

AZ E3 LIGÁZOK SZEREPE AZ INDIVIDUALIZÁLÓDÓ CISZTÁKBAN A *DROSOPHILA* SPERMATOGENEZIS SORÁN

Vedelek Viktor

*SZTE TTIK Genetikai Tanszék,
Szeged, Magyarország*

Sinka Rita

*SZTE TTIK Genetikai Tanszék,
Szeged, Magyarország*

Absztrakt

Az állatvilágban a spermium alakja, szerkezete, funkciója, nagyfokú konzerváltságot mutat. Az eukarióta modellszervezetek közül az egyik legelterjedtebb a *Drosophila melanogaster*; az *ecetmuslica*. A *Drosophila* testiszben a spermatogenezis összes stádiuma könnyen vizsgálható. A folyamat egyik végső lépése az individualizáció. Ebben a folyamatban az addig cisztában lévő spermiumok saját membránt kapnak, a felesleges sejtalkotóktól megszabadulnak. A folyamatban több E3 ligáz szerepe is ismert. Ezek a ligázok az individualizáció során egy nem apoptotikus kaszpáz-3 útvonalat szabályoznak, mutánsaikban nincsenek érett, mozgó spermiumok. A következőkben egy hasonló E3 ligáz vizsgálatának eredményeit szeretném bemutatni.

Kulcsszavak: *Drosophila melanogaster*, spermatogenezis, E3 ligázok, individualizáció

Bevezetés

Az elmúlt időszakban növekedett a spermatogenezis iránti tudományos érdeklődés, melynek fő oka a humán infertilitási problémákban keresendő. A párok 15%-a fertilitási problémákkal küzd, ennek fele hím eredetű (Poongothai *et al* 2009). Újabb publikációk alapján a spermium feladata nem ér véget a megtermékenyítéssel, a korai zigotikus fejlődésben is fontos szerepe van (Sutovsky és Schatten 2000). A spermium alakja, szerkezete, szerepe nagyfokú konzerváltságot mutat az élővilágban. A megfigyelt hisztopatológiai elváltozások is hasonlóak az ember, az egér és az *ecetmuslica* között. A *Drosophila melanogaster* hímsteril mutánsai igen változatos fenotípust mutatnak, megfigyelhetők az ősvarsejteket, a meiózist és az individualizációt érintő mutációk is. Ezen mutánsok segítségével a spermatogenezis valamennyi stádiuma vizsgálható.

Drosophila spermatogenezis

A *Drosophila* testisz kiválóan alkalmas a spermatogenezis vizsgálatára. A testisz egy felesavart, vakon végződő cső, amiben a spermatogenezis különböző stádiumai egyszerre megfigyelhetők. Az apikális végen az ősvarsejtek tartják fent a primer spermatociták populációját, melyek mitotikus osztódással 16 sejtes cisztát hoznak létre. A kialakult cisztákban a sejteket plazmahidak kötik össze, amiken keresztül továbbra is kapcsolatban maradnak. A 16 sejtes ciszták meiózisa után a másodlagos spermatociták 64 sejtes cisztát alkotnak. A spermatociták ezután elkezdnek specializálódni, az érett spermium organellumainak prekursorai már megfigyelhetők ezekben a cisztákban. A 64 sejtes ciszták megnyúlnak, tovább differenciálódnak. A megnyúlás után az érésük egyik utolsó lépése az individualizáció, amikor a felesleges sejtalkotóktól megszabadulnak, valamint önálló egyedi membránt kapnak. A folyamatban meghatározó szerepe van az individualizációs komplexnek (IC). Az IC a sejt magnál formálódik, majd elkezd vándorolni a ciszta bazális vége felé, kiszorítva a feleslegessé vált sejtalkotókat. Az IC-k a cisztában szinkronizáltan vándorolnak, ami során egy jellegzetes plazma kitérkedés jön létre, a cisztikus hólyag. A folyamat végén a cisztikus hólyag lefűződik, létrehozva az ún. „wastebag” struktúrát. Az individualizáció folyamán kaszpáz-3 aktivitás is megfigyelhető, mely folyamat nem apoptotikus, feltehetően a lebontó folyamatokat gyorsítja meg, és hibája esetén az individualizáció nem megy végbe. Az individualizálódott

spermiumok felcsavarodnak és a testisz bazális végéhez csatlakozó szeminalis vezikulumban tárolódnak.

E3 ligázok az individualizációban

A ciszták individualizációja során kaszpáz-3 aktiváció nélkül az individualizációs komplexek szétesésnek, és nem tudják ellátni feladatukat. A nem apoptotikus kaszpáz-3 útvonal szabályozásában több E3 ligáz komplex is ismert. Az egyik ilyen jól jellemzett ligáz a Cul3^{testis}-Roc1b-Klh10 E3 komplex (Arama *et al* 2007 Kaplan *et al* 2010), a másik ismert E3 komplex a Cullin-1, SkpA, Nutcracker komplex (Bader *et al* 2010).

Az Archipelago gén

Csoportunk különböző transzpozon inszerciós (P-elem, Minos elem, PiggyBac elem) mutáns törzsgyűjteményekből izolált hímsteril mutánsokat. Az *Archipelago* (*Ago*, humán homológ: *Fbw7*) gén intronjában található P-elem a legyek hím és nőstény sterilitását eredményezi. Az Ago fehérje egy SCF (Skp, Cullin, F-box) típusú E3 ligáz komplexbe épül be, annak specifikusáért felelős F-box fehérjeként. Ismert funkcióval bír számos biológiai folyamatban (Nicholson *et al* 2009; Doronkin *et al* 2003; Koepf *et al* 2001; Mortimer *et al* 2007), azonban szerepét testiszben még nem vizsgálták.

Felhasznált módszerek:

A felhasznált *Drosophila* törzsek 18 és 25 °C-on neveltük kukoricakeményítő agar táptalajon.

Genetikai komplementációs tesztekhez felhasznált törzsek a nemzetközi törzsgyűjteményekből elérhetők ezek az Ago lokuszra P-elem mutánsok, EMS mutánsok és deléciós törzsek.

Fertilitást homozigóta hím egyedekkel szűz Oregon-R vad típusú nőstényekkel teszteltük. Mutáns, és vad egyedek sejtorganellumainak követésére fluoreszcens transzgén hordozó törzseket használtunk (SNKY-GFP, DJ-GFP, Tubulin-GFP).

Mikroinjektálással transzgenikus törzseket hoztunk létre (mCherry-Ago).

Testisz preparátumokat 0-3 napos felnőtt hímekből készítettünk. (White-cooper 2004) Festékek: DAPI (1µg/ml), Texas Red®-X Phalloidin

(Molecular Probes) 1:400

Immundefés (White-Cooper 2004), nyúl anti-cleaved-caspase3, 1:200 (clone 5A1E, Cell Signalling); anti-nyúl Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) 1:400. Anti-fade ágens: Fluoromount (Southern Biotech)

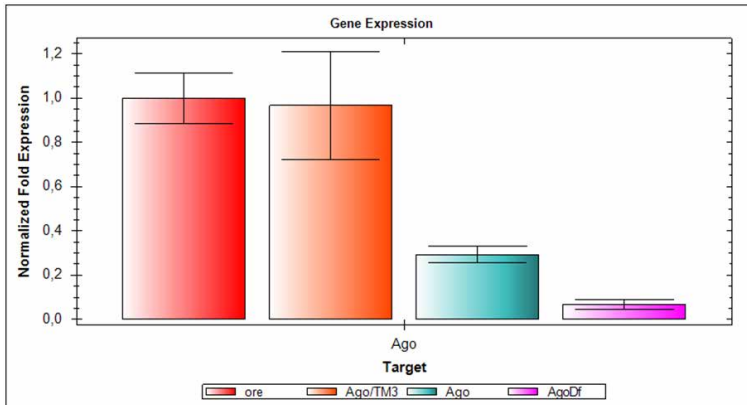
A TUNEL jelölés Click-it TUNEL Alexa Fluor 594 Imaging Assay (Molecular Probes) kittel történt.

Transzgénikus konstrukt előállításához, cDNS-ről történt az amplifikáció Phusion DNS polimerázzal. Az Ago N-terminális végére fuzionáltatott m-Cherry konstruktot TV3 vektorba klónoztuk spermatocita specifikus Béta2 tubulin promóter mögé. A szekvencia ellenőrzését szekvenálással végeztük.

qPCR-hoz felnőtt legyek testiszéből izoláltunk RNS-t RNeasy Plus Kit (Quiagen)-tel, cDNS-sé írtuk RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) segítségével. A PCR-hoz Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix (Thermo Scientific) kitet használtunk, a reakció CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) gépen történt.

Eredmények

Csoportunk P-transzpozont tartalmazó törzseket tesztelt fertilitásra. Egyik általunk azonosított mutáció az *Archipelago* (*Ago*) gént érinti. Az *Ago* mutáns allélja (*Ago^{ms}*) szemilevális, az adult legyek pedig hím- és nősténysterilek. A hemizigóta legyek hasonló fenotípust mutatnak, míg az EMS allélokkal keresztezett transzheterozigóta legyek nem érik meg az adult kort. qPCR eredmények alapján az *Ago* gén expressziója a heterozigóta egyedekben nem változott, a homozigóta *Ago^{ms}* legyekben jelentősen csökkent, csakúgy, mint a hemizigóta egyedekben. (1. ábra) Az *Ago* génben ülő intronikus P-elem remobilizálása menekíti a hímsteril fenotípust.



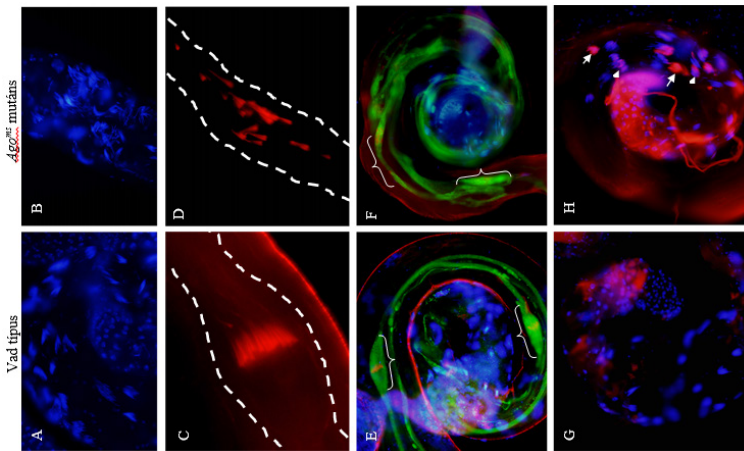
1. ábra Az Ago gén expressziójának vizsgálata qPCR technikával: 1. oszlop vad típusú testiszAgomRNS mennyisége, *rp49* referencia RNS-hez normalizálva 2. oszlop *Agomsheterozigóta* testiszAgomRNS mennyisége, 3. oszlop *Agomshomozigóta mutáns* AgomRNS mennyisége 4. oszlop *Agomshemizigóta mutáns* AgomRNS mennyisége

A hímsteril fenotípus alaposabb megértéséhez testisz preparátumokon fénymikroszkópos vizsgálatokat végeztünk. Fáziskontraszt mikroszkópos vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a spermatogenezis korai szakaszai nem mutatnak rendellenességet, megnyúlt spermatocitákat is megfigyelhetünk, viszont érett mozgó spermiumok nincsenek a szeminalis vezikulumban. A megnyúlt spermatociták sejtalkotóinak vizsgálataihoz fluoreszcens mikroszkópiát használtunk. Organellum specifikus fluoreszcens transzgéneket vittünk be genetikailag az *Ago^{ms}* mutáns törzsbe, majd a homozigóta hímek testiszét vizsgáltuk mikroszkóppal. Megvizsgáltuk az akroszómák integritását (Snky-GFP), az axonémák és megnyúlt mitokondriumok struktúráját (Tub-GFP; DJ-GFP), de ezen organellumok nem mutattak rendellenességet az *Ago^{ms}* mutánsban. A megnyúlt sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá, melyek az aktinkúpok vándorlásának beindulásával gyakran szétesésznak az *Ago^{ms}* mutánsban.

A megnyúlt spermatocitákban az IC-k kialakulását vizsgáltuk. Az IC-k fő alkotóeleme az aktin, ezért phalloidin festéssel könnyen vizualizálható. Mutánsunkban azt tapasztaltuk, hogy az IC-k elvesztik szinkronitásukat, a sejtmagtól távolodva egyre rendezetlenebbek lesznek. A cisztikus hólyag megnyúlik a vad típushoz képest, valamint „waste bag”

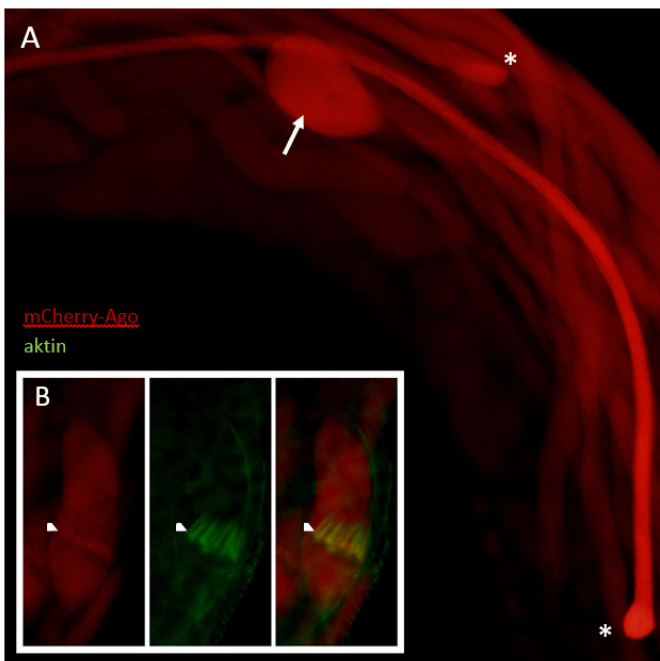
is csak ritkán formálódik az *Ago^{ms}* testiszekben. Az individualizáció során lezajló nem apoptotikus kaszpáz aktivációt az aktív, hasított kaszpáz-3-ra specifikus ellenanyaggal vizsgáltuk. Eredményeink azt mutatták, hogy az *Ago^{ms}* mutánsban az útvonal aktív. A festés alkalmas még a cisztikus hólyagokés „waste bag”-ek követésére is, a tapasztalt fenotípus megerősítette a fentebb leírtakat (2. ábra).

A mutáns testiszről készített elektronmikroszkópos képek alapján nem találtunk jelentős morfológiai eltérést a vad típushoz képest, azonban a cisztákon belül a szinkronizáltság felbomlik. Ezen felül erősen festődő, széteső cisztákat is megfigyeltünk, ami apoptózisra utalhat. TUNEL festés alkalmazásával sikerült kimutatni, hogy az individualizációban megrekedt ciszták valóban apoptózissal pusztulnak el (2. ábra).



2. ábra (következő oldal) A spermatidák egyedivé válása sérül az *Ago* mutánsban. A megnyúlt sejtmagok (DAPI, kék) a vad típusban (A) rendezetten helyezkednek el, míg a *Agoms* mutánsban (B) a rendezettség bizonyos esetekben elveszik. A megnyúlt individualizálódó cisztákban megfigyelhetők az individualizációs komplexek phalloidin TR festéssel (vörös) vad (C, E) és *Agoms* (D, F) mutáns esetén. Az *Agoms* mutánsban nem mozognak szinkronizáltan (D). Megnyúlt, individualizálódó ciszták cisztikus hólyagjai (kapocs) hasított kaszpáz-3 (zöld) immunfestéssel vad (E) és *Agoms* mutáns (F) spermatoцитákban. A kaszpáz-3 ellenanyag kifesti az individualizálódó cisztákat is. Az *Agoms* mutáns esetén a megnyúlt cisztikus hólyag, és a szétesőszerű aktin kúpok jól megfigyelhetők (F). Sejtmag (DAPI, kék) TUNEL végjelölés (vörös) vad típusú megnyúlt cisztákon (G), és *Agoms* mutánsokban (H). A vad típusban nem figyelhető meg TUNEL jelölés, míg a mutáns cisztákban részlegesen (nyílhegy) vagy teljesen (nyíl) felválthatja a DAPI jelet.

A cisztikus hólyagban történő irányított fehérje lebontásban már ismert az E3 ubiquitin ligázok szerepe. Ezen ligáz komplexek aktív formái a lebontás helyén és attól bazális irányban halmozódnak fel. Az Ago fehérje cisztán belüli eloszlásának vizsgálatára sikeresen előállítottunk egy tesztisz specifikus promóterrel rendelkező mCherry-Ago transzgén expresszálo vektort. Transzgenikus ecetmuslica törzseket alapítottunk, majd megvizsgáltuk az mCherry-Ago fehérje tesztiszspecifikus kifejeződését és lokalizációját. Ago fehérje a cisztikus hólyagban, az aktin kúpoknál, illetve a megnyúlt spermatoцитák bazális végén halmozódik fel, azon a helyen, ahol az *Ago^{ms}* ciszták megrekednek a fejlődésben (3. ábra). A továbbiakban az Ago fehérje tesztisz specifikus partnereit szeretnénk biokémiaailag is azonosítani.



3. ábra A tesztisz specifikusan kifejeztetett mCherry-Ago szubcelluláris lokalizációja megnyúlt cisztákban. A megnyúlt ciszták bazális (csillag) végén (A) illetve az individualizálódó ciszták cisztikus hólyagjában (A nyíl, B) mutat citoplazmatikus feldúsulást, valamint az aktin kúpokhoz (zöld) is köthető (nyílhegy).

Összefoglalás

A *Drosophila melanogaster* ideális modell a spermatogenezis vizsgálatára. Az acetabulum spermatogenezisének egyik fontos lépése az individualizáció. Azonosítottunk egy E3 ubikvitin ligáz komplexbe épülő F-box fehérjét érintő mutációt (*Ago^{ms}*), mely az individualizáció folyamatának leállítását okozza. Az Ago pleiotróp hatása eddig is ismert volt, azonban funkcióját még nem vizsgálták tesztiszben. Az Ago EMS allélek letálisak, azonban az általunk vizsgált *Ago^{ms}* allél hipomorf, esetében csak részleges funkcióvesztést tapasztalunk. Ez lehet az oka a szemletalitásnak, melyet a qPCR eredmények is alátámasztanak.

Az *Ago^{ms}* mutáns tesztisz fenotípusos vizsgálata megmutatta, hogy a tesztiszben a spermatogenezis korai szakaszai rendben lezajlanak egészen az individualizációig. A spermaticiták főbb organellumai mint a mitokondrium, axonéma és akroszóma nem mutatnak morfológiai rendellenességet. Az mCherry-Ago tesztiszspecifikus kifejeződésű transzgen segítségével kimutattuk az Ago fehérje lokalizációját a megnyúlt ciszták bazális végén, a cisztikus hólyagokban, valamint az aktin kúpoknál. Az individualizáció során megfigyeltük az individualizációs komplexek normális kialakulását, azonban az IC-k a vándorlásukban már hibát szenvednek. A vándorlás során a kúpok szétesésnek, a cisztikus hólyagok elnyúlnak, „waste bag”-ek ritkán alakulnak ki, valamint a hibásan individualizálódó ciszták sejtmagjai is rendezetlenséget mutatnak. Hasonló fenotípust figyeltek meg más E3 ligázok esetén is. A Nutcracker nevű F-box fehérje a cisztikus hólyagokhoz, valamint a kialakuló aktin kúpokhoz lokalizálódik, a null mutánsban nem keletkeznek aktin kúpok, és a kaszpáz kaszkád sem aktiválódik, a hipomorf mutánsban azonban megfigyelhetők abnormális aktin kúpok, és kaszpáz aktivitás is (Bader *et al* 2010). A másik individualizációban szerepet játszó E3 komplex esetén is hasonló fenotípus figyelhető meg, a Cul3^{testis}-Roc1b-Klhl10 E3 komplex esetén is a *klhl10* null mutánsban nem figyelhetünk meg kaszpáz aktivitást, ugyancsak a *cul3* null mutánsban sem, viszont a hipomorf *cul3* mutánsban a kaszpáz aktivitás csökkenése, és a rendezetlen aktin kúpok kimutathatók. (Arama *et al* 2007, Kaplan *et al* 2010). Ehhez képest az Ago mutánsunkban a kaszpáz-3 szabályosan aktiválódik, nem figyeltünk meg csökkenést, sem aktivitás növekedést a vad típushoz képest. Az aktin kúpok kialakulnak, de szinkronizáltságukat elvesztik.

Összességében elmondható, hogy az Ago fehérje az eddig ismert E3 ligázok által mediált útvonalaktól eltérő, más útvonalban játszhat szerepet, amely éppúgy nélkülözhetetlen az érett spermium kialakulásához.

Irodalom

- Poongothai, J; Gopenath, T S; Manonayaki, S 2009 *Genetics of human male infertility* Singapore Med J 2009; 50(4) : 336
- Sutovsky, P; Schatten, G. 2000 *Paternal contributions to the mammalian zygote: fertilization after sperm-egg fusion*” International review of cytology 195 2000, pp. 1-65.
- Koepp, D M; Schaefer, L K; Ye, X; Keyomarsi, K; Chu, C; Harper, J W; Elledge S J; 2001 *Phosphorylation-Dependent Ubiquitination of Cyclin E by the SCF Fbw7 Ubiquitin Ligase* Science 294, 173 2001
- Doronkin, S; Djagaeva, I; Beckendorf, S K; 2003 *The COP9 Signalosome Promotes Degradation of Cyclin E during Early Drosophila Oogenesis* Developmental Cell, Vol. 4, 699–710 2003
- Nicholson, S C; Gilbert, M M; Nicolay, B N; Frolov, M V; Moberg, K H; 2009 *The archipelago Tumor Suppressor Gene Limits Rb/E2F-Regulated Apoptosis in Developing Drosophila Tissues* Current Biology 19, 1503–1510 2009
- Mortimer, N T; Moberg, K H; 2007 *The Drosophila F-box protein Archipelago controls levels of the Trachealess transcription factor in the embryonic tracheal system* Developmental Biology 312 2007 560–571 2007
- Bader, M; Arama, E; Steller, H; 2010 *A novel F-box protein is required for caspase activation during cellular remodeling in Drosophila* Development 137, 1679-1688 2010
- Kaplan, Y; Gibbs-Bar, L; Kalifa, Y; Feinstein-Rotkopf, Y; Arama E; 2010 *Gradients of a Ubiquitin E3 Ligase Inhibitor and a Caspase Inhibitor Determine Differentiation or Death in Spermatids* Developmental Cell 19, 160–173, 2010
- White-Cooper H; 2004 *„Spermatogenesis: Analysis of Meiosis and Morphogenesis”* in *Methods in Molecular Biology v247 Drosophila Cytogenetics Protocols* ed. Daryl S. Henderson TN: Humana Press Inc.
- Arama, E; Bader, M; Rieckhof, G E; Steller, H; 2007 *A ubiquitin ligase complex regulates caspase activation during sperm differentiation in Drosophila*. PLoS Biol. 5, e251. 10.1371/journal.pbio.0050251.