

GTPáz aktiváló fehérjék szerepének vizsgálata a lizoszóma exocitózisban

37. OTDK
Biológia szekció

készítette:

GÁLIKOVÁ RAMÓNA

Eötvös Loránd Tudományegyetem
Biológus MSc III. félév

témavezető:

DR. KOVÁCS TIBOR

egyetemi adjunktus

KERESZTES FANNI

Ph.D. hallgató

Eötvös Loránd Tudományegyetem
Genetikai Tanszék

Tartalom

I.	Rezümé	3
II.	Irodalmi áttekintés	4
1.	Az autofágia élettartam szabályozó szerepe	4
2.	A lizoszomális lebontás és exocitózis.....	6
3.	Kis GTPázok és GAP-ok szerepe a lizoszomális lebontásban és transzportban.....	7
III.	Célkitűzések	9
IV.	Anyagok és módszerek	10
1.	Gal4-UAS rendszer	10
2.	FLP/FRT – szomatikus rekombináción alapuló rendszer	10
3.	Felhasznált törzsek	11
4.	Fluoreszcens és elektronmikroszkópia	12
a.	Zsírtest minták készítése.....	12
b.	Agy minták készítése	12
c.	Nyálmirigy preparálása	13
5.	Western blot	13
6.	Mászás vizsgálat	13
7.	Élettartam mérés	14
8.	Statisztika.....	14
V.	Eredmények és megvitatásuk	15
1.	<i>GAP</i> csendesítéssel fokozható a lizoszómák mennyisége lárvális zsírszövetben	15
2.	<i>GAP</i> csendesítéssel szabályozható a lizoszomális struktúrák elhelyezkedése a sejtekben	17
3.	<i>GAP</i> csendesítéssel megnövelhető az Arl8 aktivitás zsírszövetben.....	19
4.	A <i>GAP</i> -ok gátlásával fokozódhat a lizoszomális lebontás	22
5.	Lizoszóma exocitózist indukálhat a <i>GAP</i> -ok csendesítése.....	23
6.	<i>GAP</i> csendesítés idegrendszerben növelheti az Arl8 pozitív struktúrák számát.....	25
7.	Az <i>idegrendszeri GAP</i> csendesítéssel növelhető az állatok mozgásképesége és várható élettartama.....	27
VI.	Eredmények megvitatása és jövőbeli tervek	32
VII.	Köszönetnyilvánítás	35
VIII.	Irodalom	35

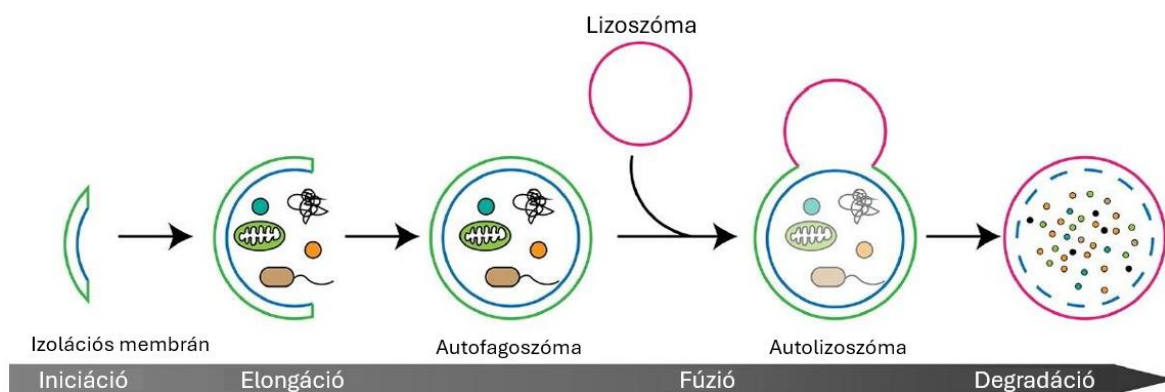
I. Rezümé

Az autofágia egy lizoszomális lebontó folyamat, amely a sejtekben felhalmozódó káros anyagok lebontásáért felelős. Aktivitása az életkor előrehaladtával csökken, főként a lebontási szakasza sérül, ez toxikus fehérjék felhalmozódásához, reaktív oxigéngyökök felszabadulásához és neurodegeneratív betegségek kialakulásához vezethet. Új terápiás megközelítésként a lizoszóma exocitózis serkentését terveztem vizsgálni, ahol a lizoszóma a mikrotubulusok mentén mozog anterográd transzporttal a plazmamembrán felé, membrán fúziót követően tartalma eltávolítódik a sejtől az extracelluláris térbe. Az Arl8 egy kis GTPáz fehérje, mely elősegíti a lizoszóma más membránokkal való fúzióját, összeköti a lizoszómákat a kinezin-1 motorfehérjével, így fontos szerepet játszik az anterográd transzportban is. Az Arl8 GTP-kötött formában aktív, GDP-kötötten inaktív. A GAP-ok (GTPáz aktiváló fehérjék) a GTP hidrolízisét serkentve gátolják a kis GTPázokat. Elméletem szerint specifikus GAP-ok gátlásával serkenthető lehet az Arl8 aktivitása és ez által fokozható a lizoszóma transzport és exocitózis. Az eredményeim alapján elmondható, hogy GAP-ok csendesítésével fokozható a Arl8 membránhoz kötött, aktív formáinak mennyisége, amely hatására növelhető a lizoszómák mennyisége lárvális zsírtestben és adult idegrendszerben. Kimutattam, hogy az Arl8-at gátló GAP-ok hiányában a lizoszómák a sejtmembránhoz közel jelennek meg. Eredményeim az anterográd transzport fokozódására utalnak. Azonban egyes eredményeim alapján a vizsgált GAP-ok némelyikének (CG42612) lizoszomális lebontásban is szabályozó szerepe lehet. Az általam tanulmányozott GAP-ok (CG7324, CG11727 és CG42612) idegrendszeri csendesítése reakcióképesség javuláshoz és élettartam növekedéshez vezet. A lizoszomális transzport GAP-ok általi szabályozása ígéretes új kutatási területe lehet az öregedés és vele összekapcsolható betegségeknek. Ezért eredményeimet szükségesnek tartom emlős modelleken tovább vizsgálni.

II. Irodalmi áttekintés

1. Az autofágia élettartam szabályozó szerepe

Az autofágia fontos szerepe fenntartani a sejt homeosztázisát, az által, hogy a lebontani kívánt anyagokat a lizoszómába szállítja, ahol megtörténik a bekerülő anyagok degradációja (1. ábra). A megemésztett makromolekulák összetevőit a sejt felépítő folyamatokban hasznosíthatja. Nem csak az aggregálódott fehérjéket távolítja el, de a meghibásodott organelumok degradációjáért is felelős például: mitokondrium, endoplazmatikus retikulum, peroxiszóma, valamint biztonságot nyújt a sejtbe jutott patogének ellen is [1–4].



1. ábra. Az autofágia mechanizmusa: A formálódó izolációs membrán körülveszi a lebontani kívánt organelumokat és záródásával létrejön az autofagoszóma. Az autofagoszóma-lizoszóma fúzióval létrejön az autolizoszóma, ahol a lebontás végbemegy [5].

Az autofágiának több típusa van: Makroautofágia, mikroautofágia és chaperon mediált autofágia. Kutatásom tárgya a legjobban jellemzett és legkonzerváltabb autofág lebontási útvonal, a makroautofágia volt, így csak ezt a formát jellemzem részletesen, dolgozatomban inntől kezdve pedig autofágiaként szerepel.

Az autofágia során a lebontandó komponensek kettősmembránnal határolt autofagoszómákba záródnak, majd a lizoszómákkal fuzionálva autolizoszómákat képeznek. Ahol a savas hidrolázok lebontják az autolizoszóma beltartalmát [4]. Az idegrendszerben az autofágia lépései térben távol helyezkednek el egymástól. Az autofagoszómák a disztális axon végeken képződnek és késői endoszómákkal fuzionálva amfiszómákká formálódnak. Az amfiszóma retrográd transzporttal mozog a sejtközpont felé, és folyamatosan érik, savasodik. A retrográd transzport folytonosságát további endoszómákkal való fúziós események biztosítják. A sejtközpontban az amfiszóma lizoszómával fuzionál és megtörténik a lebontás (1. ábra) [6].

Az autofágia aktivitásának csökkenése az élettartam előrehaladtával hozzájárul a korfüggő neurodegeneratív betegségek kialakulásához és a felgyorsult öregedéshez [7,8]. Az *Atg* (autofágiával kapcsolatos gének) mutánsokban fehérje zárványok és sérült mitokondriumok jelentek meg a neuronokban, melyek sejtes jellemzői a neurodegeneratív kórképeknek [9,10]. Az *Atg5* funkcióvesztéses mutációjával egerekben abnormális fehérjék aggregálódnak [11]. *Atg8* mutáns muslicák neurodegeneratív fenotípusokat mutattak és az élettartamuk is csökkent [7]. Tehát az autofágia szükséges az idegrendszer normál működéséhez, hiszen posztmitotikus sejtekből (például az idegsejt) álló szövetben az elpusztult sejtek pótlása nem lehetséges. Az aggregálódott, oxidált és nem funkció képes fehérjék felhalmozódása megzavarják a sejt homeosztázisát. Hosszú távon ez a sejt elpusztulásához vezet, tömeges sejtpusztulás pedig neurodegeneratív tünetek és kórképek kialakulásához vezet [12]. Idegsejtekben nem csak a kevesebb új autofág vezikulum jelenthet problémát időskorban, az autofágia korfüggő hanyatlása a lebontási lépést is érinti. Nem funkcionáló autolizoszómák halmozódnak fel a szeneszcencia során az idegrendszerben, amelyekből nem lebomló citoszolikus anyagok és a sérült mitokondriumokból származó reaktív oxigéngyökök kijuthatnak az intracelluláris térbe, ami nagymértékben károsíthatja a neuronokat [12,13]. A már sérült citoszolikus anyagok tehát nagy károkat okoznak a sejtben, így azok kijuttatása az extracelluláris térbe szükséges a sejt normál működéséhez.

Az autofágiával és annak fokozásával több kutatás is foglalkozik, melyek eredményei arra utalnak, hogy az autofágia folyamatának serkentése elősegíti a hosszabb élettartamot, továbbá hozzá járul a szervezet jobb egészségi állapotához is. Az *Atg5* túltermelése egérmodellben növelte az autofágiát és megemelte az élettartamot 17%-kal a vad típusú kontrolhoz képest. *Atg8* túltermelése a *Drosophila melanogaster* központi idegrendszerében több mint 50%-kal emelte az átlag élettartamot, a maximális élettartam 88 és 96 nap közé emelkedett, ezen kívül kontrollhoz képest sokkal kevesebb oldhatatlan ubiquitinált fehérjét találtak annál a muslicánál, melynél az *Atg8* túltermelése történt. *Drosophilában* tanulmányozták és figyelték az autofág gének expressziós szintjét és annak változásait öregedés során, melyben azt találták, hogy az *Atg* gének downregulációja történik az öregedés során. Életkor előrehaladtával az autofágia hatékonysága csökken, ami – mint már korábban is említettem – hozzájárul a korfüggő betegségek kialakulásához [7,14,15].

2. A lizoszomális lebontás és exocitózis

A lizoszóma lumen pH-ja savas (pH 4,5 – pH 5,5). A H^+ koncentrációt aktívan vakuoláris ATPázok tartják fenn. A lizoszóma több mint 60 hidroláz enzimet tartalmaz, amely képes a sejtes makromolekulákat lebontani, membránjában található fehérjék és ion csatornák pedig nagyban hozzájárulnak a megfelelő működéséhez [16].

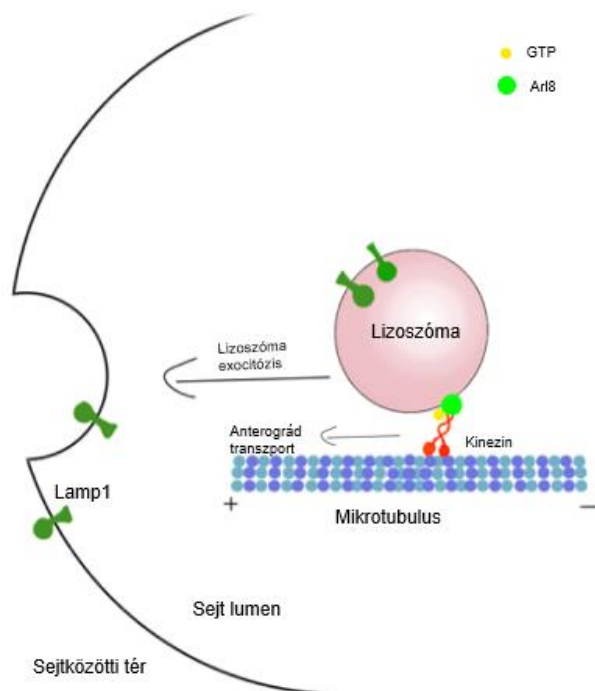
Lizoszómákat régebben „szemétgyűjtő zsákoknak” nevezték, ma már köztudott, hogy metabolikus csomópontként a sejt számára nélkülözhetetlen feladatot látnak el. A megemésztett makromolekulákat a lizoszóma a citoplazmába üríti specifikus membrántranszporterek által, ahol anabolikus folyamatokban építőkövekként, katabolikus folyamatok számára pedig energiaforrásként hasznosíthatók. Az autofágia az egyetlen olyan folyamat, amely képes lebontani a meghibásodott organelleket is [17–19]. Ezen kívül nagyon fontos megemlíteni a lizoszóma azon feladatát mely nem intracelluláris, hanem extracelluláris funkcióval rendelkezik, ez a lizoszóma exocitózis. Ez a funkciója szerepet játszik a plazmamembrán összetételének átalakításában, valamint enzimek és szubsztárok szekréciójában. A lizoszómák a mikrotubulusok mentén mozognak, anterográd (2. ábra) transzport révén a perinukleáris térről a plazmamembrán felé, míg retrográd transzport segítségével vissza a perinukleáris tér irányába. [16,20]. Bár a lizoszómák elszórtan az egész sejtben megtalálhatóak, két csoportra lehet osztani őket elhelyezkedésük alapján: perinukleáris térben, közel a MTOC-hez (mikrotubulus szervező központ), és a sejtek periferiáján. Az eltérő elhelyezkedés eltérő pH-val és eltérő funkcióval függ össze, azon lizoszómák melyek a perinukleáris térenél helyezkednek el savasabb pH-val rendelkeznek, és az endoszómák éréséért felelősek, autofagoszómákkal összeolvadva autolizoszómákat hoznak létre. Azok a lizoszómák melyek főleg a plazmamembránnál találhatóak meg, magasabb pH-val rendelkeznek, degradatív hatásuk lecsökken, feladatuk a plazmamembrán javítása, szekréció és jelzik a tápanyag elérhetőségét a rapamycin komplex 1 (mTORC1) mechanisztikus célpontjának aktiválásával [16,21–24].

Lizoszóma exocitózis idegsejtekben történhet a dendriteknél, de kinezin motorfehérjével elszállítható az axon végekhez is, ahol a lizoszómák szintén kiüríthetik a beltartalmukat az extracelluláris térbe [25,26]. Lizoszóma exocitózis serkentése elérhető a lizoszóma Ca^{2+} effluxának az emelésével [27]. A kalcium indukálta lizoszóma exocitózis normál működéséhez szükséges a szinaptotagmin VII (lizoszomális kalcium szenzor), a v-SNARE VAMP7, t-SNARE SNAP23, valamint a Syntaxin-2 (Syx-2) és Syx-4 t-SNARE fehérje. A VAMP7 a

lizoszóma membránján található, kapcsolatba lép a plazmamembránon található Syx-4 és SNAP23 fehérjékkel, így a lizoszóma dokkol a plazmamembránhoz, de membránfúzió csak később történik. A fúzió a lizoszómák nagy mennyiségű Ca^{2+} kibocsájtásával (TRPLM1 kalcium csatorna) indul meg (2. ábra) [28–31].

3. Kis GTPázok és GAP-ok szerepe a lizoszomális lebontásban és transzportban

Szekvencia összehasonlítással összesen 31 Rab-ot (Ras-related proteins in brain) azonosítottak *Drosophila melanogaster*-ben. A Rab alcsaládba tartozó kis GTPázok – intracelluláris membrán és fehérje transzport fő irányítói, amelyek szabályozzák a legtöbb intracelluláris útvonalat. A Rab fehérjék eukariótákban nagy fokú konzerváltságot mutatnak [32,33]. Az autofágiát serkenteni lehet, az autofagoszóma-lizoszóma fúzióval. A kis GTPáz fehérjék segítik a membránok transzportját és fúzióját egyaránt. A HOPS (homotypic fusion and protein sorting) fehérje és a SNARE fehérje (Snap receptor) komplexek nélkülözhetetlenek a fúzióhoz. Ezen kívül a kis GTPáz fehérjék segítik a membránok transzportját és a HOPS komplexet abban, hogy hidat képezzen az autofagoszóma és a lizoszóma között [34]. A kis GTPázok tehát kiemelt jelentőségűek az autolizoszóma érésben és transzportban, ilyen kis GTPázok a Rab2, Arl8 és Rab7. A Rab7 (Ras-associated binding 7) szükséges az autofág lebontáshoz, megtalálható az autofagoszomális és késői endoszomális membránon [35]. Fontos funkciót tölt be az axonális retrográd transzportban, a neuronális migrációban és szerepet játszik neurotrofin receptor forgalmában és jelátvitelében [36].



2. ábra. A lizoszóma exocitózis mechanizmusa: Lizoszóma exocitózist az anterográd transzport segíti, aminek a motor fehérjéje a kinezin, ami az Arl8 GTP kötött formájával kapcsolódik a lizoszómához. Az exocitózis során a lizoszóma membránja fuzionál a plazmamembránnal, így a Lamp1 fehérje átkerül a plazmamembránra [16,37].

Rab2 megtalálható a Golgi vezikulákon, lizoszómákon és az endoszómákon [38], elősegíti az autofagoszóma és lizoszóma fúziót [39]. Az Arl8 (Arf-like 8) aktív formája lizoszomális membránokon lokalizálódik, az endoszóma-lizoszóma és autofagoszóma-lizoszóma fúziót is katalizálja. Arl8 (Arf-like 8) megtalálható a lizoszomális membránon és a HOPS komplexszel kölcsönhatásba lépve elősegíti nem csak az endoszóma-lizoszóma fúziót, de az autofagoszóma-lizoszóma fúziót is, ezen kívül összeköti a lizoszómákat a kinezin-1-gyel a BORC fehérje komplexen keresztül, melynél a BORCS4 – BORCS8 alegysége specifikus a lizoszómákra. Gerincesekben 2 paralógja van ami az: Arl8a és Arl8b. Míg az Arl8a GTP-kötés aktivitását segíti és szerepe van az axonális anterográd transzportban, az Arl8b-nek más feladata van: G protein aktivitást serkenti antigén reprezentációban van fontos szerepe [40–42]. Az Arl8 elengedhetetlen a hosszú axonális transzport megfelelő működéséhez, az Arl8 mutánsokban 40%-kal csökken az axonterminálisok száma. Továbbá, az Arl8 szükséges a preszinaptikus lizoszóma-eredetű vezikulumok anterográd transzportjához, hozzájárulva a megfelelő neurotransmisszióhoz és biogenezishez (2. ábra) [25,37,43–46].

A kis GTPázok molekuláris kapcsolóként működnek, ami GTP-t kötött állapotban aktív – ebben az állapotban toborozzák az effektorokat például kötéskomplexeket vagy motorfehérje adaptereket – és GDP kötötten inaktív. A GEF (GDP/GTP cserélő faktorok) enzim képes a kis GTPázot aktiválni azáltal, hogy a GDP-t GTP-re cseréli [33,47]. A GAP-ok (GTPáz aktiváló fehérjék) katalizálják a kis GTPázok GTP hidrolízisét, tehát inaktiváló hatásúak [39,40]. A GAP-ok több kis GTPázot is befolyásolhatnak, illetve a kis GTPázok redundáns funkcióval rendelkeznek. Léteznek olyan GAP-ok, amelyek gátlása pozitív hatású, autofágiát és várható élettartamot növelnek [49]. Amint a kis GTPáz tartalmú vezikulák elérik a célpontjukat, a GAP-ok hidrolizálják a kis GTPázhoz kötött GTP-t. Az inaktiválódott kis GTPázok disszociálnak a membránról. A Rab2 és Arl8 fehérjéket szabályozó GAP-ok feltárása még folyamatban van [33].

Kutatócsoportunk előzetes eredményi alapján az Arl8 és Rab2 folytonosan GTP kötött formáinak idegrendszeri túltermeltetése javítja az idős ecetmuslicák reakció képességét és élettartam növelő hatású vad típusú és Parkinson-kórt modellező állatokban [49].

III. Célkitűzések

A lizoszóma képes megemészteni a káros citoplazmális komponenseket, de tartalmát kiürítheti az extracelluláris térbe. A lizoszóma exocitózis által membrán átrendeződés és helyreállítás is történik [16]. A lizoszóma exocitózis terápiás kezelésként alkalmazható a lizoszomális tárolási rendellenességek kezelésére (Alzheimer, Parkinson, Pompe, Batten betegségek) [27,50–52]. Ilyenkor különböző módokon Ca^{2+} efflux emelésével érték el a lizoszóma exocitózis aktiválását.

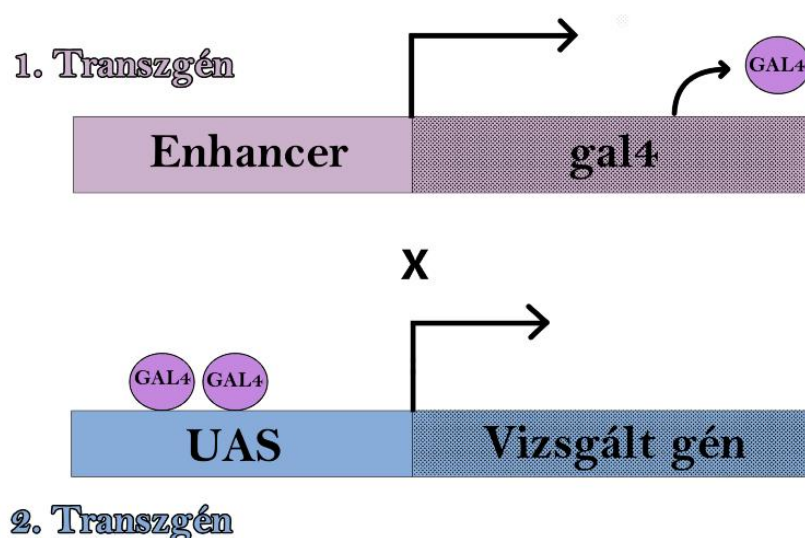
Elméletem szerint az anterográd transzport fokozásával szintén aktiválható a lizoszóma exocitózis. Kutatócsoportunk korábbi eredményei alapján elmondható, hogy az Arl8 idegrendszeri aktiválása élettartam növelő és kognitív funkció javító hatású [49]. OTDK munkámban a GAP-ok vizsgálatát tűztem ki, hiszen ezek csendesítésével aktiváljuk a kis GTPázokat. Az Arl8-nak nagy szerepe van a lizoszóma transzportban, így szerepe lehet a lizoszomális exocitózisban is. Kutatásom célja volt, GAP-ok felkutatása, amelyek csendesítésével aktiválható az Arl8 és lizoszomális exocitózis. Kísérleteim során 3 *Drosophila* (zsírtest, agy, nyálmirigy) szervre koncentráltam:

- Lárvális zsírtestben vizsgáltam a lizoszómák mennyiségi és lokalizációs változását normál és éhezés esetén. Szintén ebben a szövetben vizsgáltam az Arl8-pozitív vezikulumok változását is. Eredményeimből az anterográd transzport változására terveztem következtetni.
- A lárvális nyálmirigy egy endogén mirigy, melyben a sejtek lizoszomális vezikulumai exocitózissal egy belső, közös csatornába ürülnek. Vizsgálatával az exocitózis mértékére kívántam következtetni.
- A felnőtt idegrendszerben egyaránt tanulmányoztam a GAP-ok csendesítésének sejtes és élettani funkcióit.

IV. Anyagok és módszerek

1. Gal4-UAS rendszer

Az Gal4-UAS rendszer működéséhez az UAS - upstream aktiváló szekvenciával rendelkező transzgén és a Gal4 transzkripció faktor együttes jelenléte szükséges. A rendszer aktiválása kiváltható két transzgénikus törzs keresztezésével (3. ábra). Az egyik törzs tartalmazza a szövet specifikus enhanszer által vezérelt *gal4* gént, míg a másik tartalmazza az UAS-target szekvenciát. A Gal4-UAS rendszer használatával szövetspecifikusan lehetséges géneket aktiválni, vagy csendesíteni [53].



3. ábra. Gal4-UAS rendszer sematikus rajza: A két transzgént együttes jelenléte szükséges a rendszer aktiválódásához. Az UAS csak akkor engedi a gén kifejeződését, ha a Gal4 hozzákapcsolódik [54].

2. FLP/FRT – szomatikus rekombináción alapuló rendszer

Az FLP/FRT rendszer helyspecifikus szomatikus rekombinációt tesz lehetővé. Ezt a módszert használtam az V.1., 2. és 5. alfejezetekben bemutatott kísérletekhez. Az FLP rekombináz két egymáshoz közeli azonos kromoszómán elhelyezkedő FRT helyet ismer fel, melyek között egy STOP-kodont kódoló kazetta van. A 2 FRT hely a *Gal4*-gén enhanszer régiója és a *Gal4* kódoló szekvenciája között található. Amikor a hősök promóter vezérelt FLP aktiválódik, homológ rekombinációval kivágódik a STOP kazetta és megtörténik a Gal4 szövet specifikus expressziója. A rekombináció hősökkel aktiválható, a létrejött klón sejtek fluoreszcensen jelölődnek (*UAS-GFP* transzgénnek köszönhetően). A rendszer előnye, hogy azonos genetikai háttérben tudunk összehasonlítani egy szöveten belül sejteket [55].

3. Felhasznált törzsek

A vizsgált állatok (1. táblázat) standard kukorica-cukor-agar táptalajon voltak tartva 25°C-on. A kísérleteimet 29°C-on (UAS-Gal4 rendszer optimuma) végeztem.

Törzsek elnevezése	Genotípus	Származási hely
Arl8 cgGal4	w1118; GFP-Arl8; cgGal4	Laborunk keresztezéssel hozta létre
cgGal4	w1118; P{Cg-GAL4.A}2	BDSC: 7011
DdcGal4	w1118; P{Ddc-GAL4.L}4.36	BDSC: 7009
GFP RNSi	y1 sc* v1; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=VALIUM22-EGFP.shRNA.4}attP40	BDSC: 41550
isogenic <i>w1118</i> (kontroll)	w1118	BDSC: 5905
RNSi kontroll	y1 sc* v1; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=VALIUM22-EGFP.shRNA.4}attP2	BDSC: 41551
CG8085 RNSi	y1 v1; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.JF03085}attP2	BDSC: 28670
CG7324 RNSi	y1 sc* 1 sev21; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS00722}attP2	BDSC: 32929
CG12241 RNSi	y1 sc* v1 sev21; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS00612}attP2/TM3, Sb1	BDSC: 33729
CG7112 RNSi	y1 sc* v1 sev21; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS01132}attP2/TM3, Sb1	BDSC: 34976
CG4041(III) RNSi	y1 sc* v1 sev21; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.GL00239}attP2/TM3, Sb1	BDSC: 35332
CG11727 RNSi	y1 v1; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS01818}attP40	BDSC: 38350
CG4041(II) RNSi	y1 sc* v1 sev21; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMC04606}attP40	BDSC: 57223
CG42795 RNSi	y1 v1; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMJ23781}attP40/CyO	BDSC: 62385
CG1695 RNSi	y1 v1; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMJ24138}attP40	BDSC: 62898
CG31935 RNSi	y1 sc* v1 sev21; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMC05513}attP40	BDSC: 64495
CG42612 RNSi	y1 sc* v1 sev21; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMC06174}attP40	BDSC: 66313
CG6182 RNSi	y1 sc* v1 sev21; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMC06532}attP40	BDSC: 77400
CG5344 RNSi	y1 sc* v1 sev21; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMC06579}attP40	BDSC: 77447

ddcGal4(mCherry – Lamp1)	+;SM6b/Lamp1,3x mCherry; TM6b/DdcGal4	Laborunk keresztezéssel hozta létre
klonálisan Gal4 (mCherry-Lamp1)	hsFLP; Act<CD2<Gal4; UAS-nlsGFP; Lamp1-3xmCherry	Dr. Lőrincz Pétertől
Syntaxin 4 RNSi GD	w1118; P{GD8646}v32413	VDRC: v32413
Syntaxin 1 RNSi R1	+; syntaxin 1 RNSi	NIG Fly: 31136R-1
Syntaxin 1 RNSi R2	+; syntaxin 1 RNSi	NIG Fly: 31136R-2
Syntaxin 1 RNSi JF	y1 v1; P{TRiP.JF01829}attP2	BDSC:25811
Forkhead Gal4	w[*]; P{w[+mC]=fkh-GAL4.H}3	BDSC: 78060

1. táblázat. Törzslista: A kísérletekben használt *Drosophila melanogaster* törzsek neve, genotípusa és származási helye.

A kísérleteimhez cg-Gal4 (zsírtest specifikus), ddc-Gal4 (ideg specifikus), fkh-Gal4 (nyálmirigy specifikus) törzseket összekeresztettem az UAS-*GAP* RNS interferencia törzsekkel és a kontrollokkal. A hatást az F1 generációban vizsgáltam. A klonális rendszer (mCherry – Lamp1) aktiválásához a vizsgálat előtt 20 órával az állatokat 29°C-ra helyeztem.

4. Fluoreszcens és elektronmikroszkópia

A fluoreszcens mikroszkópos képek ApoTome2-vel felszerelt Zeiss Axioimager M2 mikroszkóppal készültek (Plan-APOCHROMAT 20x 0,8 NA objektívvel és Zeiss Zen Blue lite szoftverrel). A fluoreszcens mikroszkópiához a mintákat Hoechst (sejtmag festék) tartalmú fedőoldattal (glicerin:PBS – 4:1) fedtem.

Elektronmikroszkóp: Morada digitális kamerával felszerelt JEM-1011 transzmissziós elektronmikroszkópot használtunk, a szoftver: iTEM.

a. Zsírtest minták készítése

A zsírtest preparátumokat 90-95 órás L3 táplálkozó stádiumú lárvákból készítettem. A zsírtest boncolás során etetett és éhező állatokat vizsgáltam. Éheztetéshez a lárvákat 2,5 órán keresztül éheztettem 20 m/V% szukróz oldaton.

b. Agy minták készítése

A felnőtt nőstény állatok agyát 4%-os formaldehid - PBS (30 perc) oldatban való fixálást követően preparáltam.

c. Nyálmirigy preparálása

A vizsgát állatok nyálmirigyét L3 vándorló stádiumú állatokból preparáltam.

Az elektronmikroszkópos képek elkészítéséhez a kiboncolt nyálmirigyeket 3,2%-os paraformaldehid - 1% glutáralehid tartalmú nátrium kakodilát oldatban (pH: 7,4) fixáltam 4°C-on 1 hétig. Az utófixálás 0,5%-os ozmium tetroxidban 1 órán keresztül és 30 percig telített vizes uranil-acetátban történt szobahőmérsékleten. A minták emelkedő koncentrációjú etanol sorozattal dehidráltam, majd Durcupan műgyantába lettek beágyazva. 70nm-es metszeteket Reynolds ólom-citrát oldatba festettük meg [56].

5. Western blot

Genotípusonként 10 etetett L3 stádiumú lárvából izoláltam fehérjét. Homogenizáltam a mintákat 40 µl lízis pufferben (Tween20 (20%), Tris (100mM, 7.5pH), NaCl (5M), EDTA (0.05M), Nikotinamid (1M)) és 40 µl merkaptotetanolt tartalmazó loading oldatban. Ezután denaturáltam a fehérjéket: 95°C-on forraltam 5 percig. Izoláció után a mintákat -20°C-on tároltam.

A fehérjék méret és töltés alapján történő étválasztásához 4-20%-os SDS tartalmú gradiens gélt használtam. A blotokat többször is megismételtem. Nedves blottolást és 4%-os blokkolást követően a nitrocellulóz membránon az alábbi ellenanyag jelöléseket végeztem:

Elsődleges ellenanyagok: Ref(2)P/SQSTM1/p62 (nyúl, Dr. Boda Attilától, 1:2000), alfa-anti-Atg8a (nyúl, Dr. Boda Attilától, 1:2000). Belső kontroll: anti-Tub84B (DSHB, egér, 1:1000).

Másodlagos ellenanyagok: Alábbi másodlagos ellenanyagokat használtam: anti-nyúl IgG alkalikus foszfatáz (1:1000, Sigma, A3687), anti-egér IgG alkalikus foszfatáz (1:1000, Sigma, A8438).

Előhíváshoz használt szubsztrát oldat: NBT-BCIP (Sigma, 72091) (3%-os tejporos TBST-ben hígítva).

6. Mászás vizsgálat

Mászás teszt során az állatokat szén-dioxiddal altattam, majd nemenként elkülönítve 10-10 állatot helyeztem 25cm-es vékony átmérőjű csövekbe. Az altatást követően az állatok 1 órán keresztül regenerálódtak. A csöveket leütöttem, ami negatív geotaxist (felfelé másznak) vált ki a muslicákban. Videó felvételek alapján rögzítettem, hogy hány állat éri el 20, 40 és 60 másodperc alatt a 23,5cm-es célmagasságot hosszútáv és 10 és 20 másodperc alatt a 6cm-es célmagasságot rövid táv esetén. A méréseket két párhuzamos csoporttal végeztem, 3x ismételtem, köztük 30 perces szünetekkel. A mozgási tesztek során az állatok dopaminerg és

szeroenerg neuronjaiban voltak csendesítve a *GAP*-ok. A vizsgálattal elsősorban az állatok reakcióidejét (rövidtáv) és ingermegtartó képességét (hosszú táv) lehet mérni [11].

7. Élettartam mérés

Minden genotípusból azonos időben kelt 75 nőstény és 75 hím állatot gyűjtöttem, melyeket 5 párhuzamos csőbe (15 nőstény és 15 hím csővenként) tettem 1 napos korban. A méréseket 29°C-on az UAS-Gal4 rendszer optimális hőmérsékletén végeztem. Minden nap feljegyeztem az elpusztult állatok számát és nemét, kétnaponta pedig friss táptalajt tartalmazó csőbe ráztam át őket. A kísérlet addig tartott míg az összes állat el nem pusztult.

Az állatok túlélését SPSS programmal készült Kaplan-Meyer görbén ábrázoltam. A görbék statisztikai összevetését is ezzel a programmal végeztem. Az átlagos élettartam statisztikai elemzéséhez RStudio-t használtam.

8. Statisztika

Az eredményekből Rstudio használatával box-plot diagrammokat készítettem. Statisztikai elemzéshez az RStudio programot használtam. Megvizsgáltam az adatok eloszlását (Lilliefors-teszt), a normál eloszlású minták összehasonlításához kétmintás t-próbát végeztem, nem normál eloszlású minták összevetésénél Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztam. Klonális képeknél páros t-tesztet, vagy nem normál eloszlásnál Wilcoxon Ranks Sum tesztet használtam. Fluoreszcens mikroszkópos képek és Western blot kiértékeléshez ImageJ Fiji verzióját használtam. A fluoreszcens képekhez tartozó diagramokon az eredmények normalizálva lettek ábrázolva.

Perifériális vezikulumok kiértékelése: kijelöltem a sejteket és megmértem a vezikulumokat, melyet 100%-nak tekintettem, majd a kijelölést csökkentettem 30 pixellel és újra mértem a sejt belsejében található vezikulumokat. A két adat hányadosával megkaptam a perinukleáris vezikulumok mennyiségét. A diagramokon normalizált adatok láthatóak. A pöttyök az egyes mintákat jelölik, a feltüntetett hibasávok a standard szórást, a sötét sáv a mediánt, a box a legjellemzőbb 50% (25-75%), a csillagok pedig szignifikancia megbízhatósági fokát jelölik: $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***.

V. Eredmények és megvitatásuk

1. *GAP* csendesítéssel fokozható a lizoszómák mennyisége lárvális zsírszövetben

Célul tűztem ki meghatározni, hogy a laboratóriumunk rendelkezésére álló 11 *GAP* csendesítése közül melyek képesek megnövelni a lizoszómák mennyiségét. A *GAP*-ok csendesítése kiválthatja a lizoszómák transzportját, de fúzióját is más vezikulumokkal. Az eredmények kiértékelésekor a vezikulumok számát és méretét is figyelembe vettem. Fúzióval főleg a méret növekedhet, fúzió hiányában viszont a struktúrák száma változik. Kísérleteimet két kondícióban, jóltáplált és éhező L3 táplálkozó lárvák zsírtestein végeztem. Éhezés hatására aktiválódik az autofágia és megnövekszik a lizoszomális struktúrák mennyisége [57,58]. Az mCherry-dLamp (*Drosophila* Lamp) lizoszóma markerként szolgált. A marker alkalmas a lizoszóma membránfúzió vizsgálatára is, a lizoszóma – sejtmembrán fúziót követően az mCherry-dLamp a sejtmembránra kerül [38,59]. A csendesített *GAP*-ok a GFP-pozitív klonális sejtekben voltak vizsgálhatók, kontrollként a szomszédos GFP-t nem kifejező zsírsejtek szolgáltak (4. ábra).

Etetett kondícióban megnövekedett a dLamp pozitív struktúrák:

mérete: CG5344-, CG7324-, CG8085-, CG11727-, CG42612-RNSi

száma: CG8085-, CG11727-, CG42612-, CG7324-RNSi

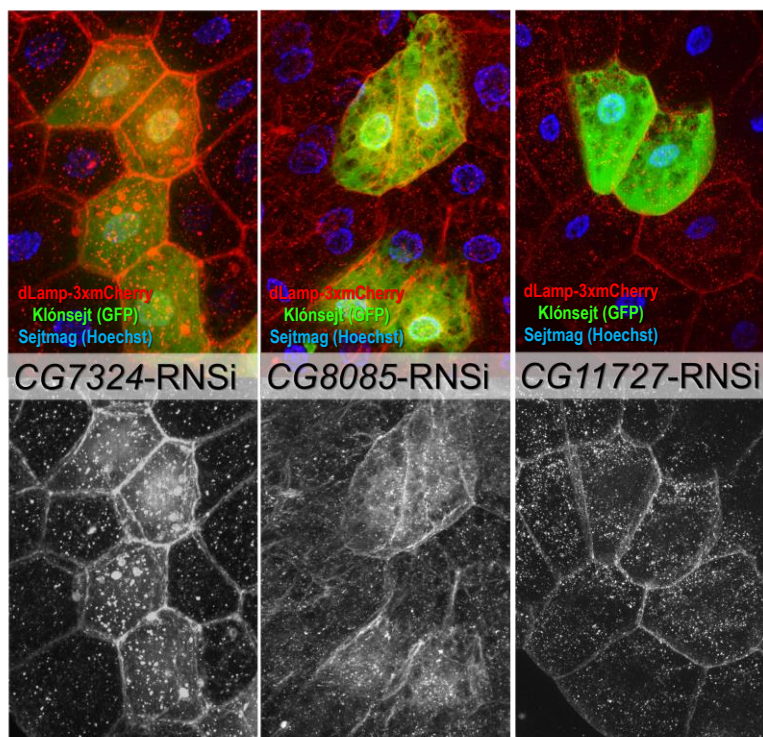
Éheztetett kondícióban megnövekedett a dLamp pozitív struktúrák:

mérete: CG4041-, CG6182-, CG7112-, CG8085-, CG11727-, CG12241-, CG31935-, CG42612-RNSi

száma: CG6182-, CG8085-, CG42612-, CG42795-RNSi

Az eredmények alapján elmondható, hogy *GAP* csendesítéssel fokozható a dLamp pozitív struktúrák mérete és száma, de különbség lehet a *GAP*-ok szerepében bazális és stressz kiváltotta autofágia esetén. A CG8085, CG11727 és CG42612 géncsengesítések mindkettő vizsgált kondícióban növelni tudták a dLamp pozitív struktúrák számát (4. ábra és 2. táblázat). Saját eredményeim és korábbi laboratóriumunkban zajló kísérletek alapján a további kísérleteimhez lecsökkentettem a vizsgálandó *GAP*-ok számát a következő 5-re: CG6182, CG7324, CG8085, CG11727, CG42612. A választás során nem csak a lizoszóma mennyiségi változások szolgáltak alapul, hanem a mikroszkópos képeken látott membrán változások is. Ezen *GAP*-ok csengesítésénél intenzív mCherry membrán jelölődést láttunk etetett kondícióban, mely jelentheti az anterográd lizoszomális transzport fokozódását (4., 5. ábra).

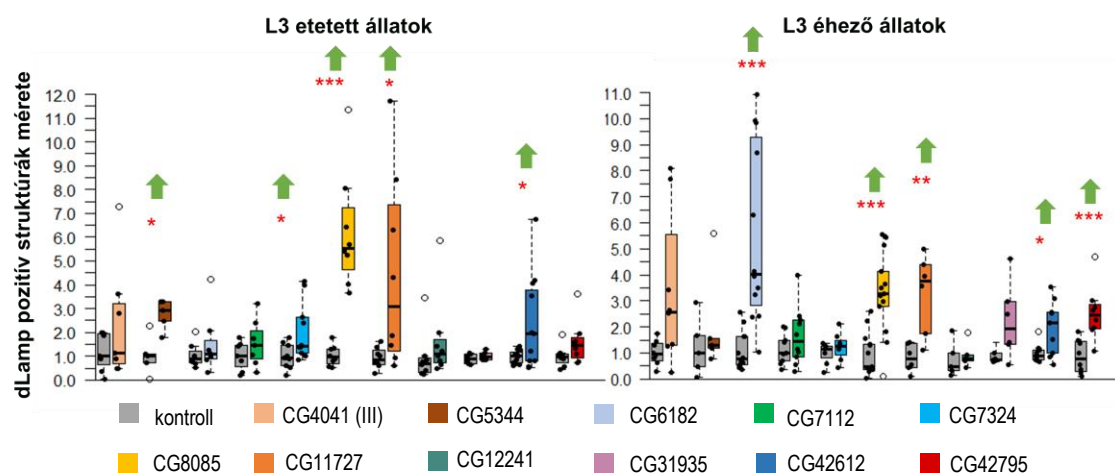
A



B



C



4. ábra. GAP csendesítés megnövelheti a lizoszomális struktúrák számát és méretét: A) 3 GAP (CG7324, CG8085, CG11727) esetén etetett kondícióban megfigyelhető a dLamp pozitív struktúrák toborzódása a plazmamembránnál, mely látható membrán kirajzolódást eredményez. B) Éheztetett kondícióban a CG11727 csendesítése megnövelte a dLamp pozitív struktúrák számát, a membrán kirajzolódás már nem figyelhető meg. C) A két diagramon látható a vezikulák méretének változása etetett és éheztetett állatokban. A piros csillagok a kontrollhoz képesti szignifikancia mértékét jelentik.

	CG 4041 (III)	CG 5344	CG 6182	CG 7112	CG 7324	CG 8085	CG 11727	CG 12241	CG 31935	CG 42612	CG 42795
É h e z ő	×	×	↑	×	↑	↑	×	×	×	↑	↑
E t e t e t	×	↑	×	×	↑	↑	↑	×	×	↑	×

2. táblázat. Összefoglaló táblázat a dLamp pozitív struktúrák méretének megváltozásairól zsírtestben különböző GAP gének csendesítésének esetében: Két kondícióban vizsgált dLamp pozitív struktúrák mérete növekedett több gén csendesítés hatására is, mindkét kondícióban növelte a méretet a CG7324, CG8085, CG42612. Zöld nyilak növekedést jelölnek, X jelöli azt, ahol nem történt szignifikáns változás.

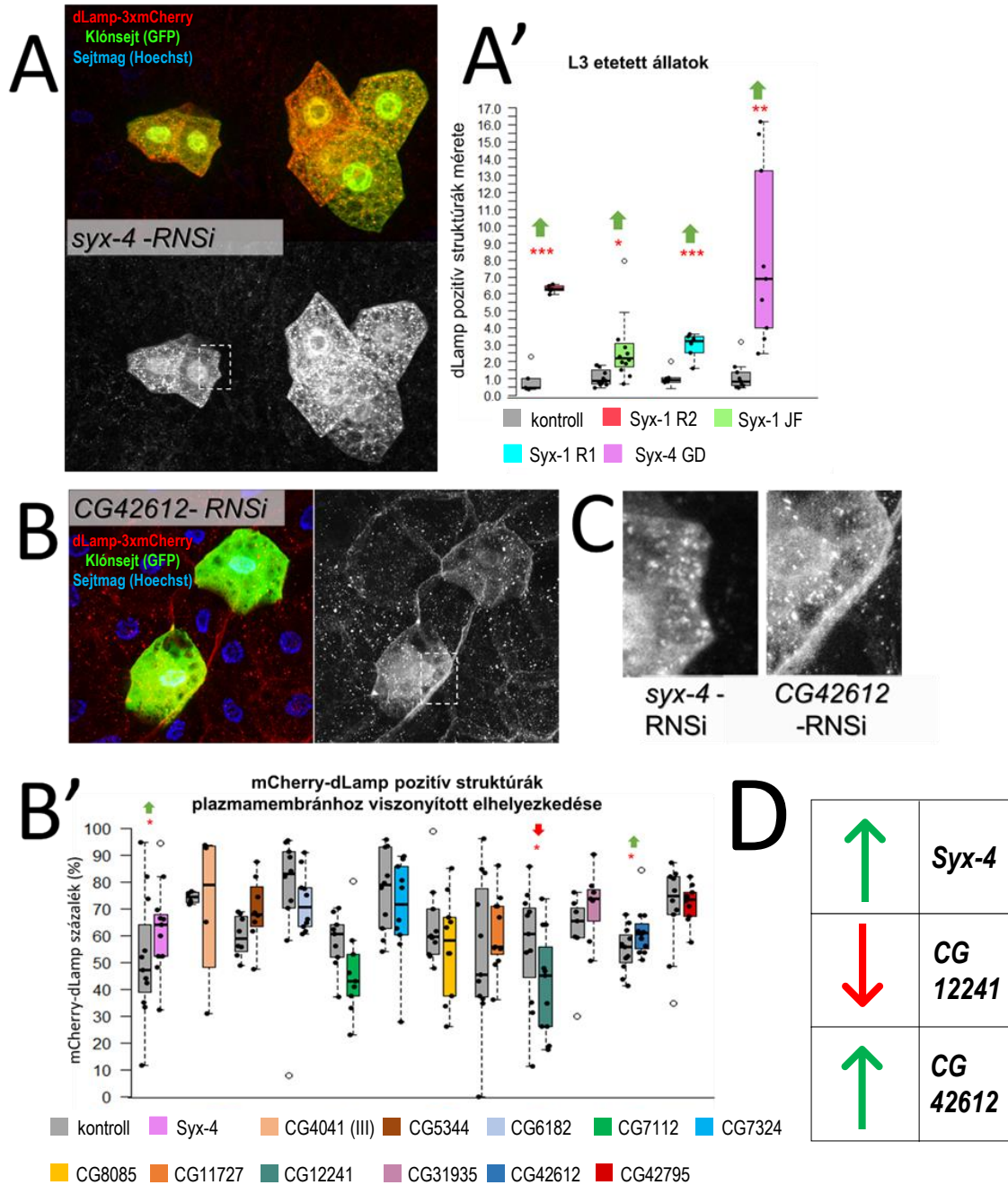
2. GAP csendesítéssel szabályozható a lizoszomális struktúrák elhelyezkedése a sejtekben

Már láthattuk, hogy a dLamp pozitív struktúrák mérete és száma is növelhető *GAP* gének csendesítésével és fokozott dLamp membrán jelölést is mutatnak. A perifériális vezikulumok kiértékelésénél csak a jól táplált kondícióból származó adatokkal dolgoztam, hiszen éheztetve membrán kirajzolódást nem tapasztaltam (4.,5. ábra).

További kísérletekhez, *syx-1* és *syx-4* (*syx-1* JF, R1 és R2 RNSi törzsek, *syx-4* GD) géneket csendesítettem és vizsgáltam az mCherry-dLamp pozitív struktúrákra. A Syx-ok olyan fehérjék, melyek intracelluláris membránfúziós útvonalakat irányítanak [58]. *Syx-1* az exocitózisban játszik szerepet, míg a *syx-4* a plazmamembránon helyezkedik el és a lizoszóma és plazmamembrán fúzióját szabályozza [31,60]. Eredményeim szerint lizoszóma méret növekedést a *syx-1*-RNSi (R1 és R2 konstrukciókkal) és *syx-4* RNSi is mutatott, viszont egyedül a *syx-4* hiányában volt észlelhető dLamp felhalmozódás a sejtmembránok közelében. További kísérleteknél a *syx-4* csendesítést negatív kontrollként használtam (5. ábra és 3. táblázat).

A *CG12241*-RNSi csökkentette a dLamp pozitív struktúrák megjelenését a plazmamembrán körül, míg a *CG42612* hiánya megnövelte azt (5. ábra). Ez utalhat arra, hogy a két GAP ellentétesen befolyásolja a lizoszóma exocitózist. Bár a vezikulák száma nem emelkedett szignifikánsan, a membránok mCherry-dLamp kirajzolódása fokozódott több *GAP*-RNSi

esetén is (4. és 5. ábra C). Ez arra utalhat, hogy a lizoszómák nem rekednek meg a sejtmembrán közelében, hanem fuzionálnak vele. Tehát a *GAP*-ok csendesítése fokozhatta a lizoszóma exocitózist. A kísérletet *syx-4* mutáns háttérben kívánom megismételni, ahol *GAP*-ok hiányában lizoszóma felhalmozódást várok a sejtmembránhoz közeli intracelluláris térben.



5. ábra. A vizsgált *GAP*-ok csendesítésével aktiválható a lizoszomális anterográd transzport és exocitózis: A-A') *syx-1* és *syx-4* csendesítés hatására megnövekszik a dLamp struktúrák mennyisége. **B-B')** Megvizsgáltam a *GAP*-RNSi-k hatására, hogyan változik a lizoszómák eloszlása a sejtekben. A CG42612-RNSi állatokban megemelkedett a perifériális mCherry-dLamp struktúrák mennyisége. **C)** Az A és B ábrákból kinagyított részleteken összehasonlítható a *syx-4* és CG42612 csendesítések hatása a perifériális dLamp eloszlásában. **D)** Összefoglaló táblázat, azokról a *GAP* csendesítésekről melyek változást értek el a dLamp pozitív struktúrák plazmamembránhoz viszonyított helyzetükben. Piros nyíl: csökkenést, zöld nyíl: növekedést jelenti a plazmamembránnál.

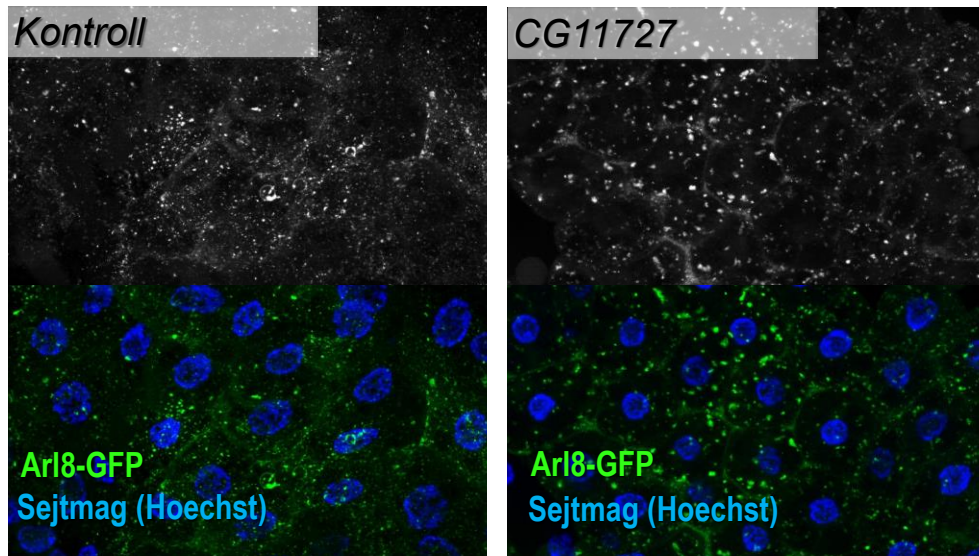
3. *GAP* csendesítéssel megnövelhető az Arl8 aktivitás zsírszövetben

A következő kísérletben megvizsgáltam, hogy a kiválasztott 5 *GAP* közül melyik befolyásolja az Arl8 (GFP-Arl8) struktúrák mennyiségét. Az Arl8 egy kis GTPáz ami lizoszóma membrán fúziót serkent más membránokkal, illetve segít összekötni a lizoszómát a kinezin-1 motorfehérjével elősegítve az anterográd transzportot [61].

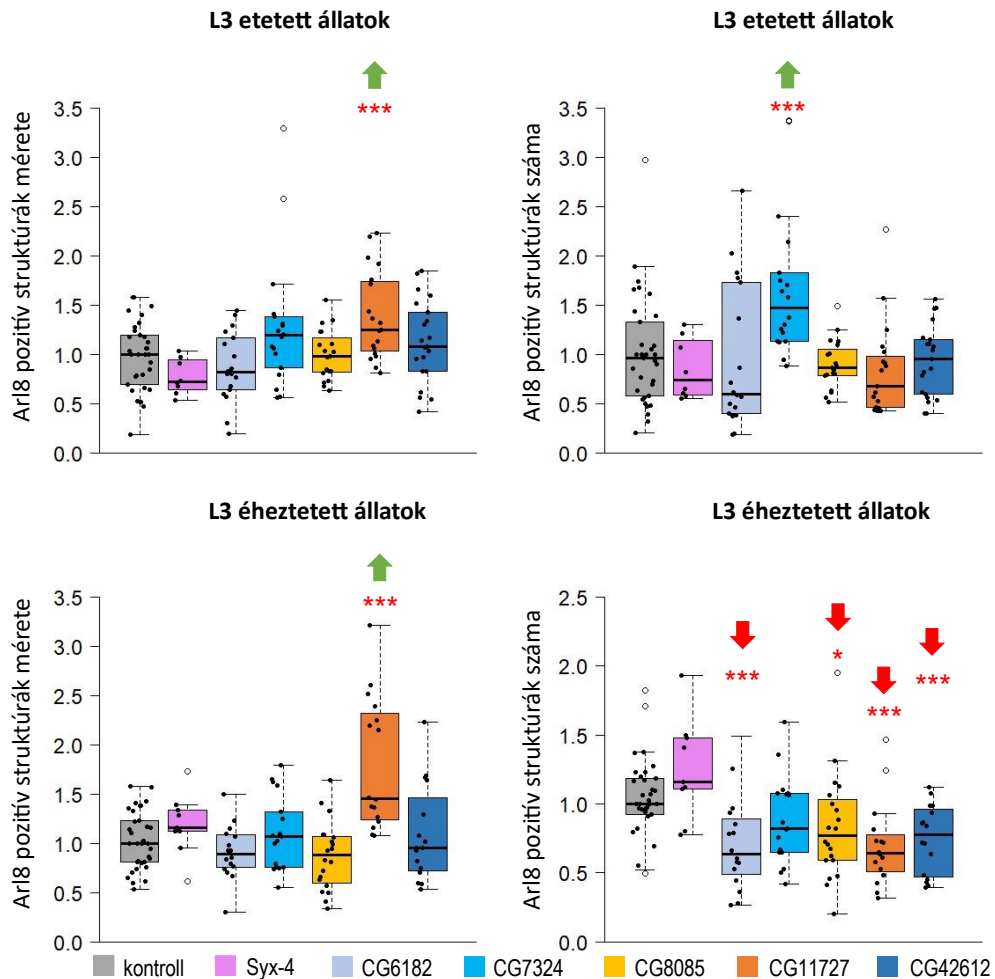
Ezt a kísérletet is két kondícióban végeztem lárvális zsírtesteken. A *CG11727*-RNSi éheztetve és etetve is növelte a GFP-Arl8 vezikulák méretét, azonban éheztetett kondícióban csökkentette a struktúrák számát. Etetett kondícióban a *CG7324*-RNSi pedig növelte az Arl8 pozitív struktúrák méretét. Éheztetéskor az alábbi *GAP*-csendesítések csökkentették a dLamp pozitív struktúrák számát: *CG6182*, *CG8085* és *CG42612* (6. ábra és 3. táblázat).

A GFP-Arl8-cal kapott eredmények részben eltérnek a mCherry-dLamp vizsgálatából származó eredményektől, de a hasonlóság még érdekesebbé tette ezt a két *GAP*-ot (*CG11727*, *CG7324*) a számomra. Az eltéréseket magyarázhatja, hogy az Arl8 lizoszóma külső membránjához kapcsolódni tudó, de nem állandóan membránon jelenlévő fehérje, míg a dLamp a lizoszómák lumene felé van kihorgonyozva. További különbség, hogy a dLamp rákerül a sejt plazmamembránjára lizoszóma exocitózis által, míg az Arl8 nem. [16,37]. A kapott eredmények megértéséhez kolokalizációs vizsgálatot tervezek az mCherry-dLamp és a GFP-Arl8 markerek között.

A



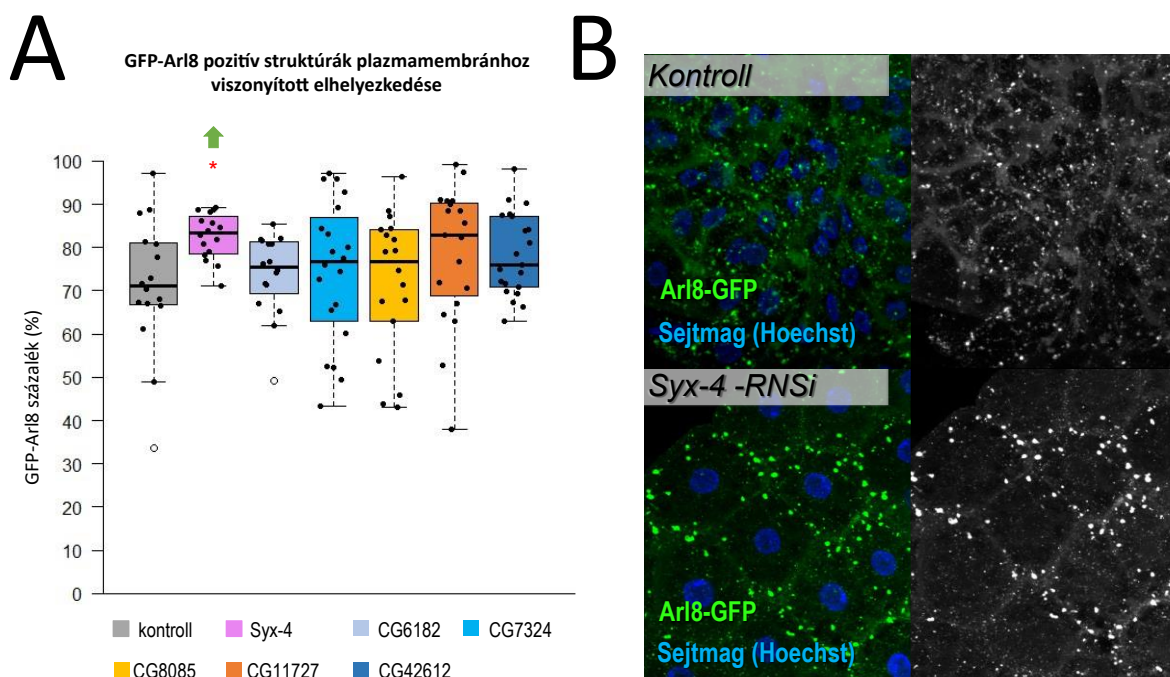
B



6. ábra. A vizsgált GAP-ok csendesítésével befolyásolható az Arl8 pozitív struktúrák száma és mérete: A) A CG11727 GAP RNSi csendesítésével növekedik a struktúrák mérete (etetett kondíció) a kontrollhoz képest. B) Megvizsgáltam a GAP-RNSi-k hatására, hogyan változik az Arl8 pozitív struktúrák száma és mérete éheztetett és jól táplált kondícióban. A CG11727-RNSi állatokban megemelkedett az Arl8 pozitív struktúrák mérete.

Az Arl8 esetén is megvizsgáltam a GAP csendesítésének hatását az Arl8 pozitív struktúrák elhelyezkedésére. A kontrollhoz képest csak a *syx-4*-RNSi esetén növekedett szignifikánsan az Arl8 perifériális struktúrák mennyisége. A *CG11727* csendesítésekor tendenciózus medián növekedés látható (7. ábra és 3. táblázat).

Eddigi zsírtesttel végzett kísérleteimet a 3. táblázatban foglaltam össze.



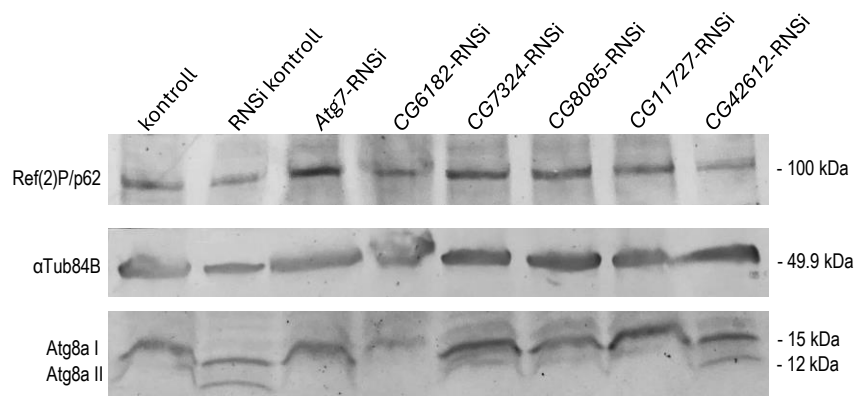
7. ábra. *Syx-4* RNSi hatására Arl8 pozitív struktúrák halmozódnak a membránál: **A)** A *Syx-4* RNSi megnövelte az Arl8 pozitív struktúrák mennyiségét a membránál, *CG11727*-RNSi-nél tendenciózus medián közeli Arl8 növekedést okozott. **B)** Kontrollhoz képes látható a struktúrák felhalmozódása a membránál.

	CG6182	CG7324	CG8085	CG11727	CG42612
mCherry-dLamp szám	×	↑	↑	↑	↑
mCherry-dLamp méret	×	↑	↑	↑	↑
dLamp perifériás struktúra arány	×	×	×	×	↑
GFP-Arl8 szám	×	↑	×	×	×
GFP-Arl8 méret	×	×	×	↑	×
Arl8 perifériás struktúra arány	×	×	×	×	×

3. táblázat. Összefoglaló táblázat a zsírtesten etetett kondícióban elvégzett kísérletek eredményeiből: Zsírtestben a dLamp pozitív vezikulák száma és mérete a legtöbb esetben nőtt, míg az Arl8csak a: *CG7324*-RNSi és *CG11727*-RNSi esetén változott.

4. A GAP-ok gátlásával fokozódhat a lizoszomális lebontás

Ahogy az Irodalmi áttekintés fejezetben írtam az Arl8 szükséges a lizoszomális fúziós eseményekhez is. Így az Arl8-at szabályozó GAP-oknak is lehet ilyen funkciója. Western blot segítségével vizsgáltam, hogyan változik az autofágiában érintett fehérjék mennyisége a GAP-RNS interferenciák esetén. A Ref(2)P a p62 *Drosophila* ortológja [62], amely fehérje az autofágia szubsztrátja. Tehát a Ref(2)P/p62 mennyisége fordítottan arányos az autofágia hatékonyságával. Fokozott autofágia esetén lecsökken a Ref(2)P/p62 mennyisége, míg gátlása esetén felhalmozódás figyelhető meg [63]. Az Atg8a az emlős LC3B ecetmuslica megfelelője, western bloton kettő formája az Atg8a-I és Atg8a-II különíthető el egymástól. Közülük az Atg8a-II az autofág membránhoz kötött forma. Mennyisége az Atg8a-I (szolúbilis) formához viszonyítva növekedhet, ha több autofagoszóma képződik, vagy ha az autofágia lebontása sérül [64]. Az Atg8a formái segíthetnek eldönteni, hogy milyen lépésénél történt változás az autofágiának, de teljes képet csak szubsztátok (pl.: p62) vizsgálatával együtt kaphatunk.



8. ábra. CG42612 csendesítésénél lecsökken az Ref(2)P mennyisége. A p62 és Atg8a jelöléseket használtam az autofágia szintjének meghatározására. Belső kontrollnak az αTubulin84B jelölést végeztem. A képen egy membránon szétválasztott fehérjék láthatóak, melyeket különböző ellenanyagokkal jelöltem. Az Atg7 csendesítése Ref(2)P felhalmozódáshoz míg a CG42612-RNSi csökkenéshez vezetett. A fehérje mintákat teljes jól táplált L3F stádiumú lárvákból izoláltam.

Az autofágia vizsgálatát jól táplált L3F (3. lárvastádium táplálkozó szakasza) lárvákból izolált fehérjemintákkal végeztem. Az Atg7-t negatív kontrollként használtam, hiszen hiányában az autofágia gátlődik, így a Ref(2)P felhalmozódását vártam [65]. Tubulin változásához korrigálva lett a Ref(2)P szintje. CG8085-RNS csendesítésénél mindkét kontrollhoz viszonyítva kismértékű csökkenést tapasztaltam. A CG42612-RNSi esetén jelentős Ref(2)P csökkenés volt megfigyelhető. Sajnos az Atg8a formáinak megjelenítése a fehérje kis méretéből adódóan nehézkes, így a kontroll mintában egyik bloton sem sikerült értékelhető eredményt kapnom. Az RNSi kontrollhoz viszonyítva az Atg7-RNSi esetén nem detektálható az Atg8a-II lipidhez

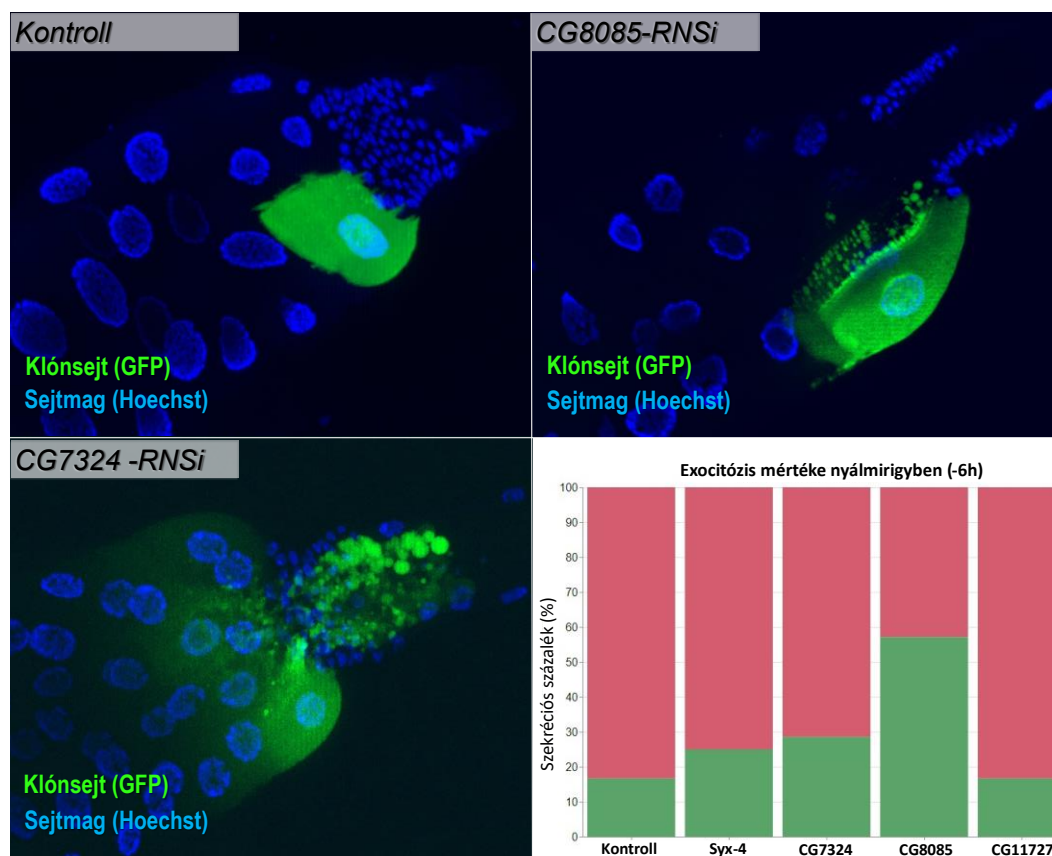
kötött forma. Ami megfelel a szakirodalom alapján vártaknak, hiszen az Atg7 fehérje szükséges az Atg8a lipidizációjához [65]. A *GAP* csendesítések közül csak a *CG42612* csendesítéskor látható Atg8a-II növekedés. Eredményeim alapján feltételezhető, hogy egyes *GAP*-ok csendesítése nem csak a lizoszóma transzportjában és extracelluláris ürülésében, hanem lebontásában is érintettek lehetnek. A *CG42612*-RNSi esetén feltételezhető, hogy hiányában aktiválódik az autofág lebontási útvonal, tehát ezen *GAP* negatív szabályozója lehet az autofágiának. A kérdéses *GAP*-ok szerepét további, főleg mikroszkópos vizsgálatokkal tervezem kiegészíteni.

5. Lizoszóma exocitózist indukálhat a *GAP*-ok csendesítése

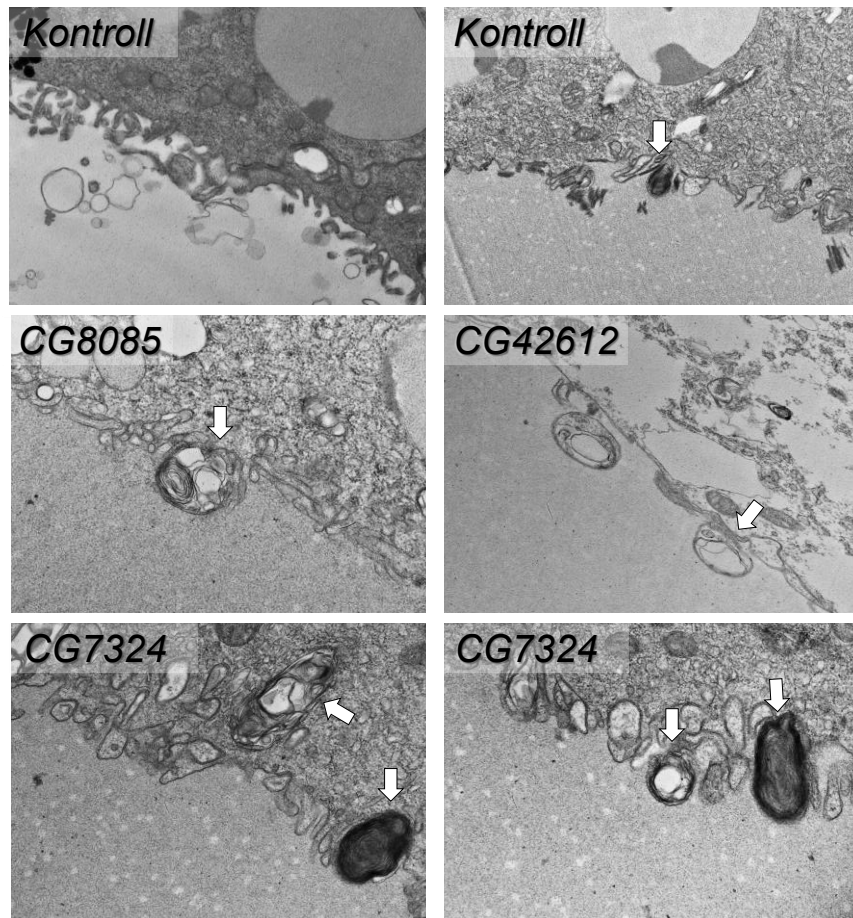
A nyálmirigy két egymáshoz kapcsolódó egyrétegű kivezető csőből áll, amelyeket oszlopos hámsejtek vesznek körül. Ezek a sejtek glue fehérjét választanak ki, ami a báb rögzítéséhez szükséges. A klonális zsírtestek elemzésekor felfigyeltem arra, hogy a nyálmirigyekben is képződnek mitotikus rekombináns (zölden fluoreszkáló) klón sejtek, amelyekben aktív az UAS-Gal4 rendszer.

Több nyálmirigyet preparáltunk, és összehasonlítottuk a genotípusok közti különbségeket. A *CG7324*-RNSi és a *CG8085*-RNSi hatására a klónsejteknél fokozott szekréciót (apró lefűződő citoplazmát tartalmazó vezikulumokat) lehetett megfigyelni (9. ábra). Kísérletesen a szekréció pontos összetételét még nem azonosítottam. Ez az exokrin mirigy, alkalmas kísérleti modell ahhoz, hogy az exocitózist vizsgálni tudjam olyan közegben, ahol a vezikulumok kilökődése zárt extracelluláris térbe történik, és láthatóvá válik az exocitózis teljes folyamata [66].

A további kísérlethez L3 stádiumú lárvák nyálmirigyét preparáltam, ahol a *GAP* géneket csendesítettem a nyálmirigyben. Elektronmikroszkópiával a *GAP*-RNSi nyálmirigyekben több sejtmembránról (kivezetőcső lumene felé) lefűződő lizoszomális vezikulumot figyeltünk meg. Legmarkánsabb perifériális lizoszóma szám növekedés a *CG7324*-RNSi esetén láttam (10. ábra). Eredményeim támogatják azon elméletemet, hogy a kiválasztott *GAP*-ok csendesítésével fokozható a lizoszóma exocitózis. A jövőben tervezem elektronmikroszkópiával megvizsgálni jóltáplált lárvák zsírtest szövetét is.



9. ábra. Zsírtest specifikus klonális rendszer esetén megjelentek klón sejtek a nyálmirigyben is, ahol a géncsendesítés hatása fokozott szekréciót eredményezett: A CG7324-RNSi és a CG8085-RNSi hatására a klónsejteknél fokozott szekréció figyelhető meg.



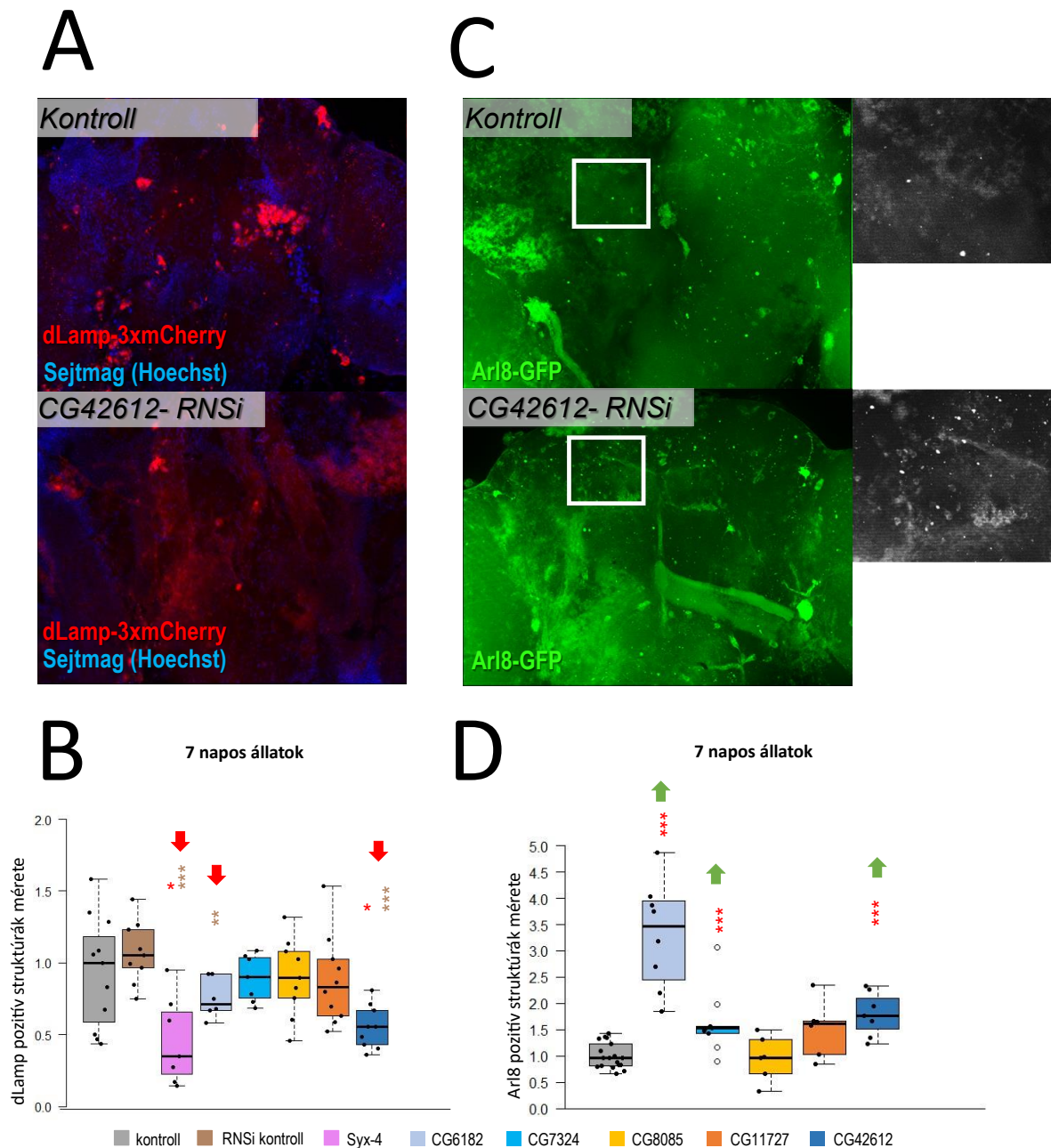
10. GAP csendesítés hatására nyálmirigyben a lizoszomális struktúrák előfordulása megnövekszik a plazmamembránál: A CG8085, CG42612 és CG7324 RNS interferencia hatására megnövekedett a lizoszomális struktúrák száma a plazmamembránál. Fehér nyilak jelzik a lizoszomális struktúrákat.

6. GAP csendesítés idegrendszerben növelheti az Arl8 pozitív struktúrák számát

Az előző kísérletek alapján kiválasztott *GAP*-RNSi-k hatását felnőtt idegrendszerben is terveztem vizsgálni.

A dLamp-nál 2 (Gal4-et hordozó törzzsel bekeresztett w^{1118} és *GFP*-RNSi kontroll) míg az Arl8-nál egy kontrollt használtam (w^{1118}). - Utóbbi esetben a *GFP* csendesítése befolyásolta volna a GFP-Arl8 marker mennyiségét is. - Irodalom alapján az RNSi használata esetén aktiválódhat a RISC komplex, mivel túlzott mennyiségű duplaszálú RNS-t termeltetünk. Az RNS interferencia így a cél mRNS-től függetlenül további gének kifejeződésére is hatással lehet. Az RNSi kontroll törzs, amely nem rendelkezik célzott hatással (cél mRNS-el), arra szolgál, hogy kiküszöbölje a nem specifikus RNS interferencia aktiválódásból eredő különbségeket [67].

Eredményim alapján *Drosophila* felnőtt idegsejtekben a dLamp pozitív struktúrák száma csökkent a *CG6182* és *CG42612*-RNSi hatására míg az Arl8 pozitív struktúrák száma a *GAP* csendesítés hatására megnőtt. A *CG42612*-RNSi esetén az Arl8 pozitív struktúrák száma is növekedett (11. ábra és 4. táblázat). Elképzelhető, hogy az idegrendszerben a dLamp és Arl8 különböző struktúrákat jelölnek. Az ellentétes eredmények további kísérletekkel magyarázhatók.



11. ábra. *GAP* csendesítéssel növelhető az Arl8 pozitív struktúrák mennyisége: A és B) dLamp pozitív struktúrák száma csökken a *GAP* RNSi hatására idegrendszerben. Barna csillagok a RNSi kontrollhoz képest mutatja a szignifikancia megbízhatósági fokát. C és D) Arl8 pozitív struktúrák száma *GAP* csendesítés hatására megnövekedik az idegrendszerben. Fehér kocka jelzi a kinagyított kép részleteket.

	<i>Syx-4</i>	<i>CG6182</i>	<i>CG7324</i>	<i>CG8085</i>	<i>CG11727</i>	<i>CG42612</i>
dLamp						
Arl8						

4. táblázat. Összefoglaló táblázat *Drosophila* felnőtt idegrendszerben (dopaminerg és szerotonerg) elvégzett kísérletek eredményeiből: Az agyban a *GAP* RNSi hatására dLamp pozitív és Arl8 pozitív struktúrák méretének változásait tartalmazza a táblázat. Piros nyíl: csökkent méret, világos piros: csökkent méret egy kontroll esetén, zöld nyíl: növekedett méret, X jelöli azt, ahol nem történt szignifikáns változás. Fekete vonal jelöli azt, ami még nem volt tesztelve.

7. Az idegrendszeri *GAP* csendesítéssel növelhető az állatok mozgásképesége és várható élettartama

Az előzetesen kiválasztott 5 *GAP*-RNSi interferencia törzseket Ddc-Gal4 törzzsel kereszteztem. A gén csendesítés így a dopaminerg és szerotonerg neuronokban történt.

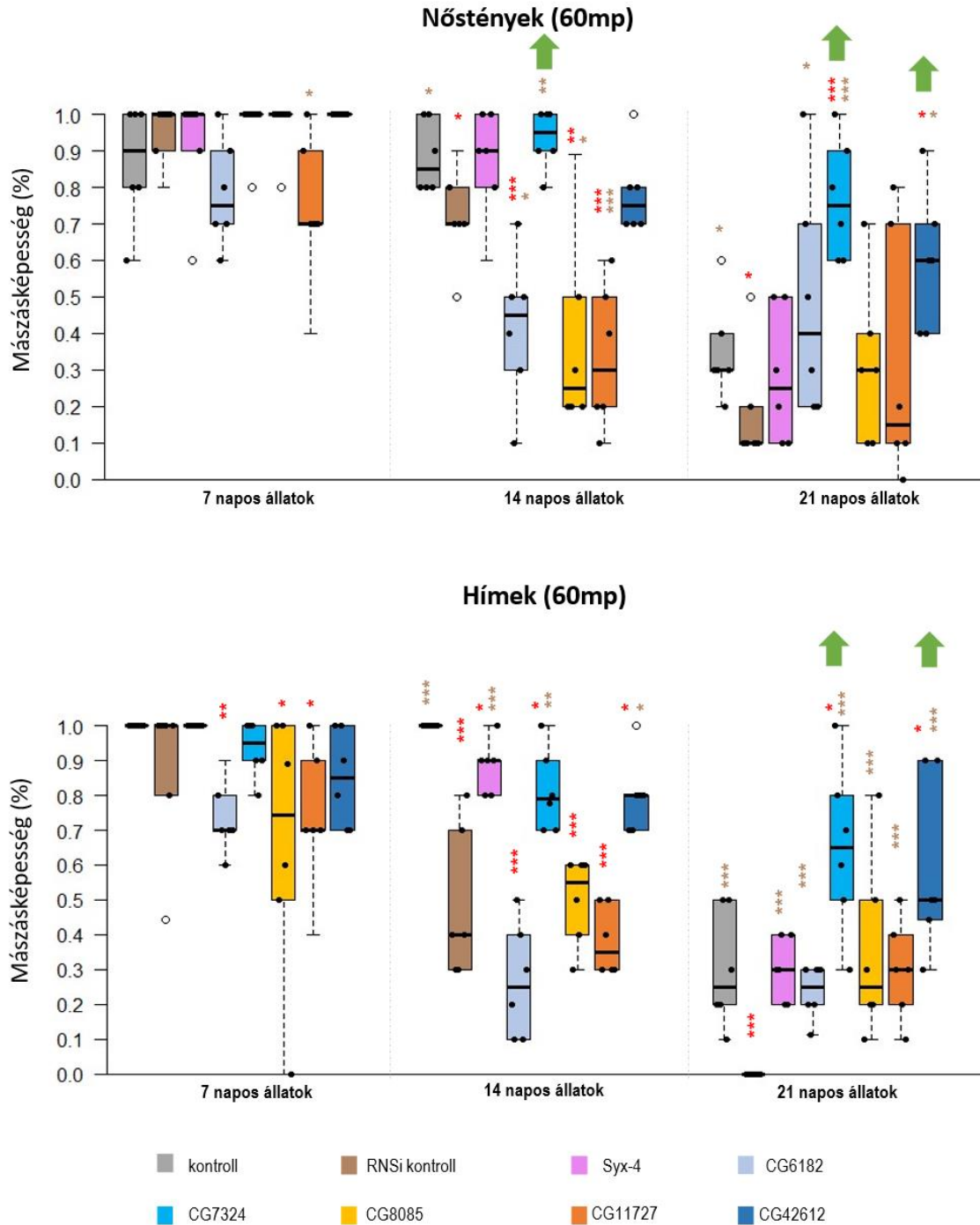
Az idegrendszer állapotára mászás esszével mérhető reakció időből következtettem. Eredményeimből látszik a mászás képesség korfüggő fokozatos romlása (12. ábra). Az eredmények értékelésekor elsősorban a legidősebb korcsoportra fókuszáltam, hiszen az autofágiának a hatékonysága öregebb állatokban alacsonyabb. A *GAP*-RNSi hatása leginkább ebben a korcsoportban figyelhető meg. A kontrollhoz és RNSi kontrollhoz képest a *CG7324* és a *CG42612* szignifikánsan növelte az állatok mászását mindkét nemből (12. ábra).

Ugyan ez a két *GAP* csendesítése nem csak a hosszútávú mászási képességet javította, de a rövid távú mászás esetén is pozitív hatást eredményezett (13. ábra). Elmondható, hogy a két gén csendesítése az idegrendszerben öregedés során javítja a mászó képességet és a reakció időt is. Kiemelhető, hogy ezek közül az Arl8 pozitív struktúrák számát az idegrendszerben a *CG7324* és a *CG42612* is képes volt növelni. Bár a *CG6182* fokozta az Arl8 mennyiségét, mászásképeség javulást ez esetben nem tapasztaltam.

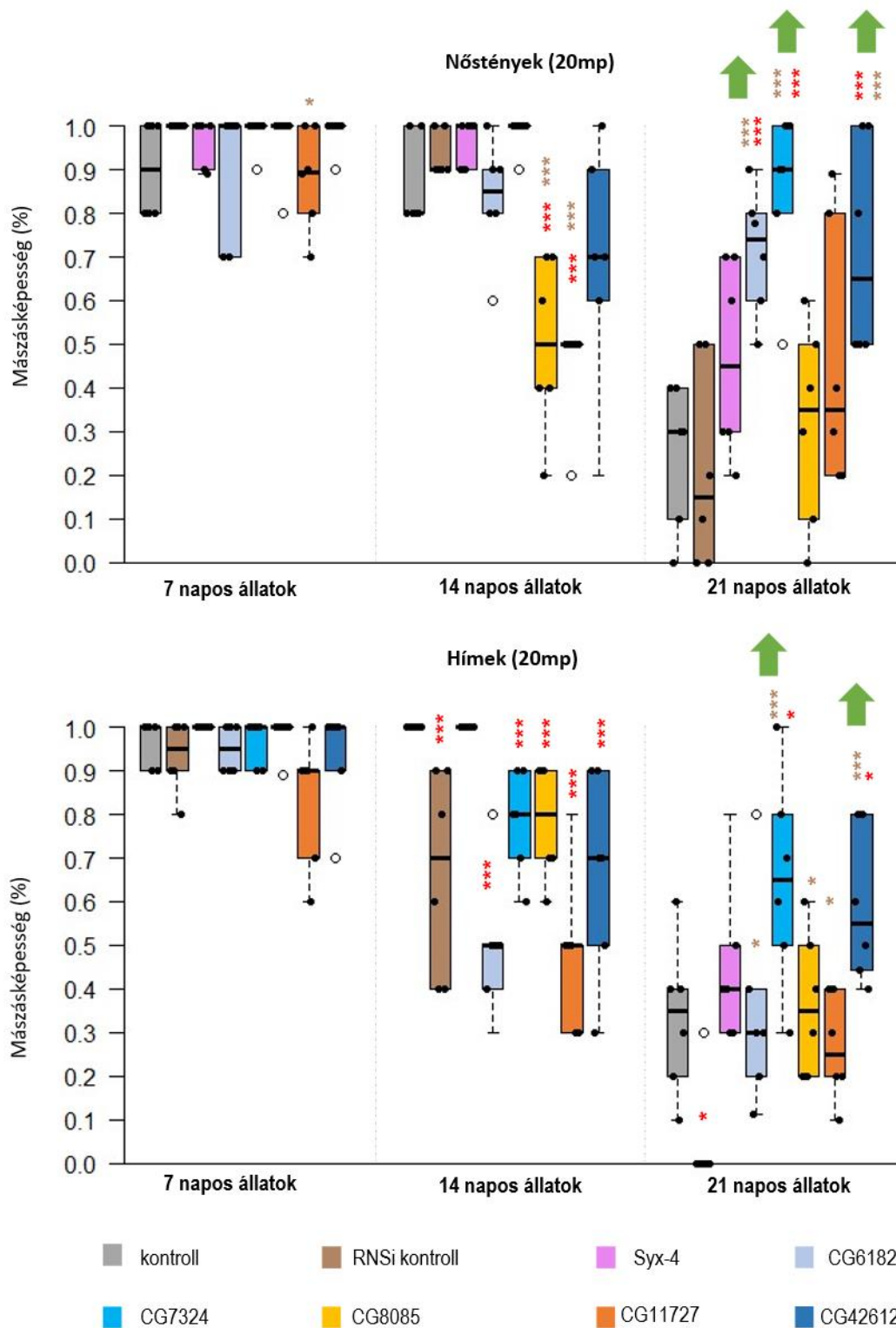
Az élettartam vizsgálat eredményei eltérőek voltak a nemek közt, így ezeket külön diagramokon szeretném bemutatni. A nőstényeknél kontrollhoz képest szignifikáns élettartam növelést ért el a *CG11727*. Az RNSi interferencia kontrollhoz képest szignifikánsan növelte az élettartamot a már említett *CG11727*, és a *CG42612* csendesítése is. Fontos kiemelni, hogy ezen a két *GAP* géncsengesítésén kívül a többi negatívan befolyásolta, csökkentette az átlag

élettartamot (*CG6182*, *CG7324*, *CG8085*). A hímek esetén csak egy *GAP* csendesítése okozott élettartam növelő hatást mindkettő kontrollhoz viszonyítva: a *CG7324*. A GFP RNSi kontrollhoz képest a *CG8085* csendesítése is szignifikánsan növelte az élettartamot. A többi gén csendesítése hímekben csökkentett élettartamot eredményezett a kontrollokhoz képest (14. ábra).

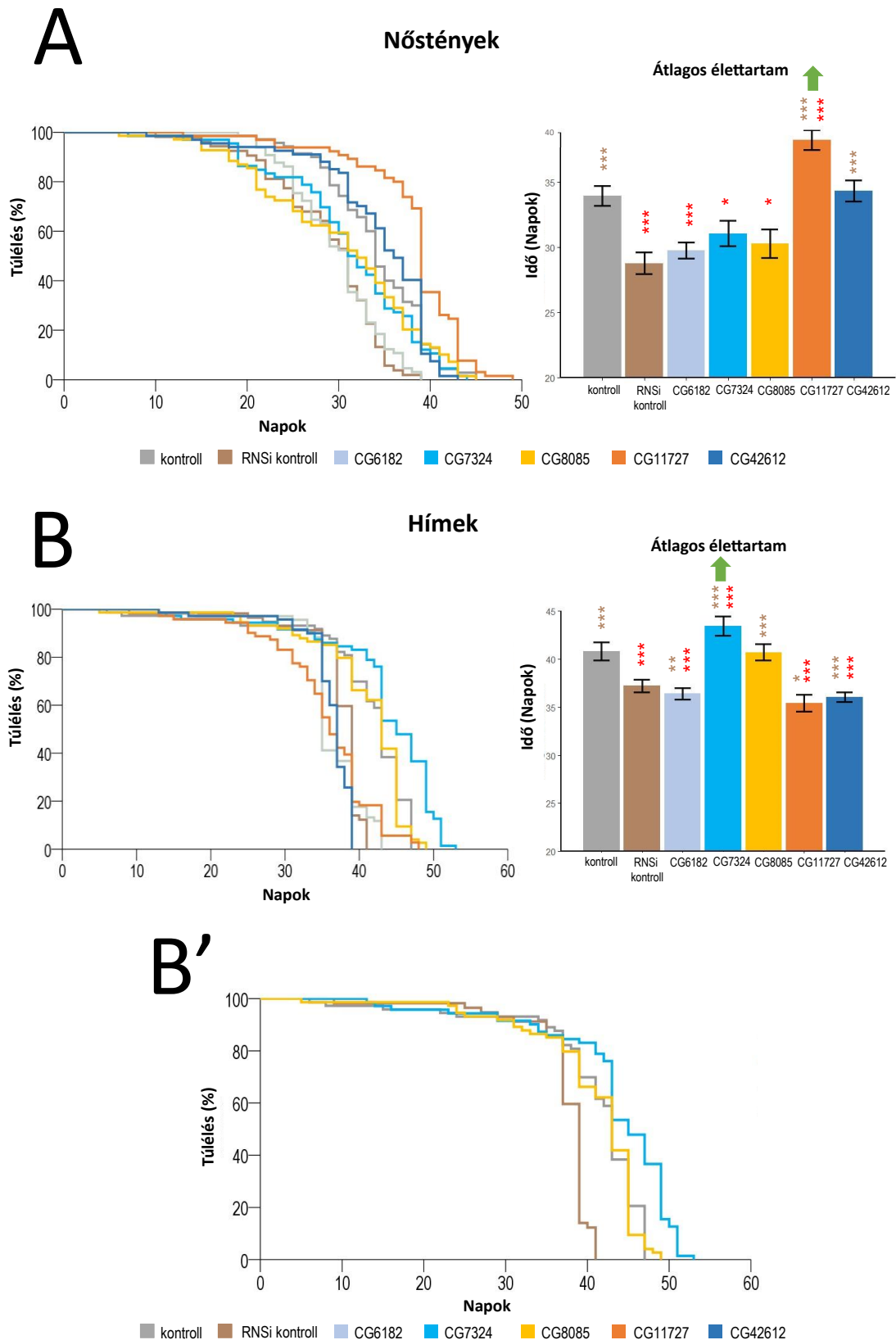
Az UAS-Gal4 rendszer (így valószínűleg az RNSi) erősebben fejeződik ki a hím egyedeknél, így ebből fakadhat a nemenkénti eltérés a kísérletek során. Ezen kívül élettartam görbék lefutása mindkét nemnél a 20. napig egybefüggő. A kísérletet, melynél a *GAP* csendesítések hatásait vizsgáltam az Arl8 és dLamp pozitív struktúrára 7 napos állatokban végeztem, így lehet az idősebb állatokban a géncsökkentés más eredményt mutatna. Az eredmények megerősítése érdekében a későbbiekben a felnőtt idegrendszeren végzett mikroszkópos kísérleteket ismételni szeretném idősebb állatok használatával. A fluoreszcens eredményeket ultrastrukturális vizsgálatokkal is tervezem kiegészíteni.



12. ábra. GAP csendesítés hatására növelhető az idős állatok mászásképpesség: Hosszútávú mászásnál 23,5cm-es magasságig kellett eljutniuk az állatoknak. Mind a nőstények mind a hímeknél a CG7324-RNSi és CG42612-RNSi a 21. napon szignifikánsan mászóképpesség javulást eredményez. A boks-plotokon a pöttyök az egyes mérések tartozó %-os értékeket jelölik (nem egyedszámot).



13. ábra. GAP csendesítés hatására növelhető az idős állatok reakcióképessége. Rövid távú mászás vizsgálatnál 6cm-es magasságot kellett az állatoknak elérni. Mind a nőstények mind a hímeknél a CG7324-RNSi és CG42612-RNSi a 21. napon szignifikánsan javulást eredményezett a reakcióképességben.



14. ábra. GAP csendesítéssel növelhető az állatok élettartama. A) Nőstényeknél növelte az élettartamot a CG11727 és CG42612 csendesítse. **B)** Hímeknél pozitív, élettartam növelő hatást fejtett ki a CG7324. **B'** Ábra csak 4 genotípust jelöl: a két kontrollt, A CG8085-RNSi melynek görbéje csak az RNSi kontrollhoz képest mutat növekedést, és a CG7324-t, ami mindkettő kontrollhoz mérten szignifikánsan növelte az élettartamot. Piros csillagok jelzik a szignifikancia megbízhatósági fokát a kontrollhoz képest, barnával pedig az RNSi kontrollhoz képest.

VI. Eredmények megvitatása és jövőbeli tervek

Az Arl8 idegrendszeri aktiválása élettartam növelő és kognitív funkció javító hatású [49]. Azonban Arl8 kis GTPázokat szabályozó GAP-ok irodalom alapján még nem ismertek. Kutató csoportunk előzetes eredményeiből kiválasztottunk GAP-okat, melyekkel további kísérleteket végeztem. A GAP-ok redundáns funkcióval rendelkezhetnek, így valószínűsíthető, hogy több kis GTPáz is befolyásolhatnak.

Összefoglalásul elmondható, hogy *GAP* csendesítéssel szabályozható az Arl8 és lizoszomális struktúrák mennyisége és transzportja. Közvetett bizonyítékot találtam, hogy az anterográd transzport serkentésével fokozható a lizoszomális exocitózis. A *CG7324* és a *CG42612* GAP-ok csendesítése megnövelheti idegrendszerben az Arl8 aktivitását és ezen keresztül javíthatja az időskorral romló reakciós mozgás képességet, és a reakció időt is javíthatja. *GAP* csendesítéssel élettartam növekedést értem el *Drosophila melanogaster*ben. A *CG7324* csendesítése a hímekben megnövelte az élettartamot, míg a nőstényekben élettartam növekedést a *CG8085-RNSi* okozott. A *CG42612* ígéretes GAP-nak bizonyul, csendesítésével élettartam növelő hatást csak nőstényekben tapasztaltam az RNSi kontrollhoz viszonyítva, ellenben hím egyedekben a gén csendesítés negatív hatású volt. Mivel az élettartam és mozgásképességek esetén is jelentős nemi eltéréseket tapasztaltam tervezem a fluoreszcens mikroszkópos vizsgálataimat is megismételni hímekben és összehasonlítani az eredményeket a korábban nőstényekben kapott eredményekkel. Eredményeim alapján *GAP* csendesítéssel serkenthető lehet a lizoszóma exocitózis (5. táblázat). Kísérletesen igazoltam, hogy a vizsgált GAP-ok közül a *CG42612* autofág lebontási lépésben is részt vehet. A továbbiakban más lebontási folyamatoknál is lehetne tanulmányozni a vizsgált GAP-ok szerepét pl.: endoszomális lebontás.

A *GAP* szabályozási pontok vizsgálatát további kísérletekkel kívánom folytatni (és más RNSi és mutáns törzsek bevonásával), lizoszomális lebontásukat is fontosnak tartom jellemezni. Szükségesnek találom a vizsgált *GAP*-ok és az Arl8 fehérjék közötti interakciókat tanulmányozni (pl.: élesztő-2-hibrid, TurboID). Hiszen jelenleg nem tudható, hogy a feltárt szabályozási kapcsolatok direkt interakción vagy más közvetett reguláción alapulnak. A részletesebben vizsgált *GAP*-ok szerepének konzerváltságát más modell élőlényeken is tanulmányozni kívánom. Az ismert emlős ortológok megnevezését és szerepét az 6. táblázatban foglaltam össze.

Vizsgált szövet	Vizsgálat tárgya	CG6182	CG7324	CG8085	CG11727	CG42612
Zsírtest (etetett-méretváltozás)	dLamp	✗	↑	↑	↑	↑
	Arl8	✗	✗	✗	↑	✗
Nyálmirigy (szekréciós exocitózis)	Szekréció	—	↑	↑	✗	—
Felnőtt idegrendszer	Arl8 (méretváltozás)	↑	↑	✗	✗	↑
	Mászás (60 mp – 21. nap) ♀	✗	↑	✗	✗	↑
	Mászás (60 mp – 21 nap) ♂	↑	↑	↑	↑	↑
	Élettartam ♀	↓	↓	↓	↑	↑
	Élettartam ♂	↓	↑	↑	↓	↓

5. táblázat. Összefoglaló táblázat a *Drosophila melanogaster* en elvégzett kísérletek eredményeiből: Zöld nyíl: szignifikánsan emelkedett érték mindkét kontrollhoz képest. Világos zöld: szignifikánsan emelkedett érték csak egy kontrollhoz képest. Piros nyíl: szignifikánsan csökkent érték mindkét kontrollhoz képest. Világos piros: szignifikánsan csökkent érték csak egy kontrollhoz képest. X: nem történt szignifikáns változás. Vonal: nem volt tesztelve.

Gének	Génexpresszió (idegsejt, adult)	Gén- expresszió lárva (L3)	Funkció	Ortológ	Forrás
CG6182	alacsony	közepes	GAP (glükóz homeosztázis)	Hsap\TBC1D7- LOC100130357; Hsap\TBC1D7 (2)	[68–70]
CG7324	közepes	magas	GAP, Ca ²⁺ kötő fehérje, Endoszmális maturáció	Hsap\TBC1D8B ; Hsap\TBC1D9 (52)	[67,68,70, 71]
CG8085	közepes	közepes	GAP, neuronális migráció, nem izom- miozin szabályozó szerep	Hsap\USP6NL; Hsap\TBC1D3C (52)	[67,68,72, 73]
CG11727	magas	közepes	GAP, kis GTPáz kötő fehérje, intracelluláris vas transzport	Hsap\EVI5; Hsap\EVI5L (48)	[67,68,74, 75]
CG42612	közepes	közepes	GAP, kis GTPáz kötő fehérje	Hsap\TBC1D1; Hsap\TBC1D4 (46)	[68,69,77]

6. táblázat. Összefoglaló táblázat a vizsgált GAP-ok főbb tulajdonságairól. A táblázat tartalmazza az expressziós szintet adult idegsejtben és lárvális szövetben (L3), a GAP-okhoz tartozó molekuláris funkciókat, valamint a vizsgált GAPok humán ortológjainak megnevezését, és a hozzá tartozó forrásokat. A zárójelben () lévő számok a humán ortológok számát jelölik.

VII. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném megköszönni a témavezetőimnek Dr. Kovács Tibornak és Keresztes Fanninak, hogy fáradhatatlanul segítettek mindenben és nem csak szakmai, de lelki támaszt is adva, hozzájárultak ahhoz, hogy ez OTDK dolgozat elkészüljön. Szeretném még megköszönni a kutatócsoportnak: ELTE – Drosophila Ageing and Neurodegeneration Group és tagjainak a támogatást. Köszönöm szépen, hogy segítségükkel elsajátíthattam a kutatásomhoz szükséges szakmai technikákat és ezt a tudást a jövőbeli kutatásoknál kamatoztathatom.

Másodszor is szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak a belém vetett hitüket és a folytonos biztatást. Kiemelném páromat, akinek köszönettel tartozom amiért lelki és technikai segítséget biztosított a OTDK dolgozat megírása során.

Nem utolsó sorban nagy köszönettel tartozom az Anatómia tanszék dolgozóinak (Szenci Győző, Hargitai Dávid, Takáts Szabolcs és Lőrincz Péter) a segítségért és szakmai támogatásért.

VIII. Irodalom

- [1] Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: Cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.* 2010. p. 3–12. 10.1002/path.2697.
- [2] Fleming A, Bourdenx M, Fujimaki M, et al. The different autophagy degradation pathways and neurodegeneration. *Neuron. Cell Press*; 2022. p. 935–966. 10.1016/j.neuron.2022.01.017.
- [3] Liu SZ, Yao SJ, Yang H, et al. Autophagy: Regulator of cell death. *Cell Death Dis. Springer Nature*; 2023. 10.1038/s41419-023-06154-8.
- [4] D’Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int. Wiley-Blackwell Publishing Ltd*; 2019. p. 582–592. 10.1002/cbin.11137.
- [5] Nakamura S, Yoshimori T. Molecules and Cells Autophagy and Longevity. *Korean Soc Mol Cell Biol.* 2018;41:65–72. 10.14348/molcells.2018.2333.
- [6] Tamminen P, Cai Q. Defective retrograde transport impairs autophagic clearance in Alzheimer disease neurons. *Autophagy [Internet]*. 2017;13:982–984. 10.1080/15548627.2017.1291114.
- [7] Simonsen A, Cumming RC, Brech A, et al. Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult Drosophila. *Autophagy.* 2008;4:176–184. 10.4161/auto.5269.
- [8] Kovács T, Billes V, Komlós M, et al. The small molecule AUTEN-99 (autophagy enhancer-99) prevents the progression of neurodegenerative symptoms. *Sci Rep.* 2017;7. 10.1038/srep42014.
- [9] Kim M, Sandford E, Gatica D, et al. Mutation in ATG5 reduces autophagy and leads to ataxia with developmental delay. *Elife.* 2016;5. 10.7554/eLife.12245.001.
- [10] Liang CC, Wang C, Peng X, et al. Neural-specific deletion of FIP200 leads to cerebellar degeneration caused by increased neuronal death and axon degeneration. *J Biol Chem.* 2010;285:3499–3509. 10.1074/jbc.M109.072389.
- [11] Hara T, Nakamura K, Matsui M, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature.* 2006;441:885–889. 10.1038/nature04724.
- [12] Kovács T, Szinyákovichs J, Billes V, et al. A conserved MTMR lipid phosphatase increasingly suppresses

- autophagy in brain neurons during aging. *Sci Rep.* 2022;12. 10.1038/s41598-022-24843-w.
- [13] Komatsu M, Waguri S, Chiba T, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature.* 2006;441:880–884. 10.1038/nature04723.
 - [14] Pyo JO, Yoo SM, Ahn HH, et al. Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan. *Nat Commun [Internet].* 2013;4:1–9. 10.1038/ncomms3300.
 - [15] Nieto-Torres JL, Hansen M. Macroautophagy and aging: The impact of cellular recycling on health and longevity. *New Orleans Med Surg J.* 1951;104:111–122. 10.4324/9781315665092-10.
 - [16] Buratta S, Tancini B, Sagini K, et al. Lysosomal exocytosis, exosome release and secretory autophagy: The autophagic- and endo-lysosomal systems go extracellular. *Int J Mol Sci.* 2020;21. 10.3390/ijms21072576.
 - [17] Lamming DW, Bar-Peled L. Lysosome: The metabolic signaling hub. *Traffic.* Blackwell Munksgaard; 2019. p. 27–38. 10.1111/tra.12617.
 - [18] Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* 2017;36:1811–1836. 10.15252/embj.201796697.
 - [19] Anding AL, Baehrecke EH. Cleaning House: Selective Autophagy of Organelles. *Dev. Cell.* Cell Press; 2017. p. 10–22. 10.1016/j.devcel.2017.02.016.
 - [20] Pollock N, De Hostos EL, Turck CW, et al. Reconstitution of Membrane Transport Powered by a Novel Dimeric Kinesin Motor of the Unc104/KIF1A Family Purified from Dictyostelium [Internet]. *J. Cell Biol.* 1999. 10.1083/jcb.147.3.493.
 - [21] Encarnação M, Espada L, Escrevente C, et al. A Rab3a-dependent complex essential for lysosome positioning and plasma membrane repair. *J Cell Biol.* 2016;213:631–640. 10.1083/jcb.201511093.
 - [22] Korolchuk VI, Saiki S, Lichtenberg M, et al. Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. *Nat Cell Biol.* 2011;13:453–462. 10.1038/ncb2204.
 - [23] Cabukusta B, Neeffes J. Mechanisms of lysosomal positioning and movement. *Traffic.* Blackwell Munksgaard; 2018. p. 761–769. 10.1111/tra.12587.
 - [24] Tancini B, Buratta S, Delo F, et al. Lysosomal exocytosis: The extracellular role of an intracellular organelle. *Membranes (Basel).* MDPI AG; 2020. p. 1–21. 10.3390/membranes10120406.
 - [25] Sidibe DK, Vogel MC, Maday S. Organization of the autophagy pathway in neurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* Elsevier Ltd; 2022. 10.1016/j.conb.2022.102554.
 - [26] Guillaud L, El-Agamy SE, Otsuki M, et al. Anterograde Axonal Transport in Neuronal Homeostasis and Disease. *Front. Mol. Neurosci.* Frontiers Media S.A.; 2020. 10.3389/fnmol.2020.556175.
 - [27] Tsunemi T, Perez-Rosello T, Ishiguro Y, et al. Increased lysosomal exocytosis induced by lysosomal Ca²⁺ channel agonists protects human dopaminergic neurons from α -synuclein toxicity. *J Neurosci.* 2019;39:5760–5772. 10.1523/JNEUROSCI.3085-18.2019.
 - [28] Gomez NM, Lu W, Lim JC, et al. Robust lysosomal calcium signaling through channel TRPML1 is impaired by lysosomal lipid accumulation. *FASEB J.* 2018;32:782–794. 10.1096/fj.201700220RR.
 - [29] MacDougall DD, Lin Z, Chon NL, et al. The high-affinity calcium sensor synaptotagmin-7 serves multiple roles in regulated exocytosis. *J. Gen. Physiol.* Rockefeller University Press; 2018. p. 783–807. 10.1085/jgp.201711944.
 - [30] Rao SK, Huynh C, Proux-Gillardeaux V, et al. Identification of SNAREs Involved in Synaptotagmin VII-regulated Lysosomal Exocytosis. *J Biol Chem.* 2004;279:20471–20479. 10.1074/jbc.M400798200.
 - [31] Xu J, Toops KA, Diaz F, et al. Mechanism of polarized lysosome exocytosis in epithelial cells. *J. Cell Sci.* 2013. p. 5086. 10.1242/jcs.143982.
 - [32] Zhang J, Schulze KL, Robin Hiesinger P, et al. Thirty-one flavors of Drosophila Rab proteins. *Genetics.* 2007;176:1307–1322. 10.1534/genetics.106.066761.
 - [33] Caviglia S, Flores-Benitez D, Lattner J, et al. Rabs on the fly: Functions of Rab GTPases during development. *Small GTPases.* Taylor and Francis Inc.; 2019. p. 89–98. 10.1080/21541248.2017.1279725.
 - [34] Izmaylov DM, Obukhova LK. Geroprotector effectiveness of melatonin: investigation of lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing Dev.* 1999. 10.1016/s0047-6374(98)00105-5.
 - [35] Gutierrez MG, Munafó DB, Berón W, et al. Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *J Cell Sci.* 2004;117:2687–2697. 10.1242/jcs.01114.
 - [36] Guerra F, Bucci C. Multiple roles of the small GTPase Rab7. *Cells.* MDPI; 2016. 10.3390/cells5030034.
 - [37] Boda A, Lőrincz P, Takáts S, et al. Drosophila Arl8 is a general positive regulator of lysosomal fusion events. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2019;1866:533–544. 10.1016/j.bbamcr.2018.12.011.
 - [38] Lund VK, Madsen KL, Kjaerulff O. Drosophila Rab2 controls endosome-lysosome fusion and LAMP delivery to late endosomes. *Autophagy.* 2018;14:1520–1542. 10.1080/15548627.2018.1458170.
 - [39] Naonobu F, Wilson H, Tzu-han L, et al. Genetic screen in *Drosophila* muscle identifies autophagy-mediated T-tubule remodeling and a Rab2 role in autophagy. *Elife [Internet].* 2017;6:e23367. 10.7554/eLife.23367.001.

- [40] Hofmann I, Munro S. An N-terminally acetylated Arf-like GTPase is localised to lysosomes and affects their motility. *J Cell Sci.* 2006;119:1494–1503. 10.1242/jcs.02958.
- [41] Garg S, Sharma M, Ung C, et al. Lysosomal Trafficking, Antigen Presentation, and Microbial Killing Are Controlled by the Arf-like GTPase Arl8b. *Immunity* [Internet]. 2011;35:182–193. 10.1016/j.immuni.2011.06.009.
- [42] Okai T, Araki Y, Tada M, et al. Novel small GTPase subfamily capable of associating with tubulin is required for chromosome segregation. *J Cell Sci.* 2004;117:4705–4715. 10.1242/jcs.01347.
- [43] De Pace R, Britt DJ, Mercurio J, et al. Synaptic Vesicle Precursors and Lysosomes Are Transported by Different Mechanisms in the Axon of Mammalian Neurons. *Cell Rep.* 2020;31. 10.1016/j.celrep.2020.107775.
- [44] Vukoja A, Rey U, Petzoldt AG, et al. Presynaptic Biogenesis Requires Axonal Transport of Lysosome-Related Vesicles. *Neuron.* 2018;99:1216–1232.e7. 10.1016/j.neuron.2018.08.004.
- [45] Zhang J, Schulze KL, Robin Hiesinger P, et al. Thirty-one flavors of Drosophila Rab proteins. *Genetics.* 2007;176:1307–1322. 10.1534/genetics.106.066761.
- [46] Jing Pu, Christina Schindler, Rui Jia, Michal Jarnik, Peter Backlund and JSB. BORC, a Multisubunit Complex that Regulates Lysosome Positioning. *Dev Cell* [Internet]. 2016;176:139–148. 10.1016/j.devcel.2015.02.011.BORC.
- [47] Stroupe C. This is the end: Regulation of Rab7 nucleotide binding in endolysosomal trafficking and autophagy. *Front Cell Dev Biol.* 2018;6:1–15. 10.3389/fcell.2018.00129.
- [48] Fukuda M. TBC proteins: GAPs for mammalian small GTPase Rab? *Biosci. Rep.* 2011. p. 159–168. 10.1042/BSR20100112.
- [49] Szinyákovics J, Keresztes F, Kiss EA, et al. Potent New Targets for Autophagy Enhancement to Delay Neuronal Ageing. *Cells.* 2023;12. 10.3390/cells12131753.
- [50] Spampinato C, Feeney E, Li L, et al. Transcription factor EB (TFEB) is a new therapeutic target for Pompe disease. *EMBO Mol Med.* 2013;5:691–706. 10.1002/emmm.201202176.
- [51] Palmieri M, Pal R, Nelvagal HR, et al. MTORC1-independent TFEB activation via Akt inhibition promotes cellular clearance in neurodegenerative storage diseases. *Nat Commun.* 2017;8. 10.1038/ncomms14338.
- [52] Xu Y, Du S, Marsh JA, et al. TFEB regulates lysosomal exocytosis of tau and its loss of function exacerbates tau pathology and spreading. *Mol Psychiatry.* 2021;26:5925–5939. 10.1038/s41380-020-0738-0.
- [53] Brand H, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Dev.* 1993;401–415. 10.1242/dev.118.2.401.
- [54] Layalle S, They L, Ourghani S, et al. Amyotrophic lateral sclerosis genes in drosophila melanogaster. *Int. J. Mol. Sci. MDPI AG;* 2021. p. 1–62. 10.3390/ijms22020904.
- [55] Weasner BM, Zhu J, Kumar JP. FLPing genes on and off in Drosophila. *Methods Mol Biol. Humana Press Inc.;* 2017. p. 195–209. 10.1007/978-1-4939-7169-5_13.
- [56] Hargitai D, Kenéz L, Al-Lami M, et al. Autophagy controls Wolbachia infection upon bacterial damage and in aging Drosophila. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10. 10.3389/fcell.2022.976882.
- [57] Settembre C, Di Malta C, Polito VA, et al. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science (80-).* 2011;332:1429–1433. 10.1126/science.1204592.
- [58] Yu Hsuan Teng elicia, Wang Y, Luen Tang B. The syntaxins. *Genome Biol* [Internet]. 2001;2. 10.1186/gb-2001-2-11-reviews3012.
- [59] Cheng XT, Xie YX, Zhou B, et al. Characterization of LAMP1-labeled nondegradative lysosomal and endocytic compartments in neurons. *J Cell Biol.* 2018;217:3127–3139. 10.1083/jcb.201711083.
- [60] Yang X, Tu W, Gao X, et al. Functional regulation of syntaxin-1: An underlying mechanism mediating exocytosis in neuroendocrine cells. *Front. Endocrinol. (Lausanne). Frontiers Media S.A.;* 2023. 10.3389/fendo.2023.1096365.
- [61] Kendrick AA, Christensen JR. Bidirectional lysosome transport: a balancing act between ARL8 effectors. *Nat Commun.* 2022;13:13–15. 10.1038/s41467-022-32965-y.
- [62] Chang YY, Neufeld TP. Autophagy takes flight in Drosophila. *FEBS Lett.* 2010;584:1342–1349. 10.1016/j.febslet.2010.01.006.
- [63] Lőrincz P, Mauvezin C, Juhász G. Exploring Autophagy in Drosophila. *Cells.* 2017;6. doi: 10.3390/cells6030022.
- [64] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 2008;451:1069–1075. 10.1038/nature06639.
- [65] Juhász G, Érdi B, Sass M, et al. Atg7-dependent autophagy promotes neuronal health, stress tolerance, and longevity but is dispensable for metamorphosis in Drosophila. *Genes Dev.* 2007;21:3061–3066. 10.1101/gad.1600707.
- [66] Lehne F, Bogdan S. Swip-1 promotes exocytosis of glue granules in the exocrine Drosophila salivary

- gland. *J Cell Sci.* 2023;136. 10.1242/jcs.260366.
- [67] Alic N, Hoddinott MP, Foley A, et al. Detrimental Effects of RNAi: A Cautionary Note on Its Use in *Drosophila* Ageing Studies. *PLoS One.* 2012;7:1–5. 10.1371/journal.pone.0045367.
 - [68] Li H, Janssens J, Waegeneer M De, et al. Fly Cell Atlas: a single-nucleus transcriptomic atlas of the adult fruit fly. *Science* (80-). 2022;375:1–25. 10.1126/science.abk2432.Fly.
 - [69] Brown JB, Boley N, Eisman R, et al. Diversity and dynamics of the *Drosophila* transcriptome. *Nature* [Internet]. 2014;512:393–399. 10.1038/nature12962.
 - [70] Ren S, Huang Z, Jiang Y, et al. dTBC1D7 regulates systemic growth independently of TSC through insulin signaling. *J Cell Biol.* 2018;217:517–526. 10.1083/jcb.201706027.
 - [71] Milosavljevic, Julian; Lempicki, Camille; Lang, Konrad; Heinkele, Helena; Kampf, Lina L.; Leroy, Claire; Chen, Mengmeng; Gerstner, Lea; Spitz, Dominik; Wang, Minxian; Knob, Andrea U.; Kayser, Séverine; Helmstädter, Martin; Walz, Gerd; Pollak, Martin R.; H T. Nephrotic Syndrome Gene TBC1D8B Is Required for Endosomal Maturation and Nephron Endocytosis in *Drosophila*. *JASN.* 2022;33:2174–2193. 10.1681/ASN.2022030275.
 - [72] Kampf LL, Schneider R, Gerstner L, et al. TBC1D8B mutations implicate rab11-dependent vesicular trafficking in the pathogenesis of nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2019;30:2338–2353. 10.1681/ASN.2019040414.
 - [73] Houalla T, Shi L, Van Meyel DJ, et al. Rab-mediated vesicular transport is required for neuronal positioning in the developing *Drosophila* visual system. *Mol Brain.* 2010;3:1–10. 10.1186/1756-6606-3-19.
 - [74] Platenkamp A, Detmar E, Sepulveda L, et al. The *drosophila melanogaster* rab GAP RN-tre cross-talks with the rho1 signaling pathway to regulate nonmuscle myosin II localization and function. *Mol Biol Cell.* 2020;31:2379–2397. 10.1091/mbc.E20-03-0181.
 - [75] Laflamme C, Assaker G, Ramel D, et al. Evi5 promotes collective cell migration through its Rab-GAP activity. *J Cell Biol.* 2012;198:57–67. 10.1083/jcb.201112114.
 - [76] Soltani S, Webb SM, Kroll T, et al. *Drosophila* Evi5 is a critical regulator of intracellular iron transport via transferrin and ferritin interactions. *Nat Commun.* 2024;15:1–20. 10.1038/s41467-024-48165-9.
 - [77] Gillingham AK, Sinka R, Torres IL, et al. Toward a Comprehensive Map of the Effectors of Rab GTPases. *Dev Cell* [Internet]. 2014;31:358. 10.1016/j.devcel.2014.10.007.