

AUTEN autofágia aktiváló kismolekulák vizsgálata az 1-es típusú spinocerebelláris ataxia *Drosophila* modellben

OTDK dolgozat
37. OTDK Biológia Szekció

készítette:
Burján Tímea
Biológus MSc IV. félév

témavezető:
Kovács Tibor
egyetemi adjunktus
ELTE Genetikai Tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2024 július

Tartalomjegyzék

Rövidítések	3
1. Összefoglaló.....	5
2. Irodalmi bevezetés	5
2.1 1-es típusú spinocerebelláris ataxia.....	5
2.2 Autofágia mechanizmusa és élettartam szabályozó szerepe.....	7
2.3 Autofágia aktiváló – AUTEN molekulák sejtbiológiai és élettani szerepe	9
2.4 <i>Drosophila</i> , mint neurodegenerációs modell.....	11
3. Célkitűzések	12
4. Anyagok és módszerek	13
5. Eredmények és megvitatásuk	16
5.1. Az AUTEN-67 élettartam növelő hatású az SCA1 betegségmodellben	16
5.2. Az AUTEN hatóanyagok eltérő mértékben növelik az autofágiát SCA1 betegségmodellben.	18
5.3. Az AUTEN molekulák eltérő mértékben hatnak különböző neuron típusokban.....	20
5.4. Az AUTEN molekulák eltérő mértékben hatnak a különböző neuron-specifikus SCA1 modellek mászásképessegre és élettartamára	27
6. Következtetések és jövőbeli tervek	29
7. Tételes szerzői hozzájárulás	31
8. Felhasznált irodalom	32
9. Köszönetnyilvánítás.....	35

Rövidítések

30Q.....	30 CAG ismétlődést tartalmazó Atx1
82Q.....	82 CAG ismétlődést tartalmazó Atx1
A67.....	AUTEN-67
A99.....	AUTEN-99
AUTEN.....	autophagy enhancer
Atg.....	autophagy-related
Atx1.....	ataxin1
cDNA.....	komplement DNS
dAtx1.....	<i>Drosophila</i> Ataxin1
DMSO.....	dimetil-szulfoxid
DNS.....	dezoxiribonukleinsav
EDTP.....	egg-derived tyrosine phosphatase
ESCRT.....	endosomal sorting complex required for transport
GABA.....	γ -aminovajsav
GFP.....	green fluorescent protein
hAtx1.....	emberi (humán) ataxin1
HOPS.....	homotypic fusion and protein sorting
isow ⁻	izogenikus <i>white</i>
LC3.....	Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3
LoF.....	funkcióvesztés (<i>loss of function</i>)
MTMR14.....	Myotubularin Related Protein 14
mTOR.....	mammalian target of rapamycin
Nlk.....	intranukleáris zárványok
PE.....	foszfatidiletanolamin
PI3K.....	Phosphoinozitid 3-kinázok
PI3P.....	foszfatidilinozitol 3-foszfát
polyQ.....	poliglutamin régió
PRW.....	proW

RNS	ribonukleinsav
SCA1	Egyes típusú spinocerebelláris ataxia
SNARE.....	soluble N-ethylmaleimide–sensitive factor attachment protein receptors
SQSTM1.....	sequestosome 1
TORC	mTOR Complexes
UAS.....	Upstream aktiváló szekvencia
UGMA.....	UAS-GFP-mCherry-Atg8a
Vps34	Vacuolar Protein Sorting – 34

1. Összefoglaló

Az 1-es típusú spinocerebelláris ataxia (SCA1) egy domináns, autoszomális, neurodegeneratív betegség, melyet az ataxin1 (Atx1) fehérje poliglutamin régiójának mutációja okoz. Az autofágia egy sejten belüli lizoszomális lebontó folyamat, amely segít a káros sejtalkotók lebontásában, biztosítva ezáltal a sejtek homeosztázisának fenntartását. Az autofágia hatékonysága az élettartam során csökken, hiányában neurodegeneráció alakulhat ki. Az AUTEN-67 (A67) és AUTEN-99 (A99) hatóanyagok a makroautofágia aktivátorai, a Vps34 autofág komplex antagonistájának, az MTMR14-nek gátlásán keresztül hatnak. Célul tűztem ki, hogy ezeket a hatóanyagokat megvizsgáljam az SCA1 muslica modelljében.

Eredményeim szerint az A67 és A99 egyaránt aktiválják az autofágiát vad típusú állatokban és növelik az élettartamot. Teljes agyban előidézett SCA1 betegségmodellben azonban csak az A67 növeli az autofágiát, az élettartamot és javítja az idős állatok mászási képességét. A betegségmodellre jellemző szem aberrációt is csak az A67 kezelés képes csökkenteni. Feltételezhető, hogy a 2 hatóanyag eltérően hat különböző típusú idegsejtekben. A megfigyelt eltéréseket neuronspecifikus hatóanyag vizsgálattal pontosítottam. A vizsgált idegsejtek közül az A99 a glutamaterg, az A67 pedig a kolinerg neuronokra volt nagyobb hatással.

Elmondható tehát, hogy bár a két AUTEN molekula célfehérjéje megegyezik, közöttük idegsejt specifikus eltérések tapasztalhatóak, amely adódhat a neuronok eltérő érzékenységéből vagy a sejtek hatóanyag affinitásából.

Ezen eredmények segítenek az SCA1 betegség áthatóbb megértését, hiszen az eddigi *Drosophila* modellek az egész agyban vizsgálták a jelenségeket. Ez különösen azért fontos, mert a humán SCA1-ben leginkább a kisagy Purkinje-GABAerg sejtjei érintettek. Az elvégzett kísérletek ezen kívül segítenek az idegsejtspecifikus autofágia farmakológia aktiválás hatását megismerni, ezáltal egy pontosabb SCA1 modellt létrehozni.

2. Irodalmi bevezetés

2.1 1-es típusú spinocerebelláris ataxia

Az egyes típusú spinocerebelláris ataxia (SCA1) egy jellemzően felnőtt korban kialakuló domináns, autoszomális, neurodegeneratív betegség. Az Ataxin-1 (Atx1) fehérje túl hosszúra nyúlt poliQ (poliglutamin) régiója miatt különböző mértékű neurodegeneráció figyelhető meg a betegek kisagyában, agytörzsében és spinocerebelláris traktusaiban^{1,2}.

Az SCA1 klinikai fenotípusának jellemzői: fokozódó nehézségek a járásban, egyensúlyban, beszédben, nyelésben, végtag koordinációban, spaszticitás (állandósult kóros izomösszehúzóds) és finom kognitív gyengülés. A tünetek először csak kis mértékben észrevehetőek, majd a betegség előrehaladtával súlyosbodnak^{2,3}.

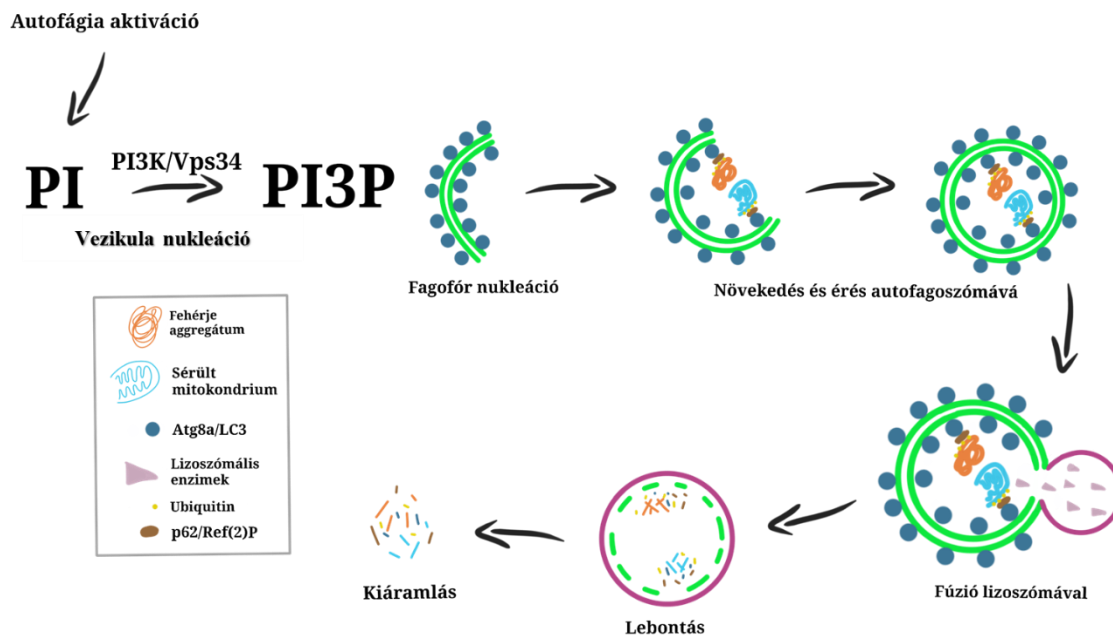
A betegségért az *atx1* gén első kódoló exonjában (exon 8) található CAG-ismétlődéses régiója felelős (a CAG a glutamint kódoló szakaszt más néven poliQ régióknak is nevezik). Egészséges emberben CAG tripletok száma 4 és 39 közé tehető. Beteg emberekben a poliQ régió hossza 40-től akár 82-83-ig is nőhet^{2,4,5}. A túl hosszú CAG-ismétlődést tartalmazó fehérje nagyon instabil, ezért, ha a szekvenciát nem szakítják meg stabilizáló CAT (hisztamin) tripletok a szekvencia fogékony lesz a meiotikus instabilitásra és a kóros feldúsulásra². A szakasz hossza korrelál a betegség megjelenésének idejével. A betegség tünetei is a CAG szakaszok méretével súlyosbodnak³.

Az Atx1 egy nukleáris fehérje, amely széles körben kifejeződik, mind sejt, mind pedig szövetszinten. Feltételezhető, hogy feladatai közé tartozik a transzkripció szabályozása és az RNS-ek processzálása⁶. A megnyúlt poliglutamin traktus a fehérje hibás feltekeredéséhez vezet, ami intranukleáris zárványokat (Nik) eredményez. Ezek az Nik megzavarják a fehérje újrarahajtogatódást és a degradációs útvonalakat. Viszont manapság már egyre több bizonyíték szól amellett, hogy nem az Nik felelősek elsősorban a betegségért, hanem a mutáns fehérjék oligomerizált formái a toxikusak. Feltételezhető, hogy az Nik a neurodegeneráció ellen dolgozhatnak, az által, hogy a képződő oligomereket „aggregátumokban” tartják^{3,7}.

A dAtx-1 (CG4547) egy 230 aminosav hosszú *Drosophila* fehérje. Ez a legközelebbi muslica homológja az emberi Atx1-nek (hAtx1). Tartalmazza az AXH domént, viszont a poliQ traktus hiányzik belőle. Összehasonlítva a hAtx1 kifejezetését és a dAtx1 túltermeltetését *Drosophilában* elmondható, hogy bár elég súlyos fenotípusos változást okozott a dAtx1, a hAtx1 jelentősebb abnormalitásokat idézett elő⁸. Ezért a kutatásokban az UAS-Gal4 rendszer segítségével humán mutáns *atx1*-et fejeztetnek ki a *Drosophila* betegségmodellekben^{7,9}.

Mivel a sejtekben felhalmozódik a toxikus fehérje¹⁰, érdemes lehet sejtben belüli lebontó folyamatokat fokozni ezek eltávolítására. Ilyen folyamat például az autofágia. Az idegsejtek jórészt osztódásra képtelenek, így pótlásuk nehéz. Viszont az autofágia segítségével megszabadulhatnak a káros, felhalmozódott fehérjéktől, sejtalkotóktól, ezáltal növelve élettartamukat és biztosíthatják normál működésüket.

2.2 Autofágia mechanizmusa és élettartam szabályozó szerepe



1. ábra: A makroautofágia főbb lépései. A makroautofágiát 6 nagy lépésre lehet bontani, ezek az autofágia aktiváció, a vezikula nukleáció, a fagofór nukleáció, a növekedés és érés autofagoszómává, a fúzió lizoszómával a lebontás és végül a kiáramlás. Dolgozatom szempontjából a vezikula nukleációs lépés a fontos, ekkor történik a PI3P képződése a PI3K segítségével. A PI3P traktumú membránok autofág útra köteleződnek el, ehhez toborzódnak az autofágia mechanizmusának későbbi lépéseinek komplexei.¹¹ alapján

Az autofágia egy sejten belüli lizoszomális lebontó folyamat, amely fontos homeosztázisának fenntartásában. E mechanizmus segítségével távolítódhatnak el a sejtől a rosszul hajtogatott, aggregálódott fehérjék és a megrongálódott sejtservecskék, így biztosítva a sejtnak energiát és felhasználható bomlástermékeket^{9,12}.

A makroautofágia (innenről egyszerűen csak autofágia) az autofágia legismertebb mechanizmusa, amelynek folyamatát felbonthatjuk 6 nagy lépésre: aktiváció, fagofór nukleáció, növekedés és érés autofagoszómává, dokkolás és lizoszómával való fúzió, lebontás és végül kiáramlás (1. ábra). Ezeket a folyamatokat az *Atg* (*autophagy related*) gének által kódolt fehérjék szabályozzák. Ezen *Atg* fehérjék funkciója és így az egymást követő mechanizmusok is erősen konzerváltak¹³.

Tápanyagban gazdag környezetben a TROC1 (*target of rapamycin kinase complex I*) gátolja az Atg1/ULK aktivációs komplex tagjait. Éhezéskor az Atg1/ULK felszabadul a TORC1 gátlása alól, ami az autofágia aktivációját eredményezi¹⁴.

A fagofór létrejöttéhez szükség van foszfatidilinozitol-3-foszfátra (PI3P), a PI3P lipidet tartalmazó membrán részek fognak autofág útra elköteleződni. A PI3P foszfatidil inozitol (PI) foszforilálásával jön létre, ezt a lépést a Vps34/ PI3K kináz I. komplex katalizálja. A komplex tagjai az Vps34, Atg6/Vps30, Vps15 és Atg14. A létrejött PI3P-hoz FYVE doménnel

rendelkező fehérjék tudnak kapcsolódni. Az egyik ilyen fehérje az Atg18 (a WIPI1/2 ortológja), amely az autofágia későbbi lépéseirel fontos komplexeket toborozza a fagofórhoz (pl: Atg12-Atg5-Atg16 komplex). A Vps34 komplex antagonistája az MTMR14 (*Jumpy*) vagy a *Drosophila* megfelelője az EDTP. Feladatuk, hogy a PI3P-ot defoszforilálják PI-lá, így védve a sejtet a túlzott, káros mértékű autofág aktivitás ellen¹⁴⁻¹⁶.

Az Atg8-PE/LC3B-PE (*Drosophila* ortológ - Atg8a) funkciója a membránformálódás és az autofagoszómazáródás segítése mellett, hogy receptorként részt vesz a szelektív autofágiában. Az Atg8 konjugációját a foszfátidiletanolaminhoz (PE) az Atg12-Atg5-Atg16 E3 szerű enzim komplex katalizálja^{13,14,17}. Az Atg8-PE kapcsolódik a p62/SQSTM1-hez (*sequestosome 1*) (és sok egyéb adaptor fehérjékhez). A p62 egy többfunkciós adaptormolekula, amely elősegíti a poliubiquitinált fehérje-aggregátumok kihorgonyzását a formálódó fagofórhoz. A p62/SQSTM1 az autofágia szubsztrátjának számít, így mennyisége fordítottan arányos a lebontás hatékonyságával^{9,14}.

Végül a fagofór két növekvő vége záródik. Ehhez az ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) fehérjék szükségesek. Az autofagoszóma fuzionál a lizoszómával a HOPS, SNARE komplexek és kisGTP-ázok közreműködésével, így megkezdődhet tartalmának lebontása. Ilyenkor az autofagoszóma belső membránja is lebomlik. Ebben a proteolitikus folyamatban keletkező metabolitok visszakerülnek a citoszolba és a sejt újrahasznosítja őket^{12,13}.

Az autofágia szerepet játszik a homeosztázis fenntartásában, így az öregedés folyamatában is kulcsszereplő. A kor előrehaladtával az autofágia génjeinek kifejeződése romlik, így maga az autofágia hatékonysága is leromlik. Az autofágia sérülésével felgyorsul az öregedés folyamata, míg aktivációja élettartam növekedését segíti elő. Idős élőlényekben a vezikula nukleáció folyamata és a lizoszómális lebontás is sérül^{18,19}. Az *Atg* gének mutációja számos időskori betegség kiváltója lehet, mint például neurodegeneráció, axon degeneráció, hepatomegalia és májelégtelenség, szívhipertrofia és diszfunkció, valamint dezorganizált mitokondriumok stb. Ezek mind olyan jellemzők, amik öregedés során is előfordulnak. Fontos megjegyezni, hogy autofágiával nemcsak fehérjéket, molekulákat, hanem egész sejtszervecskéket is bonthat a sejt. Ez nagyban hozzájárul ahhoz, hogy a hibásan működő mitokondriumok és egyéb sejtszervecskék ne okozzanak további károkat. Mindent összevetve tehát az autofágia hiánya súlyos következményekkel jár, és gyorsítja a sejtes öregedési folyamatokat¹⁸.

Különösen fontos a neuronok szempontjából a hibátlan autofágia. Extrém mértékű polarizációjuk és hosszuk miatt nélkülözhetetlen a jó lipid- és fehérjetranszport a sejten belül. A felnőtt szervezetben a neuronok pótlása nem lehetséges, így azok túlélése és funkcióik

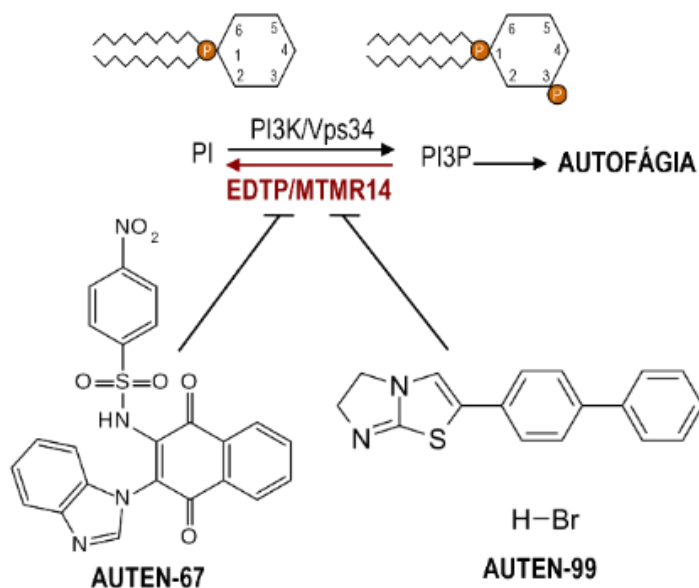
biztosítása az egész élettartam alatt esszenciális¹³. A neuronokra jellemző a gyorsabb autofagoszóma turnover. Emiatt többek között a tápanyaghiányos idegsejtek jóval kevesebb LC3-II-t (LC3B-PE) tartalmaznak, mint a nem polarizált sejtek. A fiatal idegsejtek számára valószínűleg nem szükséges jelentős mértékű autofágia, így fogékonyabbak lehetnek az autofágiás fluxus egyensúlyának felborulására. Az *Atg* gének mutációi súlyos neuronális működési zavart idézhetnek elő¹³. Az *Atg8* és *Atg5* gének kifejeződésének idegrendszeri fokozásával viszont megnövelhető az élettartam²⁰. Mivel a neuronok autofágája ilyen pontos idő- és térbeli szabályozást igényel, az idegsejtekben az autofágia mechanizmusa különbözik az átlagos sejtektől. Az autofagoszómák kialakulhatnak a sejt periferiáján is (különösen az axonvégeken), amik a sejttest felé endoszómákkal fuzionálva tudnak axon melletti retrográd transzporttal haladni. A neuronok autofág aktivitására jellemző, hogy a környező sejtek (főleg az asztrociták) segítségét igényli¹³.

2.3 Autofágia aktiváló – AUTEN molekulák sejtbiológiai és élettani szerepe

Az időskori autofágia romlás hozzájárul az öregedés folyamatához és az autofágia újra aktiválása elősegíti az élettartam növekedését. A kutatók már régóta próbálnak különféle hatóanyagokat fejleszteni, amely támogatja a szervezetet az autofág aktivitás hatékonyabbá tételében, segítve az idősödő sejt homeosztázisának fenntartását. Azonban a legtöbb elérhető autofágia aktiváló hatóanyag az autofágiától *upstream* hatnak, így alkalmazásuk számos mellékhatással járhat. A rapamycin-A például az mTORC1 kináz gátlásán keresztül hat, ami rengeteg sejtfunkcióban vesz részt (pl.: növekedés, proliferáció, fehérjeszintézis)²¹. A rilmenidin egy $\alpha 2$ -adrenoceptor és imidazolin II receptor agonista, amely nemcsak az mTOR-független makroautofágiára hat, hanem a vérnyomásra is hatással van (antihipertenzív)^{22,23}. A lítium is ismert, mint autofágia szabályozó hatóanyag, egyes esetekben indukálja, máskor viszont akár gátolhatja is azt²⁴.

Kutatócsoportunk célja az eddig ismert autofágia szabályozó pontoknál specifikusabb aktiválási lehetőségeket találni. Az MTMR14 (*Myotubularin related protein 14 /Jumpy*) és *Drosophila* ortológja az EDTP (*Egg-derived tyrosine phosphatase*) antagonistái a PI3K-nak. Defoszforilálják a PI3P-ot, ezáltal gátolják az autofágia vezikula nukleációs lépését^{25,26}. Ez az EDTP-hez hasonlóan az MTMR14-re is igaz. Az EDTP dopaminerg és szerotonerg neuron specifikus gátlásával élettartam növelhető és javítható a mászásképeség¹⁹.

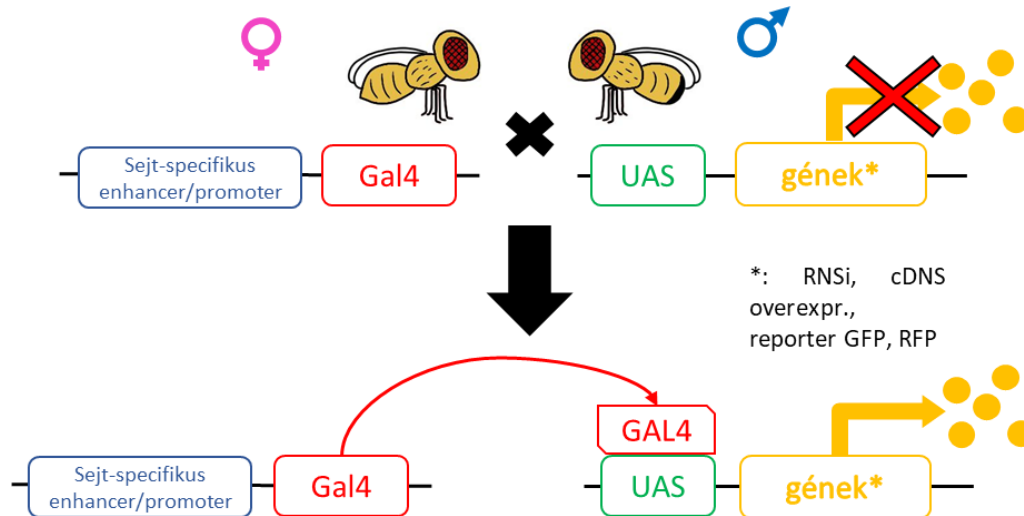
Dolgozatomban két autofágia aktiváló kismolekula hatását vizsgáltam, az AUTEN-67-et (*autophagy enhancer-67*) és az AUTEN-99-et. Az AUTEN-67 és a -99 az MTRM14/EDTP gátlásán keresztül aktiválják az autofágiát^{19,25,26} (2. ábra). HeLa sejtekben az AUTEN-67 (A67) az MTMR14 foszfatáz aktivitás gátlása koncentráció függő, így akár finomhangolni is lehet a hatását. Az A67 és A99 tehát a vezikula nukleációs lépésnél fokozhatják az autofágiát, ezért valószínűsíthető, hogy kevesebb mellékhatása van, mint például a Rapamicinnek²⁷.



2. ábra Az AUTEN-67 és -99 autofágia aktiváló hatása. Mindkét kismolekula a PI3K/Vps34 antagonistáját, az EDTP/MTMR14-et gátolja, ez által fokozva az autofág aktivitást.¹⁵

SCA1-hez hasonlóan a Huntington-kór is a poliQ betegségek közé tartozik, a tünetekért a meghosszabbodott poliglutamin régió a felelős. Humán *huntingtin* (*htt*) mutáns allélt kifejeztetve *Drosophila* agyban elmondható, hogy az A67 a Huntington-kóros muslicában is aktiválta az autofágiát. A szer hatására a káros mutáns htt fehérje mennyisége és az ubiquitinált fehérjék szintje is eredményesen csökkent. Az A67 növelte a várható élettartamot a Huntington-kóros muslicában²⁸. Az A99 az A67-hez hasonlóan pozitív eredményeket ért el a Parkinson-kór modellek esetében is¹⁵.

2.4 *Drosophila*, mint neurodegenerációs modell



3. ábra: Az UAS-Gal4 rendszer működése *Drosophilában*. Az átíródott Gal4 fehérje kötődik az UAS-transzgén promóteréhez ezzel aktiválva meg különböző funkciójú transzgének átírását. Saját ábra.

Az egyik legismertebb modellélőlény az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*). Rendkívül sok előnyös tulajdonsága van, például rövid élettartama (25°C-on kb. 10 nap), könnyen fenntartható, viszonylag kis genommal rendelkezik és génjeinek manipulálása is egyszerű és gyors²⁹.

Mivel az emberi betegségekhez köthető gének 75%-ának van ecetmuslica ortológja, alkalmazhatóak neurodegeneratív betegségmmodellekként is. Neurodegeneratív modell szempontjából előnyös tulajdonságai, hogy komplex idegrendszerrel rendelkezik, agyában neuronok és gliák találhatók, amiket „vér-agy” gát szerű határfelület véd. Neurotranszmittereik az emlőskéhoz hasonlóak (dopamin, GABA, glutamát, acetilkolin, szerotonin... stb.), de rendelkeznek emlőstől eltérő norepinefrinnek megfelelő ingerületátvivő anyaggal is, az oktopaminnal³⁰.

Sok neurodegeneratív betegségnek létezik ecetmuslica modellje: többek között a Parkinson-kór, az Alzheimer-kór, a fragilis X-szindróma, a törékeny-X-hez kapcsolt tremor-/ataxia-szindróma, valamint a spinocerebelláris ataxia. A modellhez általában transzgenikus törzseket vagy funkcióvesztéses mutáns allélokat tartalmazó törzseket használnak a kutatók. Például *parkin* funkcióvesztéses mutánsokat elő tudnak állítani egy P elem transzpozíciójának indukálásával³¹. De előfordulhat az is, hogy emberi komplement DNS-t klónoznak egy pUAST transzformációs vektorba, amit később injektálnak a muslicákba³². Ennek következményeképpen a muslica egy leegyszerűsített humán betegség tüneteit fogja mutatni, segítségével betekintést nyerhetünk a genetikai útvonalakra és folyamatokra, amik szerepet játszanak a betegség kialakulásában²⁹.

Az egyik legelterjedtebb vizsgálati módszer *Drosophilában* az UAS-Gal4 rendszer használata (3. ábra). Ennek segítségével egy betegség génjét vagy feltételezett szabályozó géneket lehet kifejeztetni szövet- és/vagy sejtspecifikusan.

A rendszer két fő részből áll. Az UAS egy *upstream* aktiváló szekvencia, ami után a kifejeztetni kívánt transzgén helyezkedik el. A Gal4 pedig egy élesztő transzkripciós faktor, ami egy sejtspecifikus promóter mögött helyezkedik el. Mivel a transzgén az UAS befolyása alatt áll, csak akkor fejeződik ki, ha a Gal4 beköt az UAS-re. Ezt egy egyszerű keresztezéssel lehet elérni az F1 generációban³³.

A Gal4 közelében lévő promóter felel a sejt-/szövetspecifikusságért, befolyásolva az UAS-target gén kifejeződését. Amely UAS-transzgén kódolhat RNS interferenciához szükséges duplaszálú RNS-t, gén túltermeltetéshez cDNS-t, vagy fluoreszcensen jelölt fehérjéket³⁴. Ez a rendszer tehát igen sokféle módon használható genetikai módosításokra. Például sejtsors megváltoztatására, az adott sejt környezetében lévő sejtek sorsának megváltoztatására vagy akár a sejt fiziológiájának módosítására is kiválóan alkalmas. Segítséget nyújthat különböző szignalizációs útvonalak tanulmányozásában, az ektopikus génexpresszió hatásának vizsgálatában, de például a szövet-/sejtspecifikus géncsendesítésben is komoly szerepe van, ezáltal világítva meg egyes folyamatok nélkülözhetetlen összetevőit³³. Ez a nagymértékű változatosság lehetővé tette szövetspecifikus funkciónyeréses vagy funkcióvesztéses screenek végrehajtását, mutáns sejtek jelölését kiméra szövetekben, génmenekítéses kísérleteket, valamint neuronális funkciók gátlását is³³.

Az SCA1 *Drosophila* modellje esetén a humán Atx1 fehérjét termeltetjük túl az UAS-Gal4 rendszer segítségével. Erre azért van szükség, mert bár muslicában megtalálható az *atx1* gén, a polyQ régió hiányzik, ami a betegség szempontjából kulcsfontosságú⁸.

3. Célkítűzések

Az AUTEN-67 (A67) és AUTEN-99 (A99) hatóanyagoknak ugyanaz a célfehérjéje (EDTP/MTMR14), mégis a szerkezeti és méreti eltéréseikből következően adódhatnak különbségek a hatásmechanizmust illetően. Az A99 a kisebb, ezért a felszívódása és a vér-agy gáton átjutása is hatékonyabb lehet, mint az A67-é. A két molekula idegrendszeri hatása eddig még nem került összehasonlításra (egyidejűleg nem voltak vizsgálva). Céлом a két autofágia aktiváló kismolekula hatásának vizsgálata SCA1 betegségmodellben és idegsejtspecifikus összehasonlításuk a *Drosophila* felnőtt idegrendszerében. Kutatásomhoz az alábbi kísérletes célokat tűztem ki:

- Az A67 és A99 összehasonlítása az SCA1 „konvencionális” betegségmodellekben (élettartam, mozgásképeség és összetett szem morfológia vizsgálatok)
- Az AUTENek autofágia aktiváló hatásának vizsgálata kontroll és SCA1 modellben (fluoreszcens mikroszkópos és fehérjemennyiség meghatározó módszerekkel)
- Megvizsgálni, hogy van-e különbség az A67 és A99 hatóanyagok autofágia aktiváló képességében különböző idegsejt típusokban (idegsejt specifikusan vizsgálni az autofágiát fluoreszcens mikroszkópos és Western blot technikákkal).
- Idegsejt specifikus SCA1 modellek létrehozása és jellemzése.
- Az AUTEN-ek élettartam és mozgási képesség vizsgálata hAtx1-et túltermelő neuron specifikus (kolinerg, GABAerg és glutamaterg) mutánsokban.

4. Anyagok és módszerek

FELHASZNÁLT TÖRZSEK ÉS KEZELÉSEIK

Név	Genotípus	Származási hely
isow ⁻	w[1118]	BDSC 5905
30Q	P{w[+mC]=UAS-Hsap\ATX1.30Q}F6	Huda Zoghbi
82Q	w[1118]; P{w[+mC]=UAS-Hsap\ATX1.82Q}M6	Huda Zoghbi
FYVE	w[*]; P{w[+mC]=UAS-GFP-myc-2xFYVE}2	BDSC 42712
UGMA	w*; P{UAS-mCherry-GFP-Atg8a}	Juhász Gábor
Appl-Gal4	P{Appl-GAL4.G1a}1, y ¹ w [*]	BDSC 32040
Chat-Gal4	w[*]; P{w[+mC]=ChAT-GAL4.7.4}19B P {w[+mC]=UAS-GFP.S65T}Myo31DF[T2]	Szabó Áron BDSC 6793
Elav-Gal4	w[*]; P{w[+mC]=GAL4-elav.L}3	Huda Zoghbi
Gad1-Gal4	P{w[+mC]=Gad1-GAL4.3.098}2/CyO	Szabó Áron BDSC 51630
OK371-Gal4	w; OK371-Gal4/CyO; UAS-mCD8::GFP/TM6 Hu	Szabó Áron
ple-Gal4	w[*]; P{w[+mC]=ple-GAL4.F}3	BDSC 8848
3xmCherry-Atg8a	w[1118]; 3xmCherry-Atg8a; +	Juhász Gábor
GFP-p62	TubGFP-p623-2M (II)/CyO	Juhász Gábor

1. táblázat A kísérletek során felhasznált *Drosophila* törzsek. BDSC: Bloomington *Drosophila* Stock Center

Az állatok normál körülmények között, standard táptalajon voltak nevelve 25°C-on. A kezeléseket a bábból való kikelést követően, 29°C-on végeztem. Az AUTEN-67 (T0501-7132) és AUTEN-99 (T0512-8758) hatóanyagok DMSO-ban (Sigma, D8418) voltak feloldva, ezért a kontroll állatokat azonos térfogatú DMSO-val kezeltem. Az állatok kezeléséhez a törzsoldatokat 100 µM-osra hígítottam élesztő szuszpenzióban. A kezelt állatokat kétnaponta friss hatóanyagos táptalajra tettem.

WESTERN BLOT

A fehérje minták 29°C-on tartott felnőtt, 7 napos (fiatal) és 21 napos (idős) muslicákból származtak²⁷. A blotokat többször is megismételtem. Elsődleges ellenanyagok: anti-Ref(2)P/SQSTM1/p62 (nyúl 1:2000), alfa-anti-Atg8a (nyúl, 1:2000), anti-ataxin (nyúl, 1:1000, Sigma, C116639), anti-GFP (patkány, 1:2500, DSHB-GFP-1D2). Belső kontrollnak anti-Tub84B (egér, 1:1000) jelölést végeztem. Alábbi másodlagos ellenanyagokat használtam: anti-nyúl IgG alkalikus foszfatáz (1:1000, Sigma, A3687), anti-egér IgG alkalikus foszfatáz (1:1000, Sigma, A8438), anti-patkány IgG alkalikus foszfatáz (1:1000, Sigma, A8438). A jelölések előhívásához NBT-BCIP oldatot (Sigma, 72091) (3%-os tejporos TBST-ben hígítva) alkalmaztam.

Az *UAS-GFP-mCherry-Atg8a* transzgént idegsejt-specifikusan fejeztettem ki, így a fehérje izolátumokból anti-GFP jelöléssel csak az általam vizsgált sejtben zajló lebontási folyamatok voltak vizsgálhatóak. A módszerrel sejttypus függően 3, vagy 4 GFP-pozitív jelölés volt tanulmányozható. A GFP-mCherry-Atg8a-I (szolubilis), GFP-mCherry-Atg8a-II (membrán kötött – lipidált forma), továbbá az Atg8a-ról hidrolázok által lehasadt GFP és GFP-mCherry fehérjék jelölései voltak láthatóak. A detektált GFP-mCherry illetve a GFP mennyisége az autofágia fluxot mutatja meg³⁵. Minél nagyobb a hasadt formák aránya, annál eredményesebb a lebontás. Ha nem történik lebontás, akkor semmilyen hasadt formát nem láthatunk. A szabad GFP és szabad GFP-mCherry egymáshoz viszonyított aránya valószínűleg a neuronspecifikus lizoszómális enzimek milyenségétől függ (4. ábra).



4. ábra: Az autofágia flux vizsgálata western blottal. Az első oszlopban nem tapasztalható degradáció. A második és a harmadik oszlopban hasonló mértékű az autofágia flux, de másik degradált forma szaporodott fel.

IMMUNHISZTOKÉMIA

Az agyakat 4%-os formaldehydben fixáltam, majd háromszor mostam PBST-ben. A blokkoláshoz magzati szarvasmarha szérumot használtam (1:20 arányban PBST-ben oldva). A kísérletet az alábbi protokoll alapján végeztem³⁶. Az elsődleges ellenanyag jelölést 2 napig 4°C-

on végeztem. Ellenanyagok: anti-ataxin (nyúl, 1:500, Sigma, C116639), Anti-Ref(P)2/p62 (nyúl, 1:200), anti-ubiquitin (egér, 1:500, Merck, ST1200). Ez után háromszor mostam PBST-vel és utána újra blokkolóba raktam őket. Másodlagos ellenanyagként Anti-Rabbit Alexa Fluor 488-t (Life Technologies, A11008) és anti-Mouse Texas Redet (Life Technologies, T862) használtam 1:500 hígításban. Fedéshez 50 µg/ ml Hoechstöt (sejtmagfesték) tartalmazó 1:4 PBS:glicerol oldatot használtam.

FLUORESZCENS és KONFOKÁLIS MIKROSZKÓPIA

A képek készítéséhez Zeiss Axioimager M2 fluoreszcens mikroszkópot használtunk, ApoTome-mal felszerelve. A konfokális képek készítéséhez Zeiss inverted LSM800 confocal mikroszkópot vettünk igénybe. A képek szerkesztéséhez pedig Zeiss Zen Blue lite szoftvert alkalmaztunk.

MÁSZÁS ESSZÉ

Az UAS-transzsgének kifejeztetéséhez Elav-Gal4-et (teljes felnőtt idegrendszerben kifejeződő) valamint Gad1-Gal4-et, Chat-Gal4-et és OK371-Gal4-et használtam. CO₂ altatást követően vékony hosszú üvegcsőbe (25 cm magas, 1,5 cm átmérőjű) helyeztem az állatokat. A mérés előtt 1,5 óra regenerációs időt hagytam 29°C-on. A negatív geotaxist finom ütögetéssel váltottam ki, ami miatt az állatok leestek a cső aljára, majd elindultak felfelé. Megszámoltam, hogy 20, 40, 60 másodperc alatt hány állat éri el a 6 cm-nél (Gad1-Gal4-et, Chat-Gal4-et és OK371-Gal4) és 21,8 cm-nél (Elav-Gal4) lévő vonalat. Az első kísérletnél a reakcióidejüket lehet mérni az állatoknak, a másodiknál viszont azt, hogy vannak-e memóriaproblémáik (képesek-e hosszabb ideig is megtartani a menekülési ingert) és az izomműködést vizsgáljuk. A kezelésként 2 párhuzamos csövet (15-15 állat) használtam, a méréseket félórás szünetekkel háromszor ismételttem³⁶.

ÉLETHOSSZ MÉRÉS

Élethossz méréshez felnőtt hímeket és nőstényeket válogattam ki, minden második nap új hatóanyagot táptalajra helyezve őket. Minden nap megszámláltam az elpusztult hímeket és nőstényeket. Öt-öt párhuzamos cső volt minden állatból, csövenként 15 hím és 15 nőstény állattal. A kiértékeléshez és az élettartam Kaplan-Meier görbék készítéséhez SPSS 17 szoftvert alkalmaztam.

Minden adathalmazról először Shapiro-Wilk teszttel megnéztem, hogy normál eloszlásúak. Ha az összehasonlítandó adatsorok normál eloszlásúak, akkor F-próbával ellenőriztem a varianciát, ha ez is megegyezett, akkor kétmintás t-próbával hasonlítottam össze az adathalmazokat. Ha a variancia nem egyezett meg, akkor Welch-próbát alkalmaztam. Ha a két összehasonlítandó adatsorból az egyik vagy mindkettő nem normális eloszlású volt, akkor Man-Whitney U-teszttel hasonlítottam össze a mintákat, ez a kétmintás t-próbával egyenértékű. Az elemzéshez és a boxplotok készítéséhez RStudio 2023.06.2 verziót használtam.

A boxploton a négyzetek alsó és felső széle az első, illetve a negyedik kvartilist jelölik. A középen szereplő vastagabb vonal a medián. A szignifikancia megbízhatóságát csillagokkal jelöltem, ***: $p < 0,005$, **: $p < 0,01$ és *: $p < 0,05$.

5. Eredmények és megvitatásuk

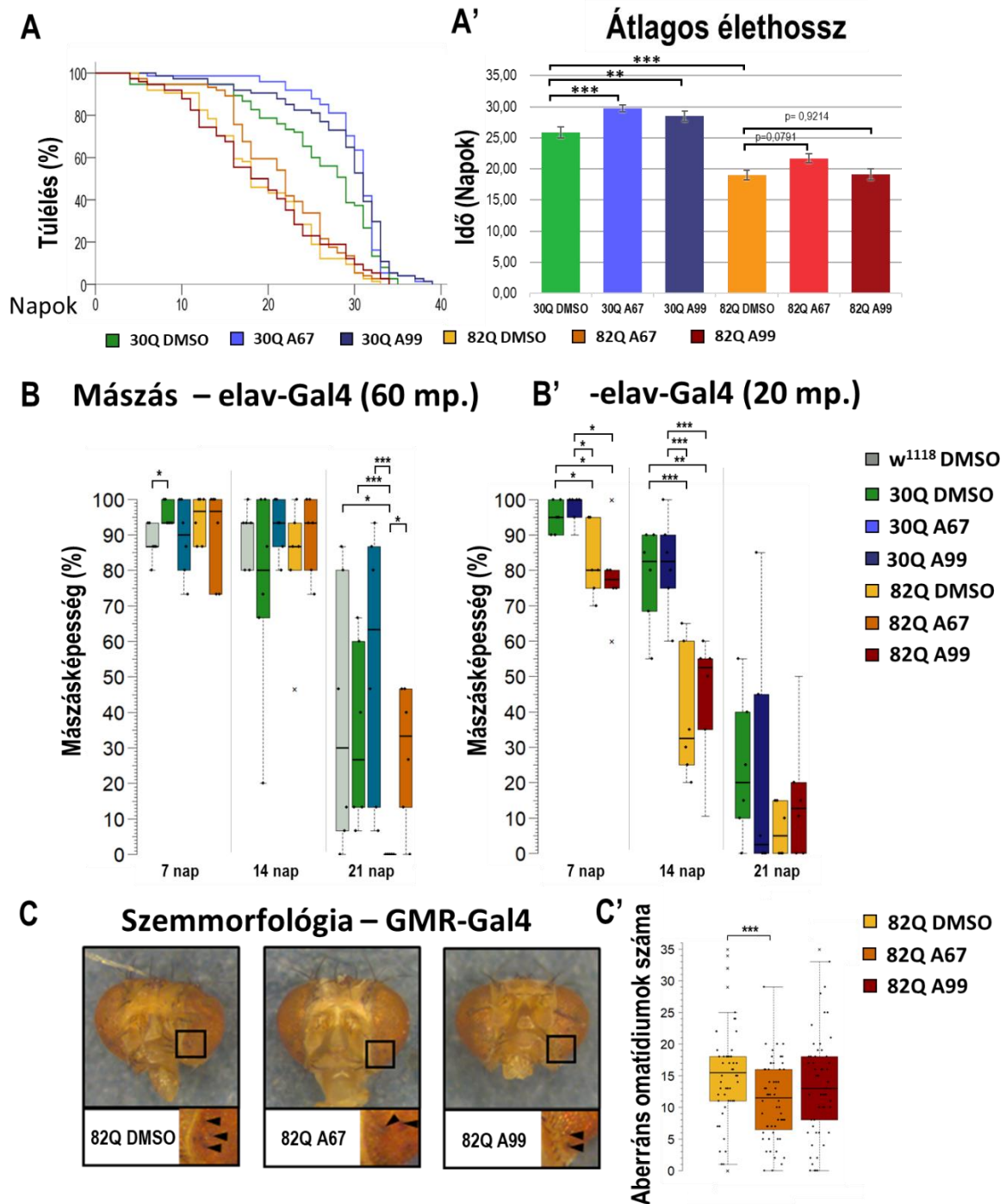
5.1. Az AUTEN-67 élettartam növelő hatású az SCA1 betegségmodellben

A kísérletekhez az SCA1 vad típusú 30Q és mutáns 82Q humán Atx1 fehérjét kifejező törzseket használtam (30 és 82 glutamin ismétlődésű Atx1 fehérjék képződnek). A 30Q mellett további kontrollként izogenikus *white* (*w^[1118]*) törzset kereszteztem a Gal4 forrással. *w^[1118]* genotípusú állatokba integrálták a vizsgálathoz használt transzgéneket. A transzgenikus 30Q és 82Q törzseket Elav-Gal4-gyel fejeztettem ki az egész agyban³⁷.

Korábbi eredmények azt mutatják, hogy mind az A67, mind pedig az A99 aktiválja az autofágiát *Drosophilában* és egyes neurodegeneratív betegségek kezelésében is segítséget nyújthatnak^{16,28}. A két molekula hatását SCA1 betegségmodell esetében tanulmányoztam.

Megvizsgáltam a hatóanyagok élettartam szabályozását. Eredményeim szerint az AUTEN-kezelések növelik a 30Q állatok élettartamát a kontroll 30Q DMSO-hoz képest (a változás hímekben volt nagyobb mértékű). A 82Q mutáns állatok szignifikánsan rövidebb ideig élnek a kontroll 30Q csoportoknál. A 82Q-esetében csak az A67 növeli a várható élettartamot (5. ábra A, A'). A mászás esszé a motoros és idegi funkciók (neuronális és izomműködés) vizsgálatára szolgál³⁸. A „negatív geotaxis” egy veleszületett menekülési reakció mérésén alapul. Az állatok felmásznak az üvegcső falán, ha előtte finoman leütögetjük a muslicákat a cső aljára. A mászás sebességéből és tartósságából következtetni lehet az állatok ingerfelfogó és megtartó-képességeire is³⁹. A beteg állatok (82Q) szignifikánsan rosszabbul másznak az azonos korú

egészséges társaiknál (30Q), így ez egy jó módszer a betegség tanulmányozására⁸. Az AUTEN-67 megnöveli idős „beteg” SCA1 modell állatok mászási képességét. Az A99 azonban nem okozott szignifikáns változást (5. ábra B, B’).



5. ábra Az AUTEN-67 növeli az SCA1 modellek élettartamát és mozgási képességét. Az A az AUTEN kezelt állatok Kaplan-Meier túlélési görbéi, A' az állatok átlagos élettartamát mutatja. A B-B' AUTEN-67 (A67) illetve AUTEN-99 (A99) kezelés hatása látható mászási képességre. A C-C' ábrán a szemben kifejeztetett mutáns atx1 hatása látható. A fekete négyzetek a kinagyított területet jelölik, a nyilak pedig az aberráns omatídiumokat.

GMR-Gal4-gyel főleg a differenciálódó fotoreceptor sejtekben lehet különböző UAS-transzgéneket kifejeztetni⁸. A mutáns Atx1 túltermeltetése az összetett szemekben dezorganizált ommatidiumokat, interomatidiális sörte vesztést, valamint a rhabdomerek és a szövetintegritás elvesztését okozza⁸. Megvizsgáltam, hogy a hatóanyagok miképpen befolyásolják ezeket a fenotípusos jellemzőket. A GMR-Gal4-gyel kifejeztetett 82Q abnormális foltokat idéz elő a muslicák összetett szemében. Nőstényekben a lárvális A67 kezelés szignifikánsan csökkenti az aberráns ommatidiumok számát a kontroll, 82Q DMSO nőstényekhez képest (5. ábra C, C').

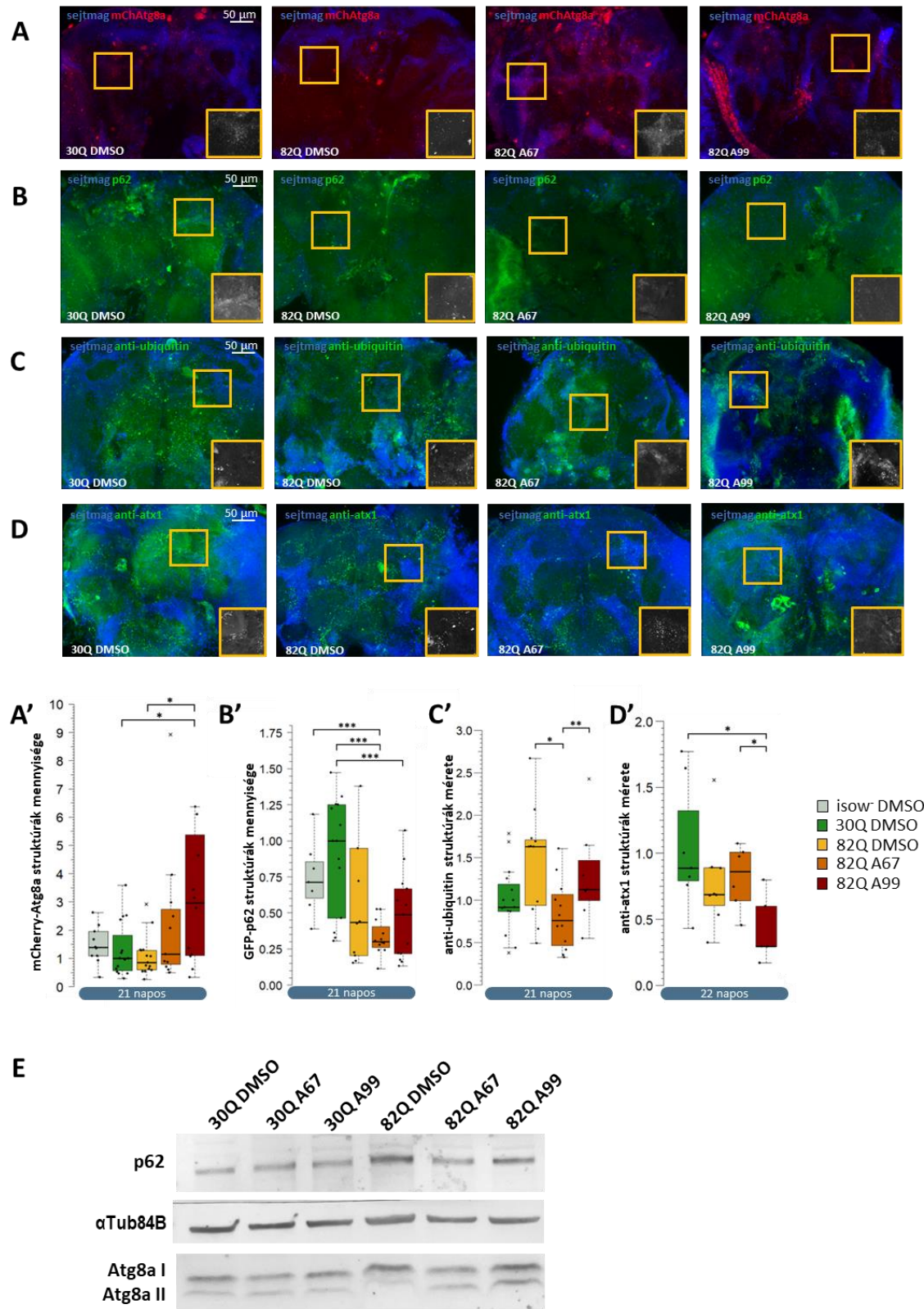
5.2. Az AUTEN hatóanyagok eltérő mértékben növelik az autofágiát SCA1 betegségmodellben

3xmCherry-Atg8a és GFP-p62 autofág markerekkel vizsgáltam *Drosophila* agyakban az autofágiát. Az mCherry-Atg8a a formálódó fagofortól az autolizoszómáig valamennyi autofág vezikula típust jelöli⁴⁰. Eredményül azt kaptam, hogy a DMSO-val kezelt 82Q-hoz képest, mindkét AUTEN növelte az autofág struktúrák mennyiségét, de csak az A99 hatása volt szignifikáns. A 30Q DMSO és a 82Q DMSO állatokhoz képest az isow DMSO állatokban kevesebb volt az autofág vezikulumok mennyisége (6. ábra A, A').

Továbbiakban megvizsgáltam, hogy a két hatóanyag hogyan hat a p62 (ecetmuslicában Ref(2)P) pozitív struktúrákra. A p62 szubsztrátja az autofágiának, mennyisége fordítottan arányos az autofágia hatékonyságával⁴⁰. Az A67 jobban csökkentette a p62 pozitív kompartmentumok méretét a 82Q állatokban az A99-hez viszonyítva (6. ábra B, B').

Az aggregálódott fehérjék mennyiségét anti-ubiquitin jelöléssel vizsgáltam. Az ubiquitináció a szelektív autofágia aktiválásában és a lebontásra ítélt fehérjék kijelölésében is szerepet játszik⁴¹. A jelölt struktúrák esetén csak az A67 csökkentette szignifikánsan az SCA1 betegekben az ubiquitinált aggregátumok mennyiségét (6. ábra C, C').

Mivel a betegségmodell fenotípusát az Atx1 mutáns fehérje váltja ki, megvizsgáltam ennek mennyiségét is immunhisztokémiával. Az A99 a 21 napos állatokban szignifikánsan csökkentette az Atx1-et 30Q DMSO kezelt állatokhoz képest. Feltételezhető, hogy fokozódott autofág aktivitás miatt tudtak a sejtek hatékonyabban megszabadulni az aggregált Atx1-től (6. ábra D, D'). Ez némileg ellentmond az eddigi eredményeknek, tervezem a kísérletek megismétlését.



6. ábra Az AUTEN-67 és -99 autofágia aktiváló hatásának összehasonlítása SCA1 modellben. A fluoreszcens képeken a magjelölést Hoechst festéssel készítettem. A sárga négyzet a kinagyított területet jelöli. **A-A'** ábrákon az mCherry-Atg8a autofág vezikulumok mennyiségi változása és kiértékelése látható. **B-B'** GFP-p62 pozitív aggregátumok változása látható. **C-C'** Ubiquitin ellenanyaggal jelölt kompartmentumok mennyiségváltozása látható. **D-D'** Anti-Atx1 struktúrák változása látható a fluoreszcens képeken. **E** Az autofágia vizsgálatához western blot módszert is használtam. Ahol a p62 és Atg8a-II az autofágia szubsztrátjait vizsgáltam. A α Tub84B belső kontrollként volt jelölve.

A mikroszkópia főleg az aggregált (vagy vezikulák felszínén csoportosult) fehérjék mennyiségét mutatja, ezért a vizsgálatomat kiegészítettem western blot – fehérje mennyiségi meghatározással is. Ez a módszer inkább alkalmas a szolúbilis fehérjék mennyiségi vizsgálatára⁴². Kísérleteimhez anti-Ref(2)P és anti-Atg8a ellenanyagokat használtam. A Ref(2)P mennyisége a 82Q DMSO kezelt állatokban volt a legmagasabb. Tehát a 82Q idegrendszeri túltermeltetése autofágia gátlást eredményezett. A kontroll 82Q DMSO állatokhoz képest az A67 nagyobb mértékben csökkentette a Ref(2)P mennyiségét, mint az A99. A western blot során az anti-Atg8a jelöléssel lipidált (Atg8a-II) és a szolúbilis (Atg8a-I) forma is vizsgálható. Új autofág vezikulumok képződésénél tehát megnövekedett Atg8a-II-es formát vártam, azonban az Atg8a-II nem válik le az autofagoszóma belső felületéről, így a fehérje szubsztrátja is az autofágiának. Az Atg8a-I és -II formák egymáshoz viszonyított aránya fontos információkkal szolgálhat az autofágiáról, de pontos értelmezésükhöz további fehérjék vizsgálata (pl: Ref(2)P) szükséges⁴³. Az Atg8a-II jelölés a 82Q DMSO esetében volt a legkisebb a vizsgált minták közül, de az Atg8a-I felhalmozódott. A 82Q A67 állatok esetében az Atg8a-I és az Atg8a-II mennyisége megegyezett egymással. A 82Q A99 muslicákban az Atg8a-I mennyisége megemelkedett az Atg8a-II-höz képest. Összehasonlítva a 82Q AUTEN kezelt és kontroll muslicákban az Atg8a-I szintjét, az A67 mintákban észlelhető csökkenés. Tehát az A67-tel kezelt állatok esetében a változás nagyobb mértékű volt, mint az A99-cel kezelt vagy a kontroll állatok esetében.

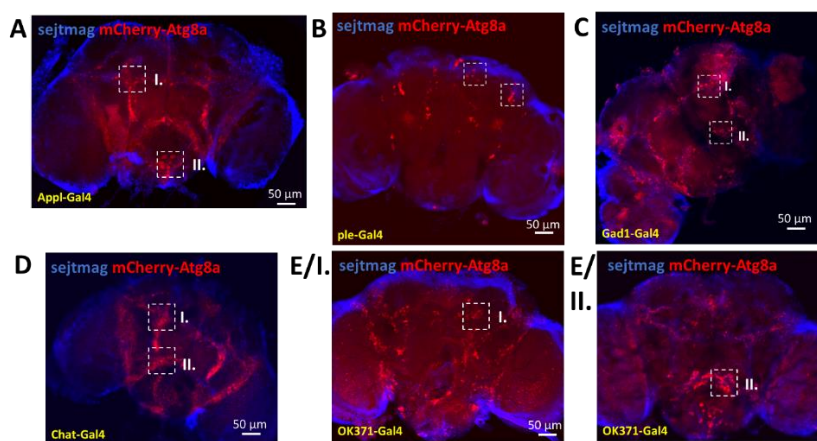
Összeségében elmondható, hogy a két hatóanyag csak a 30Q „egészséges” állatokban hat egyformán. A 82Q SCA1 modellben az A67 hatékonyabban növelte az autofágiát.

5.3. Az AUTEN molekulák eltérő mértékben hatnak különböző neuron típusokban

Megfigyeltem, hogy a két AUTEN gyakran eltérő változást okoz a kontrollokhoz és egymáshoz képest. Feltételezhető, hogy a vizsgált kismolekulák nem egyforma mértékben befolyásolják az egyes idegsejt típusokat. Hipotézisem vizsgálatához további idegsejt-specifikus kísérleteket végeztem. Többféle expressziós mintázatú Gal4 konstrukcióval kereszteztem az UAS-GFP-mCherry-Atg8a (UGMA) törzset, hogy az Atg8a pozitív struktúrákat különböző idegsejtekben vizsgálhassam (7. ábra).

Kutatócsoportunk már korábban is vizsgálta a Parkinson-kór *Drosophila* modelljét, ahol a dopaminerg neuronoknak van fontos szerepük, és az A67 hatásosnak bizonyult²⁷. Az eddig használt Elav-Gal4-hez leginkább az Appl-Gal4 expressziós mintázata hasonlít (azzal a

különbséggel, hogy az Appl a szemlebenyekben nem fejeztet ki UAS-géneket)⁴⁴. Ez egy általánosan használt idegrendszeri Gal4, ezzel ellenőriztem, hogy az eddigi eredményeim reprodukálhatóak-e más általános ideg-Gal4-el. Az SCA1-ben leginkább érintett neuronok a kisagyi Purkinje-sejtek⁴, amik maguk is GABAergek⁴⁵ és GABAerg valamint glutamaterg bemenettel rendelkeznek⁴⁶. Ezért esett a választásom a Gad1-Gal4-re (GABAerg) illetve az OK371-Gal4-re (glutamaterg és motor neuronok). Végezetül pedig szerettem volna megvizsgálni egy eddig általunk még nem vizsgált Gal4 törzset is (Chat-Gal4), amely a kolinerg neuronokban fejeződik ki⁴⁷.



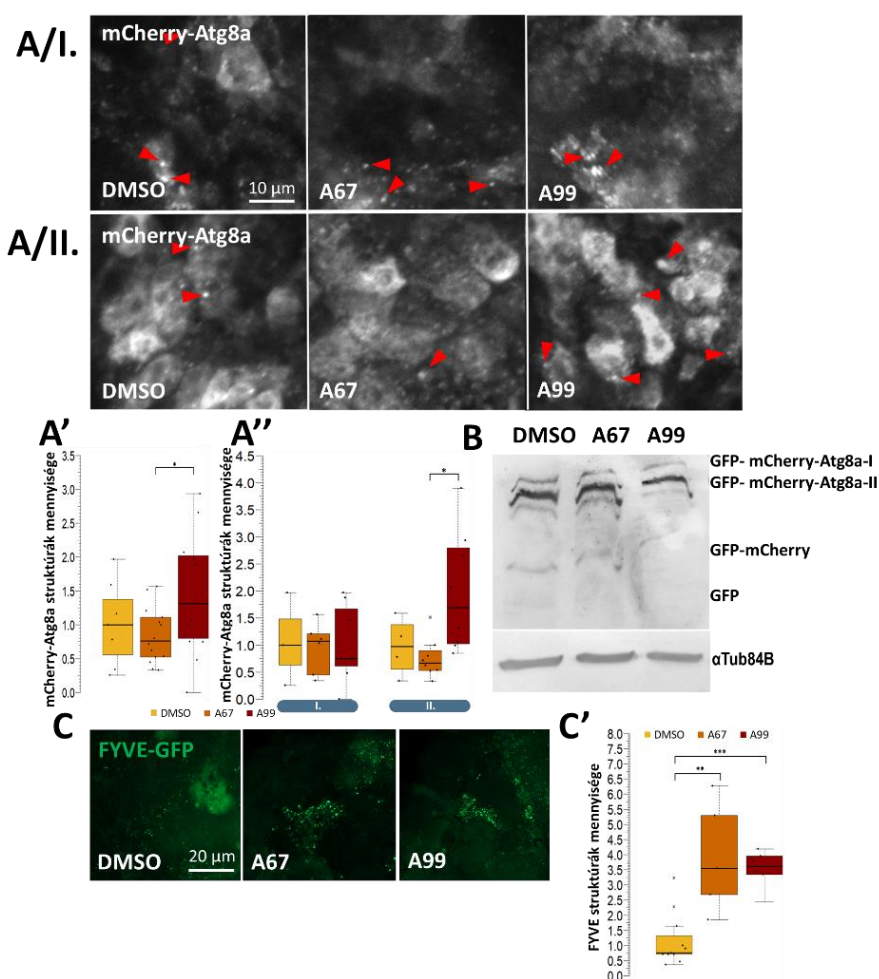
7. ábra A Gal4-es törzsek expressziós mintái és a vizsgált területek; A fehér szaggatott négyzet és a szám jelöli az adott Gal4 esetben vizsgált területet. Az ábrákon az mCherry-Atg8a (piros) autofág vezikulumokat, a Hoechst (kék) sejtmagokat jelöli.

A GFP érzékenyebb a pH változásra, mint az mCherry, ezért az autolizoszómákban a savas közeg miatt már csak mCherry jelölés detektálható. A vizsgált 5 Gal4 esetén semmilyen kezelés nem okozta a sárga (GFP és mCherry) jelölések felhalmozódását, tehát a 14 napos kezelés nem gátolta az autofagoszóma–lizoszóma fúziót (vagy a lizoszóma savasodását). Ezért a kiértékeléshez csak a mCherry-pozitív struktúrákat számoltam. Western blot analízis segítségével a szabad GFP és GFP-mCherry mennyiségét vizsgáltam anti-GFP jelöléssel, mert minél nagyobb a lehasadt fehérjék mérete a bloton, annál hatékonyabb a lebontás⁴⁸. A FYVE-GFP riporterrel a PI3P tartalmú struktúrákat lehet tanulmányozni⁴⁹, amiből következtethetünk arra, hogy az adott AUTEN mennyire eredményesen gátolta az EDTP-t. Ebben az esetben nem volt lehetőség több különálló területet vizsgálni.

Az Appl-Gal4-gyel a szemlebenyek kivételével a teljes felnőtt *Drosophila* agyban lehet fehérjéket kifejeztetni⁵⁰. Két területről vizsgáltam a mintákat az Appl-Gal4-gyel keresztezett UGMA törzsekben. Az A67 és A99 hatását gombatestek területén, illetve a prow régió idegsejtjeiben tanulmányoztam (7. ábra A). A két területet együtt vizsgálva (összesített adatok) az A99 szignifikánsan megnövelte az mCherry-Atg8a pozitív struktúrák mennyiségét az A67-hez képest. A két területet külön kiértékelve, csak a prow régióban szignifikáns az eltérés a két

AUTEN között (8. ábra A/I., A/II, A', A''). A FYVE-GFP marker (Appl-Gal4-el kifejeztetve) konfokális mikroszkópos vizsgálatából látszik, hogy a PI3P struktúrák mennyisége növekszik mindkét hatóanyag hatására, egymáshoz képest nem mutattak szignifikáns különbséget (8. ábra C, C'). A western blot eredménye idegsejt-specifikus, mivel anti-GFP ellenanyagot használtam és GFP-t csak a Gal4-re specifikus idegsejtek fejeztek ki. (Részletesebb leírás az Anyagok és módszerek fejezetben.) A western blottal csak a GFP-mCherry együttes hasadt forma detektálható, a GFP önmagában nem. (8. ábra B) Ebben az esetben a DMSO és az A67 között nem tapasztalható különbség. Látható még, hogy GFP-mCherry-Atg8a-I-hez képest az A99-ben lecsökken a II-es forma mennyisége. Szükséges a kísérlet megismétlése. A teljes agy (elav-Gal4) és Appl-Gal4 vizsgálatával tehát hasonló eredményeket kaptam.

Teljes agy (Appl-Gal4)

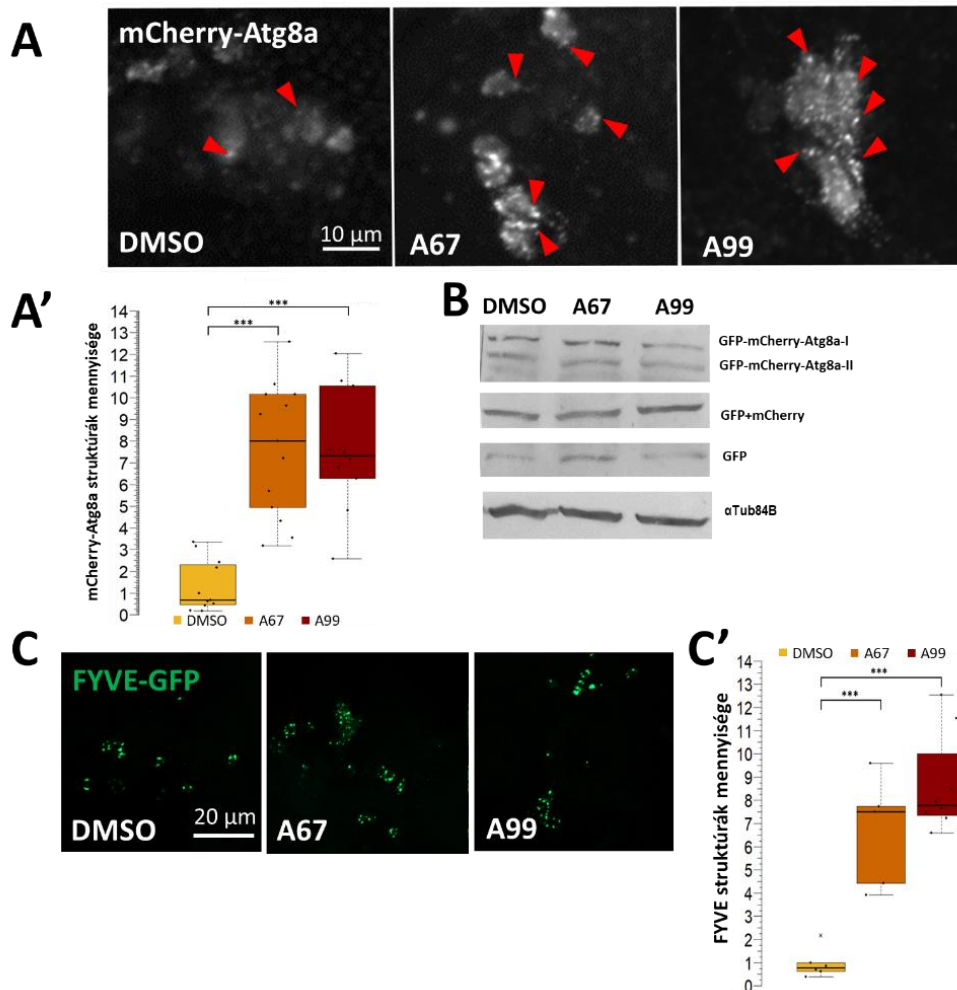


8. ábra Az A99 autofágia aktiváló hatású Appl-Gal4-et kifejező neuronokban. **A/I.** és **A/II.** ábrákon a piros nyilak az Atg8a pozitív struktúrákat jelölik. **A'-A''** ábrákon az mCherry-Atg8a autofág vezikulumok mennyiségének a kiértékelése látható. Az **A'** ábrán az mCherry-Atg8a struktúrák mennyiségének a kiértékelése látható, a két vizsgált területet együttesen kiértékelve.

Az **A''** ábrán a két terület (gombatest [A/I.] és prow régió [A/II.]) kiértékelése külön-külön látható. **B** Az autofágia vizsgálatához western blottal (anti-GFP jelöléssel) a GFP-mCherry-Atg8a-I és -II formákat, valamint az erről lehasadt fehérjét (GFP-mCherry és GFP) vizsgáltam. Az α Tub84B belső kontrollként volt jelölve. **C-C'** ábrákon a FYVE-GFP (zöld) markerrel jelölt PI3P mennyisége és kiértékelése látható.

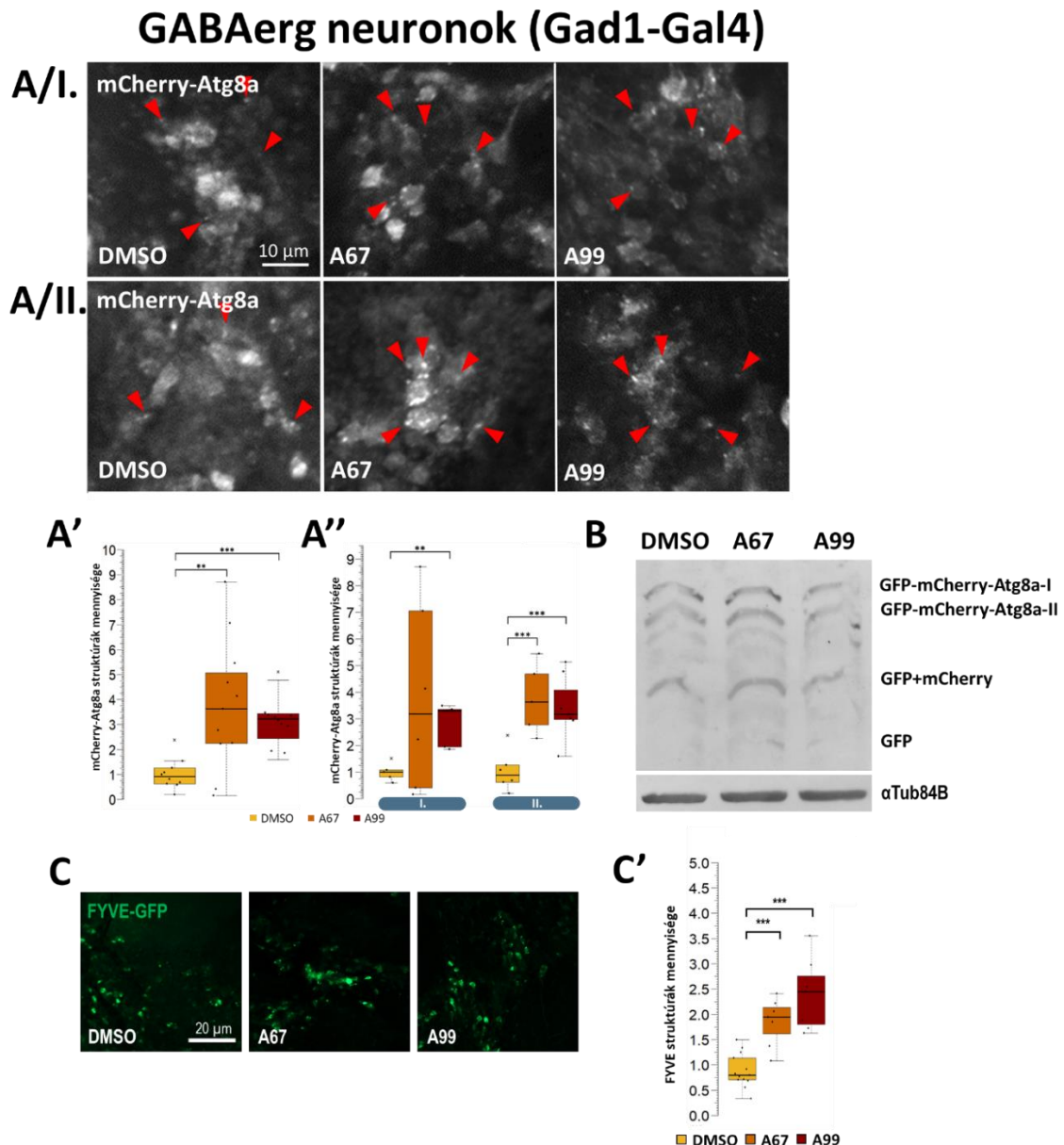
A ple-Gal4 dopaminerg neuronokban fejezteti ki a kívánt fehérjét⁵¹. Itt a csoportoknak csak együttes megfigyelésük volt lehetséges (nem minden neuroncsoport volt azonosítható az összes mintában) (7. ábra B). A DMSO kezeléshez képest az A67 és az A99 is szignifikánsan megemelte az mCherry-Atg8a mennyiségét (9. ábra A, A'). Western blottal megfigyeltem, hogy az UGMA mintákban a hasadt GFP mennyisége is megnő a kontrollhoz (DMSO) képest az A67 és A99 állatokban (9. ábra B). Az A67 és az A99 hatékonyan növelte a FYVE-GFP pozitív struktúrák mennyiségét, de egymáshoz képest nem mutattak szignifikáns elérést (9. ábra C, C'). Az A67 és az A99 is hatékonyan teljesített a dopaminerg neuronokban, közöttük szignifikáns különbség nem volt, ezért is lehet, hogy a korábban leírt az A99 által a Parkinson-kórra kifejtett pozitív hatás¹⁶ valószínűleg az A67-re is igaz.

Dopaminerg neuronok (ple-Gal4)



9. ábra Az A-67 és -99 egyaránt növeli az autofágiát dopaminerg (ple-Gal4) neuronokban; Az A ábrán a piros nyíl az Atg8a pozitív struktúrákat jelöli adott hatóanyag kezelés hatására. A' ábrán az mCherry-Atg8a autofág vezikulumok mennyiségének a kiértékelése látható. B Az autofágia vizsgálatához western blottal (anti-GFP jelöléssel) a GFP-mCherry-Atg8a-I és -II formákat, valamint az erről lehasadt fehérjét (GFP-mCherry és GFP) vizsgáltam. C-C' ábrákon a FYVE-GFP-pozitív (zöld) PI3P mennyisége és kiértékelése látható.

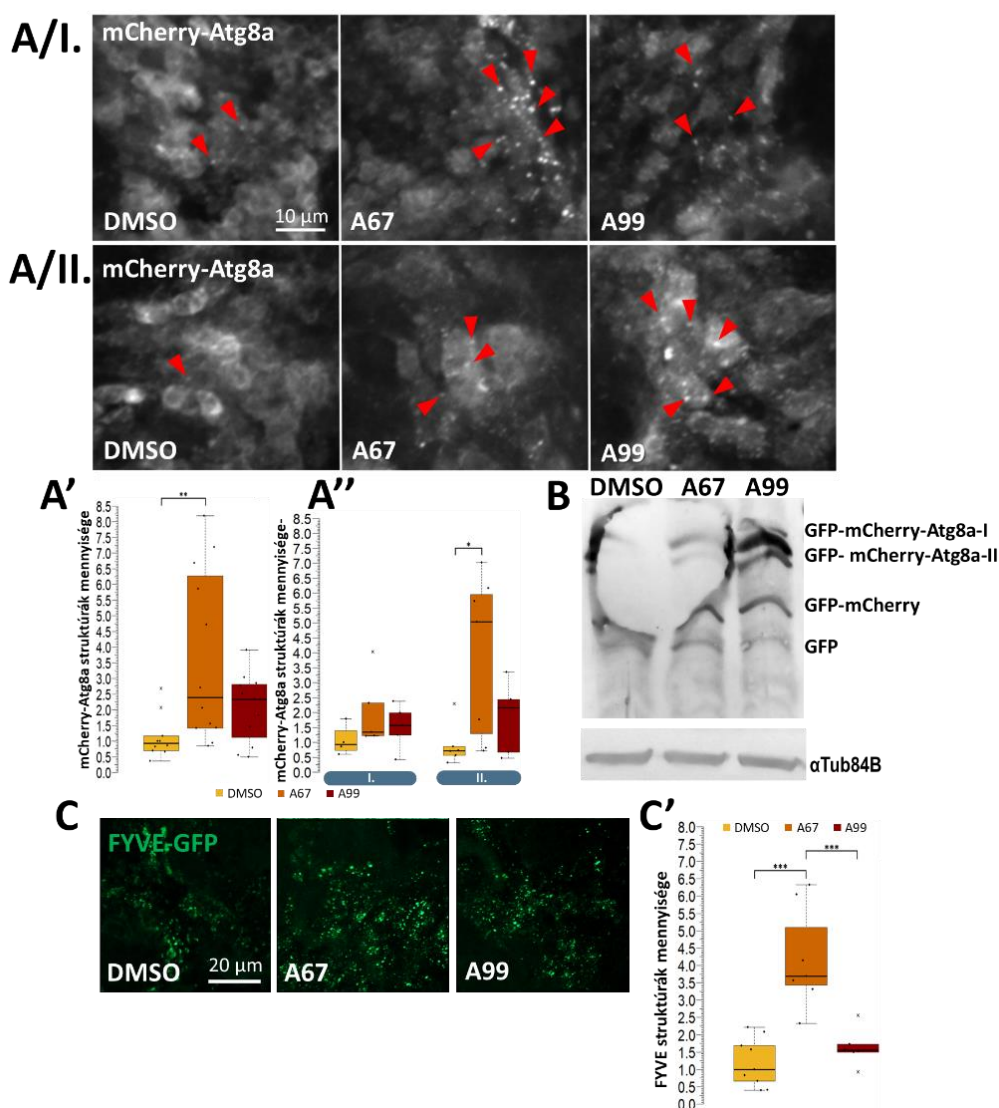
Gad1-Gal4-gyel a GABAerg neuronokban vizsgáltam az autofág struktúrák változását (7. ábra C)⁵². Az Appl esetén leírt két terület Gad1-Gal4-pozitív neuronjait vizsgáltam, ahol az autofág vezikulumok növekedése volt megfigyelhető (10. ábra A/I, A/II, A', A''). Western blot kísérletnél (10. ábra B) a hasadt GFP forma nem látszik, csak a GFP-mCherry együtt. Az A67 növelte ennek a hasadt formának a mennyiségét a kontroll állatokhoz képest. A FYVE-GFP eredményekből is látszik, hogy mindkettő hatóanyag szignifikánsan aktiválta az autofágiát, FYVE-GFP struktúrák mennyiségét. (10. ábra C, C')



10. ábra Az AUTEN-67 és -99 egyaránt növelik GABAerg (Gad1-Gal4) idegsejtekben az autofág vezikulumok mértékét. Az A/I. és A/II. ábrákon a piros nyíl az Atg8a pozitív struktúrákat jelöli adott hatóanyag kezelés hatására. A'-A'' ábrákon az mCherry-Atg8a autofág vezikulumok mennyiségének kiértékelése látható. Az A' ábrán az mCherry-Atg8a struktúrák mennyiségének a kiértékelése látható, a két vizsgált területet együttesen kiértékelve. Az A'' ábrán a két terület (gombatest [A/I.] és prow régió [A/II.]) kiértékelése külön-külön látható. A B ábrán az autofágia vizsgálat látható western blottal. Ehhez anti-GFP ellenanyagot használtam, láthatóvá téve a GFP-mCherry-Atg8a-I és -II formákat, valamint a lehasadt fehérjéket a GFP-mCherry és GFP-t. C-C' ábrákon a FYVE-GFP-pozitív (zöld) PI3P mennyisége és kiértékelése látható.

Ezt követően megvizsgáltam a Chat-Gal4 segítségével kolinerg neuronokban a két AUTEN hatását (7. ábra D)⁴⁷. A területeket együtt tanulmányozva szignifikánsan csak az A67 növelte az Atg8a struktúrák mennyiségét (11. ábra A/I, A/II, A'). Ez a szignifikáns különbség a prow régió idegsejtjeiben megnövekedett mCherry-Atg8a struktúrákból származik. (11. ábra A'') Western blottal az Appl-Gal4-gyel ellentétben, itt a GFP-mCherry együttes és GFP hasadt formák is látszanak. Elmondható, hogy az A67 kezelés hatására több hasadt GFP-t lehet látni az A99-hez képest (11. ábra B). A FYVE-GFP pozitív struktúrák eredményeiről elmondható, hogy összecsengenek az mCherry-Atg8a eredményeivel. Az A67 kezelt kolinerg idegsejtekben a DMSO-hoz és a A99-hez képest is szignifikáns különbséget tapasztaltam. (11. ábra C, C')

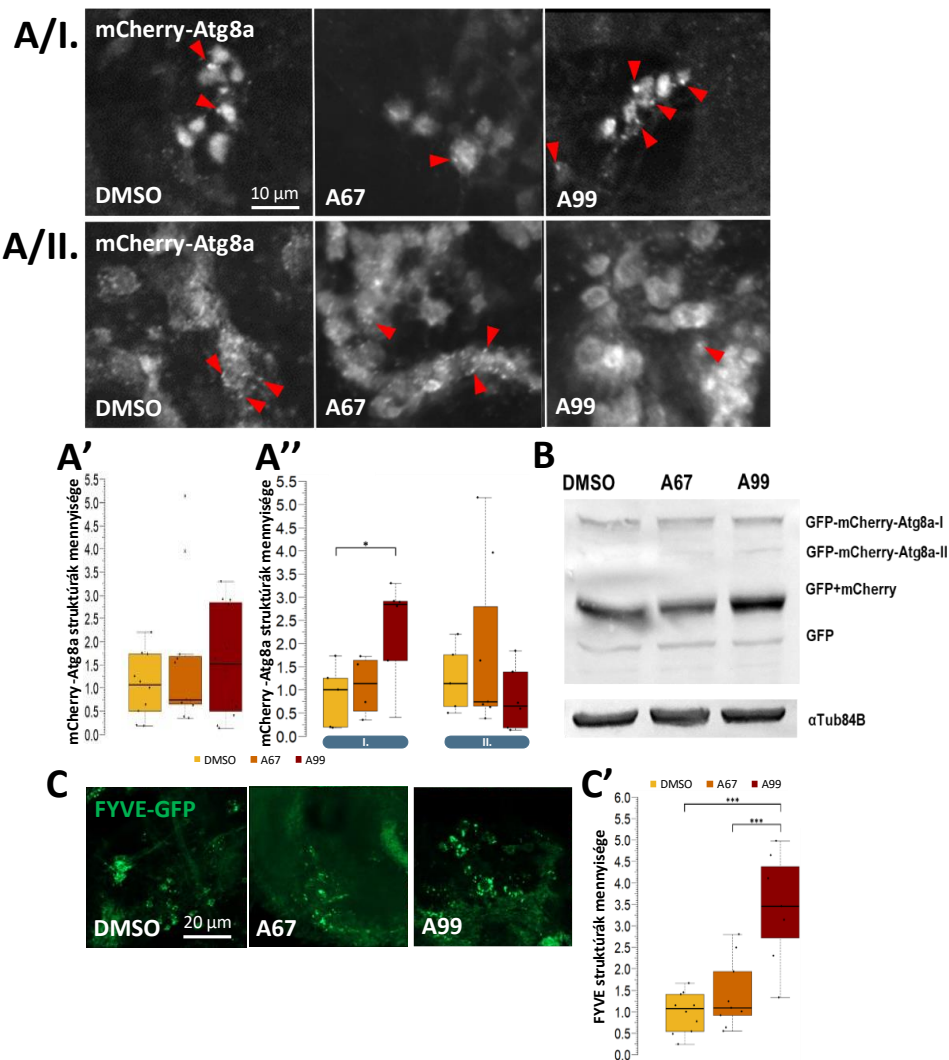
Kolinerg neuronok (Chat-Gal4)



11. ábra Az AUTEN-67 kolinerg (*Chat-Gal4*) neuronokban növeli az autofágiát; Az A/I. és A/II. ábrákon a piros nyíl az Atg8a pozitív struktúrákat jelöli adott hatóanyag kezelés hatására. A'-A'' ábrákon az mCherry-Atg8a autofág vezikulumok mennyiségének kiértékelése látható. Az A' ábrán a két vizsgált terület együttes kiértékelése, míg az A'' ábrán a két terület (gombatest [A/I.] és prow régió [A/II.]) kiértékelése szétbontva figyelhető meg. **B** Az autofágia vizsgálatához western blottal (anti-GFP jelöléssel) a GFP-mCherry-Atg8a-I és -II formákat, valamint az erről lehasadt fehérjét (GFP-mCherry és GFP) vizsgáltam. Az α Tub84B belső kontrollként volt jelölve. **C-C'** ábrákon a FYVE-GFP (zöld) mennyisége és kiértékelése látható.

A glutamaterg és motor neuronokban az OK371-Gal4-gyel vizsgáltam az autofág vezikulumok mennyiségét⁵³ (7. ábra E/I, E/II, 12. ábra A/I, A/II). Szignifikáns különbséget nem tapasztaltam a két hatóanyag és a DMSO között, amikor a két területet együttesen vizsgáltam (12. ábra A'). Azonban a gombatest területén az A99 szignifikánsan növelte az autofág struktúrák mennyiségét a kontroll DMSO-hoz viszonyítva (12. ábra A''). Western bloton mindkét hasadt forma látszik, viszont csak az mCherry-GFP jelölésben tapasztalható eltérés a kezelések között. Megfigyeltem, hogy a DMSO-hoz képest megnő az A99-es mintában a szabad GFP-mCherry mennyisége (12. ábra B). Az A99 szignifikánsan megnövelte az A67- és a DMSO-kezeléshez képest is a FYVE struktúrák számát. Elmondható, hogy a glutamaterg neuronokban csak az A99 volt hatásos.

Glutamaterg és motor neuronok (OK371-Gal4)

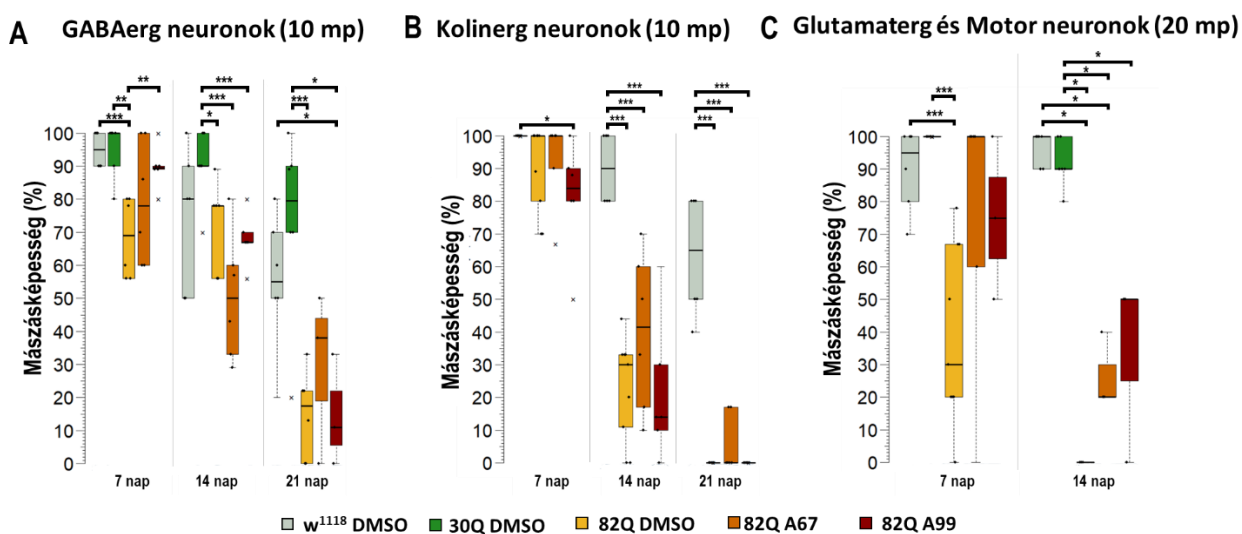


12. ábra Az AUTEN-99 autofágia aktiváló hatású glutamerg és motor (OK371-Gal4) neuronokban. Az A/I. és A/II. ábrákon a piros nyíl az Atg8a pozitív struktúrákat jelöli adott hatóanyag kezelés hatására. A'-A'' ábrákon az mCherry-Atg8a (piros) autofág vezikulumok mennyiségének a kiértékelése látható. A két vizsgálat terület együttes kiértékelését az A' ábra mutatja, külön-külön (gombatest [A/I.] és prow régió [A/II.]) pedig az A'' ábra. B Az autofágia vizsgálatához western blot (anti-GFP jelöléssel) a GFP-mCherry-Atg8a-I és -II formákat, valamint az erről lehasadt fehérjét (GFP-mCherry és GFP) vizsgáltam. A α Tub84B belső kontrollként volt jelölve. C-C' ábrákon a FYVE-GFP (zöld) mennyisége és kiértékelése látható.

5.4. Az AUTEN molekulák eltérő mértékben hatnak a különböző neuron-specifikus SCA1 modellek mászásképessegre és élettartamára

Végezetül kiválasztottam 3 Gal4 törzset további kísérletekhez. Az SCA1-ben leginkább érintett Purkinje-sejteket⁴ más idegsejtek GABA-val (γ -aminovajsav) és glutamát neurotranszmitterekkel szabályozzák⁵⁴. A Purkinje-sejtek GABAerg típusúak és ugyanilyen interneuronokat szabályoznak⁵⁵. Így a Gad1-Gal4-re és az OK371-Gal4-re esett a választásom. Az OK371-Gal4 a két hatóanyag közötti eltérés miatt is érdekes lehet, ami igaz a Chat-Gal4-re is. Továbbiakban ezzel a 3 Gal4-gyel dolgoztam.

Gad1-Gal4-gyel kifejeztetve a humán ataxin 1 fehérje formákat (30Q és 82Q). Az A99 inkább a fiatal egyedekben növelte a mászásképesseget, míg az A67 inkább az idősekben volt hatásos a kontroll állatokhoz képest, bár a két hatóanyag közötti különbség nem volt szignifikáns (13. ábra A). Ez egybe vág az mChAtg8a-val és FYVE-val kísérletek eredményével, mely szerint mindkét hatóanyag eredményes volt a GABAerg neuronokban (10. ábra A/I., A/II., A', C, C').



13. ábra: *AUTENEK hatása különböző idegsejtekben kifejeztetett hAtx1-t tartalmazó muslicák mászásképessegeire. Az A esetben a GABAerg neuronokban fejeztettem ki 30 illetve 82 CAG ismétlődést tartalmazó humán Atx1-t. A B, illetve C ábrán a kolinerg és a glutamaterg/motorneuronokban fejeztettem ki őket. A fent mért eredmények rövid távú mászásból származnak (a muslicák képtelenek voltak szakirodalomban meghatározott idő alatt felmászni a „célig” idegrendszeri gondjaik miatt).*

Kolinerg neuronokat vizsgálva idősebb állatokban az A67 növelte a mászásképesseget a 82Q állatokban a kontroll DMSO és az A99-el kezelt állatokhoz képest. Az A99 esetében nem tapasztalható jelentős mászásképeség növekedés, sőt fiatal állatokban mozgásképeség romlás látható. A 30Q nőstény állatok nagyon hamar elpusztultak kolinerg neuronokban kifejeztetve, így őket nem tudtam kontrollnak használni. (13. ábra B)

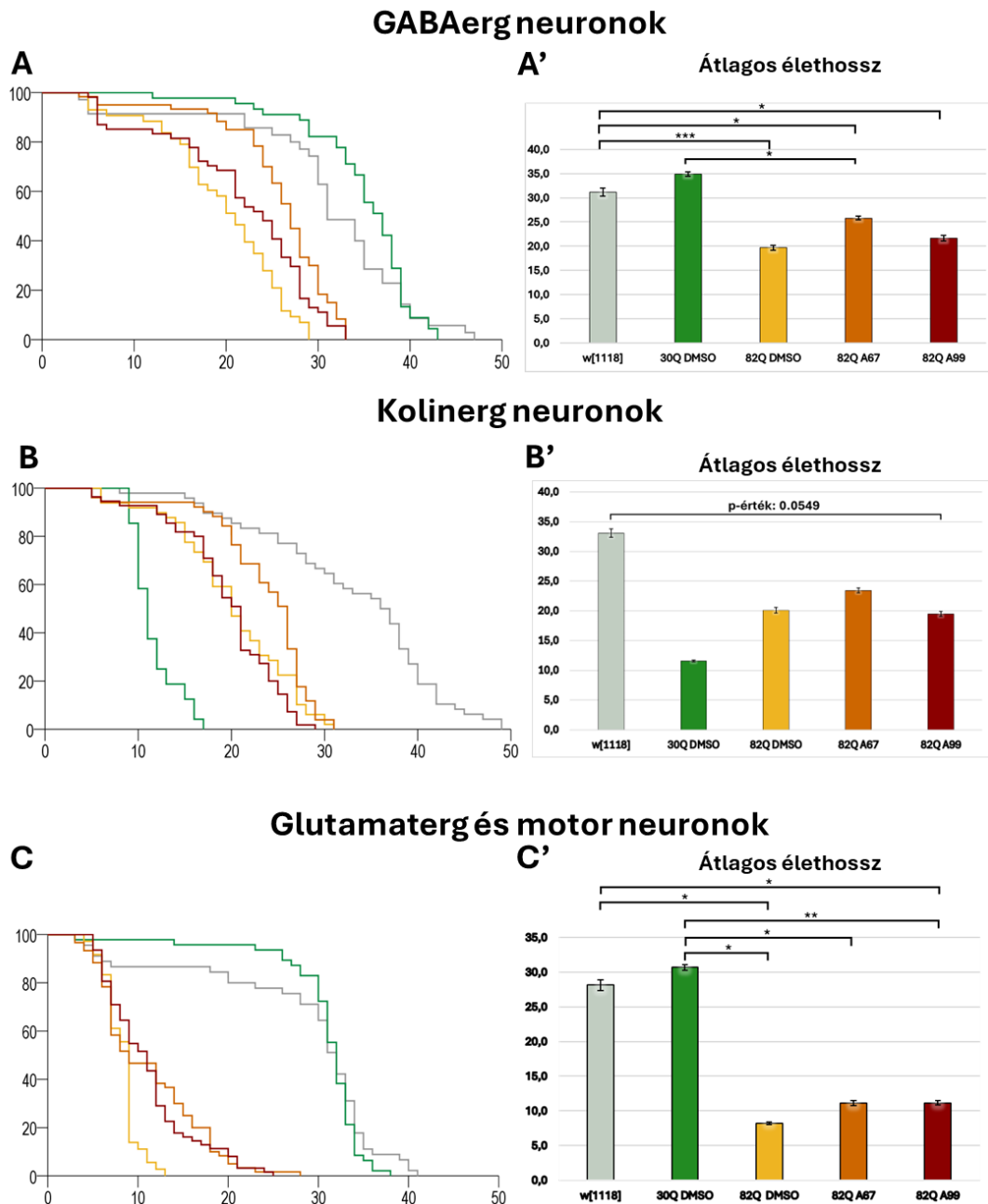
A glutamaterg neuronok esetében eltérést tapasztaltam az eddigi eredményeimhez képest. Az mChAtg8a és a FYVE esetében csak az A99 volt eredményes (12. ábra A és C részek), azonban mászáskísérletben mindkét hatóanyag hatásos volt. Viszont az állatok életképessége rendkívüli módon lecsökkent (13. ábra C). A méréseket csak 7 és 14 napos állatokon tudtam elvégezni.

A neuronspecifikus különbségek további felmérésére élettartam vizsgálatokat végeztem. Szignifikáns különbséget találtam élethossz görbék lefutása esetén a kontroll DMSO- és az A67- és A99-kezelt GABAerg-specifikus 82Q állatok között (14. ábra A). A kontroll állatok (w[1118] és 30Q) szignifikánsan hosszabb ideig éltek, mint az SCA1 modellek (14. ábra A').

Kolinerg specifikus modellekben a 30Q állatok nagyon hamar meghaltak, ezt figyeltem meg a mászáskísérletekben is. A Kaplan-Meier görbéknél szignifikáns különbség látható a 82Q DMSO és 82Q A67 állatok között és a két AUTEN között is. A w[1118] állatok éltek a legtovább (14. ábra B). Érdekes módon, bár az átlagos élethossz nem egyezik, mégsem szignifikáns a különbség közöttük (14. ábra B').

Végezetül a glutamaterg és motorneuronok esetén szignifikáns különbség látható a 82Q DMSO- és az A99-kezelt állatok élettartamgörbéi között. Ez igaz a 82Q DMSO és A67 kezelt állatokra is. A különbség az A67- és az A99-kezelt állatok Kaplan-Meier görbéi között nem volt szignifikáns. Ebben az esetben is a kétféle kontroll állatok éltek a legtovább (14. ábra C, C').

Összefoglalva tehát a mászás és az élethossz eredmények konzisztensek egymással. GABAerg neuronokban mindkét AUTEN eredményes volt (az A99 növelte a mászásképeséget fiatal állatokban, az A67 pedig az idősekben). Mindkét hatóanyag eredményes volt glutamaterg és motorneuronokban és csak az A67 volt hatásos kolinerg idegsejtekben. Élettartam mérésekben az A67 növelte az élettartamot kolinerg neuron specifikus SCA1-modellben. Mindkét kismolekula hatásos volt GABAerg neuronokban, valamint glutamaterg és motorneuronokban is. A nagyobb mintaelemszám elérése érdekében a kísérleteket érdemes megismételni.



14. ábra: Neuronspecifikus *SCA1* modell állatok élettartam mérésének eredménye. Az *A*, *B* és *C* ábrán az állatok Kaplan-Meier élethossz görbéit mutatják, az *A'*, *B'* és *C'* ábrák pedig az átlagos élethosszt.

6. Következtetések és jövőbeli tervek

Kísérleteim során az AUTEN-ek autofágia- illetve élettartambefolyásoló hatásait vizsgáltam, azonban hatóanyagok célfehérjének (így az AUTEN-eknek is) lehetnek autofágiától független hatásaik. Az MTMR-ek többféle folyamatban is részt vesznek. Emberek esetében az miotubularin típusú foszfatázok inaktiválása izomrendellenességeket okoz¹⁵. Ezen kívül az MTMR14 az autofágia egy későbbi lépését, az autofagoszóma érését követően is szabályozza *Drosophila* idegrendszerben¹⁹. Mivel a Vps34 szerepet játszik a korai

endoszómális forgalom szabályozásában és a Rab7 aktivitás szabályozásában⁵⁶, érdemes lenne további vizsgálatokat végezni annak kiderítésére, hogy ezt a folyamatot hogyan befolyásolják az AUTEN-ek. Feltételezhető, hogy a két AUTEN nem feltétlenül csak az EDTP-re specifikus, egyéb miotubularinnal rokon fehérjéket is szabályozhatnak. Eddigi eredmények alapján a hatóanyagok muslica indirekt repülőizmában, lárvális zsírtestében és felnőtt agyában csak az EDTP-n keresztül szabályozzák az autofágiát^{15, 27}.

A két hatóanyag között neuronspecifikus különbségeket tapasztaltam, amely származhat abból, hogy a hatóanyagok eltérő hatékonysággal tudnak bejutni különböző idegsejtekbe. A molekulák eltérő metabolitokkal rendelkezhetnek, amelyek hatása még nem ismert. A mutáns hAtx1 30Q túltermeltetése kolinerg neuronokban toxikus lehet. Érdekes módon, ebben az esetben inkább a nőstény egyedek voltak érzékenyek erre a túltermeltetésre. A pontos ok kiderítéséhez azonban további vizsgálatok szükségesek.

A western blot kísérleteknél néhol GFP-mCherry és GFP szabad formák, másol pedig csak szabad GFP-mCherry volt látható. Ez adódhat a különböző idegsejtek eltérő lizoszómális enzimeiből valamint abból, hogy a lebontás egy későbbi pillanata volt megjeleníthető a kísérlet során (friss hatóanyagcsöveket 2 naponta kaptak az állatok).

A dopaminerg (ple-Gal4) és a GABAerg (Gad1-Gal4) neuronokban mindkét hatóanyag ugyanolyan eredményesen hatott. Ezek segíthetik a vad típusú állatot az öregedés során. A kolinerg (Chat-Gal4) neuronokban csak az A67, míg a motoneuronok és a glutamaterg neuronokban (OK371-Gal4) csak az A99 volt hatásos. Idegsejt-specifikus SCA1 modellek esetén GABAerg valamint glutamaterg/motoneuronokban mindkét hatóanyag hatásos, kolinerg neuronokban pedig csak az A67 eredményes. A kolinerg neuronok *Drosophilában* a vizuális percepcióban és a kognícióban játszik szerepet⁵⁷. A glutamaterg neuronok pedig bár elég sok helyen fordulnak elő a *Drosophila* idegrendszerében, élettani hatásuk még nem tisztázott⁵⁸. Az A67 és az A99 hatása közötti különbség keletkezhet abból, hogy az A99 nem képes hatékonyan növelni az autofágiát az SCA1-nek leginkább kitett sejtekben, vagy az autofágiára túl szenzitív sejtekben okoz túlaktivitást.

A mászás kísérlet és az autofágiás kísérletek (FYVE és mCherry) közötti különbségek adódhatnak abból, hogy az autofágiát hAtx1-re vad típusú állatokban néztem, de a mászás esszé és élettartam mérések során már mutáns állatokat használtam. Az eredmények finomítása érdekében érdemes lenne a mutáns állatokban is az autofág markereket is vizsgálni a specifikus Gal4-ekkel keresztezve a hAtx1-et tartalmazó törzseket (8-12. ábra).

Az itt leírt kísérleteket érdemes megismételni gerinces modellekben is, hogy a megfigyelt neuronspecifikus különbségek általános érvényűek-e.

7. Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott **Burján Tímea** nyilatkozom, hogy a 37. OTDK-ra benyújtott **AUTEN autofágia aktiváló kismolekulák vizsgálata az 1-es típusú spinocerebelláris ataxia *Drosophila* modellben** című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

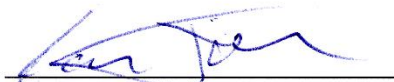
Részfeladat	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán jellemezve)
A dolgozatban szereplő állatok fenntartása, keresztezése és kezelése	5
A mikroszkópos és fehérje vizsgálati módszerekhez a minták (kezdetben segítséggel) készítése, a szükséges ellenanyag jelölések (western blot és immunhisztokémia) elvégzése	5
A hatóanyag kezelt állatok élettartamának, mozgási képességének és összetettszem aberrációjának kiértékelése	4
A pályamunkában leírt kísérletek elvégzése, az eredmények kiértékelése és grafikus ábrázolása	5
Az adatok statisztikai feldolgozása	5

Kelt: Budapest, 2024. 07. 15.



Pályamunkát benyújtó hallgató **Burján Tímea**
aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Témavezető **Kovács Tibor, ELTE Genetikai Tanszék**
aláírása

8. Felhasznált irodalom

1. Matilla-Dueñas, A., Goold, R. & Giunti, P. Clinical, genetic, molecular, and pathophysiological insights into spinocerebellar ataxia type 1. *Cerebellum* **7**, 106–114 (2008).
2. Donato, S. Di, Mariotti, C. & Taroni, F. Spinocerebellar ataxia type 1. *Handb Clin Neurol* **103**, 399–421 (2012).
3. Opal, P. & Ashizawa, T. Spinocerebellar Ataxia Type 1. *GeneReviews®* (2023).
4. Orr, H. T. The ins and outs of a polyglutamine neurodegenerative disease: spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1). *Neurobiol Dis* **7**, 129–134 (2000).
5. Zoghbi, H. Y. & Orr, H. T. Spinocerebellar ataxia type 1. *Semin Cell Biol* **6**, 29–35 (1995).
6. Tong, X. *et al.* Ataxin-1 and Brother of ataxin-1 are components of the Notch signalling pathway. *EMBO Rep* **12**, 428 (2011).
7. Klement, I. A. *et al.* Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Cell* **95**, 41–53 (1998).
8. Tsuda, H. *et al.* The AXH Domain of Ataxin-1 Mediates Neurodegeneration through Its Interaction with Gfi-1/Senseless Proteins. *Cell* **122**, 633–644 (2005).
9. Glick, D., Barth, S. & Macleod, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* **221**, 3 (2010).
10. Donato, S. Di, Mariotti, C. & Taroni, F. Spinocerebellar ataxia type 1. in *Handbook of Clinical Neurology* vol. 103 399–421 (Elsevier B.V., 2012).
11. Jing, K. & Lim, K. Why is autophagy important in human diseases? *Experimental & Molecular Medicine* 2012 44:2 **44**, 69–72 (2012).
12. Ichimiya, T. *et al.* Autophagy and Autophagy-Related Diseases: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 8974 **21**, 8974 (2020).
13. Ariosa, A. R. & Klionsky, D. J. Autophagy core machinery: overcoming spatial barriers in neurons. *J Mol Med* **94**, 1217–1227 (2016).
14. Mizushima, N., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005> **27**, 107–132 (2011).
15. Komlós, M. *et al.* The Small-Molecule Enhancers of Autophagy AUTEN-67 and -99 Delay Ageing in Drosophila Striated Muscle Cells. *Int J Mol Sci* **24**, 8100 (2023).
16. Kovács, T. *et al.* The small molecule AUTEN-99 (autophagy enhancer-99) prevents the progression of neurodegenerative symptoms. *Sci Rep* **7**, (2017).
17. Ichimura, Y. *et al.* A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 2000 408:6811 **408**, 488–492 (2000).

18. Tabibzadeh, S. Role of autophagy in aging: The good, the bad, and the ugly. *Aging Cell* **22**, e13753 (2023).
19. Kovács, T. *et al.* A conserved MTMR lipid phosphatase increasingly suppresses autophagy in brain neurons during aging. *Sci Rep* **12**, (2022).
20. Simonsen, A. *et al.* Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila*. *Autophagy* **4**, 176–184 (2008).
21. Cai, Z. & Yan, L.-J. Rapamycin, Autophagy, and Alzheimer's Disease. *J Biochem Pharmacol Res* **1**, 84 (2013).
22. Perera, N. D. *et al.* Stimulation of mTOR-independent autophagy and mitophagy by rilmenidine exacerbates the phenotype of transgenic TDP-43 mice. *Neurobiol Dis* **154**, 105359 (2021).
23. Perera, N. D. *et al.* Rilmenidine promotes MTOR-independent autophagy in the mutant SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis without slowing disease progression. *Autophagy* **14**, 534–551 (2018).
24. Motoi, Y., Shimada, K., Ishiguro, K. & Hattori, N. Lithium and Autophagy. *ACS Chem Neurosci* **5**, 434 (2014).
25. Vergne, I. *et al.* Control of autophagy initiation by phosphoinositide 3-phosphatase jumpy. *EMBO J* **28**, 2244–2258 (2009).
26. Manzéger, A. *et al.* Condition-dependent functional shift of two *Drosophila* Mtmr lipid phosphatases in autophagy control. *Autophagy* **17**, 4010–4028 (2021).
27. Papp, D. *et al.* AUTEN-67, an autophagy-enhancing drug candidate with potent antiaging and neuroprotective effects. *Autophagy* **12**, 273 (2016).
28. Billes, V. A. *et al.* AUTEN-67 (Autophagy Enhancer-67) Hampers the Progression of Neurodegenerative Symptoms in a *Drosophila* model of Huntington's Disease. *J Huntingtons Dis* **5**, 133–147 (2016).
29. McGurk, L., Berson, A. & Bonini, N. M. *Drosophila* as an In Vivo Model for Human Neurodegenerative Disease. *Genetics* **201**, 377–402 (2015).
30. Shin, M., Copeland, J. M. & Venton, B. J. *Drosophila* as a Model System for Neurotransmitter Measurements. *ACS Chem Neurosci* **9**, 1872–1883 (2018).
31. Greene, J. C. *et al.* Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila* parkin mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4078–4083 (2003).
32. Fernandez-Funez, P. *et al.* Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration. *Nature* **408**, 101–106 (2000).
33. Elliott, D. A. & Brand, A. H. The GAL4 system : a versatile system for the expression of genes. *Methods Mol Biol* **420**, 79–95 (2008).
34. Phelps, C. B. & Brand, A. H. Ectopic Gene Expression in *Drosophila* Using GAL4 System. *Methods* **14**, 367–379 (1998).

35. Prajapat, S. K., Subramani, C., Sharma, P., Vrati, S. & Kalia, M. Avobenzone, Guaiazulene and Tioxolone identified as potent autophagy inducers in a high-throughput image based screen for autophagy flux. *Autophagy Reports* **1**, 523–536 (2022).
36. Szinyákovich, J. *et al.* Potent New Targets for Autophagy Enhancement to Delay Neuronal Ageing. *Cells* **2023**, Vol. 12, Page 1753 **12**, 1753 (2023).
37. Wittmann, C. W. *et al.* Tauopathy in *Drosophila*: Neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science* (1979) **293**, 711–714 (2001).
38. Piper, M. D. W. & Partridge, L. *Drosophila* as a model for ageing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1864**, 2707–2717 (2018).
39. Gargano, J. W., Martin, I., Bhandari, P. & Grotewiel, M. S. Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. *Exp Gerontol* **40**, 386–395 (2005).
40. Lőrincz, P., Mauvezin, C. & Juhász, G. Exploring Autophagy in *Drosophila*. *Cells* **2017**, Vol. 6, Page 22 **6**, 22 (2017).
41. Chen, R. H., Chen, Y. H. & Huang, T. Y. Ubiquitin-mediated regulation of autophagy. *Journal of Biomedical Science* **2019** 26:1 **26**, 1–12 (2019).
42. Lo Piccolo, L., Bonaccorso, R. & Onorati, M. C. Nuclear and Cytoplasmic Soluble Proteins Extraction from a Small Quantity of *Drosophila*'s Whole Larvae and Tissues. *International Journal of Molecular Sciences* **2015**, Vol. 16, Pages 12360-12367 **16**, 12360–12367 (2015).
43. Mizushima, N. & Yoshimori, T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* **3**, 542–545 (2007).
44. Soares, L., Parisi, M. & Bonini, N. M. Axon Injury and Regeneration in the Adult *Drosophila*. *Scientific Reports* **2014** 4:1 **4**, 1–12 (2014).
45. Lowenstein, E. D., Cui, K. & Hernandez-Miranda, L. R. Regulation of early cerebellar development. *FEBS J* **290**, 2786–2804 (2023).
46. Kawaguchi, K., Habara, T., Terashima, T. & Kikkawa, S. GABA modulates development of cerebellar Purkinje cell dendrites under control of endocannabinoid signaling. *J Neurochem* **114**, 627–638 (2010).
47. Boerner, J. & Duch, C. Average shape standard atlas for the adult *Drosophila* ventral nerve cord. *Journal of Comparative Neurology* **518**, 2437–2455 (2010).
48. Sláviková, S. *et al.* The autophagy-associated Atg8 gene family operates both under favourable growth conditions and under starvation stresses in *Arabidopsis* plants. *J Exp Bot* **56**, 2839–2849 (2005).
49. Sakuma, C. *et al.* *Drosophila* Strip serves as a platform for early endosome organization during axon elongation. *Nature Communications* **2014** 5:1 **5**, 1–14 (2014).
50. Soares, L., Parisi, M. & Bonini, N. M. Axon Injury and Regeneration in the Adult *Drosophila*. *Scientific Reports* **2014** 4:1 **4**, 1–12 (2014).

51. Iyer, E. P. R., Iyer, S. C. & Cox, D. N. Application of cell-specific isolation to the study of dopamine signaling in *Drosophila*. *Methods in Molecular Biology* **964**, 215–225 (2013).
52. Liu, W. W., Mazor, O. & Wilson, R. I. Thermosensory processing in the *Drosophila* brain. *Nature* **519**:7543 **519**, 353–357 (2015).
53. King, A. N. *et al.* A Peptidergic Circuit Links the Circadian Clock to Locomotor Activity. *Current Biology* **27**, 1915–1927.e5 (2017).
54. Kawaguchi, K., Habara, T., Terashima, T. & Kikkawa, S. GABA modulates development of cerebellar Purkinje cell dendrites under control of endocannabinoid signaling. *J Neurochem* **114**, 627–638 (2010).
55. Lowenstein, E. D., Cui, K. & Hernandez-Miranda, L. R. Regulation of early cerebellar development. *FEBS J* **290**, 2786–2804 (2023).
56. Jaber, N. *et al.* Vps34 regulates Rab7 and late endocytic trafficking through recruitment of the GTPase-activating protein Arp2/3. *J Cell Sci* **129**, 4424–4435 (2016).
57. Basso, M. A., Bickford, M. E. & Cang, J. Unraveling circuits of visual perception and cognition through the superior colliculus. *Neuron* **109**, 918 (2021).
58. Liu, W. W. & Wilson, R. I. Glutamate is an inhibitory neurotransmitter in the *Drosophila* olfactory system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 10294–10299 (2013).

9. Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném megköszönni a sok segítséget, támogatást és útmutatást, amit témavezetőmtől, Kovács Tibortól kaptam.

Köszönöm még Szinyákovics Jankának, Keresztes Fanninak és Falcsik Gergőnek a szakmai segítségüket.

Külön köszönet páromnak, hogy kibírt engem, és hozzájárult a túlélésemhez.

Anyukámnak, Apukámnak és tesókámnak köszönöm, hogy támogattak és elviseltek.

Koktélkának meg Kajlának köszi, hogy cukik vagytok.