84^{ms} és a t -Grip84-GFP a t -Grip91^{ms} mutáns spermatidákban citoplazmatikus eloszlást mutat (nyilak).

A Mzt1 szintén a γ -TuRC-hez kötődő fehérje, amely az általánosan kifejeződő Grip91 és Grip128 fehérjék kötőpartnereként ismert és előzőleg kizárólag a centroszómán és a bazális testen mutatták ki a jelenlétét (Tovey et al. 2018). A Mzt1 fehérjéről emlős sejtekben kimutatták, hogy szükséges a γ -TuRC normális működéséhez, annak integritásához. Előzőleg kísérletesen csak a Mzt1 és GCP3 alegység között tudtak kimutatni közvetlen kapcsolatot, de később a GCP2, GCP3, GCP5 és GCP6 N-terminálisán található konzervált hidrofób motívumon keresztüli kapcsolatok is biokémiai bizonyítást nyertek (Cota et al. 2017). A *Mzt1 Drosophila* ortológja csak a testiszben mutat erőteljes kifejeződést, de hiánya nem eredményez hímsterilitást, csupán az öregedéssel együtt járó fertilitás csökkenés felgyorsulását (Tovey et al. 2018)

A Mzt1 és a t - γ -TuRC tagok közötti kapcsolat tesztelésére létrehoztunk egy GFP-Mzt1 transzgenikus vonalat. GFP-Mzt1 transzgén segítségével igazoltuk a Mzt1 már ismert centroszómális és bazális test lokalizációját (36. ábra A-D). A publikált eredményekkel (Tovey et al. 2018) ellentétben a GFP-Mzt1, már a meiótikus osztódások alatt a mitokondriumokhoz lokalizálódik és ez a lokalizáció a kerek spermatidákban is megfigyelhető. A poszt-meiotikus stádiumokban a GFP-Mzt1 és a t - γ -TuRC tagok átfedő lokalizációs mintázatot mutatnak, a bazális testen, a mag apikális csúcsán és a mitokondriumok felszínén (36. ábra E-F).

A t - γ -TuRC mutánsokban (t -Grip84^{ms} és t -Grip91^{ms}) a GFP-Mzt1 lokalizációja kizárólag a meiózist követően tűnik el, a korai stádiumokban megőrzi a centroszómális lokalizációt.



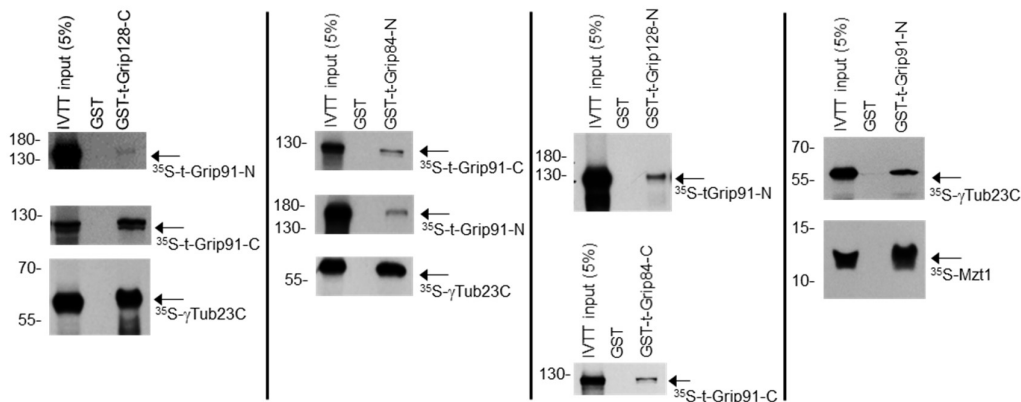
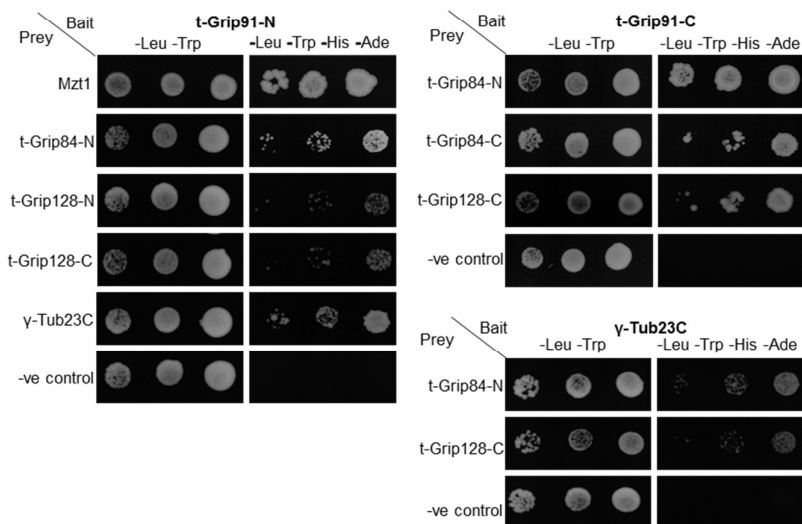
33. ábra Mzt1 a γ -TuRC tagja a spermatogenezis minden stádiumában. (A-C) A GFP-Mzt1 (zöld) és a γ -tubulin a centroszómákhoz lokalizálódik (A) a vad típus (B), *t-Grip84^{ms}* (C) és a *t-Grip91^{ms}* (H, K) mutánsokban. Mércé: 20 μ m. (D) t-Grip84-mCh (piros) együtt lokalizálódik a GFP-Mzt1-gyel (zöld) a centriólum származékok közelében. (E) A HA-t-Grip91 (piros) együtt lokalizálódik GFP-Mzt1-gyel (zöld) centriólum származékon (nyíl) és a sejtmagok apikális csúcsán (nyílhegy) a sejtmag kenu stádiumában és a mitokondriumok közelében (csillag) a sejtmag tú alakú stádiumában. (F) A GFP-Mzt1 (zöld) a centriólum származék lokalizációjával párhuzamosan (nyílhegy) a Tom20-mCh-vel vizualizált mitokondrium származékokkal (nyíl) is együtt lokalizálódik a kerek spermatida stádiumtól kezdve. A kerek spermatidák nebenkernbe szerveződött mitokondrium származékai (jobb felső csúcsa a képek) és a 32 sejtes ciszták mitokondriumainál is kimutatható a GFP-Mzt1.

Eredményeink arra engedtek következtetni, hogy a poszt-meiotikus stádiumokban a változatos MTOC-k kialakításához egy alternatív γ -TuRC is felépülhet a γ -tubulinnal és a Mzt1-gyel, de a t- γ -TuRC molekuláris összetétele még tisztázatlan volt. Ennek a kérdésnek a

megválaszolására először élesztő-kéthibrid (Y2H) kísérleteket végeztünk, ahol a három t- γ -TuRC fehérje egymás közötti valamint a γ -tubulinnal és a Mzt1-el kialakuló kölcsönhatását teszteltük (37. ábra). A fehérjék nagy mérete miatt mindhárom t- γ -TuRC fehérjét egy N-terminális és egy C-terminális darabban vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a t-Grip84-N, a t-Grip91-N és a t-Grip128-C terminális része az általánosan expresszáldó γ -Tub23C fehérjéhez kötődik. Változatos kapcsolatokat találtunk a t- γ -TuRC tagok között. A t-Grip84-N kölcsönhatásba lép mind a t-Grip91-N terminális, mind a t-Grip91 fehérje C-terminális felével. A t-Grip91-C-terminális darabja a t-Grip84-C-vel és a t-Grip128-C-vel mutat kötődést. A t-Grip91-N mind a t-Grip128-N-nel, mind a t-Grip128-C-vel is interakciót mutat az Y2H kísérletekben. Kimutattuk, hogy a Mzt1 kizárólag a t-Grip91 N-terminálisához kötődik a t- γ -TuRC fehérjék közül (37. ábra). Korábban már kimutatták az általánosan kifejeződő Grip91 és a Grip128 interakcióját a Mzt1-gyel, azonban ennek a kölcsönhatásnak a pontos helyét a spermatogenezis során nem vizsgálták (Tovey et al. 2018). Eredményeink arra utalnak, hogy a korai stádiumokban a Mzt1 az általánosan kifejeződő Grip91-en keresztül kötődhet a γ -TuRC-hez, míg a poszt-meiotikus stádiumokban a Mzt1 a t-Grip91 N-terminális részén kapcsolódhat a t- γ -TuRC-hez.

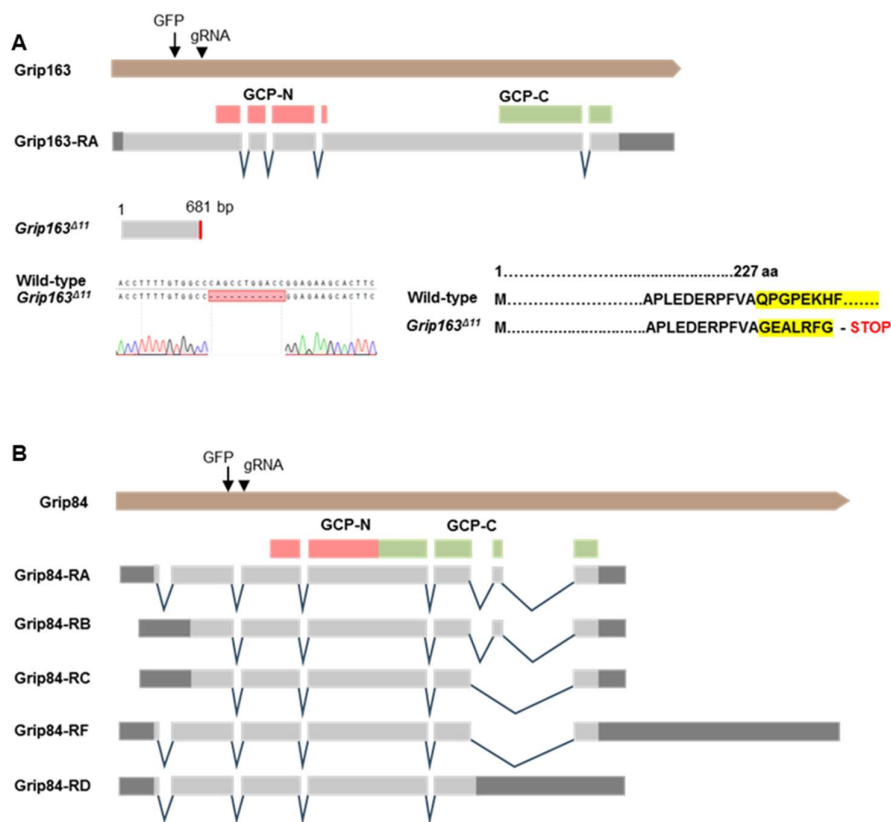
A pozitív Y2H eredmények további validálására, valamint a direkt interakciók igazolására az *in vitro* transzkripció-transzláció (IVTT) rendszerrel előállított fehérjék és a bakteriálisan expresszáltatott fehérjéket közötti kapcsolat meglétét vizsgáltuk (37. ábra). Ehhez a t- γ -TuRC fehérjék N- vagy C-terminális részéhez GST-t fuzionáltattunk és a fúziós fehérje darabokat egyedileg expresszáltattuk baktériumokban, majd tisztítottuk a fehérjéket a Glutathion-Sepharose-segítségével. 35S-metioninnal jelölt t- γ -TuRC fehérje fragmentumokat, γ -tubulint és Mzt1-et szintetizáltunk az IVTT reakciókban. A GST fúziós fehérjék és a 35S-metioninnal jelölt fehérjék közötti fizikai kölcsönhatások kimutatására autoradiográfiát használtunk. Az *in vitro* kötési kísérletek eredményei alátámasztották a Y2H megállapításokat (37. ábra). Következésképpen két független kísérleti rendszerrel is bizonyítottuk, hogy mindhárom t- γ -TuRC fehérje képes kötődni a γ -tubulinhoz, de csak az N-terminális t-Grip91 mutat kölcsönhatást az Mzt1-gyel. Továbbá, a t- γ -TuRC fehérjék egymással való változatos kapcsolódása feltételezi egy változatos t- γ -TuRC-k kialakulásának lehetőségét.

	t-Grip84-N	t-Grip84-C	t-Grip91-N	t-Grip91-C	t-Grip128-N	t-Grip128-C
γ -Tub23-C	+	-	+	-	-	+
Mzt1	-	-	+	-	-	-
t-Grip84-N			+	+	-	-
t-Grip84-C			-	+	-	-
t-Grip91-N					+	+
t-Grip91-C					-	+



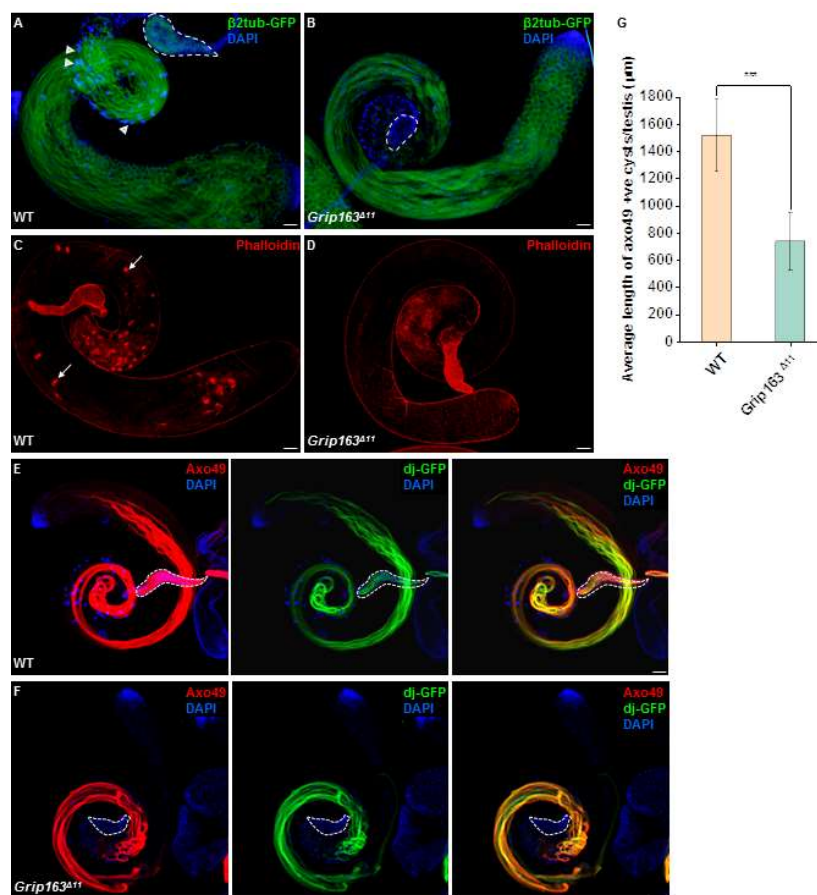
34. ábra A t- γ -TuRC és a partnerfehérjék közötti kölcsönhatás vizsgálata élesztő két hibrid és IVTT módszerrel. (A) Az N- és C-terminális t- γ -TuRC fehérjék egymás közötti, a γ -Tub23-C-vel és a Mzt1-gyel vizsgált Y2H összefoglalása. **(B)** A Y2H analízis reprezentatív eredményei 10-szeres soros hígításban (balról jobbra). A kettős transzformáns csali- és préda plazmidok jelenlétét a szelektív -Leu, -Trp táptalajon, a fehérjék közötti kölcsönhatást szelektív -Leu, -Trp, -His, -Ade táptalajon vizsgáltuk. A negatív kontroll (-ve kontroll) az üres préda a megfelelő csalivektorral. **(C)** A baktériumból tisztított GST-t- γ -TuRC fehérje fragmentumok (GST-Grip128-C, GST-Grip128-N, GST-Grip84-N, GST-Grip91-N és az IVTT reakcióban előállított ³⁵S-metioninnal jelölt interakciós fehérjék (t-Grip91-N, t-Grip91-C, Mzt1, γ -Tubulin23) közötti kölcsönhatásokat a minták PAGE-t követő autoradiográfiai elemzéssel végeztük.

Eredményeink felvetették azt a kérdést, hogy az általánosan kifejeződő γ -TuRC fehérjét a testisz-specifikus γ -TuRC tagok felváltják-e, vagy képesek együttműködni és együttesen akár kevert komplexek formájában hozzájárulni a változatos MTOC-ok kialakításához a spermatogenezis késői szakaszában. Ennek a megválaszolására a CRISPR-Cas9 technológia segítségével, a saját genomi környezetében megjelöltük a Grip163 és Grip84 géneket egy a GFP riporter fehérjét kódoló szakasszal és a létrehozott transzgenikus vonalak segítségével nyomon követtük a kanonikus γ -TuRC-t. A Grip163 génnek nincs testisz-specifikus paralógja, ezért alkalmasnak bizonyult a kanonikus γ -TuRC követésére. A Grip163 gRNS tesztelése során egy klasszikus mutánst is előállítottunk, amely szemben az eddig jellemzett Grip84 és Grip91 génekkel, nem bizonyult esszenciálisnak (38. ábra A).



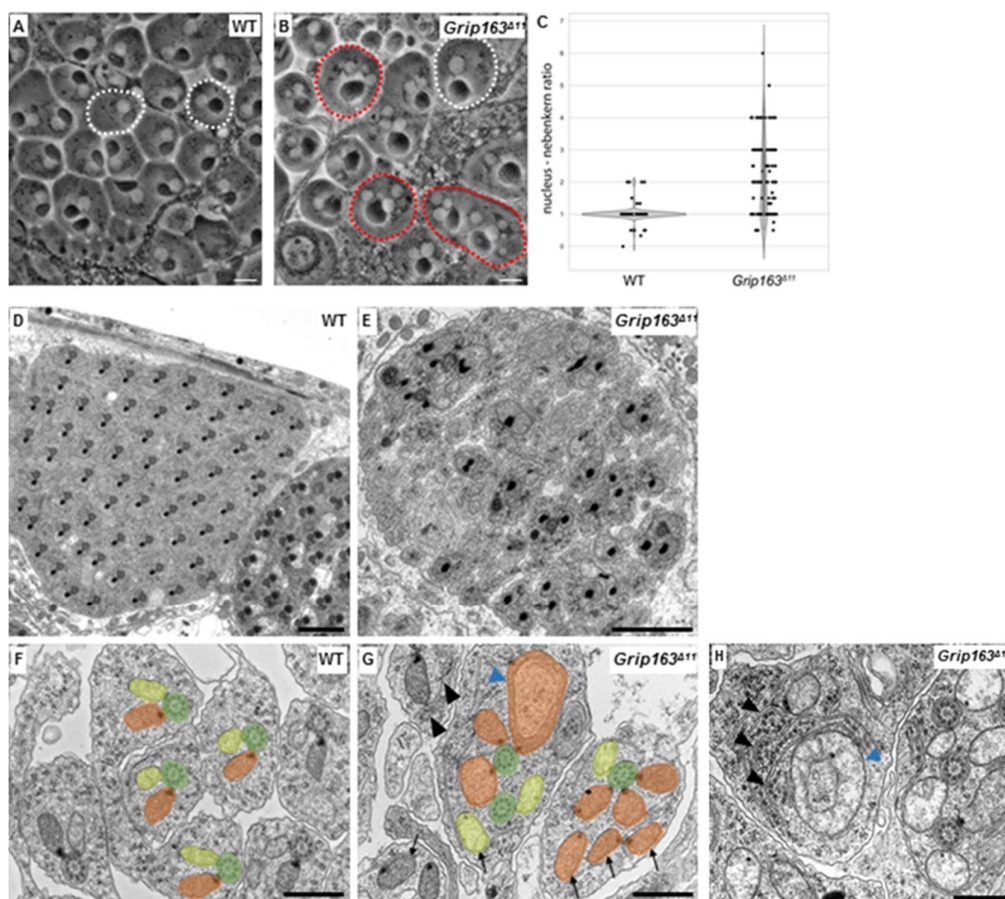
35. ábra A Grip163 és Grip84 gének és a róluk átíródó transzkriptek szerkezete, a gének *in vivo* genomi jelölése. (A) A Grip163 gén szerkezete, a beépített GFP helyének feltüntetésével és a CRISPR technológiához használt gRNS helyével. A gRNS pozíciója (11,997,349-11,997,371 [+]) és az *in vivo* beillesztett GFP riporter pozíciója (11,997,601 [-]) A transzkriptek exon-intron határai és a fehérje doméneket kódoló szakaszok (GCP-N, GCP-C) a Grip163 RA transzkripten vannak bejelölve. A Grip163^{Δ11} mutáns 11bp delécióval rendelkezik (11,997,369-11,997,359). A deléció környezetének DNS és fehérje szekvenciáját ábrázoltuk. **(B)** A Grip84 gén szerkezete a gRNS (19,564,635-19,564,657 [-]) és a GFP riporter (19,564,845 [-]) helyeivel. A beillesztett GFP fehérje mind az öt Grip84 RNS izoformába képes *in vivo* a saját genomi környezetében beépülni. A transzkriptek exon-intron határait és a fehérje doméneket (GCP-N, GCP-C) a Grip84-RA, -RB, -RC, -RF, -RD transzkripteken jelöltük.

A homozigóta *Grip163^{Δ11}* nőstények fertilisek, ellenben a hímek sterilek (39. ábra). Hasonló fenotípust figyeltek meg a *Grip128* és *Grip75* (γ -TuRC komponensek) mutánsainál (Vogt et al. 2006). A *Grip163^{Δ11}* mutánsok kerek spermatidáiban abnormális nebenkern-mag arányt találtunk, ami a rendellenes mitotikus osztódások következménye lehet (40. ábra A-C).



36. ábra Mitokondrium és axonéma hibák rendellenes spermatida megnyúláshoz vezetnek a *Grip163^{Δ11}* mutánsban. (A, B) A mikrotubulusokat a β 2tub-GFP transzgénnel (zöld), míg a sejtmagokat DAPI-val (kék) tettük láthatóvá vad típusban és a *Grip163^{Δ11}* mutáns spermatidákban (b) A megnyúlt ciszták mind a vad típusban, mind a *Grip163^{Δ11}* esetében jelen vannak, azonban a *Grip163^{Δ11}* mutáns szeminális vezikuluma (szaggatott vonalak) nem tartalmaz β 2tub-GFP pozitív érett spermiumokat. (C, D) Az individualizációs komplexekben (IC) jelen lévő aktin kúpok Phalloiddinnel (piros) festettük, (C) vad típusban az IC-k szinkronizáltnak helyezkednek el a megnyúlt cisztákban (nyilak), a *Grip163^{Δ11}* mutánsban az IC-k nem alakulnak ki. (E, F) Az érett, megnyúlt axonémák Axo49 (poliglicilált-tubulin) antitesttel (piros) és a megnyúlt mitokondriumok DJ-GFP transzgénnel (zöld) vannak jelölve (E) vad típusú testiszekben és az azokhoz kapcsolódó szeminális vezikulumban (szaggatott vonal). A (F) *Grip163^{Δ11}* mutánsban a ciszták rövidebbek, a megnyúlt poliglicilált axonémák és mitokondriumok rövidebbek, a szeminális vezikulum pedig üres (szaggatott vonal). (G) A grafikon az Axo49 pozitív ciszták átlagos hosszát mutatja vad típusban és *Grip163^{Δ11}* mutánsban (vad n=12, *Grip163^{Δ11}* n=22). A statisztikai varianciát egyirányú ANOVA-tesztel vizsgáltuk. Mércse= 50 μ m.

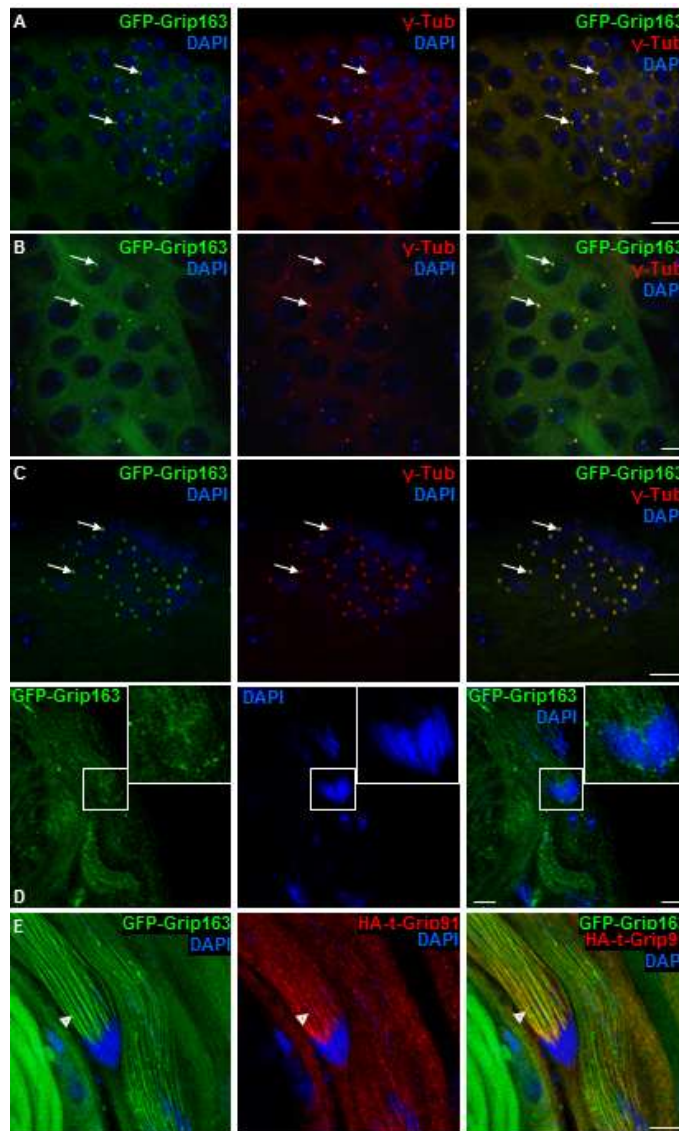
Ennek ellenére a *Grip163^{Δ11}* mutánsban sok ciszta képes a meiózist követően megnyúlni (39. ábra A). Az axonémák megnyúlása a megnyúló mitokondriumoktól függ, amelyek felületet biztosítanak a mikrotubulus hálózat újrendeződéséhez, és az extrém hosszúságú axonéma kialakulásához (Nouguchi 2011).



37. ábra Hibás mitokondrium és axonéma fejlődés a *Grip163^{Δ11}* mutáns poszt-meiotikus cisztáiban. (A) Fáziskontraszt mikroszkópiával vad típusú kerek spermatidákban 1:1, sejtmag:nebenkern arány jellemző (fehér körvonal). (B) A *Grip163^{Δ11}* mutánsban abnormalis sejtmag:nebenkern arány jellemző (piros körvonal). (C) A sejtmag:nebenkern arány ábrázolása „violin plot” segítségével vad típusú (n=186) és a *Grip163^{Δ11}* mutáns kerek spermatidák esetén (n=112). (D-H) Transzmissziós elektronmikroszkópos keresztmetszeti felvételek (D, F) vad típusú és (E, G, H) *Grip163^{Δ11}* mutáns testiszekről. (F) A vad típusú megnyúló cisztákban az axonémára a 9+2 tubulin dimerek (zölddel kiemelve) jellemzőek, amihez két mitokondrium származék kapcsolódik (sárga és narancssárga), a nagy származékban (narancssárga) a parakristályos anyag felhalmozódásával. (G) A *Grip163^{Δ11}* mutánsban a ciszták axonémái és a hozzájuk kapcsolódó kis és nagy mitokondrium származékok hibásak. A mitokondriumok és az axonéma nem kapcsolódnak egymáshoz, és több mitokondrium származék (narancssárgával és sárgával kiemelve) kapcsolódik egy axonémához (zöld). (H) A mitokondriumok összeolvadnak, megnagyobbodnak (kék nyílhegyek) és eltávolodnak (nyíl) az axonémától, valamint az axonémák mikrotubuluskötegei szétesnek, és az axiális membrán kinyílik (fekete nyílhegyek). (mérce: A-E 2 μ m, F-H 500 nm)

A megnyúlási folyamat komponenseit, a mikrotubulusokat a β 2tub-GFP transzgén, az érett axonémát az anti-pan poliglicilált tubulin (Axo49) immunfestés, a megnyúlásban fontos a mitokondrium származékokat a Dj-GFP transzgén segítségével, valamint az individualizációs komplex (IC) aktinkúpjait Phalloidin festéssel vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy az individualizáció előfeltételét jelentő megfelelő cisztamegnyúlás elmarad a *Grip163^{Δ11}* mutánsban (39. ábra C-D). A *Grip163^{Δ11}* mutánsban a WT-hez képest szignifikánsan rövidebb axonémákat figyeltünk meg, ami a spermatidák rendellenes megnyúlására utal (39. ábra E-F). A tesztiszek elektronmikroszkópos vizsgálata megmutatta, hogy a *Grip163^{Δ11}* mutánsban a ciszták rendezetlenné válnak, cisztánként kevesebb spermatidával és zavart mitokondrium:axonéma aránnyal (40. ábra D-G). Gyakran több mitokondrium származék kapcsolódik egyetlen axonémához, és több sérült axonémát is megfigyelhetünk (40. ábra H). Ezek a megfigyelések alátámasztják, hogy a Grip163 a normális axonémaképződéshez és/vagy stabilitáshoz szükséges.

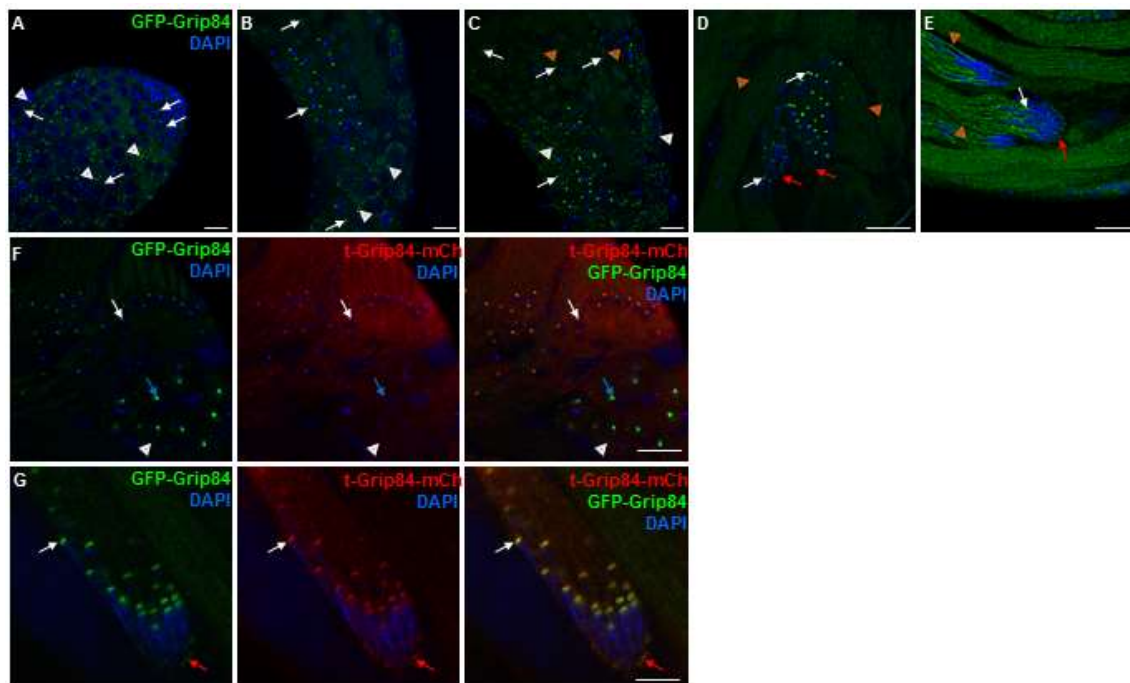
Mivel az általánosan kifejeződő γ -TuRC elengedhetetlen a centroszóma kialakulásához (Vérollet et al. 2006; Bärenz et al. 2011; Gupta et al. 2020; Barbosa et al. 2000), megvizsgáltuk a centroszóma/bazális test jelenlétét *Grip163^{Δ11}* mutánsok spermatogenezisének különböző szakaszaiban. Megállapítottuk, hogy a *Grip163^{Δ11}* mutáns tesztiszekben mind a γ -Tubulin, mind a GFP-PACT fehérje gyengén lokalizálódik a centroszómákhoz és a késői stádiumokban a bazális test a sejtmagtól eltávolodva, szétszórta helyezkedik el. A Grip163 szubcelluláris lokalizációjának vizsgálatához *in vivo* endogén genomi környezetben GFP-vel jelölt *Grip163* vonalat hoztunk létre. A tesztisz-specifikus γ -TuRC tagokhoz hasonlóan a GFP-Grip163 is kimutatható volt a bazális testen, a sejtmagok apikális végén, és a mitokondriumok felszínén egyaránt (41. ábra A-E). Ezek az eredmények határozottan arra utalnak, hogy a tesztisz-specifikus γ -TuRC mellett a kanonikus γ -TuRC is jelen van a poszt-meiotikus spermatidákban. A GFP-Grip163 lokalizációja a bazális test/CA-hoz felvetette a további kanonikus γ -TuRC tag jelenlétét a későbbi fejlődési stádiumokban. Ennek eldöntésére a Grip84 fehérje nyomonkövetését választottuk, amely a γ -TuSC tagja és rendelkezik tesztisz-specifikus paralóggal is. A CRISPR technológia segítségével a Grip84 génről átíródó mind az 5 potenciális izoformát internálisan, *in vivo* a saját genomi környezetében jelöltük a GFP-vel. A *GFP-Grip84* normális életképessége és termékenysége bizonyítékul szolgált arra, hogy a GFP-riporter fehérje nem változtatja meg a *Grip84* normális működését, hiszen a *Grip84* klasszikus mutánsa letális (Bourbon et al. 2002) (38. ábra B).



38. ábra A GFP-Grip163 lokalizációja a spermatogenezis során. (A-C) Az endogén jelölt GFP-Grip163 kolokalizálódik a γ -Tubulinnal a centroszómán és a bazális testen a spermatogenezis során (nyílak). **(D, E)** A GFP-Grip163 ezen felül lokalizálódik a megnyúló sejtmagok apikális csúcsához (D kis kiemelt négyzet), a megnyúló mitokondriumok közelébe (nyílhegyek). **(E)** A t- γ -TuRC tag HA-t-Grip91 a GFP-Grip163-mal együtt lokalizálódik a poszt-meiótikus stádiumokban. (mérce: 10 μ m)

Megállapítottuk, hogy a GFP-Grip84 a spermatociták centroszómáihoz, bazális testjeihez, valamint a poszt-meiotikus MTOC-khez is lokalizálódik, hasonlóan a GFP-Grip163-hoz és a t- γ -TuRC tagjaihoz (42. ábra A-E). A GFP-Grip84 centroszómális lokalizációja mellett a spermatociták citoplazmájában is erős GFP jelek voltak detektálhatók, amelyek eloszlása a t-ER-Golgi-egységekre jellemző (42 ábra B., 43. ábra A-C). Ismert, hogy az emlős sejtekben a Golgi-apparátus a centroszóma környezetében szerveződik össze ún. szalagszerű struktúrává

(Allan et al. 2002). A Golgi-szerveződés *Drosophilában* speciális, ugyanis a szétszóró Golgi-egységek a transz-ER helyek (t-ER-Golgi) közvetlen közelében találhatók, függetlenek a szomatikus sejtek centroszómáitól (Kondylis and Rabouille 2009). A GFP-Grip84 t-ER-Golgi lokalizációjának igazolásához a GM130 cis-Golgi, valamint a GCC88 transz-Golgi specifikus antitesteket használtunk immunfestésnél (ábra). A GFP-Grip84 a GM130 cisz-Golgi markerrel együttesen lokalizálódik, ami bizonyítja a GFP-Grip84 t-ER-Golgi felhalmozódását a spermatocitákban (43. ábra A-C).



39. ábra GFP-Grip84 lokalizációja a spermatogenezis során. (A-E) *In vivo* jelölt GFP-Grip84 lokalizálódik mind a centroszómákhoz (A), mind a bazális testekhez (B, C) (fehér nyilak), és a poszt-meiotikus megnyúló cisztákban a GFP-Grip84 lokalizálódik (D) a megnyúló sejtmagok apikális csúcsához is (piros nyilak). (C, D) Emellett megfigyelhető a megnyúló mitokondriumok körül (narancssárga nyílhegyek). (C) A spermatocitákban a GFP-Grip84 Golgi-szerű lokalizációja figyelhető meg (fehér nyílhegyek). (F, G) A GFP-Grip84 a meiózis előtt a spermatociták centroszómáihoz lokalizálódik (kék nyilak), a meiózist követően a spermatidákban átfedő lokalizációt mutat a t-Grip84-mCh-vel a bazális testnél (fehér nyilak) és a megnyúló sejtmagok apikális csúcsánál (piros nyilak) (mérce: 20 μ m).

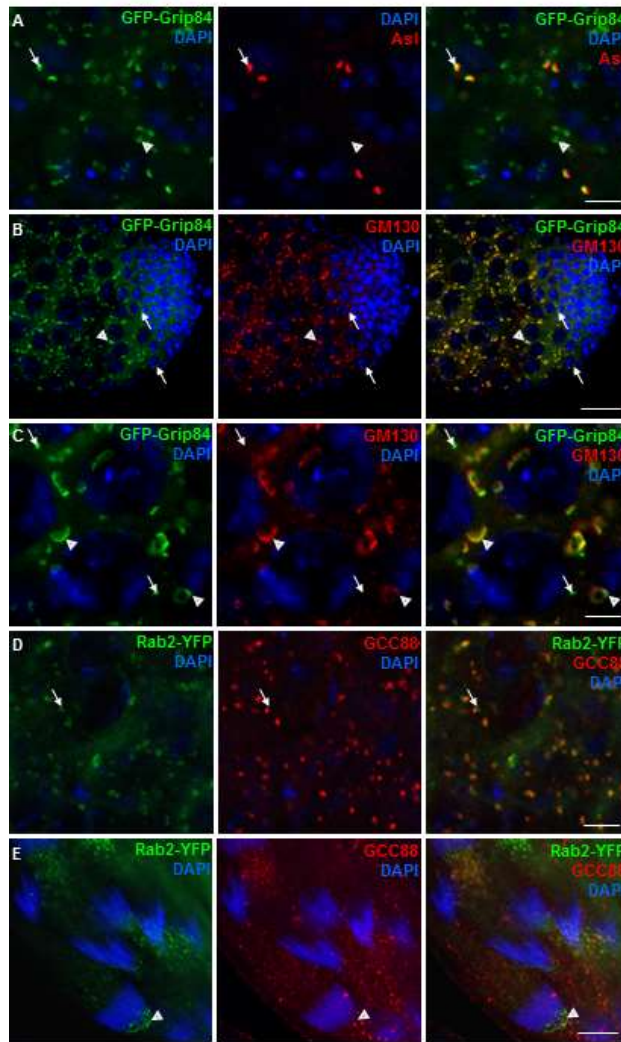
A Rab GTPázok effektorfehérjéinek átfogó meghatározása során a Grip84, a Grip91 és a γ -Tubulin egyaránt a Golgi-lokalizált Rab2 és Rab4 interakciós partnereként lettek azonosítva GST pull-down kísérletekben *Drosophila* S2 sejtek lizátumából (Gillingham et al. 2014). A Rab2A és Rab2B fehérjéről kimutatták, hogy egerekben nélkülözhetetlenek az akroszóma kialakulásához és a hímek fertilitásához (Morohoshi et al. 2021), ezért indokoltnak tűnt megvizsgálni, hogy a Rab2 a Golgi lokalizáció mellett jelen van-e a megnyúló poszt-meiotikus

spermatidák sejtmagjának apikális végén, ahol az akroszóma és a γ -TuRC-t tartalmazó ncMTOC is megtalálható. A Rab2-YFP transzgen segítségével a Rab2 fehérjét a t-ER-Golgin és a megnyúlt spermatidák apikális végén is detektáltuk (43. ábra D-E). A GFP-Grip84 lokalizációja a Golgi-apparátusban arra enged következtetni, hogy a *Drosophila* γ -TuSC az emlős γ -TuRC-hez hasonlóan szükséges a Golgi-szerveződéshez, az apikális lokalizációja pedig felveti az akroszóma/apikális ncMTOC kialakításban való részvétel lehetőségét.

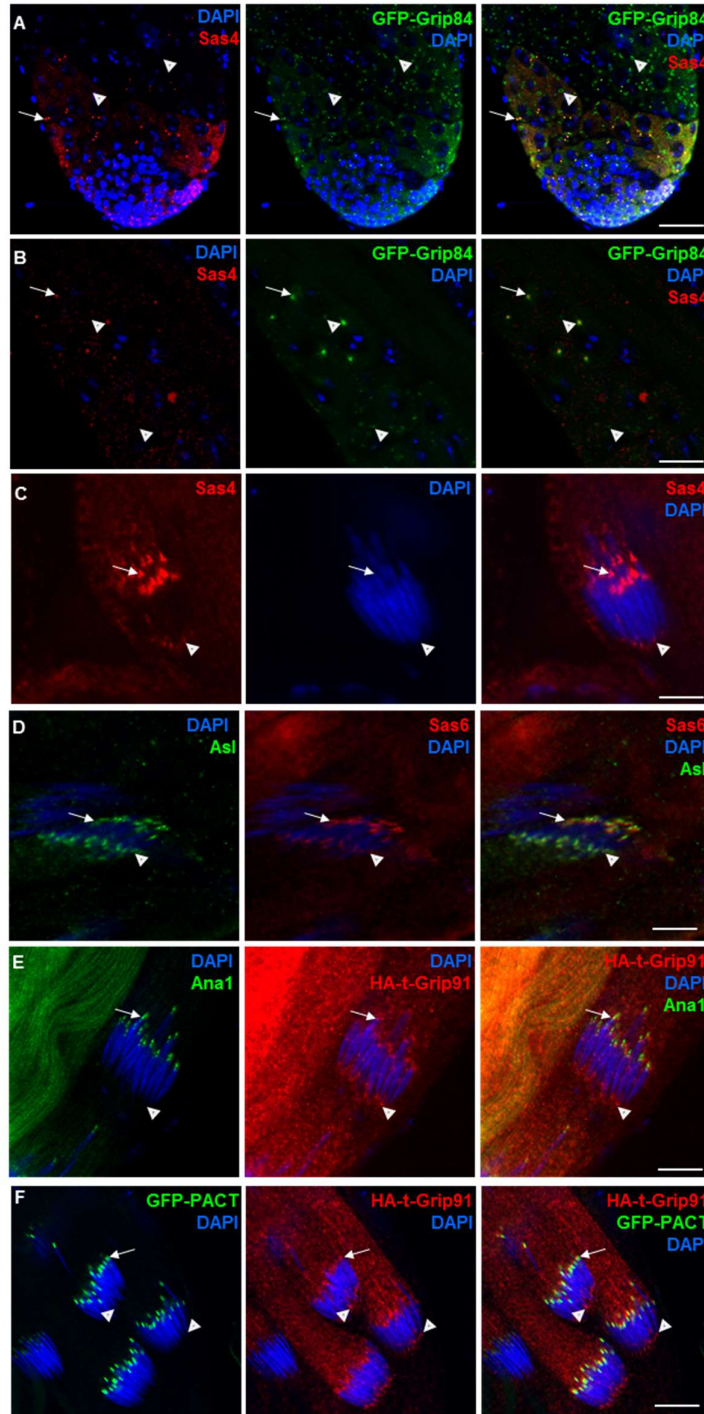
A GFP-Grip84 változatos mintázata arra készítetett minket, hogy megvizsgáljuk a γ -TuRC már ismert kötőpartnereit az újonnan azonosított lokalizációs fókuszokon. A γ -Tubulinról már ismert volt, hogy a spermatidák megnyúló magjainak apikális régiójában lokalizálódik, a sejtmag felszínén jelen lévő mikrotubulusok disztális végénél (Alzyoud et al. 2021; Riparbelli et al. 2020). Megvizsgáltuk a γ -TuRC fehérjék egyik ismert interakciós partnerének, a centriólum komponens Sas4-nek a lokalizációját a megnyúló cisztákban, a fehérjére specifikus ellenanyag segítségével (Gopalakrishnan et al. 2012; Galletta et al. 2016). A Sas4-et a mitotikus spermatociták centroszómáján és a spermatidák bazális teste mellett a meiózist követően a megnyúló spermatidák magjainak apikális csúcsán is detektáltuk (44. ábra A-C).

Mivel a γ -TuRC fehérjék mellett a Sas4-nek több centrioláris kötőpartnere is van, köztük a Sas6, Asl, Ana1 és Dplp (Dzhindzhev et al. 2010; Gopalakrishnan et al. 2012; Galletta et al. 2016; Gopalakrishnan et al. 2011; Guruharsha et al. 2011), ezeknek a fehérjéknek a jelenlétét is teszteltük a poszt-meiotikus sejtmagok apikális csúcsán. A Sas6-ot és az Asl-t a CA és a sejtmagok apikális csúcsán egyaránt detektáltuk, azonban az Ana1 és a GFP-PACT kizárólag a megnyúlt levél és a kenu stádiumú sejtmagok CA régiójában lokalizálódott (44. ábra D-F). Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a sejtmag apikális csúcsára lokalizálódó ncMTOC a γ -TuRC több jól definiált kötőpartnerét is tartalmazza, de a fehérje összetétele eltér bazális testtől.

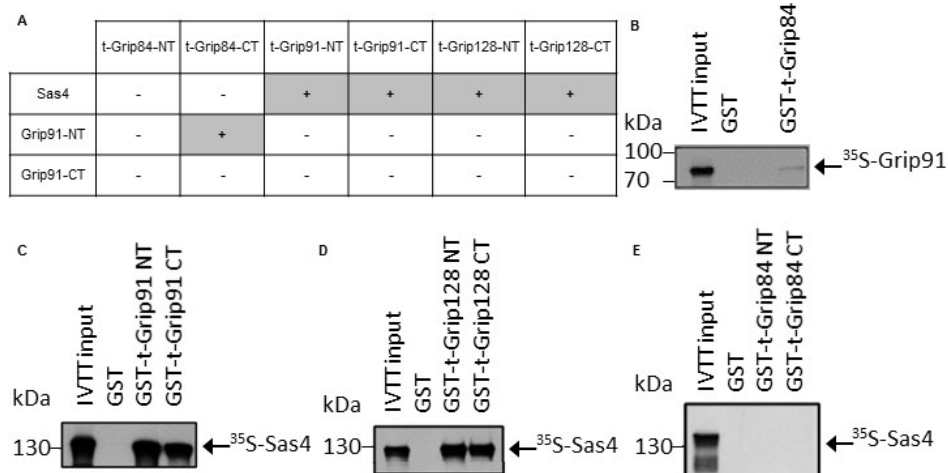
Ezután biokémiaiilag is megvizsgáltuk, hogy az átfedő lokalizációs mintázat mellett fizikai kölcsönhatás is kialakulhat-e a kanonikus γ -TuRC és a t- γ -TuRC illetve a t- γ -TuRC fehérjék és a Sas4 fehérje között. Az élesztő-kéthibrid vizsgálatokkal kölcsönhatást találtunk a t-Grip84-C-terminális és a Grip91-N terminális része között, ami a kanonikus és a tesztisz-specifikus tagokat is tartalmazó, kevert γ -TuRC létezésére utal (45A, 46. ábra).



40. ábra A γ -TuSC fehérje GFP-Grip84 a Golgi-hoz lokalizálódik a spermatocitákban. (A) A GFP-Grip84 kolokalizál a centroszómális Asl fehérjével (anti-Asl ellenanyag festése, fehér nyíl) és a Golgi apparátushoz is (fehér nyílhegy). (B, C) A GFP-Grip84 kolokalizál a GM130 antitesttel festett cisz-Golgi markerrel a spermatocitákban (nyílhegyek). (D, E) A Rab2-YFP a GCC88 transz-Golgi markerrel együtt a Golgi-hoz (nyíl) lokalizálódik a spermatocitákban, valamint a megnyúló sejtmagok apikális végéhez (nyílhegy). (Mérce: A, C, D 10 μ m, B, E 20 μ m).



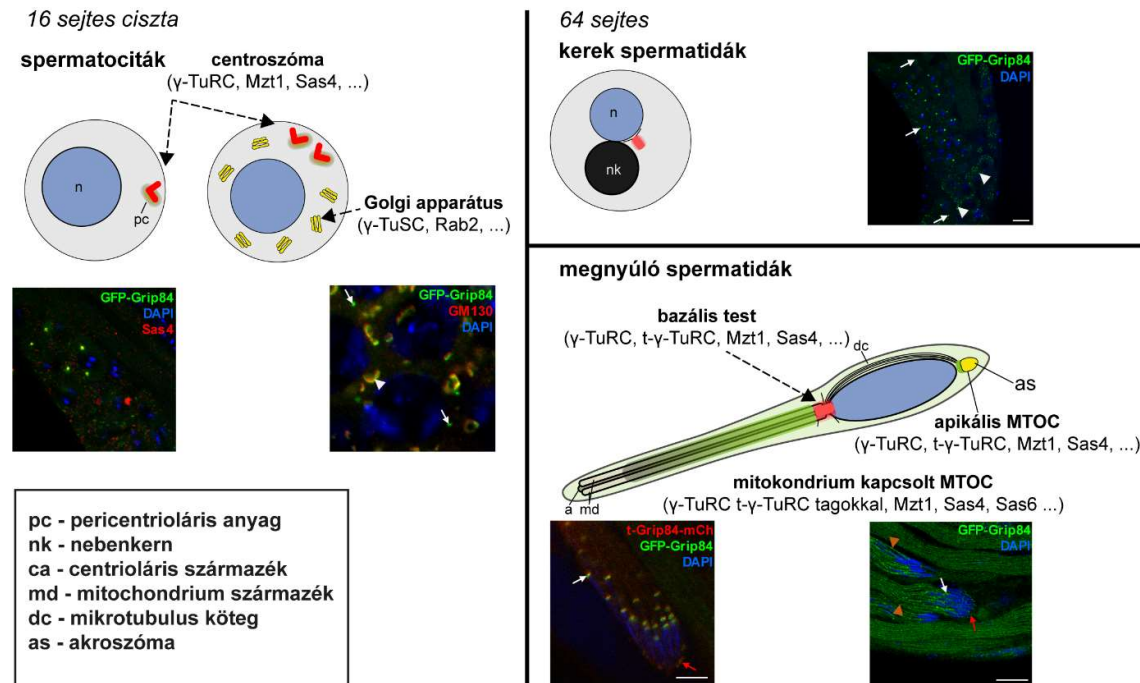
41. ábra A Sas4 a ncMTOC egyik komponense a megnyúló sejtmagok apikális csúcsán. (A, B) A a spermatocitákban a GFP-Grip84 kolokalizálódik az anti-Sas4 ellenanyaggal festett Sas4 fehérjével a centroszómán (nyílak, piros), de a Golgin nem látható Sas4 szignál (nyílhegyek). (C, D) A Sas4 (C, piros), a Sas6 (D, piros) és az Asl (D, zöld) a megnyúló spermatidák bazális testén (nyílak) és ezen felül a sejtmagok apikális csúcsán (nyílhegyek) lokalizálódik a fehérjékre specifikus immunfestést alkalmazva. (E, F) Az antitesttel festett Ana1 (E) és GFP-PACT (F) csak a megnyúló spermatidák bazális testéhez (nyílak) lokalizálódik, míg a t- γ -TuRC komponens HA-t-Grip91 a bazális testhez (nyíl) és megnyúló spermatida apikális csúcsához is (nyílhegyek). (Mérce: 20 μ m).



42. ábra A t- γ TuRC fehérjék kölcsönhatásai a Sas4-gyel és a kanonikus Grip91-gyel. (A) A t- γ -TuRC fehérjék N- vagy C-terminális részeinek (a táblázatban jelzettek szerint) a Sas4-gyel, illetve a Grip91 N- vagy C-terminális részével való kölcsönhatása Y2H-del. **(B-E)** A tisztított és immobilizált GST t- γ -TuRC fehérje fragmentumok és az IVTT reakcióval szintetizált ^{35}S -jelölt Sas4 vagy Grip91 közötti kölcsönhatások vizsgálata kötődési reakciók PAGE-t követő autoradiográfiájával.

A hibrid komplex létezését bizonyítja továbbá a Sas4 és a t-Grip91-N, t-Grip91-C, t-Grip128-N és t-Grip128-C kölcsönhatás is (45. ábra A). Az Y2H eredményeket IVTT eredményekkel is alátámasztottuk (45. ábra B-E). A spermatidákban tapasztalt γ -TuRC/t- γ -TuRC fehérjék és partnerfehérjéinek sejten belüli mintázatai, valamint az *in vitro* kölcsönhatások eredményei együttesen azt bizonyíthatják, hogy valószínűleg a kanonikus és a tesztisz-specifikus γ -TuRC tagokból és a γ -TuRC kötőpartnereiből felépülő ncMTOC-k vannak jelen a megnyúló spermatidákban.

Ezek az eredmények kiemelik és bizonyítják a különböző γ -TuRC-k jelentőségét a különböző MTOC-k szerveződésében a sejtorganellek kiterjedt átrendeződése során a *Drosophila* spermatogenezisben (46. ábra).



43. ábra A spermatogenezis különböző szakaszaiban jelenlévő γ -TuRC/t- γ -TuRC-t tartalmazó MTOC-ok lokalizációjának összefoglalása.

Anyagok és módszerek

A dolgozat terjedelme miatt a kísérletek során felhasznált módszereket vázlatosan írom le, ahol lehet, ott a vonatkozó szakirodalomra hivatkozom.

Sejtenyésztés, RNSi

Drosophila S2 és Dmel2 sejteket (embriókból származó sejtvonalak) Schneider médiumban tenyésztettünk. A sejtek transzfektálását 10 µg dsRNS-szel és 10 µl Transfast-tal (Promega) hat lyukú lemezekben végeztük az általunk kidolgozott protokoll szerint, amely a hivatkozásból elérhető (Bettencourt-Dias et al. 2004).

Drosophila fenntartási körülmények, genetikai vizsgálatok

A felhasznált törzseket a gyűjteményben 18°C-on, a keresztezésekhez 25°C-on tenyésztjük standard táptalajon (szárított élesztő, agar, kukoricadara, búzaliszt, dextróz, nipagin). Az állatok altatása szén-dioxiddal történik.

A fertilitási teszthez 1 hím/nőstényt állatot 4 szűz nőstény/hím állattal keresztezzük normál táptalajon 25°C-on. A keresztezéseket minimum 15 egyedi állattal elvégezzük. A szülőket lerázva 14 nap után megszámloljuk az utódokat. 3 független alkalommal elvégezzük a fertilitási teszteket. A törzseket balanszer kromoszómák segítségével tartjuk fenn.

A transzgenikus törzsek létrehozásához a *Drosophila* embriók injektálását a HUN-REN SZBK Genetikai Intézet Injektáló Szolgálat végezte <https://www.drosophila-injection-facility.com>. Az injektált állatok törzsbeállításához a klasszikus balanszer kromoszómákat használtuk.

Felhasznált *Drosophila* törzsek:

Általános törzsek, sejtservecske specifikus riporterek:

A vad típusnak használt Oregon-R vagy w^{1118} , a klasszikus mutánsok és a balanszer kromoszómák a Bloomington *Drosophila* Stock Center-ből származnak.

Snky-GFP (Wilson et al. 2006), *GFP-PACT*, (Martinez-Campos et al. 2004),

Lamp1-GFP, (Pulipparacharuvil et al. 2005), *bam-Gal4* (Chen and McKearin 2003),

P(His2Av-EGFP.C2), *P(protamineB-eGFP)*. (Raja and Renkawitz-pohl 2005),

w^{1118} ; *P{DJ-GFP.S}AS1/CyO* (Santel et al. 1998),

y1 v1 P{nos-phiC31\int.NLS}X; *P{CaryP}attP40*

y1, sc1, v1, P{y[+t7.7]=nos-phiC31\int.NLS}X; *P{y[+t7.7]=CaryP}attP2*,

w, P-Tom20-mCherry (Zhang et al. 2016)

Scat jellemzéséhez

scat^l, és a genomi régióra specifikus deléción : *Df(2L)ED680*, *fws^P(fws^{KG02853})*, és a genomi régióra specifikus deléción *Df(2L)ED1175*, (Farkas et al. 2003), GFP-*fws* (Farkas et al. 2003)

Bb8 jellemzéséhez

w¹¹¹⁸;Mi{ET1}CG4434^{MB10362}, és a genomi régióra specifikus deléción *w¹¹¹⁸; Df(3R)Exel9012/TM6B*, *Tb^l*, *w¹¹¹⁸; Df(3R)BSC619/TM6C*, *cu^l Sb^l*,

S-Lap géncsaládhoz

y^l w^{}; Mi{MIC}S-Lap2^{MI14597}*, *y^l w^{67c23}; Mi{ET1}S-Lap3^{MB01319}*, *w¹¹¹⁸; Mi{ET1}S-Lap4^{MB11296}*,
y^l w^{}; Mi{MIC}loopin-1^{MI06848}*, *w¹¹¹⁸; Df(3L)ED4457/TM6C cu^l Sb^l*, *Df(2R)CX1*, *wg¹² b^l*
pr^l/SM1, *w¹¹¹⁸; Df(2R)BSC550/CyO* and *SLap7^{KK105511}*, *S-Lap8^{KK106866}*

γ-TuRC géncsaládhoz

Mi{MIC}CG7716^{MI12921} (58006, BDSC), *Mi{ET1}CG7716^{MB07394}* (26394, BDSC),
Df(3L)BSC375, (24399, BDSC), *Mi{MIC}CG18109^{MI05374}* (42318, BDSC) and *Df(2L)osp29*
(3078, BDSC)

A létrehozott transzgenikus törzsek

Scat jellemzés

w;P{UASp-Scat-RFP}

w;P{tv3-Arl1-mCherry}

w;P{tv3-GFP-Lerp}

Bb8 jellemzés

w; pUAST-5'genomic-bb8^{N100aa}-GFP

w; pUAST- bb8^{genomic rescue}

w; pUAST-bb8^{genomic regulatory region}-Aralar1

w; pUAST-bb8^{genomic regulatory region}-dmGlut

w; pUAST-bb8^{genomic regulatory region}-Gdh

w; pUAST-bb8^{genomic regulatory region}-GLUD1

w; pUAST-bb8^{genomic regulatory region}-GLUD2

S-Lap géncsalád

w; S-Lap1^{Δ7}

w;pUAST-5'upstream-S-Lap-HA^{int}

w;pUAST-5'upstream- S-Lap1-GFP

w;pUAST-5'upstream-S-Lap1^{60aa}-GFP

w;pUAST-5'upstream-S-Lap1 genomi menekítő

w;pUAST-5'upstream-S-Lap6 genomi menekítő

γ-TuRC géncsalád

pCFD4-Grip128-gRNA

w;pUAST-5'upstream-t-Grip84-mCh,

w;pUAST-5'upstream-t-Grip84-GFP,

w;pUAST-5'upstream-3xHA-t-Grip91,

w;pUAST-5'upstream-3xHA-t-Grip128

w;pUAST-5'upstream-GFP-Mzt1

w;pUAST-5'upstream-γ-Tub23C-GFP

w;pCFD5-Grip163-gRNA

w;pCFD5-Grip84-gRNA

w;Grip163^{Δ11}

w,GFP-Grip163 (in vivo genomi jelölés)

w,GFP-Grip84 (in vivo genomi jelölés)

Biokémia módszerek

A Western blot kísérletekhez 1xLaemmli pufferben denaturált fehérjemintákat SDS-PAGE segítségével frakcionáltuk és PVDF-membránra vittük át. 0,1% Tween-20-at tartalmazó TBST-ben mostuk a membránt. A blokkolást és az antitest inkubációt majd 5% sovány tejport tartalmazó TBST pufferben végeztük. Az elsődleges antitestekkel 25°C-on 2 órát inkubáltuk membránt, majd 3x15 percig mostuk TBST-ben. A HRP-hez kötött másodlagos antitesteket (Millipore) 1:5000 hígításban használtuk. Az antitestekkel történő inkubációt követően a membránokat TBST-ben mostuk, majd ECL kit-et (GE Healthcare) használva röntgenfilmen detektáltuk a jelet.

Leucin-aminopeptidáz aktivitás mérése

10 hímiből boncoltunk tesztiszt PBS-ben és 400 µl inkubációs pufferben (50 mM HEPES pH 7,4, 1 mM MnCl₂, 1 mM DTT) szonikáltuk, majd 15000 rcf-en 4°C-on centrifugáltuk. A bakteriálisan expresszált és tisztított rekombináns His-Grsm, His-S-Lap1 és His-S-Lap6 fehérjék azonos mennyiségét használtuk fel egy *in vitro* aminopeptidáz vizsgálatban. A leucin aminopeptidáz aktivitást 100 µl here felülúszóból vagy tisztított fehérjéből, 100 µM L-Leu-AMC (Sigma-Aldrich) hozzáadása után, 460 nm-en (340 nm gerjesztés) fluoreszcens emisszióval mértük FLUOstar OPTIMA Plate Reader segítségével.

Glutamátszint mérés

A glutamát szintjét Amplex Red glutaminsav/glutamát oxidáz assay kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével mértük a gyártó utasításai szerint. Minden egyes mintához 10 pár tesztiszt boncoltunk 1-2 napos hímekből, és a mintákat folyékony nitrogénben tároltuk. A tesztiszteket 200 µL 0,5M Tris-HCl, pH 7,5-ben szonikálással homogenizáltuk. Minden genotípust legalább négy biológiai mintával képviseltünk, és minden mintát duplikátumban vizsgáltunk. A 96 lyukú lemezekben minden reakcióhoz 50 µL mintát használtunk, amelyeket 37°C-on inkubáltunk 15 percig. A fluoreszcenciát Synergy HTX multi plate readerrel mértük. A koncentrációkat a 0 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM és 20 µM-os kalibrációs görbékhez viszonyítva állapítottuk meg. A koncentrációkat egy pár tesztisztre normalizáltuk.

Immunfestés

Az S2 sejtek fixálása 4%-os formaldehidben történt 12 percig 25°C-on a festési procedura a fixálást követően megegyezett a tesztiszteknél használttal. A tesztiszteket un. tesztisz pufferben boncoltuk (White-cooper 2004). A tesztiszte az alkalmazott ellenanyagtól függően 4%-os formaldehidben (12 percen keresztül 25°C-on) vagy metanol/acetone keverékében (5 perc -20°C) voltak fixálva. 3xPBS-es mosást követően vagy közvetlenül festettük a mintákat sejtorganellum specifikus festékekkel vagy blokkoltuk őket (5% BSA-PBS+0.1% TritonX100).

Az elsődleges ellenanyaggal 4°C-on inkubáltuk a mintákat egy éjszakán keresztül. 3-szor mostuk PBS-0,1%Triton X100-as pufferrel, majd a másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk a mintákat. PBS-0,1%Triton X100 mosást követően a sejtmagokat DAPI-val festettük. A mintákat SlowFade Gold reagensbe ágyazva tettük tárgylemezre.

Ellenanyagok:

ellenanyag /festék	hígítás	Source	eredetr	fixálási mód
Anti-HA (rat)	1:100 1:1000WB	Sigma-Aldrich/Roche	Cat#11867423001	Formaldehid
Anti-Sas4 (rat)	1:500	(Fu et al. 2016)		Metanol-aceton
Anti-Sas6 (rat)	1:500	(Dzhindzhev et al. 2014)		Metanol-aceton
GM130 (rabbit)	1:500	Abcam	ab30637	Formaldehid
GCC88 (G. pig)	1:100	(Jones et al. 2008)		Formaldehid
Anti-GFP (rabbit)	1:500	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-11122	Metanol-aceton
anti-pan polyglycylated Tubulin Axo49 (egér)	1:5000	Sigma-Aldrich/Merck	Cat#MABS276	Formaldehid
anti-γ-Tubulin (egér)	1:5000	Sigma-Aldrich/Merck	Cat#T6557	Formaldehid
anti-Ana1 (nyúl)	1:5000	(Fu et al. 2016)	-	Formaldehid
anti-Asl (nyúl)	1:1000	(Dzhindzhev et al. 2010)	-	Metanol-aceton
Anti-Scat (tengeri malac)	1:200 IF 1:2000WB	(Fári et al. 2016)		Formaldehid
anti-béta-tubulin E7 egér	1:1000	Developmental Studies Hybridoma Bank		Formaldehid
anti-S-Lap1 egér	1:1000	(Laurinyecz et al. 2019)		
anti-His antitest	1:3000	Invitrogen,	MA1-21315	
anti-ATP5α egér	1:200	Abcam	15H4C4#ab14748	
tengeri malac Alexa Fluor 546 másodlagos	1:400	ThermoFisher	Cat#A-11074	
egér Alexa Fluor 488 másodlagos	1:400	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-11029	
egér Alexa Fluor 546 másodlagos	1:400	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-11030	
egér Alexa Fluor 633 másodlagos	1:400	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-21052	
patkány Alexa Fluor 488 másodlagos	1:400	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-21208	

patkány Alexa Fluor 568 másodlagos	1:400	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-11081	
nyúl Alexa Fluor 488 másodlagos	1:400	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-11008	
nyúl Alexa Fluor 546 másodlagos	1:400	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-11010	
4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (DAPI)	1 µg/ml	Thermo Fisher Scientific	Cat#D1306	

Mikroszkópos technikák

A képeket Olympus FLUOVIEW Fv10i konfokális mikroszkóp (Olympus FW10-ASW 04.02) vagy Olympus BX51 fluoreszcens mikroszkóp (Olympus cell A 3.3 szoftver) segítségével készítettük. A képeket GIMP 2.8.6 programmal dolgoztuk fel, és az AXO49-pozitív ciszták hosszát ImageJ szoftverrel mértük.

A tesztszekek elektronmikroszkópos elemzését Prof Juhász Gábor laborjában Dr Kovács Attila (ELTE, Anatómiai és Sejtbiológiai Tanszék) és Dr. Szögi Titanilla (SZTE ÁOK, Patológiai Intézet) kutatókkal kollaborációban végeztük. Mind a hagyományos, mind az immunoelektronmikroszkópiához a tesztszeket felboncoltuk és egy éjszakán át 4°C-on 3,2% paraformaldehidben, 1% glutaraldehidben fixáltuk. Másnap 1% szacharózt, 0,028% CaCl₂-t tartalmazó 0,1 N nátrium-kakodilátban (pH =7. 4), alaposan átmostuk a tesztszeket, majd 1 órán át 0,5%-os ozmium-tetroxidban posztfixáltuk, és a gyártó ajánlásainak megfelelően Durcupan (Fluka) gyantába ágyaztuk. A hagyományos EM-hez 70 nm-es metszeteket vágunk, Reynold ólom-citrátban festettük meg, és egy Morada kamerával és iTEM szoftverrel (Olympus) felszerelt JEM-1011 (JEOL) vagy JEOL JEM 1400 elektronmikroszkóppal vizsgáltuk (JEOL, Tokyo, Japan) értékeltük ki.

Statisztikai analízis

A boxplotok több kísérletet ábrázolnak, ahol az egyes kísérletek utódainak számát 0 és 100 között min-max normalizáltuk. A szignifikancia meghatározásához a Welsch-féle szignifikancia tesztet használtuk. A grafikonokat és a kapcsolódó statisztikai elemzéseket a Python 3.0 programmal készítettük a NumPy, Pandas, Seaborn és SciPy könyvtárakkal.

Élesztő két-hibrid vizsgálatok

Az élesztő kéthibrid vizsgálatot a Matchmaker kéthibrid rendszer (K1605, Clontech) segítségével végeztük. Az egyik csalit pGBT9: a t-Grip91 és a teljes hosszúságú γ-Tub23C N- és C-terminális részei és a pGAD424: a t-Grip84, t-Grip91, t-Grip128, teljes hosszúságú Mzt1

és γ -Tub23C N- és C-terminális részei pGAD424 prédák egyikével együtt transzformáltuk PJ69 élesztősejtekbe (James et al. 1996). Az egyes kolóniákat triptofánt és leucint nem tartalmazó élesztő lemezekre szélesztettük (Y0750, Merck) egymást követően 3-szor. Növekedés után a kölcsönhatásokat triptofán-, leucin-, hisztidin- és adeninhányos (Y2021, Merck), 10 mM 3-amino-1, 2, 4-aminotrizol (3-AT) (A8056, Sigma) tartalmú négyszeres auxotróf lemezekon vizsgáltuk (Y2021, Merck).

IVTT

Az IVTT kísérletek Dr Lipinszki Zoltán csoportjával (HUN-REN Biokémiai Intézet) kollaborációban történtek. Az IVTT kísérletekhez a vizsgálni kívánt fehérjét kódoló fragmentumokat GST-fúziós pDEST15 (Thermo Scientific) illetve pJet1.2 (Thermo Scientific) vektorokban Gateway vagy GIBSON assembly klónozás segítségével készítettük el. A direkt szekvenálást követően a GST fúziós fehérje tisztítása és az IVTT interakciós kísérletek a már publikált protokol alapján történtek (Karman et al. 2020).

Filogenetikai analízis

A metazoa fehérje szekvenciákat (S-lap, glutamát dehidrogenázok) az OrthoDB v10.1-ből töltöttük le az elérhető fajokra. A filogenetikai fákat az NGPhylogeny.fr weboldal (MAFFT alignment, BMGE alignment curation és FastME Tree inference) segítségével építettük fel. Az adatokat ezután iTolba exportáltuk a további vizualizációs lehetőségekhez. A SNAP-elemzésekhez a clustalW kodon-illesztést (MegaX) használtuk a Drosophilidae 13 *Bb8* és 11 *Gdh*-szerű génjének CDS-ére. A szinonim és nem szinonim szubsztitúciók vizsgálatához az online SNAP v2.1.1.1 szervert használtuk (www.hiv.lanl.gov)(Korber et al., 2000).

Fehérje szerkezeti modellezés

Az *in vivo* internális riporter jelöléshez vagy a helyspecifikus mutagenizáláshoz a fehérjék szerkezeti modelljét (S-lap1, Bb8, Gdh, GLUD1, GLUD2, Grip163, Grip84) AlphaFold 2.0 online elérhető program segítségével vizualizáltuk.

Az intracelluláris lokalizációs szignál elemzését a Predotar (Small et al. 2004) segítségével végeztük, majd a mitokondriális szignál szekvenciát a MitoFates (Fukasawa et al. 2015) segítségével határoztuk meg. Az összehasonlító szerkezeti modellezést az UCSF Chimera (Pettersen et al. 2004) és a Modeller (Sali and Blundell 1993) segítségével végeztük.

In situ hibridizáció

A cDNS-t vad típusú tesztiszekből izoláltuk és PCR segítségével amplifikáltuk a próbaként használt templátot (900-10009 bp), amelyet tisztítás után a DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche) segítségével (a gyártó utasításai szerint) használtuk a szintéziséhez (nem kódoló és kódoló szálra specifikus próbákhoz). Az *in situ* hibridizációt a White-Cooper által korábban

leírtak szerint végeztük a következő eltérésekkel: a hibridizációs puffer további 100 µg tRNS-t (Sigma) tartalmazott. Negatív kontrollként sense DIG-jelölt *bb8* RNS-t használtunk, amellyel nem találtunk festődést (S1 D ábra).

Lipidomika

A lipidomikai vizsgálatokat a Prof. Víg László (HUN-REN Biokémiai Intézet) kutatócsoportjával kollaborációban történtek Dr Balogh Gábor és Péter Mária segítségével. A lipidek kivonásához ismétlésenként öt párt tesztiszt használtunk. Minden genetikai háttérben öt független ismétlést elemeztünk. A tesztisz mintákat 400 ml metanolban (amely 0,001% butilált hidroxitoluolt tartalmazott antioxidánsként) 5 percig szonikáltuk, majd további 5 percig rázattuk, végül 5 percig 13 000 fordulatszámra centrifugáltuk. A felülúszót új Eppendorf-csőbe töltöttük, és -80°C-on tároltuk a tömegspektrometriás elemzésig. A lipid standardokat az Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) cégtől szerezték be. Az extrakcióhoz és a tömegspektrometriai elemzésekhez használt oldószerek a Merck (Darmstadt, Németország) folyadékkromatográfiás minőségű, illetve a Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) Optima LCMS minőségű oldószerei voltak.

Proteomika

A proteomikai elemzéshez a mintakészítés során 10 napos legyek 50 szeminális vezikulumát vagy 20 pár tesztiszt boncoltunk és homogenizáltunk 100 µl módosított RIPA pufferben (140 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 1% Triton-X-100, 0,1% nátrium-deoxikolát, 1% nátrium-dodecil-szulfát (SDS), 1 mM PMSF). A sejtörmelék 2000 rpm-en 2 percig pelletáltuk, majd a felülúszót 15000 rpm-en 15 percig 4°C-on centrifugáltuk, eltávolítottuk és 20 µl 6xLaemmli mintapufferben vettük fel. Az oldhatatlan pelletet kétszer mostuk 0,75 M Tris-HCl-lal (pH 7,6) és 15 percig 15000 rcf-en centrifugáltuk, majd 120 µl 1xLaemmli pufferben szuszpendáltuk. A mintákat 10%-os SDS poliakrilamid géleken (Bio-Rad) választottuk szét. A proteomikai elemzéshez a gél Coomassie Brilliant Blue-val festettük, majd 40%-os etanol és 10%-os ecetsav keverékével defestettük. Az oldható és az oldhatatlan minta 50-65 kDa régióját a gélben emésztették (Migh et al. 2018). A proteomikai vizsgálatokat a Dr. Darula Zsuzsannával (HUN-REN Biokémiai Intézet) kollaborációban történtek. Az MS-spektrumokat az Orbitrapban (felbontás: 60000), az MS/MS-spektrumokat a lineáris ioncsapdában vették fel. A nyers adatokat a PAVA szoftverrel (Guan et al. 2011) csúcslistákká konvertáltak, és a ProteinProspector keresőmotorral (v.5.16.0) az UniProt adatbázisban (2015.12.14 letöltés) a *Drosophila melanogaster* fajkorlátozással (42462 fehérjeszekvencia) kerestek.

Transzkriptomika

Oregon-R-t használtuk vad típusú törzsként. Az szeminális vezikulum nélküli testiszeket jégen hűtött PBS-ben boncoltuk ki az állatokból, majd 0,25 mm átmérőjű rovartüvel leválasztottuk a herék apikális (200), középső (150) és bazális (150) régióját, és mikrocentrifugacsövekbe helyeztük át a darabokat, amelyeket minden 10 herét követően folyékony nitrogénben lefagyasztottunk. Az összevont testisz régióból származó mintákból a ReliaPrep RNA Miniprep Sytem (Promega) segítségével a gyártó ajánlásait követve totál RNS-t izoláltunk. A transzkriptomikai analízist Dr. Bodai László csoportjával kollaborációban végeztük (SZTE TTIK Molekuláris Biológiai és Biokémiai Tanszék) Az RNS minőségét kapilláris gélelektroforézissel ellenőrizték Bioanalyzer 2100 műszerben (Agilent) az Agilent RNA 6000 Nano Kit használatával, majd az RNS koncentrációját fluorometriás méréssel határozták meg Qubit 2.0 fluorométerrel (Thermo Fisher Scientific) a Qubit RNA HS Assay kit használatával. Az indexált RNA-Seq könyvtárakat 800 ng teljes RNS-ből állították elő a TruSeq RNA Library Prep Kit v2 (Illumina) segítségével, a gyártó által megadott TruSeq RNA Sample Prep v2 LS protokollt követve. Ez röviden összefoglalva magában foglalja a poli(A) mRNS tisztítását oligo-dT mágneses gyöngyökkel, RNS-fragmentálást, kettős szálú cDNS szintézisét SuperScript II reverz transzkriptázzal (Invitrogen), indexált Illumina-adapterek ligálását és korlátozott ciklusú PCR-rel történő amplifikációt. A szekvenáló könyvtárakat kapilláris elektroforézissel validálták az Agilent DNA 1000 kit segítségével a Bioanalyzer 2100 műszerben, majd a Qubit dsDNS HS Assay Kit segítségével kvantitálták a Qubit 2.0 műszerben és a KAPA Library Quantification Kit (KAPA Biosystems) segítségével egy Piko-Real Real-Time PCR rendszerben (Thermo Fisher Scientific). A 4 nM szekvenáló könyvtárakat összevonták, 0,1 M NaOH-val denaturálták, majd hígítás után végezték a szekvenálást Illumina MiSeq szekvenálóval a MiSeq Reagent Kit V3-150 használatával. Az elsődleges szekvenciaelemzést a BaseSpace felhőalapú számítástechnikai rendszer segítségével végezték. A FastQ fájlokat a Dmr6.05 *Drosophila melanogaster* referencia genomhoz igazítottuk a TopHat v2.0.9. segítségével, majd a génexpressziós elemzést a Cuffdiff v2.1.1. segítségével végeztük el. A különbözően felhalmozódott transzkriptek kiválasztása a testisz három vizsgált régiójának páros összehasonlításával történt. A szignifikáns különbségeket mutató géneket (a p-értékek 0,05-nél kisebbek, a Benjamini-Hochberg módszerrel végzett többszörös összehasonlítások korrekciója után) különböző kifejeződésűnek tekintettük.

Összegzés

Az új eredmények összefoglalása

A *Drosophila melanogaster* modell a sejtbiológiai és fejlődésbiológia folyamatok klasszikus genetikai, molekuláris genetikai és biokémiai tanulmányozását teszi lehetővé. A reverz genetikai módszerek felfedezésével lehetőségünk van az RNS interferenciát és a CRISPR technológiát egyaránt sejttenyészetekben és stabil transzformánsok alkalmazásával genetikailag módosított állatokban alkalmazni. A fejlődésbiológia egy fontos kérdése a szervek kialakítása során az egyes sejttypusok specializációját irányító és meghatározó fehérjék azonosítása, azok feladatának megértése. Az ivarsejtképződés tanulmányozása alapvető sejtbiológiai folyamatoknak, mint a mitotikus és meiotikus sejtosztódás szabályozásának, a sejtorganellumok kialakulásának, specializációjának és vándorlásának vizsgálatára, valamint az ivarsejt és szomatikus sejtek közötti morfológiai és molekuláris különbségek vizsgálatára is alkalmas.

A sejtek közötti és a sejteken belüli kommunikáció fontos komponensei az eukariótákban a membránok által határolt sejt szervecskék. Ezek dinamikus mozgása és egymásba alakulása hozzájárul a sejtosztódástól az autofágián át a szignalizációs folyamatok szabályozásáig. A reverz genetikai technológiák felfedezésével és alkalmazásával, mint az RNS interferencia, lehetőség nyílt egyes géncsoportok vagy akár a genom teljes fehérje kódoló részének a funkció vesztéses vizsgálatára. A sejt ciklus szabályozásában kulcsfontosságú kinázok és foszfatázok szisztematikus vizsgálatával bebizonyítottuk, hogy az RNS interferencia egy sejtekben egyszerűen és hatékonyan alkalmazható módszer fenokópiák létrehozására és azt követően sejtbiológiai vizsgálatokra. Az RNS interferenciát felhasználva a membrántranszport folyamatokban kulcsfontosságú gének azonosítására és tanulmányozására is lehetőségünk volt. Ebben a szisztematikus analízisben számos, a vezikula transzportban szerepet játszó gént azonosítottunk és jellemztünk. Ezek közül különösen érdekesnek bizonyultak a vezikulák membránfelszínhez történő kihorgonyozását elősegítő nagy méretű coiled-coil fehérjék, a Golginok. Megállapítottuk, hogy a Golginok változatos módon kapcsolódnak kis GTPáz fehérjékkel és kihorgonyzó komplexekkel. Munkánk során kimutattuk, hogy a Golginok (dGCC88, dGolgin-245 és dGolgin-97, dGCC185, dGMAP, dGM130) több az Arl és Rab típusú kis GTPáz kötésére is képesek, amely egy szelektívebb, de ugyanakkor specifikus membránkapcsolódását teszi lehetővé ezeknek a nagy fehérjéknek és rajtuk keresztül a szállított vezikulának. A kis GTPáz interakciós partnerek biokémiai azonosítása során számos

kulcsfontosságú, új fehérje-fehérje kapcsolatot tártunk fel, amelyek az Golgi, az endoszómális rendszer és az endoszóma-lizoszóma kapcsolatok és átalakulások jobb megértéséhez vitt közelebb bennünket. Ezek a vizsgálatok sarkalltak bennünket a membrántranszport folyamatok vizsgálatára a spermatogenezis során, hiszen ismert volt, hogy jelentős endomembrán átalakulások zajlanak a meiózist követően, különösen a spermatidák megnyúlásakor. A GARP és a COG komplex vizsgálatával megállapítottuk, hogy a retrográd membrántranszport elengedhetetlen a sejtmagok megnyúlásához és a specializált Golgi, az ún. akroblaszt, illetve az abból származó akroszóma kialakításához. Munkánk során azonosítottuk a membránok kialakításához szorosan kapcsolható, lipid bioszintézisben szerepet játszó *CdsA* gént és leírtuk a PA szintjének megemelkedését a *CdsA^{ms}* mutánsban. Megállapítottuk, hogy a meiózist követő transzkripcionális inaktivitás miatt a sejtek valószínűleg nem képesek a megemelkedett PA-szintet kompenzálni a *CdsA^{ms}* mutánsban a dPIszintáz és más faktorok mennyiségének növelésével, és feltételezzük, hogy a PA a belső membránokba beépülve azok felületét megnöveli, ami spermatidák fejlődését leállítja.

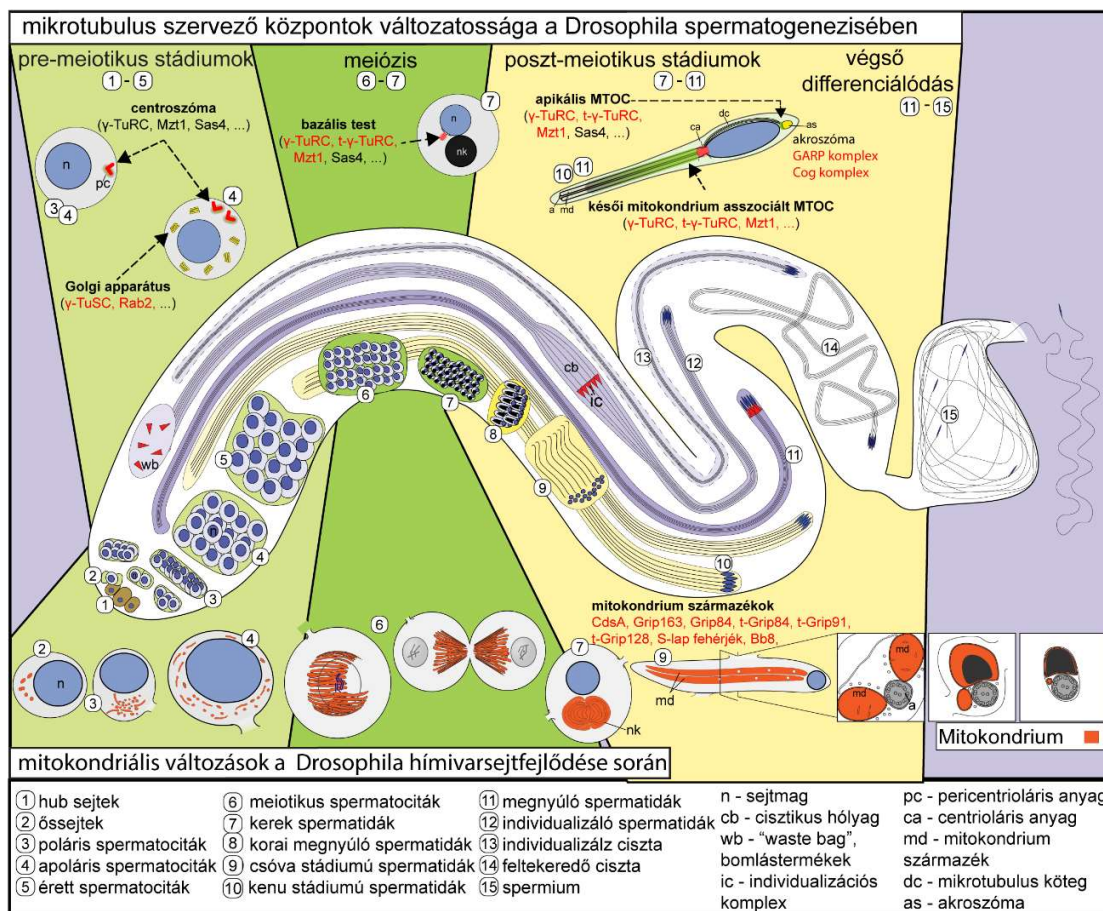
A meiózist követően a spermatidákban megfigyelhető sejtorganellum átalakulások jelentős mértékben tesztisz-specifikus géntermékek közreműködésével történnek. Mindazok a géntermékek, amelyek hozzájárulnak a haploid, közel 1.8mm-es spermatidák fejlődéséhez, a meiózist megelőzően íródnak át és RNS-ek vagy fehérjék formájában vannak jelen a fejlődés poszt-meiotikus stádiumaiban. A meiózist követően a kromatin kompakt, transzkripció csak néhány lókuszt esetében lett kimutatva (Barreau et al. 2008). Ezt figyelembe véve végeztük el a tesztisz régiók transzkriptomikai analízisét. Az RNS szekvenálás során azonosítottunk mintegy 15015 transzkriptet, amelyekről a tesztisz specificitási index és a stádium-specifikusság megállapításával azonosítottuk a különböző géncsoportok általánosan és tesztisz-specifikusan kifejeződő komponenseit. Azonosításra kerültek a protein foszforilációban kulcsfontosságú tesztisz-specifikus kinázok és foszfatázok, valamint a fehérje degradációban jelentős szereppel bíró E2, E3 és DUB fehérjecsalád tagjai. Ezek a gének a késői stádiumokban megfigyelhető, intenzív fehérje lebontás szabályozásáért lehetnek felelősek.

Klasszikus mutánsok hipomorf alléljeinek tesztelésével azonosítottuk és jellemeztük a tumorszupresszor *Ago* gén egy himsteril allélját. Megállapítottuk, hogy, az *Ago* az individualizáció szabályozásában játszik szerepet, ott is feltehetően az irányított fehérjelbontás szabályozásában.

Ismert, hogy a proteaszóma aktivitás elengedhetetlen a nem apoptotikus kaszpáz aktivitás bekapcsolásához, amely a spermatidák egyedivé válása során hozzájárul az érett spermiumban szükségtelen citoplazma alkotók lebontásához (Bader et al. 2011). A transzkriptomikai

adatainkból kirajzolódott, hogy a proteasóma katalitikus és a regulátor alegységeinek tesztisz-specifikus paralógjai a poszt-meiotikus stádiumokban vannak leginkább reprezentálva. A pontos szerkezeti és enzimatis funkciójuk, valamint a tesztisz-specifikus proteasóma szubsztrátjai még azonosításra várnak.

Klasszikus mutánsok analízisével és a transzkriptomikai adatokból is egyértelműen kirajzolódott, hogy a *Drosophila* spermatogenezise során a mitokondriumok működéséhez, szerkezetének kialakításához köthető gének és azok paralógjai nagymértékben hozzájárulhatnak a meiózist követő jelentős morfológiai változásokhoz. A mitokondrium származékai az azokat körülvevő axonéma független mikrotubulusokkal együtt biztosítják a spermatidák megnyúlását, amely egy közel 280-szeres méretnövekedést jelent (Noguchi et al. 2011) (Tokuyasu 1975). A megnyúlással párhuzamosan megváltozik a mitokondriumok belső szerkezete, felhalmozódnak benne a tesztisz-specifikus mitokondriális enzimek és a nagy mitokondrium származékban összeszerveződik a parakristályos anyag, amely a Hexapodák spermiumaiban általánosan jelen van, változatos formában és eloszlásban. Bár a az 1970-es években leírták egy parakristályos anyag felhalmozódását a mitokondrium származékokban, a molekuláris összetevői ezidáig ismeretlenek voltak. Munkánk során azonosítottuk a parakristályos anyag molekuláris összetevői között az S-Lap fehérjecsaládot, amelynek 8 tagja génduplikációk révén keletkezhetett a kanonikus *grms* leucin-aminopeptidázból. Bebizonyítottuk, hogy az S-Lap fehérjék enzimatis aktivitásukat elveszítve neofunkcionalizáció révén szerkezeti funkciót töltenek be a közel 2 mm hosszú nagy mitokondrium származékban. Polimerizációjuk a hexamer szerkeztüknek köszönhetően valósulhat meg, ami filament képzésen keresztül járul hozzá a parakristályos anyag kialakításához. Ez nagy jelentőséggel bírhat, hiszen bizonyos myophátiákban is megfigyelhető a mitokondriumokban parakristályos anyag felhalmozódás, valamint egyre több enzimről is kiderül, hogy filamentek képzésére képesek. (Laurinyecz et al. 2019) (Aughey and Liu 2016) (Stadhouders et al. 1994; Wucherpfennig et al. 2003). A tömegspektrometriai vizsgálataink során az S-Lapok mellett azonosítottuk a Bb8 glutamát-dehidrogenázt is, mint a parakristályos anyag másik fontos alkotórészét.



44. ábra A *Drosophila melanogaster* spermatogenezise során bekövetkező sejtorganelum változások a mikrotubulus szervező központok és a mitokondrium specializációjában szerepet játszó gének feltüntetésével. A folyamatokhoz kapcsolható, általunk jellemzett gének pirossal kerültek kiemelésre.

Szemben az S-lap fehérjékkel, a Bb8 megtartotta enzimátikus aktivitását. Eredményeink azt sugallják, hogy a Bb8 funkciója többértű a spermatidákban, szerkezeti funkciója mellett glutamát dehidrogenáz funkciója is van, ami a mitokondrium identitás meghatározásához járul hozzá. Hiányában mindkét mitokondrium származékban elindul a parakristályos anyag képződése, valamint mitokondrium megnagyobbodás, megamitokondrium képződés tapasztalható. A szomatikus és a tesztisz-specifikus glutamát-dehidrogenáz vizsgálatával, és szerkezeti összehasonlításokkal valamint az emlős homológok vizsgálatával feltételeztük, hogy hasonlóan a *Drosophila*-hoz, az emberben is a két glutamát-dehidrogenáz szövetspecifikusan eltérő funkcióval rendelkezhet. A Glud1 általánosan minden szövetben kifejeződik, míg a Glud2 a tesztiszben és az agyban mutat jelentős transzkriptmennyiséget. A funkcionális hasonlóságot a Glud1 illetve Glud2 hibrid transzgének *Bb8^{ms}* mutáns háttéren történő

menekítési képességének tesztelésével vizsgáltuk meg. Eredményeink felvetették a Bb8 és a Glud2 konvergens evolúció eredményeként keletkezhetett, amelyet fehérjeszerkezeti elemzések és a heterológ menekítési kísérletek is alátámasztottak.

A mitokondriális anyagcsere funkcióval rendelkező gének transzkriptjeinek (oxidatív foszforiláció és citrát ciklus enzimeit) késői stádiumokban történő felhalmozódása, valószínűsíti, hogy az érett spermiumban lévő mitokondrium, egy nem csak formájában és méretében, de az anyagcsereenzimek tekintetében is egy tesztisz-specifikus enzimkészlettel működik.

Végezetül a sejtalkotók sejten belüli mozgásáért felelős sejtváz komponensek vizsgálatával azonosítottuk és jellemeztük γ -TuRC eloszlását, molekuláris összetételét és partnerfehérjéit a spermatogenezis alatt. A spermatociták, spermatidák intenzív sejtváz átalakulásai egy dinamikus változó mikrotubulus rendszert igényelnek mind a sejtosztódási, mind a spermatidák megnyúlási fázisában. Az eddig ismert centroszóma/bazális test szervezésében betöltött funkcion (Vérollet et al. 2006) kívül, a laboratóriumunk eredményeinkből vált ismertté, hogy a γ -TuRC kanonikus és tesztisz-specifikus tagjai egyaránt részt vesznek a sejtmagok apikális végén, valamint a mitokondriumok felszínén szerveződő nem-centroszómális MTOC-k kialakításában. Genetikailag jellemeztük a tesztisz-specifikus γ -TuRC (t-Grip84, t-Grip91, t-Grip128) valamint a kanonikus γ -TuRC komplex Grip163 fehérjéjét. Egy eddig nem ismert alternatív γ -TuSC lokalizációt is elsőként írtunk le a Grip84 gén genomikailag GFP riporterrel jelölt transzgenikus törzsének segítségével. A Grip84 gén internális jelölésének köszönhetően mind az 5 izoforma együttes vizsgálatára lehetőségünk nyílt. Megállapítottuk, hogy a kanonikus Grip84 a Golgi apparátushoz lokalizálódik a primer spermatocitákban. A Golgi lokalizációt megerősítik a korábban a kis GTPázok kötőpartnereinek szisztematikus vizsgálata során kapott eredményeink, ahol a Rab2 GTPáz esetében tömegspektrometriai vizsgálattal azonosítottuk az interakciós partnerek között a γ -TuSC tagjait (Grip84 és Grip91) és magát a γ -Tubulint is *Drosophila* S2 sejt lizátumból. A Rab2 fehérjéről ismert, hogy a Golgihoz lokalizálódik (Tisdale and Balch 1996) és interakciós partnerei között a Golgi lokalizált dGMAP fehérjét mi is azonosítottuk. Az egér Rab2 fehérjéről azonban kimutatták, hogy az akroszóma membránjához kapcsolódik (Morohoshi et al. 2021). Az ismert Golgi lokalizáció mellett a sejtmagok apikális végén, az akroszóma szerveződés helyén is kimutattuk a Rab2 fehérjét, ezért feltételezzük, hogy a *Drosophila* Rab2 fehérjének a Golgiban betöltött funkció mellett az akroszóma kialakításában is szerepe lehet.

Eredményeinkkel közelebb jutottunk a spermatogenezis során bekövetkező sejtservecske átalakulások, specializációk kialakításáért felelős mechanizmusok megértéséhez a résztvevő molekulák azonosításán és jellemzésén keresztül.

Kitekintés

A *Drosophila melanogaster* spermiogenezisének tanulmányozása hozzájárul a sejtorganellumok differenciálódásának jobb megértéséhez, és bővíti ismereteinket a szövetspecifikus fehérje komplexek szerveződésével és azok feladatával kapcsolatban.

A spermiumok szerkezete nagyfokú hasonlóságot mutat az állatok valamint az ember között. A spermiumokban jelenlévő kondenzált sejtmag, az akroszóma, az axonéma jelenléte és a specializált mitokondrium szerkezet általánosnak tekinthető az élővilágban. A szerkezeti hasonlóságok mellett molekuláris szinten is felfedezhetők jelentős hasonlóságok, mint a Hiszton fehérjék protaminra történő kicserélődése, a tesztisz-specifikus proteaszómák jelenléte, valamint az anyagcsere útvonalak ivarsejtekre jellemző specializációja.

Annak ellenére, hogy a specializált mitokondrium szerkezetében kulcsfontosságú parakristályos anyag kialakításához szükséges fehérjék azonosításában, a tesztisz-specifikus mikrotubulusok nukleációjában, a sejtmagi átrendeződésben, a kromatin újraszerveződésében szerepet játszó fehérjék azonosításában előrehaladást értek/értünk el, ezeknek a folyamatok és a spermatidák morfogenezisének más aspektusai még mindig nem teljes mértékben ismertek. Az, hogy milyen energetikai változások zajlanak a poszt-meiotikus mitokondriális specializáció során, illetve, hogy a két mitokondrium származék között a parakristályos anyag felhalmozódásán kívül, egyéb funkcionális különbség is van-e, az a jövő kutatásainak a témája. Hasonlóan a spermatidák megnyúlása során keletkező változatos MTOC-k pontos molekuláris összetétele is meghatározásra vár. Egy másik érdekes, és nagy tudományos érdeklődést kiváltó kutatási terület a hosszú nem kódoló RNS-ek vizsgálata különböző szövetekben, sejtekben, beleértve az ivarsejteket is. A hosszú nem kódoló RNS-ek bár nem kódolnak fehérjét, az azt kifejező sejtekben, szövetekben feltehetően szabályozó funkciót töltenek be. Jelenlétüket kimutatták már a humán spermiumokban is (Joshi and Rajender 2020; Zhao et al. 2021; Kyrgiagini et al. 2022; Zhang et al. 2019). Az általunk elvégzett transzkriptomikai elemzés is megmutatta, hogy *Drosophila melanogaster*-ben, 2061 különböző hosszú nem kódoló RNS fejeződik ki tesztisz-specifikusan. Vizsgálatainkkal párhuzamosan a szakirodalomban számos tanulmány megerősítette az általunk talált hosszú nem kódoló RNS-ek tesztisz-specifitását, de

ezek spermatogenezisben betöltött funkciója még mind a mai napig nem ismert (Wen et al. 2016). Az összehasonlító elemzések lehetőséget adnak a konzervált hosszú nem kódoló RNS-ek azonosítására és azok célzott genetikai és funkcionális jellemzésére *Drosophilában*.

Transzkriptomikai vizsgálatok felhasználásával már azonosítottak olyan konzervált géneket, amelyek egyaránt szerepet játszanak a rovarok és az emlősök spermatogenezisében (Lécureuil et al. 2021; Yu et al. 2023; Sotillos et al. 2022; Yuan et al. 2019). A nagy konzorciumok által elvégzett transzkriptomikai vizsgálatok eredményei szabadon hozzáférhetővé váltak a tudományos közösség számára az elmúlt évek során (Moreno et al. 2022). A transzkriptomikai vizsgálatok azt is kimutatták, hogy az élővilágban általánosan jellemző, hogy a tesztiszben a háztartási géneken kívül tesztisz-specifikus gének is kifejeződnek, biztosítva ezzel a szomatikus sejtektől eltérő sejtosztódáshoz és a spermium specifikus sejtorganellek (axonéma, kondenzált specializált kromatin szerkezettel rendelkező sejtmag, akroszóma, specializált mitokondriumszerkezet/elhelyezkedés) kialakításához szükséges géntermékeket (Guo et al. 2018; Pineau et al. 2019). A tesztisz-specifikus gének nagy evolúciós potenciállal is rendelkeznek, és több elmélet is született arra vonatkozólag, hogy az evolúciósan fiatal gének a tesztiszben fejeződnek ki először, majd ezt követően szereznek új kifejeződési mintázatokat és jelennek meg további szövetekben (Kaessmann 2010; Kondo et al. 2017; Assis and Bachtrog 2013, 2015). Az állatmodellekkel meglévő nagyfokú hasonlóságnak köszönhetően eredményeink kísérletesen is ellenőrizhetők és modellezhetők a jövőben. Az irodalmi adatok alapján széles körben ismert, hogy a férfi meddőség vagy a fertilitás jelentős csökkenése a férfi általános egészségi állapotát is tükrözheti és előjele lehet számos később manifesztálódó betegségnek. Összefüggést találtak a meddőség diagnózisa és a későbbi szív-, anyagcsere- és onkológiai betegségek kialakulásának valószínűsége között (Joseph and Mahale 2021). Hosszútávú célunk azon gének megismerése, számának további bővítése, amelyek a spermatogenezisen kívül a fent említett folyamatok bármelyikéhez köthetők.

Közlemények

A doktori műben bemutatott eredmények az alábbi első vagy utolsó szerős közleményekre alapulnak:

Sinka, R., AK Gillingham, V Kondylis, and S Munro.. “Golgi Coiled-Coil Proteins Contain Multiple Binding Sites for Rab Family G Proteins.” JOURNAL OF CELL BIOLOGY 183 (4): 607–615. doi:10.1083/jcb.200808018. **2008**

Wendler, F*, AK Gillingham*, **R Sinka***, C Rosa-Ferreira, DE Gordon, X Franch-Marro, AA Peden, JP Vincent, and S Munro.. “A Genome-Wide RNA Interference Screen Identifies Two Novel Components of the Metazoan Secretory Pathway.” EMBO JOURNAL 29 (2): 304–314. doi:10.1038/emboj.2009.350. **2010**

*megosztott első szerző

V. Viktor, B. László, G. Gábor, K. Bence, M. B. Imre, L. Barbara, and **S. Rita**, “Analysis of Drosophila melanogaster testis transcriptome,” BMC GENOMICS, vol. 19, no. 1, **2018**. doi: 10.1186/s12864-018-5085-z.

K. Fari, S. Takacs, D. Ungar, and **R. Sinka**, “The role of acroblast formation during Drosophila spermatogenesis,” BIOLOGY OPEN, vol. 5, no. 8, pp. 1102–1110, **2016**. doi: 10.1242/bio.018275.

B. Laurinyecz, M. Péter, V. Vedelek, A. L Kovács, G. Juhász, P. Maróy, L. Vigh, G. Balogh, and **R. Sinka**, “Reduced expression of CDP-DAG synthase changes lipid composition and leads to male sterility in Drosophila,” OPEN BIOLOGY, vol. 6, no. 1, **2016**. doi: 10.1098/rsob.150169.

V. Vedelek, B. Laurinyecz, A. Kovacs, G. Juhasz, and **R. Sinka**, “Testis-Specific Bb8 Is Essential in the Development of Spermatid Mitochondria,” PLOS ONE, vol. 11, no. 8, **2016**. doi: 10.1371/journal.pone.0161289.

B. Laurinyecz, V. Vedelek, A. L. Kovács, K. Szilasi, Z. Lipinszki, C. Slezák, Z. Darula, G. Juhász, and **R. Sinka**, “Sperm-Leucylaminopeptidases are required for male fertility as structural components of mitochondrial paracrystalline material in Drosophila melanogaster sperm,” PLOS GENETICS, vol. 15, no. 2, **2019**. doi: 10.1371/journal.pgen.1007987.

E. Alzyoud, V. Vedelek, Z. Réthi-Nagy, Z. Lipinszki, and **R. Sinka**, “Microtubule Organizing Centers Contain Testis-Specific γ -TuRC Proteins in Spermatids of Drosophila,” FRONTIERS IN CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY, vol. 9, **2021**. doi:10.3389/fcell.2021.727264.

V. Vedelek, A. L. Kovács, G. Juhász, E. Alzyoud, and **R. Sinka**, “The tumor suppressor archipelago E3 ligase is required for spermatid differentiation in Drosophila testis,” SCIENTIFIC REPORTS, vol. 11, no. 1, **2021**. doi: 10.1038/s41598-021-87656-3.

V. Vedelek, B. Vedelek, P. Lőrincz, G. Juhász, and **R. Sinka**, “A comparative analysis of fruit fly and human glutamate dehydrogenases in Drosophila melanogaster sperm

development,” FRONTIERS IN CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY, vol. 11, **2023**.
doi: 10.3389/fcell.2023.1281487.

A doktori műben bemutatott eredmények az alábbi utolsó szerzős (közlés alatti) közlemény adatait is tartalmazzák

E. Alzyoud1, D. Németh, V. Vedelek, T. Szögi, M. Krecsmarik, Z. Lipinszki, **R. Sinka**
Gamma-TuRC proteins contribute to the dynamic organization of MTOCs during *Drosophila* spermatogenesis (BIOARCHIVE 2024.)

A doktori műben bemutatottak az alábbi társszerzős közlemények eredményeit is tartalmazzák:

Bettencourt-Dias M, Giet R, **Sinka R**, Mazumdar A, Lock WG, Balloux F, Zafiroopoulos PJ, Yamaguchi S, Winter S, Carthew RW, Cooper M, Jones D, Frenz L, Glover DM.
Genome-wide survey of protein kinases required for cell cycle progression.
NATURE. **2004** Dec 23;432(7020):980-7. doi: 10.1038/nature03160.

Chen F, Archambault V, Kar A, Lio' P, D'Avino PP, **Sinka R**, Lilley K, Laue ED, Deak P, Capalbo L, Glover DM.
Multiple protein phosphatases are required for mitosis in *Drosophila*.
CURRENT BIOLOGY **2007** doi: 10.1016/j.cub.2007.01.068.

Gillingham AK, **Sinka R**, Torres IL, Lilley KS, Munro S.
Toward a comprehensive map of the effectors of rab GTPases.
DEVELOPMENTAL CELL. **2014** Nov 10;31(3):358-373. doi: 10.1016/j.devcel.2014.10.007.

Egyéb, a doktori műben bemutatottakhoz nem kapcsolódó utolsó szerzős közlemények:

Datki Z, Darula Z, Vedelek V, Hunyadi-Gulyas E, Dingmann BJ, Vedelek B, Kalman J, Urban P, Gyenesei A, Galik-Olah Z, Galik B, **Sinka R**. Biofilm formation initiating rotifer-specific biopolymer and its predicted components.
INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES. **2023** doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.127157.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm a Magyar Tudományos Akadémia, a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal és az EMBO támogatását.

Köszönetemet szeretném kifejezni mindazoknak, akik támogattak tudományos pályafutásom alatt. Erdélyi Miklós (Szegedi Biológiai Központ), David Glover (University of Cambridge, UK) és Sean Munro (MRC-LMB Cambridge, UK) professzorok voltak a mentoraim, ők alapozták meg tudásom, nagyon hálás vagyok nekik.

Tudományos szemléletem formálásához a Raskó István és az általa vezetett Genetikai Intézet rovargenetikai kutatói nagymértékben hozzájárultak. Köszönöm az együttműködésüket és a barátságot, amit irányomban tanúsítottak az elmúlt évtizedek során. Különös köszönet Mihály Józsefnek, Török Tibornak, Gyurkovics Henriknek, Gausz Jánosnak, Kiss Istvánnak, Honti Viktornak, Sipos Lászlónak, Vilmos Péternek, Andó Istvánnak és a rovaros csoportok kutatóinak és technikusainak. Külön szeretném megköszönni Jankovics Ferencnek a sok évtizedes együtt gondolkodást és a barátságát. Szeretném megköszönni Peter Lawrencenek a mentorálását, a sok tudományos beszélgetést, a barátságát és az életszemléletem formálását.

Köszönöm szépen Maróy Péternek, hogy lehetőséget adott a Genetikai Tanszéken a csoportalapításra és támogatását a kutatások beindításánál.

Az értekezésben bemutatott eredmények közvetlen kollégáimnak, diákjaimnak az állhatatos munkájukat, külön kiemelten, Laurinyecz Barbarának, Vedelek Viktornak, Elham Alzyoudnak, Fári Karolinának és Takács Sándornak. Köszönöm Hajduné Tóth Melindának, Török Anikónak, Dosztig Monikának, Apjok Ibolyának és Bogos Orsolyának a technikai és adminisztratív segítséget.

Óriási hálával tartozom Lipinszki Zoltánnak, akinek a biokémiai és sejtbiológia elméleti és gyakorlati tudása és tapasztalata jelentősen hozzájárult munkáink színvonalához.

Szintén köszönet illeti a rengeteg együttműködő kollégát, akik mindig nyitottak voltak a közös munkára. Kiemelt köszönet illeti Juhász Gábort, Kovács Attilát, Ungár Dánielt, Vígh Lászlót, Balogh Gábort, Péter Máriát, Darula Zsuzsannát, Bodai Lászlót, Gácsér Attilát, Papp Tamást és Udvardy Andort. Köszönöm szépen Datki Zsoltnak, hogy megismerhettem a kerekférgekben rejlő tudományos lehetőségeket és a fejlődésbiológiából kicsit kilépve belekóstolhattam a biopolimerek világába.

Hálásan köszönöm családomnak, férjemnek, Kalmár Tibornak, hogy mellettem volt és szakmailag, emberileg is mindvégig támogatott. Köszönöm, hogy meg tudtuk teremteni azt a hátszínét, ami nélkülözhetetlen az alkotó munkához és a boldog családhoz. Köszönöm gyermekeimnek, Petinek és Gergőnek a vidámságot és türelmet, hogy megértők voltak a hosszú napok miatt. Köszönöm szüleim támogatását és végtelen szeretetét.

Hivatkozási lista

- Alavi SMH, Postlerová-Maňásková P, Hatef A, Pšenička M, Pěkníková J, Inaba K, Ciereszko A, Linhart O. 2014. Protease in sturgeon sperm and the effects of protease inhibitors on sperm motility and velocity. *Fish Physiol Biochem* **40**: 1393–1398.
- Aldridge AC, Benson LP, Siegenthaler MM, Whigham BT, Stowers RS, Hales KG. 2007. Roles for Drp1, a dynamin-related protein, and mltin, a kinesin-associated protein, in mitochondrial segregation, unfurling and elongation during *Drosophila* spermatogenesis. *Fly (Austin)* **1**: 38–46.
- Allan VJ, Thompson HM, McNiven MA. 2002. Motoring around the Golgi. *Nat Cell Biol* **4**: E236–E242.
- Alzyoud E, Vedelek V, Réthi-Nagy Z, Lipinszki Z, Sinka R. 2021. Microtubule Organizing Centers Contain Testis-Specific γ -TuRC Proteins in Spermatids of *Drosophila*. *Front Cell Dev Biol* **9**.
- Assis R, Bachtrog D. 2013. Neofunctionalization of young duplicate genes in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci* **110**: 17409–17414.
- Assis R, Bachtrog D. 2015. Rapid divergence and diversification of mammalian duplicate gene functions. *BMC Evol Biol* **15**: 138.
- Aughey GN, Liu JL. 2016. Metabolic regulation via enzyme filamentation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **51**: 282–293.
- Baccetti B, Dallai R, Pallini V, Rosati F, Afzelius BA. 1977. Protein of insect sperm mitochondrial crystals: crystallomitin. *J Cell Biol* **73**: 594–600.
- Bader M, Benjamin S, Wapinski OL, Smith DM, Goldberg AL, Steller H. 2011. NIH Public Access. *October* **145**: 371–382.
- Baker JD, Adhikarakunnathu S, Kernan MJ. 2004. Mechanosensory-defective, male-sterile *unc* mutants identify a novel basal body protein required for ciliogenesis in *Drosophila*. *Development* **131**: 3411–3422.
- Barbosa V, Yamamoto RR, Henderson DS, Glover DM. 2000. Mutation of a *Drosophila* gamma tubulin ring complex subunit encoded by discs degenerate-4 differentially disrupts centrosomal protein localization. *Genes Dev* **14**: 3126–3139.
- Bärenz F, Mayilo D, Gruss OJ. 2011. Centriolar satellites: Busy orbits around the centrosome. *Eur J Cell Biol* **90**: 983–989.
- Barreau C, Benson E, Gudmannsdottir E, Newton F, White-Cooper H. 2008. Post-meiotic transcription in *Drosophila* testes. *Development* **135**: 1897–1902.
- Belote JM, Zhong L. 2009. Duplicated proteasome subunit genes in *Drosophila* and their roles in spermatogenesis. *Heredity* **103**: 23–31.
- Bettencourt-Dias M, Sinka R, Frenz L, Glover DM. 2004. *RNAi in drosophila cell cultures*.
- Bonifacino JS, Hierro A. 2011. Transport according to GARP: Receiving retrograde cargo at the trans-Golgi network. *Trends Cell Biol* **21**: 159–167.

- Bourbon H-M, Gonzy-Treboul G, Peronnet F, Alin M-F, Ardourel C, Benassayag C, Cribbs D, Deutsch J, Ferrer P, Haenlin M, et al. 2002. A P-insertion screen identifying novel X-linked essential genes in *Drosophila*. *Mech Dev* **110**: 71–83.
- Brill JA, Yildirim S, Fabian L. 2016. Phosphoinositide signaling in sperm development. *Semin Cell Dev Biol* **59**: 2–9.
- Carvalho-Santos Z, Machado P, Alvarez-Martins I, Gouveia SM, Jana SC, Duarte P, Amado T, Branco P, Freitas MC, Silva STN, et al. 2012. BLD10/CEP135 Is a Microtubule-Associated Protein that Controls the Formation of the Flagellum Central Microtubule Pair. *Dev Cell* **23**: 412–424.
- Chaves RG. 2011. Successful screening for Gaucher Disease in High-prevalence population in Tabuleiro do Norte. *JIMD Rep* **1**: 73–78.
- Chen D, McKearin DM. 2003. A discrete transcriptional silencer in the *bam* gene determines asymmetric division of the *Drosophila* germline stem cell. *Dev Camb Engl* **130**: 1159–1170.
- Cheung PP, Pfeffer SR. 2016. Transport Vesicle Tethering at the Trans Golgi Network : Coiled Coil Proteins in Action. **4**: 1–10.
- Consolati T, Locke J, Roostalu J, Chen ZA, Gannon J, Asthana J, Lim WM, Martino F, Cvetkovic MA, Rappsilber J, et al. 2020. Microtubule Nucleation Properties of Single Human γ TuRCs Explained by Their Cryo-EM Structure. *Dev Cell* **53**: 603-617.e8.
- Cota RR, Teixidó-Travesa N, Ezquerro A, Eibes S, Lacasa C, Roig J, Lüders J. 2017. MZT1 regulates microtubule nucleation by linking γ TuRC assembly to adapter-mediated targeting and activation. *J Cell Sci* **130**: 406–419.
- Csizmadia T, Lorincz P, Hegedus K, Széplaki S, Low P, Juhász G. 2018. Molecular mechanisms of developmentally programmed crinophagy in *Drosophila*. *J Cell Biol* **217**: 361–374.
- Dallai R. 2014. Overview on spermatogenesis and sperm structure of Hexapoda. *Arthropod Struct Dev* **43**: 257–290.
- Demarco RS, Eikenes ÅH, Haglund K, Jones DL. 2014. Investigating spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Methods* **68**: 218–227.
- Díaz-Castillo C, Ranz JM. 2012. Nuclear Chromosome Dynamics in the *Drosophila* Male Germ Line Contribute to the Nonrandom Genomic Distribution of Retrogenes. *Mol Biol Evol* **29**: 2105–2108.
- Ding Y, Zhao L, Yang S, Jiang Y, Chen Y, Zhao R, Zhang Y, Zhang G, Dong Y, Yu H, et al. 2010. A young *drosophila* duplicate gene plays essential roles in spermatogenesis by regulating several Y-linked male fertility genes. *PLoS Genet* **6**: 1–12.
- Dorus S, Wasbrough ER, Busby J, Wilkin EC, Karr TL. 2010. Sperm proteomics reveals intensified selection on mouse sperm membrane and acrosome genes. *Mol Biol Evol* **27**: 1235–1246.
- Dorus S, Wilkin EC, Karr TL. 2011. Expansion and functional diversification of a leucyl aminopeptidase family that encodes the major protein constituents of *Drosophila* sperm. *BMC Genomics* **12**: 177.

- Dzhindzhev NS, Tzolovsky G, Lipinski Z, Schneider S, Lattao R, Fu J, Debski J, Dadlez M, Glover DM. 2014. Plk4 phosphorylates Ana2 to trigger Sas6 recruitment and procentriole formation. *Curr Biol CB* **24**: 2526–2532.
- Dzhindzhev NS, Yu QD, Weiskopf K, Tzolovsky G, Cunha-Ferreira I, Riparbelli M, Rodrigues-Martins A, Bettencourt-Dias M, Callaini G, Glover DM. 2010. Asterless is a scaffold for the onset of centriole assembly. *Nature* **467**: 714–718.
- Enjolras C, Thomas J, Chhin B, Cortier E, Duteyrat JL, Soulavie F, Kernan MJ, Laurençon A, Durand B. 2012. *Drosophila* chibby is required for basal body formation and ciliogenesis but not for Wg signaling. *J Cell Biol* **197**: 313–325.
- Fabian L, Brill JA. 2012. Big things come from little packages *Drosophila* spermiogenesis. 1–16.
- Fári K, Takács S, Ungár D, Sinka R. 2016a. The role of acroblast formation during *Drosophila* spermatogenesis. *Biol Open* **5**: 1102–1110.
- Fári K, Takács S, Ungár D, Sinka R. 2016b. The role of acroblast formation during *Drosophila* spermatogenesis. *Biol Open* **5**: 1102–10.
- Farkas RM, Giansanti MG, Gatti M, Fuller MT. 2003. The *Drosophila* Cog5 homologue is required for cytokinesis, cell elongation, and assembly of specialized Golgi architecture during spermatogenesis. *Mol Biol Cell* **14**: 190–200.
- Fu J, Lipinski Z, Rangone H, Min M, Mykura C, Chao-Chu J, Schneider S, Dzhindzhev NS, Gottardo M, Riparbelli MG, et al. 2016. Conserved molecular interactions in centriole-to-centrosome conversion. *Nat Cell Biol* **18**: 87–99.
- Fukasawa Y, Tsuji J, Fu SC, Tomii K, Horton P, Imai K. 2015. MitoFates: Improved prediction of mitochondrial targeting sequences and their cleavage sites. *Mol Cell Proteomics* **14**: 1113–1126.
- Fuller MT. 1993. Spermatogenesis. In *The Development of Drosophila melanogaster* (eds. B. M and M.A. A.), pp. 71–148, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, New York, US.
- Galletta BJ, Fagerstrom CJ, Schoborg TA, McLamarrah TA, Ryniawec JM, Buster DW, Slep KC, Rogers GC, Rusan NM. 2016. A centrosome interactome provides insight into organelle assembly and reveals a non-duplication role for Plk4. *Nat Commun* **7**: 12476.
- Galletta BJ, Ortega JM, Smith SL, Fagerstrom CJ, Fear JM, Mahadevaraju S, Oliver B, Rusan NM. 2020. Sperm Head-Tail Linkage Requires Restriction of Pericentriolar Material to the Proximal Centriole End. *Dev Cell* **53**: 86-101.e7.
- Gatti M, Baker BS. 1989. Genes controlling essential cell-cycle functions in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* **3**: 438–453.
- Giansanti MG, Bonaccorsi S, Kurek R, Farkas RM, Dimitri P, Fuller MT, Gatti M. 2006. The class I PTP giotto is required for *Drosophila* cytokinesis. *Curr Biol* **16**: 195–201.
- Giansanti MG, Fuller MT. 2012. What *Drosophila* spermatocytes tell us about the mechanisms underlying cytokinesis. *Cytoskelet Hoboken NJ* **69**: 869–881.

- Gillingham AK, Sinka R, Torres IL, Lilley KS, Munro S. 2014. Toward a Comprehensive Map of the Effectors of Rab GTPases. *Dev Cell* **31**: 358.
- Godinho SA, Pellman D. 2014. Causes and consequences of centrosome abnormalities in cancer. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **369**: 20130467.
- Gopalakrishnan J, Frederick Chim Y-C, Ha A, Basiri ML, Lerit DA, Rusan NM, Avidor-Reiss T. 2012. Tubulin nucleotide status controls Sas-4-dependent pericentriolar material recruitment. *Nat Cell Biol* **14**: 865–873.
- Gopalakrishnan J, Mennella V, Blachon S, Zhai B, Smith AH, Megraw TL, Nicastro D, Gygi SP, Agard DA, Avidor-Reiss T. 2011. Sas-4 provides a scaffold for cytoplasmic complexes and tethers them in a centrosome. *Nat Commun* **2**: 359.
- Goto S, Bono H, Ogata H, Fujibuchi W, Nishioka T, Kanehisa M, Sato K. 1996. Organizing and Computing Metabolic Pathway. *Pac Symp Biocomput Pac Symp Biocomput* 175–186.
- Guan S, Price JC, Prusiner SB, Ghaemmaghami S, Burlingame AL. 2011. A Data Processing Pipeline for Mammalian Proteome Dynamics Studies Using Stable Isotope Metabolic Labeling. *Mol Cell Proteomics* **10**: M111.010728.
- Guan XL, Cestra G, Shui G, Kuhrs A, Schittenhelm RB, Hafen E, van der Goot FG, Robinett CC, Gatti M, Gonzalez-Gaitan M, et al. 2013. Biochemical Membrane Lipidomics during Drosophila Development. *Dev Cell* **24**: 98–111.
- Gunawardane RN, Martin OC, Cao K, Zhang L, Dej K, Iwamatsu A, Zheng Y. 2000. Characterization and reconstitution of Drosophila γ -tubulin ring complex subunits. *J Cell Biol* **151**: 1513–1523.
- Guo J, Grow EJ, Mlcochova H, Maher GJ, Lindskog C, Nie X, Guo Y, Takei Y, Yun J, Cai L, et al. 2018. The adult human testis transcriptional cell atlas. *Cell Res* **28**: 1141–1157.
- Gupta H, Rajeev R, Sasmal R, Radhakrishnan RM, Anand U, Chandran H, Aparna NR, Agasti S, Manna TK. 2020. SAS-6 Association with γ -Tubulin Ring Complex Is Required for Centriole Duplication in Human Cells. *Curr Biol* **30**: 2395-2403.e4.
- Guruharsha KG, Rual J-F, Zhai B, Mintseris J, Vaidya P, Vaidya N, Beekman C, Wong C, Rhee DY, Cenaj O, et al. 2011. A Protein Complex Network of Drosophila melanogaster. *Cell* **147**: 690–703.
- James P, Halladay J, Craig E a. 1996. Genomic Libraries and a Host. *Genetics* **144**: 1425–1436.
- Jones RB, Ndhlovu LC, Barbour JD, Sheth PM, Jha AR, Long BR, Wong JC, Satkunarajah M, Schweneker M, Chapman JM, et al. 2008. Golgi coiled-coil proteins contain multiple binding sites for rab family G proteins. *J Cell Biol* **183**: 607–615.
- Joseph S, Mahale SD. 2021. Male Infertility Knowledgebase: decoding the genetic and disease landscape. *Database J Biol Databases Curation* **2021**: baab049.
- Joshi M, Rajender S. 2020. Long non-coding RNAs (lncRNAs) in spermatogenesis and male infertility. *Reprod Biol Endocrinol* **18**: 103.
- Kaessmann H. 2010. Origins, evolution, and phenotypic impact of new genes. *Genome Res* **20**: 1313–1326.

- Karman Z, Rethi-Nagy Z, Abraham E, Fabri-Ordogh L, Csonka A, Vilmos P, Debski J, Dadlez M, Glover DM, Lipinski Z. 2020. Novel perspectives of target-binding by the evolutionarily conserved PP4 phosphatase. *Open Biol* **10**: 200343.
- Kayode OT, Rotimi DE, Olaolu TD, Adeyemi OS. 2020. Ketogenic diet improves and restores redox status and biochemical indices in monosodium glutamate-induced rat testicular toxicity. *Biomed Pharmacother* **127**: 110227.
- Kazmi Z, Fatima I, Perveen S, Malik SS. 2017. Monosodium glutamate: Review on clinical reports. *Int J Food Prop* **20**: 1807–1815.
- Kondo S, Vedanayagam J, Mohammed J, Eizadshenass S, Kan L, Pang N, Aradhya R, Siepel A, Steinhauer J, Lai EC. 2017. New genes often acquire male-specific functions but rarely become essential in *Drosophila*. *Genes Dev* **31**: 1841–1846.
- Kondylis V, Rabouille C. 2009. The Golgi apparatus: Lessons from *Drosophila*. *FEBS Lett* **583**: 3827–3838.
- Kyrgiagini M-A, Sarafidou T, Mamuris Z. 2022. The Role of Long Noncoding RNAs on Male Infertility: A Systematic Review and In Silico Analysis. *Biology* **11**: 1510.
- Lattao R, Kovács L, Glover DM. 2017. The Centrioles, Centrosomes, Basal Bodies, and Cilia of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **206**: 33–53.
- Laurinyecz B, Péter M, Vedelek V, Kovács AL, Juhász G, Maróy P, Vigh L, Balogh G, Sinka R. 2016a. Reduced expression of CDP-DAG synthase changes lipid composition and leads to male sterility in *Drosophila*. *Open Biol* **6**.
- Laurinyecz B, Péter M, Vedelek V, Kovács AL, Juhász G, Maróy P, Vigh L, Balogh G, Sinka R. 2016b. Reduced expression of CDP-DAG synthase changes lipid composition and leads to male sterility in *Drosophila*. *Open Biol* **6**.
- Laurinyecz B, Vedelek V, Kovács LA, Szilasi K, Lipinski Z, Slezák C, Darula Z, Juhász G, Sinka R. 2019. Sperm-Leucylaminopeptidases are required for male fertility as structural components of mitochondrial paracrystalline material in *Drosophila melanogaster* sperm. *PLoS Genet* **15(2)**: 1–24.
- Lécureuil C, Fouchécourt S, Eliautout R, Guérin V, Hidalgo K, Neutre D, Roux G, Monget P. 2021. A comparative genomic approach using mouse and fruit fly data to discover genes involved in testis function in hymenopterans with a focus on *Nasonia vitripennis*. *BMC Ecol Evol* **21**: 90.
- Littleton JT. 2000. A Genomic Analysis of Membrane Trafficking and Neurotransmitter Release in *Drosophila*. *J Cell Biol* **150**: F77–F82.
- Liu JL. 2010. Intracellular compartmentation of CTP synthase in *Drosophila*. *J Genet Genomics* **37**: 281–296.
- Liu P, Würtz M, Zupa E, Pfeffer S, Schiebel E. 2021. Microtubule nucleation: The waltz between γ -tubulin ring complex and associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* **68**: 124–131.
- Martinez-Campos M, Basto R, Baker J, Kernan M, Raff JW. 2004. The *Drosophila* pericentrin-like protein is essential for cilia/flagella function, but appears to be dispensable for mitosis. *J Cell Biol* **165**: 673–683.

- Mastorodemos V, Zaganas I, Spanaki C, Bessa M, Plaitakis A. 2005. Molecular basis of human glutamate dehydrogenase regulation under changing energy demands. *J Neurosci Res* **79**: 65–73.
- MEIZEL. 1984. THE IMPORTANCE OF HYDROLYTIC ENZYMES TO AN EXOCYTOTIC EVENT, THE MAMMALIAN SPERM ACROSOME REACTION Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1469-185X.1984.tb00404.x?sid=nlm%3Apubmed> (Accessed March 20, 2024).
- Migh E, Götz T, Földi I, Szikora S, Gombos R, Darula Z, Medzihradsky KF, Maléth J, Hegyi P, Sigrist S, et al. 2018. Microtubule organization in presynaptic boutons relies on the formin DAAM. *Development* **145**: dev158519.
- Moreno P, Fexova S, George N, Manning JR, Miao Z, Mohammed S, Muñoz-Pomer A, Fullgrabe A, Bi Y, Bush N, et al. 2022. Expression Atlas update: gene and protein expression in multiple species. *Nucleic Acids Res* **50**: D129–D140.
- Moritz M, Braunfeld MB, Guénebaut V, Heuser J, Agard DA. 2000. Structure of the γ -tubulin ring complex: A template for microtubule nucleation. *Nat Cell Biol* **2**: 365–370.
- Morohoshi A, Miyata H, Oyama Y, Oura S, Noda T, Ikawa M. 2021. FAM71F1 binds to RAB2A and RAB2B and is essential for acrosome formation and male fertility in mice. *Development* **148**: dev199644.
- Muro I, Berry DL, Huh JR, Chen CH, Huang H, Yoo SJ, Guo M, Baehrecke EH, Hay BA. 2006. The *Drosophila* caspase Ice is important for many apoptotic cell deaths and for spermatid individualization, a nonapoptotic process. *Dev Camb Engl* **133**: 3305–15.
- Nigg EA, Raff JW. 2009. Centrioles, Centrosomes, and Cilia in Health and Disease. *Cell* **139**: 663–678.
- Noguchi T, Koizumi M, Hayashi S. 2011. Sustained elongation of sperm tail promoted by local remodeling of giant mitochondria in *Drosophila*. *Curr Biol* **21**: 805–814.
- Nowicka-Bauer K, Ozgo M, Lepczynski A, Kamieniczna M, Malcher A, Skrzypczak W, Kurpisz M. 2018. Human sperm proteins identified by 2-dimensional electrophoresis and mass spectrometry and their relevance to a transcriptomic analysis. *Reprod Biol* **18**: 151–160.
- Paiardi C, Pasini ME, Gioria M, Berruti G. 2011. Failure of acrosome formation and globozoospermia in the wobbler mouse, a Vps54 spontaneous recessive mutant. **1**: 52–62.
- Park SY, Muschalik N, Chadwick J, Munro S. 2022. *In vivo* characterization of *Drosophila* golgins reveals redundancy and plasticity of vesicle capture at the Golgi apparatus. *Curr Biol* **32**: 4549-4564.e6.
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. 2004. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**: 1605–1612.
- Pineau C, Hikmet F, Zhang C, Oksvold P, Chen S, Fagerberg L, Uhlén M, Lindskog C. 2019. Cell Type-Specific Expression of Testis Elevated Genes Based on Transcriptomics and Antibody-Based Proteomics. *J Proteome Res* **18**: 4215–4230.

- Polevoy G, Wei HC, Wong R, Szentpetery Z, Kim YJ, Goldbach P, Steinbach SK, Balla T, Brill JA. 2009. Dual roles for the *Drosophila* PI 4-kinase Four wheel drive in localizing Rab11 during cytokinesis. *J Cell Biol* **187**: 847–858.
- Prince E, Kroeger B, Gligorov D, Wilson C, Eaton S, Karch F, Brankatschk M, Maeda RK. 2019. Rab-mediated trafficking in the secondary cells of *Drosophila* male accessory glands and its role in fecundity. *Traffic* **20**: 137–151.
- Pulipparacharuvil S, Akbar MA, Ray S, Sevrioukov EA, Haberman AS, Rohrer J, Krämer H. 2005. *Drosophila* Vps16A is required for trafficking to lysosomes and biogenesis of pigment granules. *J Cell Sci* **118**: 3663–3673.
- Qian MX, Pang Y, Liu CH, Haratake K, Du BY, Ji DY, Wang GF, Zhu QQ, Song W, Yu Y, et al. 2013. Acetylation-mediated proteasomal degradation of core histones during DNA repair and spermatogenesis. *Cell* **153**: 1012–1024.
- Rabouille C, Kuntz DA, Lockyer A, Watson R, Signorelli T, Rose DR, Heuvel M van den, Roberts DB. 1999. The *Drosophila* GMII gene encodes a Golgi α -mannosidase II. *J Cell Sci* **112**: 3319–3330.
- Raghu P, Coessens E, Manifava M, Georgiev P, Pettitt T, Wood E, Garcia-Murillas I, Okkenhaug H, Trivedi D, Zhang Q, et al. 2009. Rhabdomere biogenesis in *Drosophila* photoreceptors is acutely sensitive to phosphatidic acid levels. *J Cell Biol* **185**: 129–145.
- Raja SJ, Renkawitz-pohl R. 2005. Replacement by *Drosophila melanogaster* Protamines and Mst77F of Histones during Chromatin Condensation in Late Spermatids and Role of Sesame in the Removal of These Proteins from the Male Pronucleus †. **25**: 6165–6177.
- Riparbelli MG, Callaini G, Megraw TL. 2012. Assembly and Persistence of Primary Cilia in Dividing *Drosophila* Spermatocytes. *Dev Cell* **23**: 425–432.
- Riparbelli MG, Persico V, Callaini G. 2020. The Microtubule Cytoskeleton during the Early *Drosophila* Spermiogenesis. *Cells* **9**: 1–18.
- Sali A, Blundell TL. 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* **234**: 779–815.
- Santel A, Blumer N, Kämpfer M, Renkawitz-Pohl R. 1998. Flagellar mitochondrial association of the male-specific Don Juan protein in *Drosophila* spermatozoa. *J Cell Sci* **111**: 3299–3309.
- Shen QJ, Kassim H, Huang Y, Li H, Zhang J, Li G, Wang PY, Yan J, Ye F, Liu JL. 2016. Filamentation of Metabolic Enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Genet Genomics* **43**: 393–404.
- Shim MS, Kim JY, Jung HK, Lee KH, Xu X-M, Carlson BA, Kim KW, Kim IY, Hatfield DL, Lee BJ. 2009. Elevation of Glutamine Level by Selenophosphate Synthetase 1 Knockdown Induces Megamitochondrial Formation in *Drosophila* Cells. *J Biol Chem* **284**: 32881–32894.
- Skerget S, Rosenow M, Polpitiya A, Petritis K, Dorus S, Karr TL. 2013. The Rhesus Macaque (*Macaca mulatta*) Sperm Proteome. *Mol Cell Proteomics* **12**: 3052–3067.
- Small I, Peeters N, Legeai F, Lurin C. 2004. Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics* **4**: 1581–1590.

- Sotillos S, von der Decken I, Domenech Mercadé I, Srinivasan S, Sirokha D, Livshits L, Vanni S, Nef S, Biason-Lauber A, Rodríguez Gutiérrez D, et al. 2022. A conserved function of Human DLC3 and Drosophila Cv-c in testis development. *eLife* **11**: e82343.
- Stadhouders AM, Jap PH, Winkler HP, Eppenberger HM, Wallimann T. 1994. Mitochondrial creatine kinase: a major constituent of pathological inclusions seen in mitochondrial myopathies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 5089–93.
- Tates AD (role)aut. 1971. Cytodifferentiation during spermatogenesis in *Drosophila Melanogaster* : an electron microscope study. 1971. <http://lib.ugent.be/catalog/rug01:002210526>.
- Thomason PA, King JS, Insall RH. 2017. Mroh1, a lysosomal regulator localized by WASH-generated actin. *J Cell Sci* **130**: 1785–1795.
- Tisdale EJ, Balch WE. 1996. Rab2 Is Essential for the Maturation of Pre-Golgi Intermediates*. *J Biol Chem* **271**: 29372–29379.
- Tokuyasu KT. 1975. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. VI. Significance of “onion” nebenkern formation. *J Ultrastructure Res* **53**: 93–112.
- Tovey CA, Tubman CE, Hamrud E, Zhu Z, Dyas AE, Butterfield AN, Fyfe A, Johnson E, Conduit PT. 2018. γ -TuRC Heterogeneity Revealed by Analysis of Mozart1. *Curr Biol* **28**: 2314–2323.e6.
- Vedelek V. 2017. A *Drosophila melanogaster* poszt-meiotikus spermatogenezisében szerepet játszó gének vizsgálata. p. 3111, Szegedi Tudományegyetem, Szeged, Hungary <http://doktori.bibl.u-szeged.hu/3111/> (Accessed February 28, 2024).
- Vedelek V, Bodai L, Grézal G, Kovács B, Boros IM, Laurinyecz B, Sinka R. 2018a. Analysis of *Drosophila melanogaster* testis transcriptome. *BMC Genomics* **19**:697.
- Vedelek V, Bodai L, Grézal G, Kovács B, Boros IM, Laurinyecz B, Sinka R. 2018b. Analysis of *Drosophila melanogaster* testis transcriptome 06 Biological Sciences 0604 Genetics. *BMC Genomics* **19**: 1–19.
- Vérollet C, Colombié N, Daubon T, Bourbon HM, Wright M, Raynaud-Messina B. 2006. *Drosophila melanogaster* γ -TuRC is dispensable for targeting γ -tubulin to the centrosome and microtubule nucleation. *J Cell Biol* **172**: 517–528.
- Vincent AE, Ng YS, White K, Davey T, Mannella C, Falkous G, Feeney C, Schaefer AM, McFarland R, Gorman GS, et al. 2016. The Spectrum of Mitochondrial Ultrastructural Defects in Mitochondrial Myopathy. *Sci Rep* **6**: 1–12.
- Vogt N, Koch I, Schwarz H, Schnorrer F, Nüsslein-Volhard C. 2006. The γ TuRC components Grip75 and Grip128 have an essential microtubule-anchoring function in the *Drosophila* germline. *Development* **133**: 3963–3972.
- Wakimoto BT, Lindsley DL, Herrera C. 2004. Toward a comprehensive genetic analysis of male fertility in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **167**: 207–216.
- Wasbrough ER, Dorus S, Hester S, Howard-Murkin J, Lilley K, Wilkin E, Polpitiya A, Petritis K, Karr TL. 2010. The *Drosophila melanogaster* sperm proteome-II (DmSP-II). *J Proteomics* **73**: 2171–2185.

- Wei H-C, Rollins J, Fabian L, Hayes M, Polevoy G, Bazinet C, Brill JA. 2008. Depletion of plasma membrane PtdIns(4,5)P2 reveals essential roles for phosphoinositides in flagellar biogenesis. *J Cell Sci* **121**: 1076–84.
- Wen K, Yang L, Xiong T, Di C, Ma D, Wu M, Xue Z, Zhang X, Long L, Zhang W, et al. 2016. Critical roles of long noncoding RNAs in Drosophila Spermatogenesis. *Genome Res* **26**: 1233–1244.
- Wendler F, Gillingham AK, Sinka R, Rosa-Ferreira C, Gordon DE, Franch-Marro X, Peden AA, Vincent JP, Munro S. 2010. A genome-wide RNA interference screen identifies two novel components of the metazoan secretory pathway. *EMBO J* **29**: 304–314.
- White-cooper H. 2004. Analysis of Meiosis and Morphogenesis. *Drosoph Cytogenet Protoc* **247**: 468.
- White-Cooper H. 2010. Molecular mechanisms of gene regulation during Drosophila spermatogenesis. *Reproduction* **139**: 11–21.
- Wieczorek M, Urnavicius L, Ti S-C, Molloy KR, Chait BT, Kapoor TM. 2020. Asymmetric Molecular Architecture of the Human γ -Tubulin Ring Complex. *Cell* **180**: 165-175.e16.
- Wilson KL, Fitch KR, Bafus BT, Wakimoto BT. 2006. Sperm plasma membrane breakdown during Drosophila fertilization requires Sneaky, an acrosomal membrane protein. *Development* **133**: 4871–4879.
- Wu L, Niemeyer B, Colley N, Socolich M, Zuker CS. 1995. Regulation of PLC-mediated signalling in vivo by CDP-diacylglycerol synthase. *Nature* **373**: 216–22.
- Wucherpennig T, Wilsch-Bräuninger M, González-Gaitán M. 2003. Role of Drosophila Rab5 during endosomal trafficking at the synapse and evoked neurotransmitter release. *J Cell Biol* **161**: 609–624.
- Würtz M, Zupa E, Atorino ES, Neuner A, Böhler A, Rahadian AS, Vermeulen BJA, Tonon G, Eustermann S, Schiebel E, et al. 2022. Modular assembly of the principal microtubule nucleator γ -TuRC. *Nat Commun* **13**: 473.
- Yamaguchi M. YH. 2018. Drosophila as a Model Organism. *Drosoph Models Hum Dis Adv Exp Med Biol* **1076**.
- Yano H, Yamamoto-Hino M, Abe M, Kuwahara R, Haraguchi S, Kusaka I, Awano W, Kinoshita-Toyoda A, Toyoda H, Goto S. 2005. Distinct functional units of the Golgi complex in Drosophila cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 13467–13472.
- Yu J, Li Z, Fu Y, Sun F, Chen X, Huang Q, He L, Yu H, Ji L, Cheng X, et al. 2023. Single-cell RNA-sequencing reveals the transcriptional landscape of ND-42 mediated spermatid elongation via mitochondrial derivative maintenance in Drosophila testes. *Redox Biol* **62**: 102671.
- Yuan X, Zheng H, Su Y, Guo P, Zhang X, Zhao Q, Ge W, Li C, Xi Y, Yang X. 2019. Drosophila Pif1A is essential for spermatogenesis and is the homolog of human CCDC157, a gene associated with idiopathic NOA. *Cell Death Dis* **10**: 125.
- Zhang X, Zhang P, Song D, Xiong S, Zhang H, Fu J, Gao F, Chen H, Zeng X. 2019. Expression profiles and characteristics of human lncRNA in normal and asthenozoospermia sperm[†]. *Biol Reprod* **100**: 982–993.

- Zhang Y, Chen Y, Gucek M, Xu H. 2016. The mitochondrial outer membrane protein MDI promotes local protein synthesis and mt DNA replication. *EMBO J* **35**: 1045–1057.
- Zhao S, Heng N, Weldegebrial Sahlu B, Wang H, Zhu H. 2021. Long Noncoding RNAs: Recent Insights into Their Role in Male Infertility and Their Potential as Biomarkers and Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci* **22**: 13579.