

XXXI. OTDK Biológia Szekció

**Az autofágia szerepe a *Drosophila*
lárvális nyálmirigyének lebomlásában a
fejlődés során**

készítette:

Csizmadia Tamás

biológus mesterszak

II. évfolyam

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi kar

témavezető:

Dr. Lőw Péter, habilitált egyetemi docens

ELTE-TTK, Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék



Budapest, 2013.



„Az én életem mottója: „Légy hű magadhoz”. Ez azt jelenti, hogy fejleszd ki magadban mindazt a képességet, szépet és jót, amit a természet adott, fejleszd ki a legmagasabb fokig. Így lehet az ember hű hazájához, emberi mivoltához, az emberiséghez. Ne hagyjad magad eltéríteni attól, amit jónak és helyesnek tartasz, semmiféle földi hatalom vagy fenyegetés által.”

(Szent-Györgyi Albert)

Tartalomjegyzék

1	Bevezető.....	5
1.1	A programozott sejtpusztulás szerepe a rovarok egyedfejlődésében	5
1.2	Az autofágia mechanizmusa	6
1.3	A pusztuló nyálmirigyben zajló folyamatok	10
2	Célkitűzések	12
3	Anyagok és módszerek	13
3.1	A keresztezések	14
3.2	Az autofágia különféle útvonalaiban hibás törzsek	14
3.3	A korai kaszpázaktivitás kimutatása apoliner segítségével	16
4	Eredmények és megvitatásuk.....	19
4.1	A nyálmirigyek élethosszának változása autofágia hiányában.....	19
4.2	Aktív kaszpázok jelenléte a pusztuló nyálmirigysejtekben	24
5	Köszönetnyilvánítás	30
6	Szerzői hozzájárulás.....	31
7	Irodalom	32

Kivonat

Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) lárvális szervei, köztük a nyálmirigy is a posztembrionális fejlődés során lebomlanak. Ezen szerv degradációjában az apoptózis mellett bizonyosan jelentős szerepet kap az autofágia, melynek hozzájárulása a sejtek pusztulásához még nem teljesen tisztázott. Mindketten, mint katabolikus sejtélettani folyamatok a növekedéssel fordítottan szabályozódnak és együttesen vesznek részt a nyálmirigysejtek halálában [2]. Munkám során részletesen foglalkoztam az autofágia szerepével a programozott sejtpusztulásban, melyet ecetmuslica lárvális nyálmirigyén vizsgáltam. Megfigyeléseimet GAL4/UAS rendszert tartalmazó muslica törzsön végeztem, mivel ezzel a konstrukcióval bármely gén a muslica bármely szövetében expresszáltatható. Így a GAL4 forrás csak a nyálmirigyben jelent meg, és ez hajtotta meg az autofágia specifikus *Atg8*-at, melyhez fluoreszcens fehérje volt kötve. Ehhez kereszteztem hozzá az autofágia különféle útvonalaiban mutáns törzsek egyedeit: a *TSC1* az autofágiát szabályozó útvonalnak, az *Atg1* és *Atg6* pedig az autofág folyamatnak a kulcsfehérjéi. Normál esetben a nyálmirigy 17-19 órával a bábképződés után pusztult el, míg az *Atg6*, *Atg1* és *TSC1* deficiens egyedekben még 21-23 óra múltán is fellelhető volt. Fúzionáltatott fluoreszcens konstrukciót (apolinert) expresszáló törzs (*Apo;rGo/TM6*) segítségével pedig sikerült korai kaszpázaktivitást kimutatnom 13 órás bábból származó nyálmirigyben, amely az autofágia és az apoptózis szoros együttműködésére utaló jelenség. Az autofágia gének nyálmirigy-specifikus csendesítésével az autofágiát lecsökkentettem, a nyálmirigyek élettartamának növekedése, továbbá a korai kaszpázaktivitás pedig arra utal, hogy az autofágia mindenképpen részt vesz e szerv sejtjeinek eliminációjában.

Abstract

During postembryonal development, the larval organs of the common fruit fly (*Drosophila melanogaster*) degrade, so do their salivary glands. In the degradation of these organs, apart from apoptosis, autophagy is suggested to play an important role. The way autophagy contributes to the destruction of the cells is still unclear. Both mechanisms act as catabolic, cellular-physiological processes regulated in inverse proportion to growth, and they take a joint part in the death of the salivary gland cells [2]. During my thesis work, I conducted detailed research on the role of autophagy in programmed cell death, which I performed on the salivary glands of the common fruit fly. I examined the fly phylum containing the GAL4/UAS system, since with this construction, any gene in any tissue of the fly can be expressed. The GAL4 source only appeared in the salivary glands, and this triggered the autophagy-specific Atg8 which had fluorescent proteins bound to it. To achieve this, I crossed individuals originating from phyla mutant in different pathways of autophagy: *TSC1*, one of the key-proteins of the pathways regulating autophagy; *Atg1* and *Atg6*, other key-proteins of the autophagic process. In normal cases, the salivary glands degrade 17 to 19 hours after the formation of the cocoon, while *Atg6*, *Atg1* and *TSC1* deficient individuals tend to have them even after 21 to 23 hours. With the help of a phyla (*Apo;rGo/TM6*) expressing fusionated fluorescent construction (apoliner), I managed to trace early caspase activity in a salivary gland originated from a 13 hour old cocoon. This phenomenon implies the cooperation of autophagy and apoptosis. With the salivary gland specific silencing of the autophagy genes I slowed decreased autophagy. In addition, the prolonged lifespan of the salivary glands suggests that autophagy has to play a role in eliminating the cells of this organ.

1 Bevezető

1.1 A programozott sejtpusztulás szerepe a rovarok egyedfejlődésében

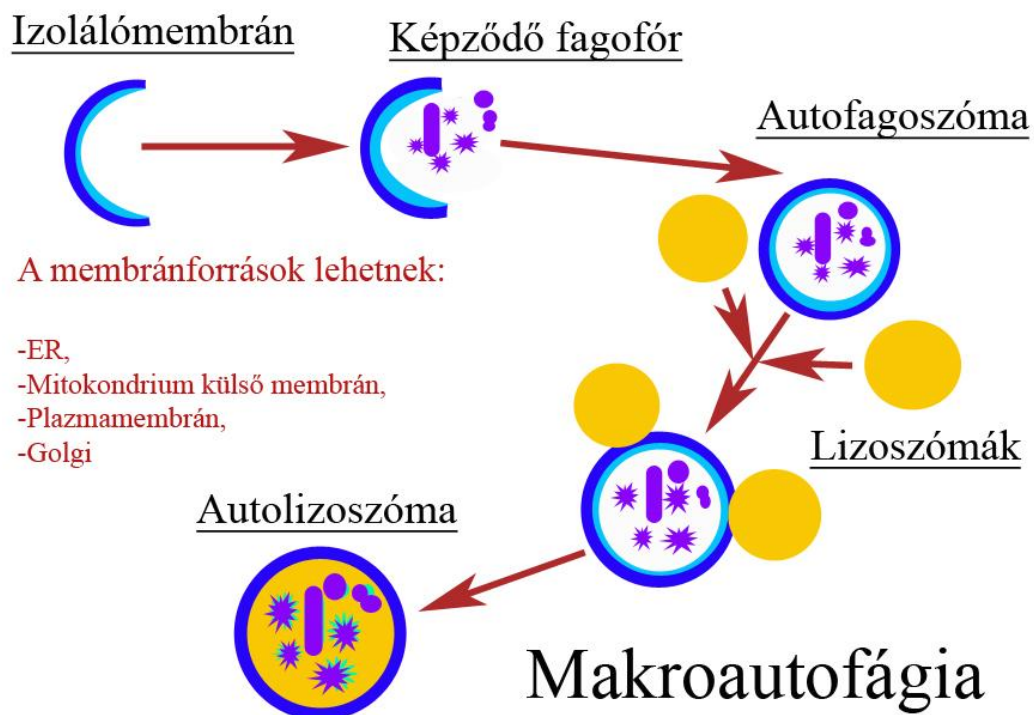
A holometabola rovarok posztembrionális fejlődése során ugrásszerű változások zajlanak, melyeket az állattan tudományában a görög *metamorphosis* (μεταμόρφωσις) szóval jelölnek, amely átalakulást, alakváltozást jelent. Szűkebb értelemben tehát a teljes átalakulással fejlődő rovarok posztembrionális fejlődését, vagyis azt a folyamatot jelenti, melynek során a rovar a bábállapotban lezajló nagyszabású átrendeződés révén kifejlett állattá, imágóvá alakul: új szervei fejlődnek, míg a lárvakoriak teljesen eltűnnek. A lárvák legfőbb feladata a folyamatos táplálkozás, egészen a harmadik lárvastádium vándorló szakaszáig, melynek során a lárvális szövetek sejtjei hatalmas méretűvé növekednek, bennük a kromoszómák sokszorozódása endoreplikációval zajlik, amely poliploidiahoz vezet. Valódi sejt és magosztódás nem történik, a kromoszómák a sejten belül többször replikálódnak egészen addig, míg a ploidia foka el nem éri az 512-es kópiaszámot ($n=512$), nyálmirigysejtek esetén pedig akár az $n=1024$ -et. Mindezzel egyidejűleg tehát a lárvális szöveik sejtjei is óriási mértékben megnövekednek: tápanyagokat halmoznak fel, melyek a posztembrionális fejlődés során használnak fel, biztosítva az imaginális discusok aktiválásához, sejtjeik osztódásához, majd az imaginális szervek kialakulásához szükséges tápanyagokat és energiát [3]. Mindezen folyamatok lezajlásához nélkülözhetetlenek a programozott sejthalál egyes folyamatai, melyek a lárvális szervek eliminációjáért felelősek: helyet, tápanyagokat és energiát biztosítva ezáltal az újonnan felépülő szerveknek. A lárvális szövetekben felhalmozott és raktározott tápanyagok a sejtek pusztulása által válnak hozzáférhetővé az imágó szerveit kialakító imaginális discusok számára. Ebben a fejlődési folyamatban két nagyon jelentős sejthalálforma vehet részt: a programozott sejtpusztulás I-es típusa (*Programmed Cell Death – PCD I.*), vagyis az apoptózis (απόπτωσης), illetve a II-es típus, vagyis az autofág sejthalál (*PCD II.*) [2]. Ezen folyamatok szerepe egyrészt a sejtek valamint a szervek méretének genetikai meghatározottságának a szabályozása, amelyben a sejtpusztulás mellett a növekedés és a sejtosztódás is jelentős szerepet vállal. Ezeket pedig a környezeti faktorok, a szomszédos sejtek egymásra hatása, valamint a rendelkezésre álló tápanyagok tovább befolyásolják. A sejtnövekedés és sejthalál közti egyensúly megtartása különösen jelentős a szövetek homeosztázisának fenntartásában, melynek zavarai különféle betegségekhez, például a rák kialakulásához vezethetnek [2]. Ezért olyan fontos, hogy a

Dorosphila egyedfejlődésének behatóbb vizsgálatával egyre inkább megértjük a bennünk, ezáltal pedig a bennünk lezajló sejtpusztulási mechanizmusokat. Az apoptózist szabályozó biokémiai folyamatokat már alaposan leírták, azonban az autofág sejthalál és az azt szabályozó gének ma még kevésbé ismertek. Továbbá keveset tudunk a két folyamat együttműködéséről, vagyis a sejtek eliminációja során zajló feladatok megoszlásáról. Az apoptózis jellemzője az aktív kaszpázok jelenléte a sejtben, a DNS fragmentálódása, a citoplazmatikus blebek keletkezése, valamint az apoptotikus sejt fagociták általi eliminálása. Ezzel szemben azok a sejtek, melyek autofág sejthalállal pusztulnak el, saját beltartalmukat emésztik meg fagociták segítségével, melynek legfontosabb morfológiai jele a dupla izoláló membránnal körülvett citoplazma részletek (autofagoszómák) jelenléte, amelyek gyakran figyelhetők meg a pusztuló sejtekben. Újabb és az általam kapott eredmények is azt mutatják, hogy a fejlődés során zajló előrehaladott autofágiához is szükséges aktivált kaszpázok, például a kaszpáz-3 jelenléte [4]. Mindezek alapján úgy gondolják, hogy az autofág folyamatok az érintett szövetekben hozzájárulnak a sejtek programozott pusztulásához [2].

1.2 Az autofágia mechanizmusa

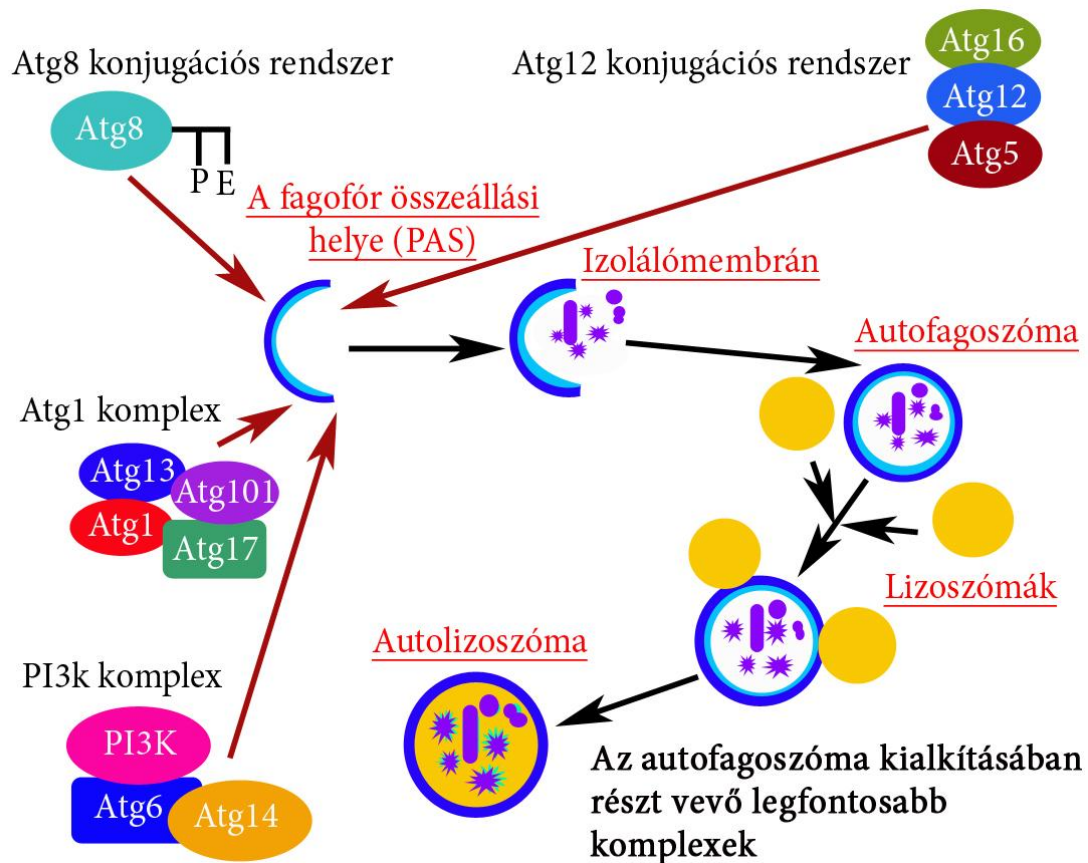
Az autofágia egy olyan konzervált katabolikus sejtleletani folyamat, melynek során a sejt saját anyagainak lizoszómális úton történő lebomlása zajlik: eltávolítódnak a hosszú féléletidejű, valamint a sérült és elöregedett fehérjék, organellumok, és a citoplazma egyes komponensei, elősegítve ezáltal a sejtek stressztűrését. Éppen ezért az autofágiát eddig túlélési mechanizmusnak tartották, a legújabb tanulmányok azonban kimutatták, hogy elősegítheti a programozott sejthalált is [5]. Ehhez való hozzájárulása azonban vita tárgyát képezi, az eddig feltételezett stressztűrésben, túlélésben játszott szerepe miatt. Többféle útja lehet annak, hogy a sejtől szelektív módon anyag jusson be a lizoszóma belsejébe: a Chaperon Mediálta Autofágia (CMA) során a HSC70 chaperonfehérjék az egyedi KFERQ szekvenciával rendelkező polipeptidláncokat ismerik fel és juttatják a lizoszóma belsejébe. Ezt egy speciális lizoszóma asszociált membránfehérjén, a LAMP2A-n keresztül teszik, előidézve a bejuttatott fehérjék szelektív degradációját [5], [6]. Az egyedi szekvencia az esetek többségében fedve van: a fehérjék hibás foldingja, sérülése, illetve öregedése következtében válik csak elérhetővé a HSC70 számára. A mikroautofágia során az endocitózissal fordított folyamat zajlik, autofagoszóma nem képződik, a folyamat során a lizoszóma membránján betűrődések jönnek létre, így nagyobb méretű partikulumok, például peroxiszómák, valamint

citoplazmarészletek kerülnek annak belsejébe. A leggyakoribb és leginkább kutatott folyamat azonban a makroautofágia (a továbbiakban autofágia), amely a legtöbb anyagot szállító útvonal. Ez az egyik legfontosabb katabolikus folyamat a sejtben, amely éheztetés, növekedési faktorok hiánya, hypoxia valamint szélsőséges hőmérsékleti körülmények hatására indukálódik, biztosítva ezáltal a túlélést [6]. Az autofágia a fejlődésben is szerepet játszó mechanizmus, melyet rovarok esetén a szteroid típusú vedlési hormon (*20-hydroxyecdysone*) hemolimfabeli koncentrációjának növekedése indít el az egyedfejlődés megfelelő stádiumában [2]. Az **1. ábrán** szemléltetett folyamat során a citoplazma egy meghatározott része körül izoláló membrán (fagofór) jön létre, amely addig növekszik, amíg autofagoszómává nem zárul. Így a körülölelt citoplazmarész a benne található komponensekkel együtt egy elhatároló kompartmentbe kerül, amely később egy vagy több lizoszómával egyesülve hozza létre az autolizoszómát, amelyben a körülölelt anyagok degradálódnak. A képződő fagofór membránjának forrása lehet külső mitokondriális, Golgi apparátus és endoplazmatikus retikulumbeli, illetve plazmamembrán is [5].



1. ábra. A makroautofágia folyamata (módosítva a [5]. forrás ábrája alapján)

Az autofágia folyamatának genetikai szabályozása mind a mai napig kevésbé tisztázott, azonban egyre több, annak szabályozásában szerepet játszó gén (*az úgynevezett atg gének*) válik ismertté, amelyek a legfontosabb végrehajtói az autofágia folyamatának. Belőlük eddig mintegy 34-et azonosítottak, melyek termékei az alábbi komplexeket alkotva fejtik ki hatásaikat (összegezve a **2. ábra** szemlélteti): 1. Atg1 kináz és a hozzá tartozó szabályozó fehérjék (**Atg1**, *Atg13*, *Atg17*), melyekből a megfelelő jel hatására olyan komplex alakul ki, amely szükséges más komplexek kialakulásához, aktiválódásához, amelyek részt vesznek az autofágia további lépéseinek, mint az izoláló membrán létrejöttének, majd az azt követő növekedési, végül pedig a záródási fázisnak a megvalósításában [6]. A legtöbb Atg fehérje (*Atg3*, *Atg4*, *Atg5*, *Atg7*, *Atg8*, *Atg10*, *Atg12* és *Atg16*) az izoláló membrán növekedésében játszik nélkülözhetetlen szerepet [5], [6]. Két, egymással is kapcsolatban álló, az ubiquitin-rendszerhez hasonló konjugációs folyamatot hoznak létre: az 2. Atg12 konjugációs rendszert, melynek tagjai az *Atg5*, *Atg7*, *Atg10*, *Atg12* és *Atg16*, illetve az 3. Atg8 konjugációs rendszert, melybe az *Atg3*, *Atg4*, *Atg7* és **Atg8** tartozik. Utóbbi felelős az ubiquitin-szerű fehérjék közé tartozó *Atg8* aktiválásáért és annak foszfatidil-etanolaminhoz történő kapcsolásáért [5], [6]. 4. a III. osztályba tartozó PI3K komplex elemei a *Vps15*, *Vps34*, **Atg6/Vps30** és az *Atg14*, amelyről egyelőre csak annyi ismert, hogy nélkülözhetetlen szerepe van a membránokban található foszfatidilinozitol molekulák foszforilálásában és így az izoláló membrán kialakításában. 5. Az előbbi csoportokba nem tartozó fehérjék (*Atg2*, *Atg9* és *Atg18*), a további folyamatok finomszabályozásában vesznek részt [6]. Az elkészült autofagoszóma beltartalmával készen áll arra, hogy lizoszómákkal egyesüljön, így beltartalma degradálódjon.



2. ábra. Az autofagoszóma kialakulásában részt vevő legfontosabb fehérje komplexek áttekintése (módosítva a [5]. forrás ábrája alapján)

Az autofágia optimális feltételek mellett a TOR komplex aktivitása által folyamatosan gátolva van. A TOR komplex egy hatalmas méretű, mintegy 300 kDa molekulatömegű szerin/treonin kináz, fontos szerepet játszik a sejtnövekedésben, a metabolizmusban és a stressztűrés szabályozásában is [6]. A TOR hiperfoszforilált állapotban tartja az Atg13 fehérjét, ezáltal az nem tud hozzákapcsolódni az Atg1-hez, így nem alakulhat ki az autofágia folyamatát iniciáló komplex [6]. Továbbá a TOR foszforilált állapotban tartja az S6 kinázt (riboszómális protein S6 kináz) és a 4E-BP-t (eukarióta transzláció iniciációs faktor 4E-kötő fehérje), ezáltal biztosítja a transzláció folyamatos működését és a sejt proliferációját. A folyamat egyik, ebben a tanulmányban különösen jelentős upstream szabályozója a **TSC1** fehérje (Tuberous Sclerosis Complex 1), amely funkcióját a TSC2-vel (Tuberous Sclerosis Complex 2) alkotott komplex formájában tudja ellátni. Ennek kialakulását a PKB/Akt fehérje komplex gátolja, AMPK pedig serkenti. A TSC1/TSC2 együttesen gátolja a Rheb fehérjét, ezáltal nincs ami serkentőleg hasson a TOR-ra, így felszabadul az autofágia folyamata annak gátlása alól [6].

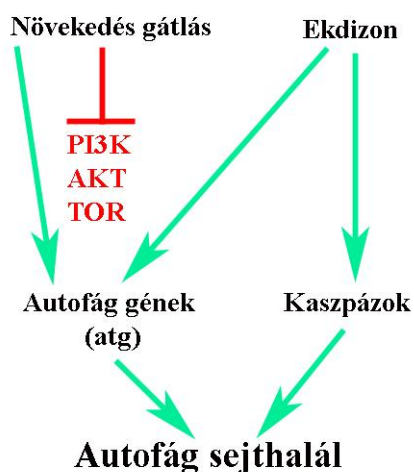
Látható, hogy magának az autofágiának igen sokrétű szabályozási módja alakult ki az evolúció során, amely nagymértékben konzerválódott: ezt mutatja az a megfigyelés, mely szerint

a fentiekben leírtakhoz nagyon hasonló módokon zajlik e sejten belüli degradációs folyamat a különféle eukarióta szervezetekben [6], [7] .

1.3 A pusztuló nyálmirigyben zajló folyamatok

A *Drosophila* lárvális nyálmirigyek ideális in vivo modellrendszerei a fejlődés során bekövetkező programozott sejthalál vizsgálatának. Ezen sejtek pusztulását a vedlési hormon, a *20-hydroxy-ecdysone* szintjének ugrásszerű emelkedése indukálja a bábképződés után mintegy 10-12 órával. A vad típusú fehérbábok nyálmirigyében azonban már intenzív autofágia zajlik, tehát a sejtpusztulás kezdetét megelőzően már aktív a folyamat. Ezt demonstrálja az **6. ábra A**-val jelölt felvétele is. Normál esetben a nyálmirigyek gyorsan, a fehérbábok kialakulása után (After Puparium Formation-APF) mintegy 17-19 órával teljesen lebomlanak. Magának az autofágiának egyik legfőbb morfológiai jellemzője, hogy a sejt saját citoplazmatikus komponenseinek emésztése zajlik, amelyre a citoplazmában található jelentős mennyiségű autofagoszóma jelenléte utal, a nyálmirigysejtek pedig önállóan bomlanak le fagocitáló sejtek segítségével [2], [4], [8]. Az in vivo fejlődés során bekövetkező autofág sejthalál szabályozásában jelentős szerepe van a gátolt növekedésnek és az *atg* géneknek (**3. ábra**) [2]. A legújabb adatok szerint az apoptotikus sejthalálhoz hasonlóan, ezen pusztulási folyamatot a nyálmirigyben még a szteroidok által kontrollált kaszpázaktiváció is

Autofág sejthalál



3. ábra. Autofág sejthalálban részt vevő folyamatok [1]

szabályozza, melynek során a sejtek morfológiai változásokat mutatnak [4]. A nyálmirigysejtek 12 órával az APF után még szögletesek, ép plazmamembránnal rendelkeznek, nagy eozinofil vakuólumokat, valamint sávozott politén kromoszómákat tartalmaznak [8]. Egy órával később a sejtek lekerekednek, a nagy eosinofil vakuólumok fragmentálódnak és a plazmamembránhoz asszociálódnak. A 14 órás nyálmirigyek autofág vakuólumai számos citoplazmatikus komponenst tartalmaznak [8]. 14,5 óra után a plazmamembránok intaktsága megszűnik, a sejtekben kevés vakuólum van már csak jelen, a kromoszómák pedig már nem sávozottak. A nyálmirigyek mintegy 17 órával az APF után pusztulnak el [8]. E szerv sejtjeinek degradációját a filamentózus aktinok, α -tubulin, α -spektrin, és a nukleáris lamin

menyiségének és lokalizációjának megváltozása előzi meg, amely egybeesik az aktív kaszpáz-3 aktivitásával [4]. A szteroid gének közül a *bFTZ-F1*, *E93*, *BR-C* és *E74-A* játszanak fontos szerepet a nyálmirigyek degradációjában, a kaszpázok szintjének meghatározásában, valamint az aktin, α -tubulin, α -spektrin és a nukleáris laminok szintjének és lokalizációjának megváltozásában [4]. A proteázok a struktúrális fehérjéket hasítják, tehát a proteolízis, valamint az ebből adódó citoskeletonot érintő változások részt vesznek a nyálmirigyek autofág sejthalála során bekövetkező változások szabályozásában [8]. Az autofágiával pusztuló nyálmirigysejtekben az aktin váz fennmarad, amely szerepet játszik a fehérjék, membránok, vakuólumok sejten belüli lokalizációjának változtatásában. Ezen intracelluláris folyamatok játszanak fontos szerepet az autofágiában, mivel a membránba csomagolt citoplazmarészek (autofagoszómák) így szállítódnak, és egyesülnek a lizoszómákkal [8]. Látható, hogy a nyálmirigyek a fejlődés során dinamikus változásokon mennek keresztül. A sejtek alakjának megváltozásában a szerkezeti fehérjék módosítása, lokalizációjuk és szintjük erőteljes megváltozása zajlik, mindehhez pedig jelentős mértékben járul hozzá az aktivált kaszpázok sejten belüli működése. [8].

A legtöbb *Drosophila atg* és *kaspáz* gén időben koordináltan indukálja a nyálmirigysejtek halálát [2]. A *Drosophila* pusztuló lárvális nyálmirigyben azonban az autofágia mellett az apoptózis is aktív szerepet vállal azok eliminációjában. Kimutathatóak bennük annak markerei: a DNS fragmentáció, továbbá a *proapoptotikus* gének RNS-einek megemelkedett szintje. Mindemellett azonban ezekben a sejtekben jelentős számú autofagoszóma is megfigyelhető a citoplazmában, valamint megemelkedik bennük az *atg* gének mRNS-einek szintje is [5]. Fontos megemlítenünk, hogy e folyamatok aránya szövetenként jelentős eltéréseket mutathat: a megfigyelések szerint a *Drosophila* lárvális középbelének eliminációja gátlódik, ha az *atg1*, *atg2* és *atg18*-as gének hibásak, vagyis abban szinte csak az autofágia vesz részt [9]. Ezzel ellentétben a nyálmirigy hatékony degradációjához egyaránt szükséges a programozott sejtpusztulás, a kaszpázaktivitás és az autofágia együttműködése [2]. A kísérleti adatok arra utalnak, hogy az autofágia és a kaszpázok funkciói párhuzamos genetikai útvonalban nyilvánulnak meg [5].

Összességében elmondható, hogy az autofágia jelentős a sejtek homeosztázisának fenntartásában, elősegíti a sejthalált, szerepe függ az érintett szövet típusától, valamint a környezeti tényezőktől, a sejtek egymásra hatásától, továbbá az érintett szövet adott fejlődési állapotától [5]. E folyamat önmagában nem okozza a nyálmirigysejtek pusztulását, mivel a vizsgált sejtekben indukált autofágia során nem következett be a szövet szétesése. Az autofágia az apoptózissal upstream módon vagy párhuzamosan hathat a sejthalál során [10].

2 Célkitűzések

A *Drosophila* lárvális nyálmirigyének pusztulása a fejlődés során programozott sejthalállal valósul meg, amelyben az apoptózis mellett az autofágiának is jelentős szerepe van [4], [8]. A morfológiai megfigyelések szerint e sejtek eliminációjuk során nagy mennyiségű autofág vakuólumot halmoznak fel, továbbá a sejtek alakjának erőteljes megváltozása figyelhető meg a struktúrális fehérjék átrendeződése révén, melyek az aktív kaszpázok segítségével hasítódnak el, ezáltal sejten belüli lokalizációjuk megváltozik. Tehát az autofág sejthalál folyamán apoptózishoz hasonló jelenségek is zajlanak, mint például a kaszpázaktiváció [4]. Ennek következtében a nyálmirigyek pusztulása a fehérbábképződés után mintegy 17 órával válik teljessé [2], [8]. Mindezen adatok figyelembevételével olyan mutáns egyedek létrehozását tűztem ki célul, melyekben az autofágia folyamata különböző pontokon gátolva van, valamint bennük e sejtpusztulás nyálmirigyspecifikusan detektálható és könnyedén nyomonkövethető. Ezáltal kezddhetem el a mutáns egyedekben a bábképződés kezdetétől mérni azt az időtartamot, amely szükséges a nyálmirigyek pusztulásához a vad típusú egyedekhez képest.

Továbbá célul tűztem ki a korai kaszpázaktivitás kimutatását egy fúzionált fluoreszcens konstrukció, az apoliner segítségével olyan pusztuló nyálmirigysejtekben, ahol még egyéb apoptotikus jellemzők nem mutathatóak ki: a sejtek épek, blebképződés pedig nincs, ezekben a szövetekben a degradáció korai fázisában csupán intenzív autofágia zajlik. Megfigyeléseim által pedig igazolni szeretném, hogy az autofágia valóban jelentős mértékben, az apoptózissal szorosan együttműködve járul hozzá a nyálmirigysejtek pusztulásához, mely e folyamat hiányában lassabban, időben eltolódva következik csak be.

3 Anyagok és módszerek

A megfigyelésekhez speciális genetikai konstrukciókkal rendelkező ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) törzseket használtam fel, melyeket termosztátban 25°C-on és 44%-os állandó páratartalom mellett tartottam. Ezeket gondosan, heti két-három alkalommal friss táptalajra ráztam át. Az állandó hőmérséklet és páratartalom biztosítása azért volt olyan fontos, mivel általánosan azt tapasztaltam, hogy bizonyos hőmérsékleti ingadozások következtében az egyes lárvális szervek, a hőmérséklettől függően hosszabb - rövidebb idő alatt bomlottak le. A felhasznált törzsek stabilak, rekombinálódni nem tudnak, mert balanszer kromoszómákkal vannak fenntartva bennük az értékes mutációk. A balanszerek mindegyike több inverziót tartalmaz, így akadályozzák meg a homológ kromoszómák párba állását az első meiotikus osztódás profázisában, így nem következhetnek be a crossing-overek. Emiatt a balanszer kromoszómán kívül a párja is változatlan formában kerül az utódgenerációba, amely a marker mutációval megjelölt, értékes mutációt hordozó kromoszóma. Ezek úgy vannak megjelölve, hogy fenotípushoz kötötten genotípust tudunk vizsgálni. A felhasznált törzsek egyike (amelyet kontrollként használtam) a *ptc GAL4, UAS mCH Atg8* jelű, amelyben a GAL4/UAS rendszer segítségével egy nyálmirigy-specifikus promóterhez kötve elhelyezkedő, majd expresszáldó GAL4 fehérje csak és kizárólag a nyálmirigyben hajtotta meg az Atg8-al fuzionáltatott mCherry riporterfehérjét. A GAL4/UAS rendszer élesztőből származó GAL4 és UAS génekből létrehozott konstrukció, amely segítségével bármely gén a muslica bármely szövetében expresszáltatható. A vezető (driver) transzgénben a muslica valamely szövetspecifikusan expresszáldó génjének szabályozó szekvenciáját az élesztő GAL4 génjével kombinálják. A GAL4 fehérje pedig az élesztő UAS (upstream-activating sequence) szekvenciához kötődve bekapcsolja azt a meghajtott gént, amelynek expressziója az UAS-szekvencia szabályozása alatt áll. A *ptc*-GAL4 driver a nyálmirigysejtekben biztosítja az UAS-hez kapcsolt génnek (*mCh-Atg8*) expresszióját. Az mCherry egy GFP módosulat, amely adott hullámhosszú fénnel gerjesztve piros fényt emittál, és jól bírja a savas környezetet. Ez tehát az autofágia specifikus fehérjével, az Atg8-al fuzionáltatott markerfehérje, amely csak a nyálmirigyben expresszáldott: fluoreszcens mikroszkópban a megfelelő hullámhosszú fénnel gerjesztve pirosan világított, a sejtekben pedig a fagofórok, autofagoszómák, illetve autolizoszómák (amelyek külső és belső membránjához horgonyzódva helyezkedik el az Atg8) piros pöttyként, elszórtan jelentek meg, ezáltal a benne zajló autofágia könnyedén detektálható volt. Ezek mennyiségéből pedig következtetni lehet az

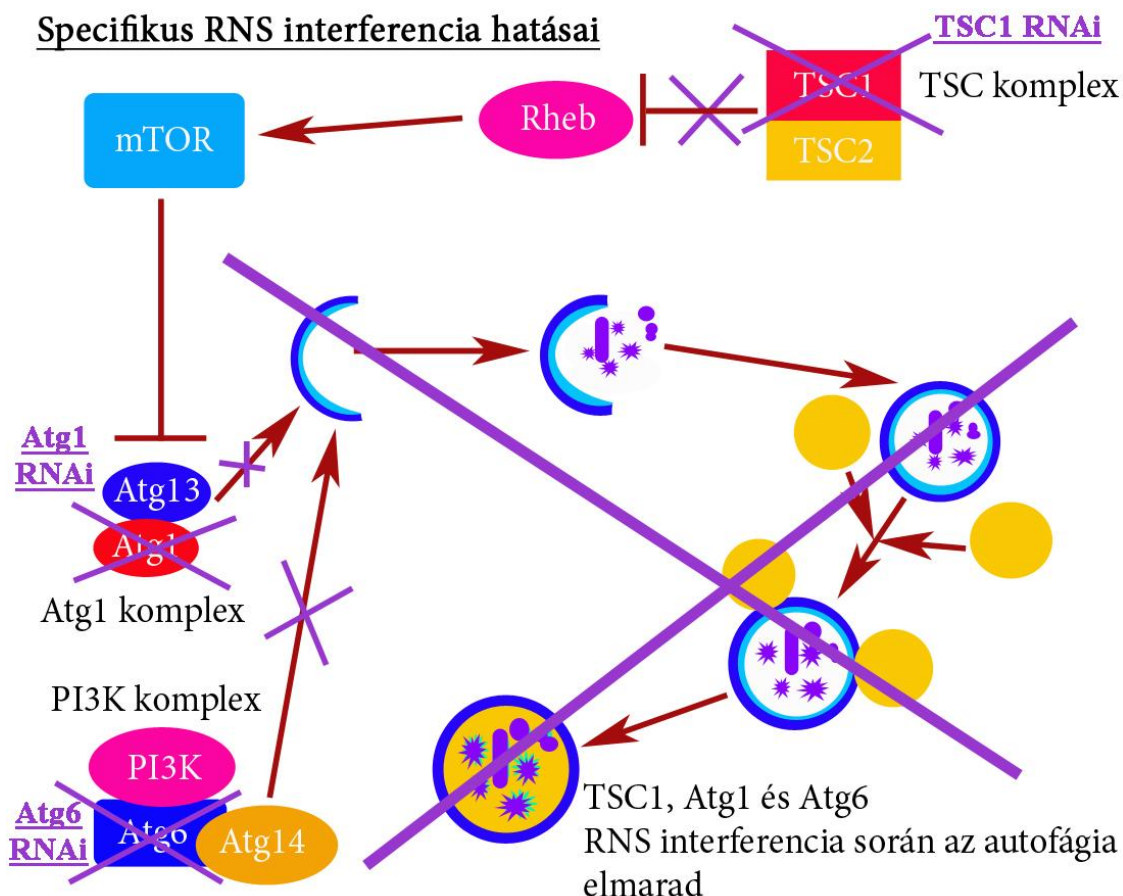
adott szövetben zajló autofágia intenzitására. A továbbiakban az autofágia egyes pontjaiban hibás törzsek egyedeivel foglalkoztam, melyekből a folyamatban szereplő fontosabb fehérjéket (adott törzsből egyet-egyét) RNS interferencia segítségével ültettek ki. Ezek az *Atg1 RNAi*, *Atg6 RNAi*, *TSC1/R1 RNAi* és *TSC1/R2 RNAi* voltak. Ahhoz, hogy nyálmirigy specifikusan vizsgálható, autofágia mutáns egyedeink legyenek, össze kellett kereszteznem a kontrollként használt és az autofágia deficiens törzseink megfelelő egyedeit. Ezért a *ptc GAL4, UAS mCH Atg8* törzsből szüzeket gyűjtöttem, melyeket az *Atg1 RNAi*, *Atg6 RNAi*, *TSC1/R1 RNAi* és *TSC1/R2 RNAi* törzsek hímjeivel kereszteztem össze külön csőbe, 5:3 arányban (öt nőtényhez három hím adva).

3.1 A keresztezések

1. <i>TSC1/R1 RNAi</i> ♂	X	<i>ptc GAL4, UAS mCh Atg8</i> ♀
2. <i>TSC1/R2 RNAi</i> ♂	X	<i>ptc GAL4, UAS mCh Atg8</i> ♀
3. <i>Atg1 RNAi</i> ♂	X	<i>ptc GAL4, UAS mCh Atg8</i> ♀
4. <i>Atg6 RNAi</i> ♂	X	<i>ptc GAL4, UAS mCh Atg8</i> ♀

3.2 Az autofágia különféle útvonalaiban hibás törzsek

A keresztezés során nyert többszörös mutáns egyedekben az autofágia útvonalának különböző pontjai hiányoztak, amely sejtjeikben a folyamat intenzitáscsökkenését eredményezte. A TSC1 RNS interferencia során, mivel hiányzott a rendszerből a TSC1, az nem alkotott komplexet TSC2-vel, ezáltal aktív maradt a Rheb fehérje, amely aktiválta a TOR kinázt, így az autofágia folyamata gátolva maradt (**4. ábra**). *Atg1* RNS interferencia esetén a hiányzó *Atg1* miatt nem tudott kialakulni a fagofór kialakulásához szükséges iniciáló komplex, így szintén autofágia hiányos állapot lépett fel (**4. ábra**). Mivel az *Atg6* az izolálómembrán növekedésében játszik kulcsfontosságú szerepet, így az *Atg6* RNS interferencia szintén autofágiát gátló mechanizmust hozott létre. Ezekben az egyedekben az autofágia folyamata csak minimálisan és nem tökéletesen elcsendesítetten zajlott, mert egyéb jelátviteli útvonalak segítségével számos ponton indukálható autofágia, így a vad típushoz képest minimális intenzitással működött.



4.ábra. Az RNS interferenciával kezelt törzsekben zajló folyamatok áttekintése

A továbbiakban az F1 nemzedékből mintákat vettem, melyekből nyálmirigy élethosszvizsgálatot végeztem az alábbi módon: meg kellett állapítanom egy viszonyítási pontot. Ez volt a fehérbáb, amely az utolsó lárvastádium vége és a bábstádium eleje közti időszak. Innen számoltam a bábok korát. A fehérbáb állapot során az állat már nem mozog, spirákulumait növeszti, ugyanakkor áttetsző, mert köztakarója még nem kezdte meg a szklerotizációt. A mérés napjától számított vizsgálati időponthoz igazítottam ezeknek az állatoknak a keresését: vagyis adott időpontban megjelölt egyed a másnapi vizsgálat során x órás lesz. Például, ha a másnapi vizsgálat időpontja 13:00 volt, akkor ahhoz, hogy akkorra 15 órás bábjaim legyenek, a megfelelő állatokat (fehérbábokat) este 22:00-kor kellett megkeresnem, majd megjelölnöm, az adott időponthoz rendelt színű filctollal. Kezdetben fejlődési sort készítettem, vagyis a fehérbáb állapot kialakulása után 8 órával vettem az első, majd innen 2-2 óránként a többi mintát, egészen 24 órás állatokig. Ezzel a sorozattal és az irodalmi adatokat figyelembe véve sikerült eltalálnom a vad típusban azt az időpontot, amikor már nincs meg a bábokban a nyálmirigy. Mindezek után az esetek többségében megvártam, míg az állatok legalább 15 órásk lesznek, így a vizsgálati időpontban minden kiválasztott

minta, illetve a bennük található nyálmirigyek kora ismertté vált. Ezáltal 15, 17, 19, 21 és 23 órás bábjaik lettek. (Egy-egy időpont néhol hiányzik, mert az adott időben nem álltak rendelkezésre jelölhető fehérbábok). Ezeket felhasználva, fluoreszcens mikroszkóp nagy látóterű objektívjével (2,5x) kimutatható volt boncolás nélkül, hogy az adott korú bábok tartalmazznak e még nyálmirigyeket vagy sem. Azt az időpontot kerestem, amikor már nincs meg a megfelelő jel a bábokban, utalva ezáltal a nyálmirigyek degradációjára. E szervek a gerjesztés hatására, a speciális GAL4/UAS konstrukciónak köszönhetően piros fényt emittáltak. A fehérbábok boncolásából nyert nyálmirigyekben, mintegy ellenőrizve az RNS interferencia hatékonyságát, megnéztem, milyen intenzitású az adott időpontban az autofágia e sejtekben (**6. ábra**). A nyálmirigyek kinyerését két darab hegyes végű csipesz segítségével végeztem, így könnyedén voltak kiboncolhatók a harmadik stádiumú vándorló lárvák és fehérbábok esetében, azonban az idősebb bábokból nem sikerült a kinyerésük. Egy degenerálódó szövet már a legkisebb behatás során is szétesik, így vizsgálhatatlanná válik. A kiboncolt nyálmirigyek fluoreszcens szövettani vizsgálatához 20 µl DAPI sejtmagfestéket használtam fel mintánként, amely 50%-os gliceriben van feloldva. Abban 5-10 percig azokat állni hagytam, majd ebben fedtem le a szerveket. A kinyert nyálmirigyeket fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltam, és fotókkal dokumentáltam.

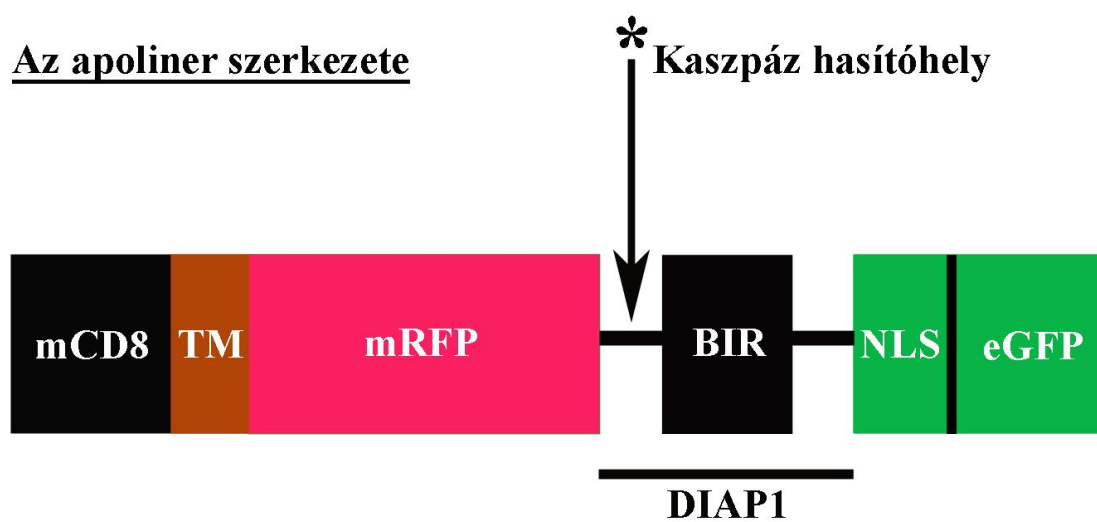
3.3 A korai kaszpázaktivitás kimutatása apoliner segítségével

A korai kaszpázaktiváció már az apoptózis egyéb markerei előtt megfelelő módszerekkel detektálható. Ezek egyike az apoliner, amely egy rendkívül hatékony, új és közvetett módszerként szolgál az aktivált kaszpázok jelenlétének kimutatására. A konstrukció tehát egy általános markere a kaszpázaktivitásnak, amely segít megérteni azok szerepét és szabályozódását a fejlődési folyamatok során [11]. Az apoliner fuzionáltatott fehérjekonstrukciót az N-terminustól a C-terminusig számos összetevő alkotja: tartalmaz egy transzmembrán domént hordozó mCD8-at, amely egérből származik (ezen régió felelős a membránban való lokalizációért), továbbá mRFP-t, amely megfelelő hullámhosszú fénnel gerjesztve piros színű fényt emittáló fluoreszcens fehérje. A fúziós konstrukció további komponense a DIAP1-ből származó kaszpázérzékeny hasítóhely (a BIR domén) és az NLS szignállal rendelkező eGFP, amely gerjesztve zöld fényt emittáló fluoreszcens fehérje (**5. ábra**) [11]. Az apoliner tehát két fuzionáltatott fluoreszcens fehérjét foglal magában, melyeket olyan régió köt össze, amely különösen érzékennyé teszi a kaszpázaktivításra. Azok működése során a konstrukció megfelelő részei elválnak egymástól, amelyek irányító

szignáljaik segítségével specifikusan sejten belüli kompartmentekbe helyeződnek. Ezen áthelyeződés utal a kaszpázaktivitásra a megfelelő szövetekben. Az élő sejtekben a két fluoreszcens fehérje együtt szintetizálódik, majd a membránokban lokalizálódik, így együttesen megvilágítva őket piros és zöld színű fényt emittálnak, amely együtt sárga színt eredményez. A szekréciósan aktív sejtekben, például a nyálmirigysejtek citoplazmatikus szekréciós vakuólumaiban is nagy mennyiségben halmozódik fel (**10. ábra** A és B felvétele, lila nyilak), továbbá a nyálmirigy lumenében is kimutatható az apoliner tartalmú szekrétum, amely kirajzolja a mirigyvégkamrát (**11. ábra** A, B és C felvétele). Azonban ha a sejten aktív kaszpázok vannak jelen, az apoliner azok általi hasítódása az mRFP és az eGFP közti BIR domén mRFP felőli oldalán történik (**5. ábra**), ennek következtében a két fluoreszcens fehérje elválik egymástól, és lokalizációs szignáljaiknak megfelelően adott kompartmentekben helyezkednek el: az mRFP TM doménje segítségével a plazmamembránban marad, míg az eGFP a hasítódás következtében felszabaduló NLS szignáljával a sejtmagba transzlokálódik, és ott halmozódik fel. A **9. ábra** F ábrája a hasítódást ábrázolja, míg a **10. ábra** C felvétele a fluoreszcens fehérjék megfelelő kompartmentbe helyeződését mutatja. A DIAP1-ből származó kaszpázérzékeny fragment hatékonyan hasítódik, mert BIR1 domént tartalmaz, amely elősegíti a kaszpázok általi felismerését, vagyis a megfelelő helyre csalogatja az aszpartát specifikus ciszteinil proteinázokat [11]. Az apoliner a korai kaszpázaktivitás markere, nem igényel kifinomult képalkotó eljárást, mivel általánosan használt fluoreszcens fehérjékből épül fel, továbbá kihasználja a lokalizációs szignálok sejten belüli kompartmentbe jutásának mechanizmusait. Ezen konstrukció mint aktív kaszpáz érzékelő, specifikus jelölést biztosít, azonban nem zavarja a normál fejlődés során zajló folyamatokat: sem az autofágiát, sem az apoptózist. Az apoliner a korai kaszpázaktivitást mutatja ki, nem feltétlen az apoptózis markere.

Az apoliner fluoreszcens konstrukciót expresszáló törzs (*Apo;rGo/TM6*) felhasználásával az L2 és L3 stádiumú lárvák, továbbá fehérbábok és 13 órás báb nyálmirigyét vizsgáltam meg. A szerveket hegyes végű csipeszek segítségével nyertem ki, azonban az L2 - L3 lárvák és fehérbábok esetében 20 µl DAPI sejtmagfestékben végeztem a boncolást, amely 50%-os glicerinen van feloldva. A 13 órás báb nyálmirigyét ezzel szemben 20 µl, 4%-os formalinban nyertem ki a szervek enyhe fixálása céljából, mivel az ilyen idős állatokban már a lárvális szövetek nagy részének intaktsága jelentősen lecsökken. A boncolás után mosás céljából 1-2 percre vízbe helyeztem a szerveket, majd áttettem őket DAPI-glicerin oldatba, ahol (ahogy a többi esetben is) 5-10 percig állni hagytam azokat, majd lefedtem a

szerveket. A kinyert nyálmirigyeket fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltam, és megfigyeléseimet fotókkal dokumentáltam.

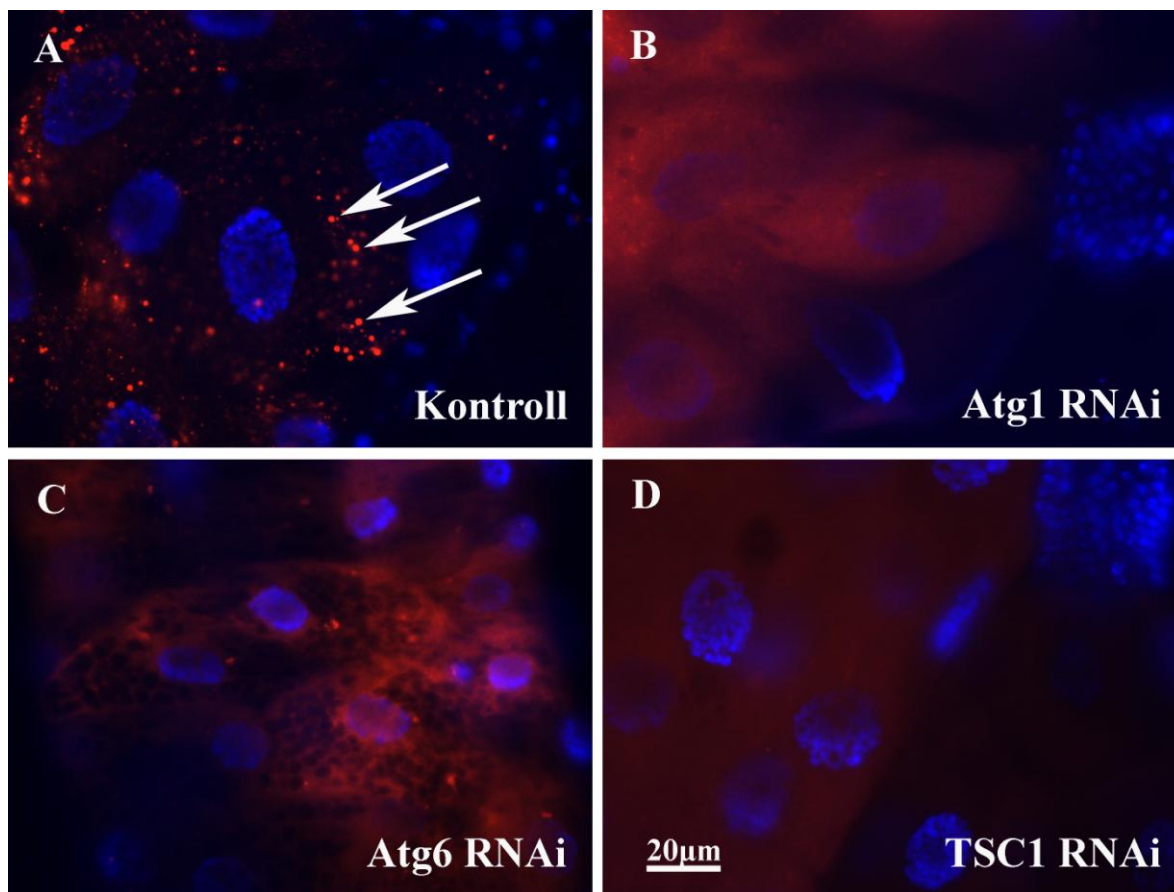


5.ábra. Az apoliner fúziós fluoreszcens konstrukció vázlatos felépítése (módosítva a [11] forrás ábrája alapján)

4 Eredmények és megvitatásuk

4.1 A nyálmirigyek élethosszának változása autofágia hiányában

Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) lárvális nyálmirigyei programozottan pusztulnak el a posztembrionális fejlődés során. Mint láttuk, e szervek degradációjában az apoptózis mellett jelentős szerepet kap az autofágia folyamata is. Munkám során utóbbi szerepével foglalkoztam a sejtpusztulásban, melyet ecetmuslica lárvális nyálmirigyén vizsgáltam. Megfigyeléseimet olyan törzsek egyedein végeztem el, amelyekben szövetspecifikusan az Atg8-al fuzionáltatott markerfehérje, mCherry volt expresszáltatva, a GAL4/UAS rendszer segítségével, így az csak a nyálmirigyben fejeződött ki. Továbbá az ilyen állatokban zajló autofágia egy-egy kulcsgénje RNS interferenciával volt csendesítve. Ezt a konstrukciót megfelelő keresztezésekkel hoztam létre. Ezáltal közvetlenül nyomon lehetett követni, mi is történik a nyálmirigyekkel az autofágia kiiktatását követően: módosul-e a szervek élettartama? A megfigyelések első lépéseként tesztelnem kellett, valóban működnek-e az általam, keresztezéssel létrehozott konstrukciók. Ezt az egyes törzsek fehérbájbaiból nyert nyálmirigyek szövettani vizsgálata alapján derítettem ki. Két alapvető funkciót kellett ellenőriznem: szövetspecifikusan expresszálódik-e bennük az Atg8-al fuzionáltatott mCherry, tehát világítanak-e a nyálmirigyek, illetve az adott törzsekben működik-e az RNS interferencia? A szöveteket fluoreszcens mikroszkópban vizsgálva azt tapasztaltam, hogy a konstrukció működőképes. Mind a kontroll *ptc GAL4, UAS mCH Atg8* törzs, mind pedig az ebből és az RNS interferenciás törzsekből létrehozott többszörösen mutáns törzsek egyedeiben szövetspecifikusan fejeződött ki az mCherry, tehát nyálmirigyük fluoreszcens fényben pirosan világított (**6. ábra**). (Az RNS interferenciás törzsekben azonban mintegy háttérként jelent meg csupán az mCherry a nyálmirigyekben). A továbbiakban a mikroszkópban 40x-es nagyítással vizsgáltam a nyálmirigysejteket, melyekben kimutatható volt, mely törzsek sejtjeiben nem látunk jelölt autofagoszómákat, vagyis melyekben működik az RNS interferencia. A vártaknak megfelelően, a vad típusú (kontroll) fehérbábokból nyert nyálmirigyek sejtjeiben számos jelölt autofagoszóma volt kimutatható, bennük tehát intenzív autofágia zajlott (**6. ábra**, A felvétele). Ezzel szemben mind az Atg1, Atg6 és TSC1 RNS interferenciával kezelt törzsek fehérbájainak nyálmirigysejtjeiben minimális jelölés volt tapasztalható, tehát az autofágia folyamata valóban gátolva volt (**6. ábra** B, C és D felvétele).

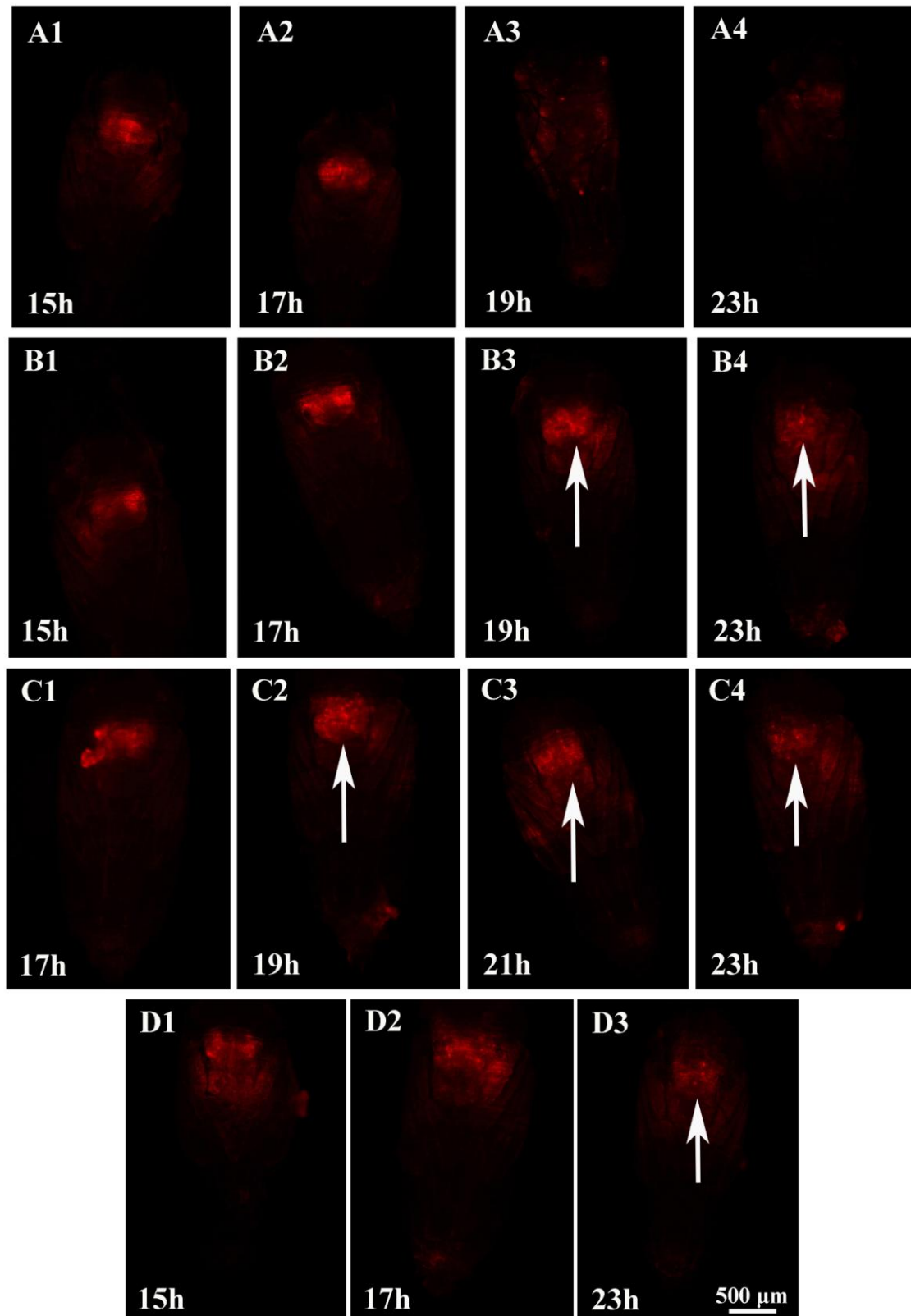


6. ábra. Fehérbábok nyálmirigysejtjeiben zajló autofágia: az A-val jelölt képen a kontroll, B-vel az Atg1, C-vel az Atg6, míg a D-vel jelölt felvételen a TSC1 RNS interferenciás állatok nyálmirigysejtjei láthatóak. (Az autofág struktúrák fehér nyilakkal jelölve, magyarázat a 19. oldalon)

A továbbiakban, a fent említett eredmények által lehetővé vált, hogy a működőképes konstrukciók felhasználásával vizsgáljam a nyálmirigyek élethosszának változását a kontroll törzshöz képest. A kapott kísérleti adatok azt mutatták, hogy a vad típusú egyedekben a nyálmirigy a fehérbáb kialakulását (APF) követő 17. órában még kimutatható volt, azonban a 19. órától kezdődően már nem. Tehát vad típusú egyedekben a nyálmirigyek teljes pusztulásának időpontja az APF után 17 és 19 óra közé esik (7. ábra, A-val jelölt legfelső sor: A1 az APF utáni 15 órás, az A2 17 órás, A3 19 órás, míg A4 a 23 órás állapotot mutatja vad típusú egyedek bábjaiban). Ezzel szemben az Atg1 RNS interferenciás egyedek (7. ábra, B-vel jelölt sora) bábjaiban mind a 15 (B1), 17 (B2), 19 (B3) és 23 (B4) órás bábokban mindvégig jelen volt a jelölés, mutatva ezáltal, hogy a nyálmirigy még nem degenerálódott. A 23. órában készült felvételen láthatóan a szerv már kezdi elveszíteni az intaktságát, de jelentős része még egyben van. Atg6 RNS interferenciás egyedek bábjaiban az előzőhöz hasonló eredmények voltak tapasztalhatóak (7. ábra, C-vel jelölt sora). Itt szintén 17 (C1), 19 (C2), 21 (C3) és 23 (C4) órás állatokban mindvégig megmaradt a nyálmirigy. Azonban ebben az

esetben is megfigyelhető a 23. órában tapasztalt intaktságcsökkenés. A *TSC1* RNS interferenciás törzs 15 (D1), 17 (D2) és 23 (D3) órás bábjaiban is jól kivehető a nyálmirigy. Az időbeli különbségek abból adódnak (B1 és C1, valamint a D1, D2 esetén is), hogy a vizsgálat adott idejében nem állt rendelkezésre az adott törzsből jelölhető fehérbáb. A kísérleti eredmények alapján elmondható, hogy a vad típusú, normál egyedek nyálmirigyei a bábképződés után mintegy 17 órával még kimutathatóak, 19 órával azonban már nem, tehát a szervek sikeresen degradálódtak. Az *Atg1*, *Atg6* és *TSC1* deficiens egyedekben azonban még 21-23 óra múltán is megfigyelhető volt a szerv.

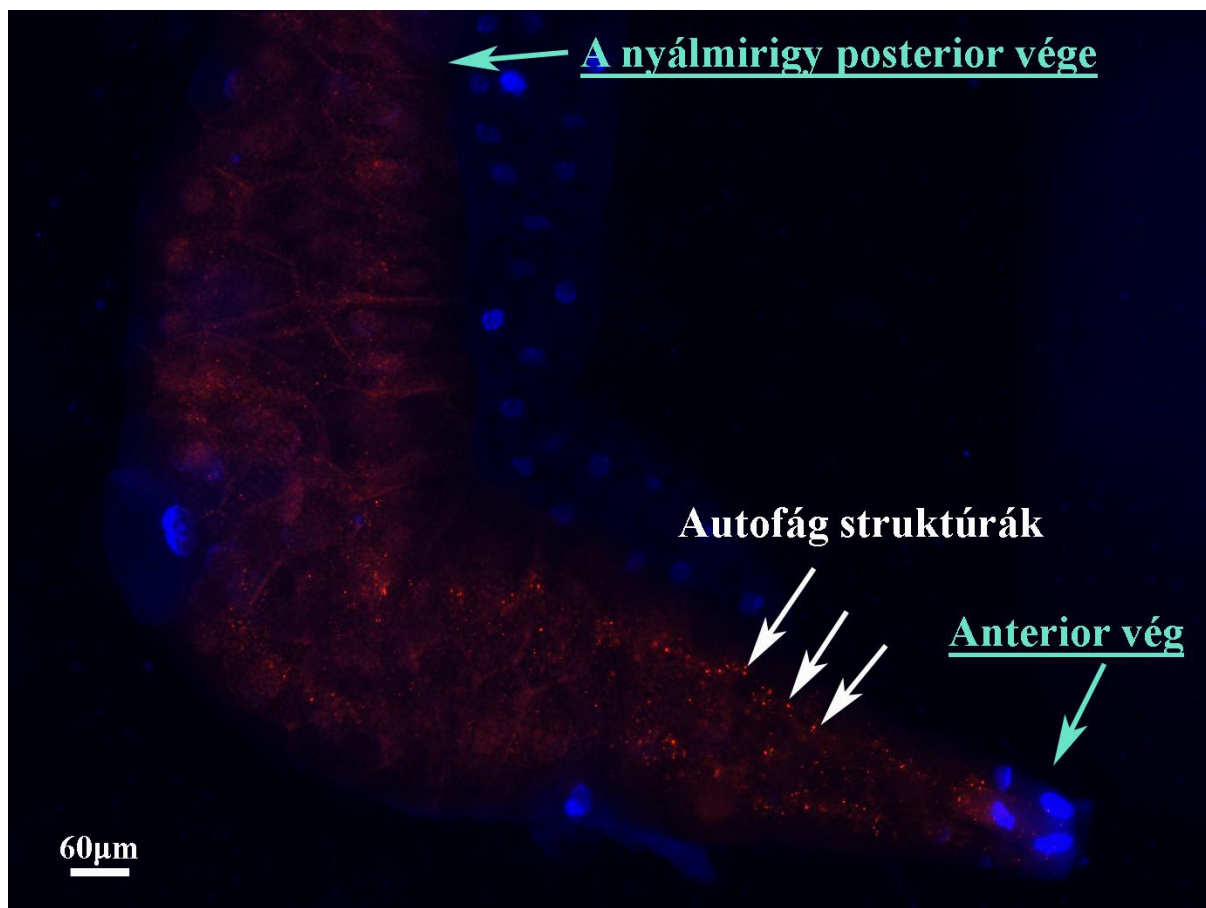
Látható, hogy az autofágia gének nyálmirigy-specifikus csendesítésével a folyamat bomlási intenzitása jelentősen lecsökkenthető (**6. ábra**), a mutáns állatok nyálmirigyélettartamának jelentős növekedése (**7. ábra**) azt mutatja, hogy az autofágia mindenképpen részt vesz e szerv sejtjeinek eliminációjában összehangoltan az apoptózissal. A vad típusú állatokhoz képest az autofágia különféle pontjaiban hibás egyedek nyálmirigyei mintegy 2-5 órával tovább voltak kimutathatóak fluoreszcens mikroszkópban, ami bizonyítja az autofágia szerepét és jelentőségét a lárvális nyálmirigyek eliminálásában a fejlődés során. Ez a folyamat kimutathatóan már vad típusú, harmadik lárvastádiumú állatok nyálmirigyében is zajlik, a fehérbábokéban pedig óriási mértékű intenzitásnövekedés tapasztalható (**6. ábra**).



7. ábra Kontroll és a megfelelő fehérjére RNS interferenciás bábok nyálmirigyeinek túlélési sorozata (A: kontroll, B: Atg1, C: Atg6, D: TSC1 RNAi tözsekből származó bábok, részletes magyarázat a szövegben a 20-21. oldalon)

Figyelembe véve, hogy a nyálmirigyek pusztulása az APF után mintegy 10-12 órával kezdődik csak el [2], azt mondhatjuk, hogy a vad típusú fehérbábok esetén tapasztalható autofágia intenzitásának növekedése (**6. ábra**) mintegy előkészítő folyamatként funkcionálhat a sejthalál beindításában, majd a továbbiakban fenntartott autofágia annak kiteljesedésében játszhat jelentős szerepet.

Fontos továbbá megjegyezni, hogy mindkét sejthalálforma esetén térben és időben pontosan meghatározott sejtpusztulási folyamatokról van szó. Az apoptózis és az autofágia hullámszerűen terjed sejtről-sejtre a nyálmirigy anterior feléről a posterior felé. Kísérletekkel kimutatták, hogy a kaszpázaktiváció iniciációja a nyálmirigy anterior felén kezdődik, majd sejtről-sejtre haladva terjed tovább a posterior vég felé, átjárva ezáltal az egész szervet [12]. A mikroszkópos fotózások során figyelmes lettem arra, hogy a vad típusú, harmadik lárvastádiumú állatokból származó nyálmirigyekben az autofágia intenzitását jelző autofagoszómák mennyisége és elhelyezkedése nem homogén, azok sajátos anatómiai elhelyezkedést mutattak: a szerv anterior részében nagy mennyiségű autofagoszóma felhalmozódás volt megfigyelhető (a **8. ábrán**, fehér nyilakkal jelölve). Ezen megfigyelés pedig egybevág a fentebb említett kutatási eredményekkel, mi szerint a kaszpázaktiváció is az anterior vég felől indul [12]. Ezek a megfigyelések pedig alátámasztják az apoptózis és autofágia szoros együttműködését a nyálmirigy sejtjeinek pusztulása során. Ezen megfigyelés azért is nagyon jelentős, mert a továbbiakban tervezett ultrastrukturális vizsgálatokhoz szükséges metszetek elkészítésénél adott korú nyálmirigy esetén ki kell jelölni azt a pontot, ahonnan mintákat veszünk, így kaphatunk csak a fentiek tükrében releváns eredményeket.

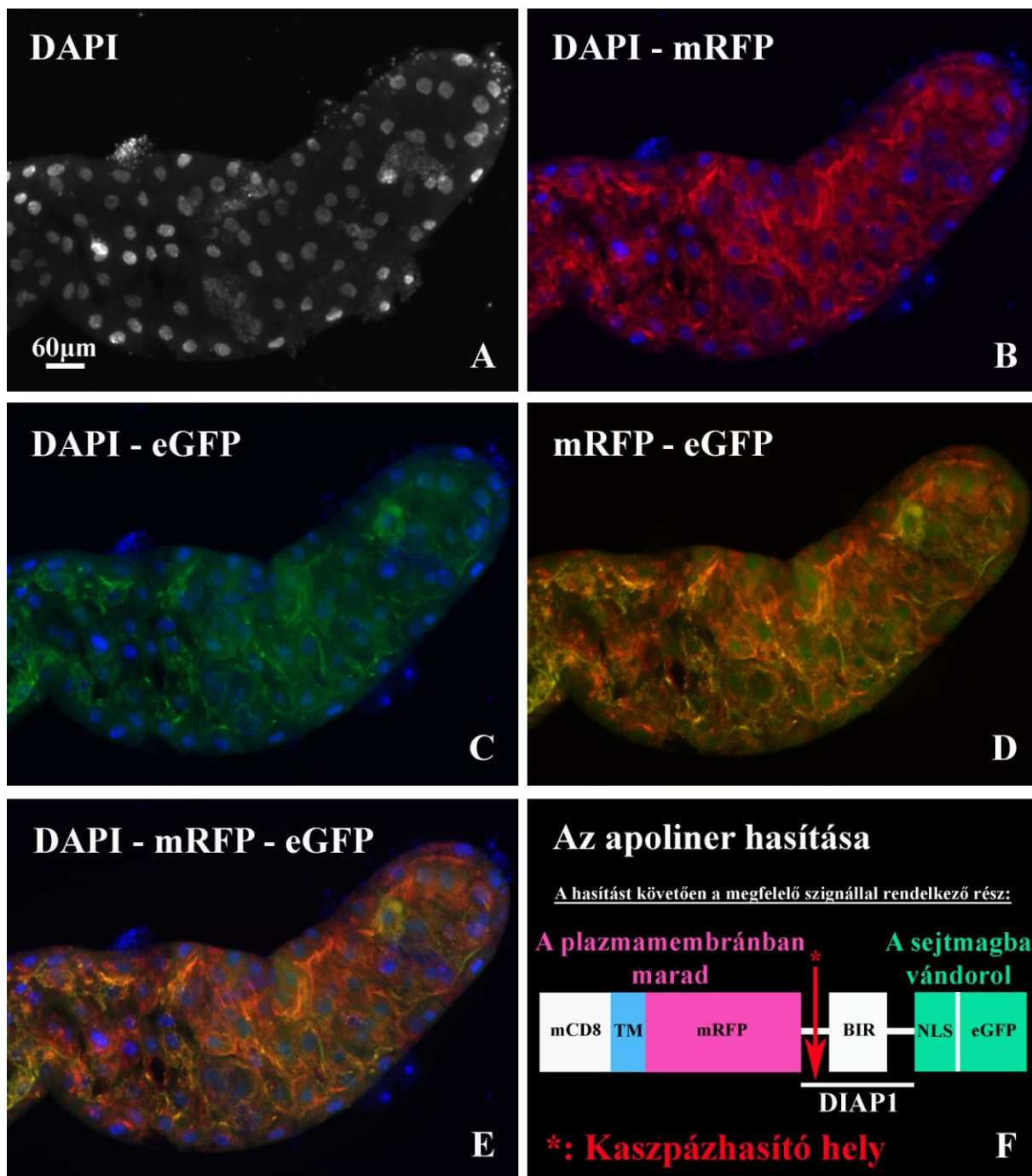


8. ábra. L3 stádiumú vándorló, kontroll állatból izolált nyálmirigyben zajló autofágia, mely fokozott intenzitást mutat a szerv anterior részén (az autofág struktúrákat fehér nyilak jelölik)

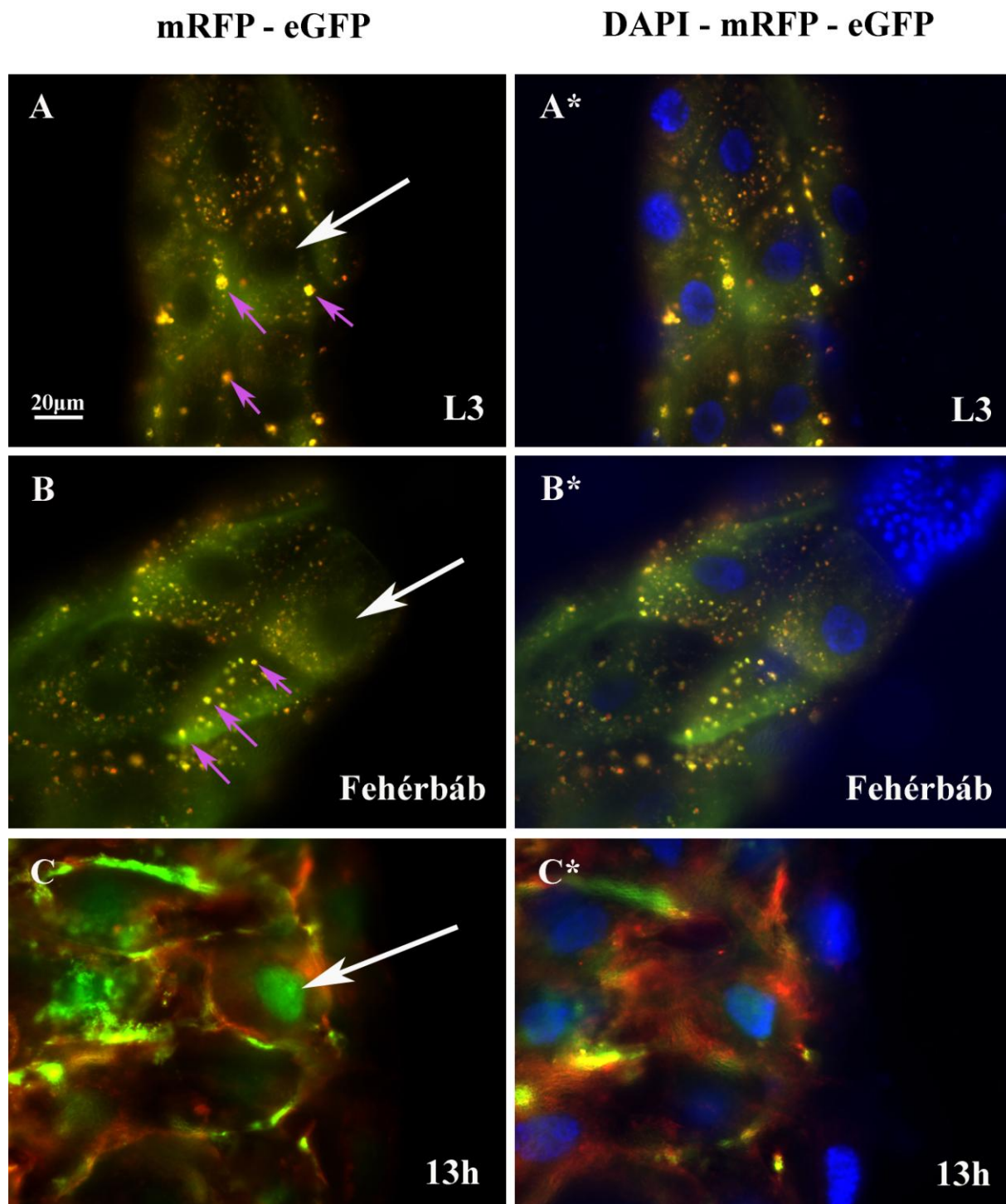
4.2 Aktív kaspázok jelenléte a pusztuló nyálmirigysejtekben

Az apoliner egy olyan fúzionáltatott fluoreszcens fehérjekonstrukció, amely specifikusan jelzi az aktív kaspázok jelenlétét az azt expresszáló állatok sejtjeiben. A rendszert két fluoreszcens fehérje, az mRFP és az eGFP alkotja, amelyek mindegyike speciális sejten belüli szignálokkal van ellátva: míg az mRFP transzmembrán domént, addig az eGFP NLS szignált tartalmaz. A két fehérjét BIR domén köti össze, amely a kaspázaktivitásra különösen érzékeny teszi ezen konstrukciót. A rendszer expressziója során a két fehérje összeköttetésben marad egymással, a szabad N terminális végen elhelyezkedő TM domén segítségével a membránokban lokalizálódnak. Együttesen megvilágítva őket a sárga színű fluoreszcens jelölődést (a piros és zöld emittált fények összességét) láthatjuk (**10. ábra** A és B, **11. ábra** A, B és C felvétele). Aktív kaspázok

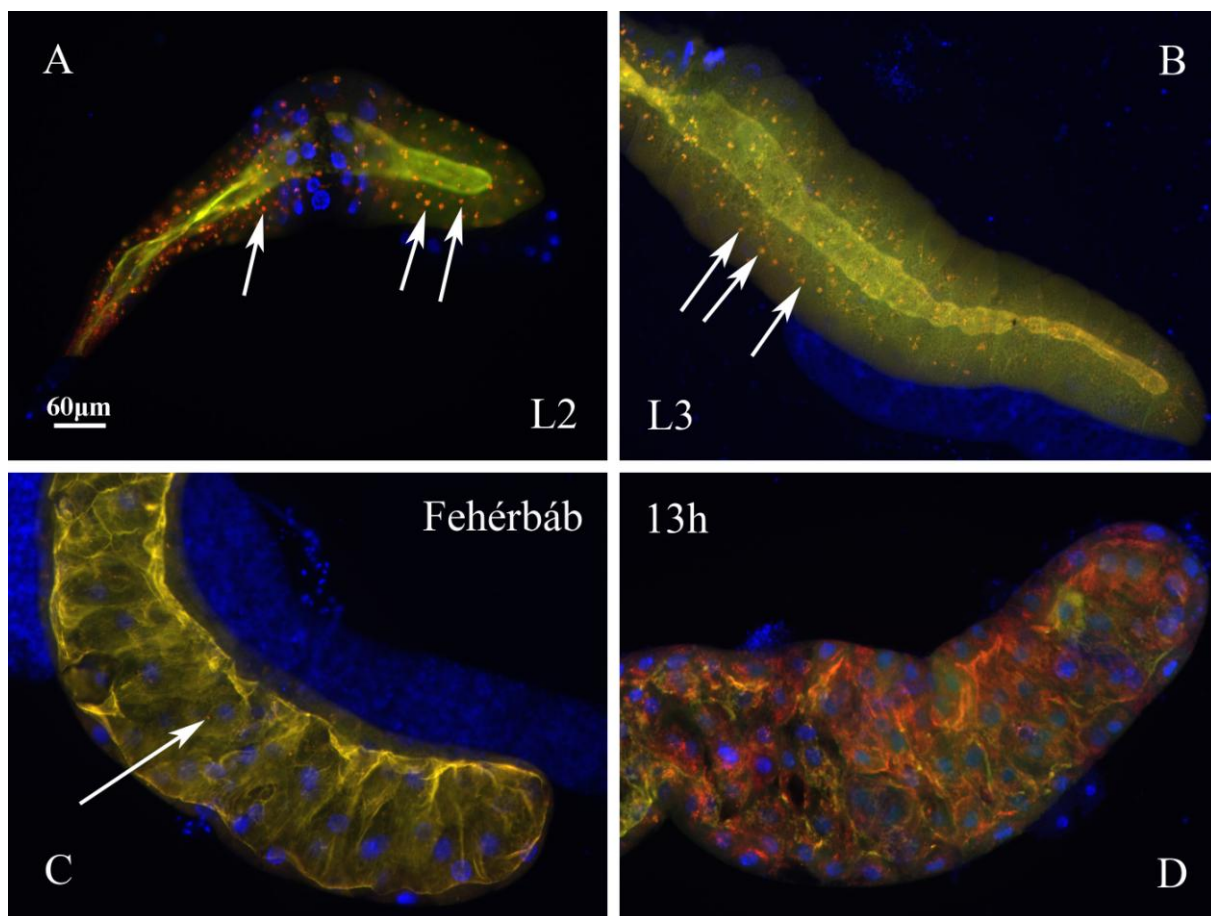
jelenlétében azonban a rendszer a BIR doménál hasítódik el, így az mRFP a TM doménje segítségével a membránban lokalizálva marad, míg az eGFP az NLS szignállal a sejtmagba transzlokálódik (**9. ábra D**, **10. ábra C** felvétele). A megfigyelésekhez speciális, apoliner expresszálo törzs (*Apo;rGo/TM6*) egyedeit használtam fel, amelyekben a fluoreszcens fehérjekomplex az agydúcban és a nyálmirigyben egyaránt expresszálódik. Kezdetben tesztelnem kellett, hogy kifejeződik-e a konstrukció az állatok nyálmirigyében. Ehhez L2 és L3 lárvastádiumú, továbbá fehérbábok szerveit vizsgáltam meg. A **11. ábra A** és **B** felvételén jól láthatóak az apoliner tartalmú szekréciós vakuolumok, továbbá az ürülés következtében az általa kirajzolt lumen. Ezekben a szövetekben a sejtmagok még üresek, az mRFP és eGFP tehát együtt lokalizálódik a citoplazmatikus szekréciós granulumokban és a plazmamembránban (**10. ábra**, **A** és **B** felvétele). Elmondható tehát, hogy az *Apo;rGo/TM6* törzs megfelelően expresszálja a konstrukciót. A továbbiakban kíváncsi voltam arra, hogy történik-e kaspázaktiváció a nyálmirigysejtek korai degradációja során, amikor az apoptózis morfológiai jellemzői még nem észlelhetők (a sejtmagok épek, blebképződés pedig nincs). Az irodalmi adatok alapján elmondható, hogy a nyálmirigy degradációja az APF után mintegy 10-12 óra elteltével indul csak meg [2]. Ehhez képest a korai kaspázaktiváció a degradálódó nyálmirigyekben időben kissé eltolódva, mintegy 12-14 óra múltán mutatható csak ki [4]. Az irodalmi adatokat figyelembe véve 13 órás állat nyálmirigyét vizsgáltam meg fluoreszcens mikroszkóppal. A fejlődés ezen fázisában a nyálmirigy sejteiben kaspázaktivitás volt kimutatható apoliner segítségével: a **9. ábrán** látható felvételek ugyanazon szervről készültek eltérő megvilágítási tartományokban, hogy azok egymással összevethetőek legyenek. Így láthatjuk a a nyálmirigy **DAPI**, **DAPI – mRFP**, **DAPI – eGFP**, **mRFP – eGFP** és **DAPI – mRFP – eGFP** tartományokban, melyekkel azt szeretném megmutatni, hogy a zölddel jelölődő struktúrák valóban sejtmagok. Látható tehát, hogy a 13 órás bábok nyálmirigyében apoliner pozitív sejtmagok és plazmamembránok vannak, vagyis ezzel a módszerrel, ebben a fejlődési állapotban bizonyíthatóvá vált az aktív kaspázok jelenléte a sejtekben (**9. ábra D** és **10. ábra C** felvétele). A korai kaspázaktiváció során megváltozik a sejtek alakja, amely a szerkezeti fehérjék lebomlásából, illetve azok áthelyeződéséből adódik (**10. ábra E** felvétele). Mindennek pedig az lesz a következménye, hogy a sejtek ellaposodnak, a szerv lumene pedig kitágul (**11. ábra D** felvétele). A fenti eredményekből világosan kivehető tehát, hogy az autofágia és az apoptózis folyamata közti kaspázaktiváció, mint átvezető folyamat zajlik le, amely előkészíti a szövetet a programozott sejtpusztulás kiteljesedése felé.



9.ábra. 13 órás muslicabáb nyálmirigyében zajló kaszpázaktivitás kimutatása apoliner fúziós fluoreszcens fehérje konstrukcióval (magyarázat a szövegben 25. oldalon)



10.ábra. Vándorló lárva (A-A*), fehérbáb (B-B*) és 13 órás muslicabáb (C-C*) nyálmirigyének összehasonlítása apoliner konstrukció használatával. Az A és B felvételen a sejtek magjai üresek (fehér nyilak), a citoplazmában azonban számos szekréciós vakuólum figyelhető meg (lila nyilak). Ezzel szemben a C felvételen apoliner pozitív sejtmag és membrán látható, a granulumok eltűntek a sejtek citoplazmájából. Az A*, B* és C* felvételeken a DAPI sejtmagjelölés is látható, így megmutatható, hogy az üres mezők, illetve a zöld elszíneződés valóban sejtmagi struktúrákat jelölnek



11.ábra. Az apoliner kifejeződése L2, L3 stádiumú lárvák, továbbá 0 (fehérbáb) és 13 órás bábok nyálmirigyében. Az idő előrehaladtával jól megfigyelhető a szekréciós granulumok méretének és mennyiségének a csökkenése, továbbá a sejtek alakjának változása és a lumen átmérőjének növekedése. A fehér nyilak a sejten belüli szekréciós granulumokat jelölik

Fontos megjegyezni továbbá, hogy a nyálmirigyek fejlődése során az apoliner segítségével nem csak a korai kaszpázaktivitás mutatható ki a megfelelő fejlődési állapotú szervekben, de megfigyelhető azok lumenátmérőjének növekedése, valamint a sejtekben található szekréciós granulumok méretének és mennyiségének csökkenése a degradáció előrehaladtával. A nyálmirigy sejtei L2 stádiumú lárvában igen intenzív szekréciót folytatnak, a citoplazma nagy mennyiségben tartalmaz apoliner pozitív szekréciós vakuólumokat (a **11. ábra** A felvételen fehér nyilakkal jelölve), továbbá jól megfigyelhető, hogy a szekrétum kirajzolja a lument is, amely még a nyálmirigyhez képest normál átmérővel rendelkezik. L3 lárvastádiumú nyálmirigyben még viszonylag normál lumen figyelhető meg, és továbbra is sok szekréciós vakuólumot tartalmaznak (**11. ábra** B felvétele). Tehát a nyálmirigy sejteinek működése az állatok életmódjával szoros összefüggésben áll, vagyis a táplálék pépesítéséhez és

előemésztéséhez szükséges nyál (*saliva*) szekrécióját intenzíven folytatják (ezzel együtt szekretálódik az apoliner is, amely így megjelenik a szekréciós vakuólumokban és a lumenben, ezáltal tehetők ezen struktúrák láthatóvá a szervben). Fehérbábok nyálmirigyében azonban a szekréciós vakuólumok száma látszólagosan lecsökken (valójában a méretcsökkenésük általi intenzitáscsökkenés miatt), a **10. ábra B** felvételén és a **11. ábra C** felvételén számos apró granulum figyelhető meg a fehérbábból származó nyálmirigysejtekben), számuk jelentősen nem, méretük azonban látványos csökkenést mutat. Megfigyelhető továbbá ezekben az apoliner által kirajzolt lumen átmérőjének növekedése is, amely összefüggésben állhat a sejtek alakjának megváltozásával. Fehérbábok esetében a jelentős mennyiségű szekréció (anyagvesztés) következtében alakulhat ki efféle struktúrális változás. Továbbá az L3 stádiumú állatokhoz képest a fehérbábok nyálmirigyének struktúrális és funkcionális változásai összefüggésben állhatnak a nyálmirigy működésének megváltozásával is, mivel L2 és korai L3 stádiumú állatok nyálmirigyében még a táplálék pépesítéséhez, előbontásához szükséges szekrétrum termelődik, azonban a fehérbábok nyálmirigye már a pupárium adott felülethez rögzítésében szerepet játszó ragasztóanyag előállítására és szekréciójára tér át. A megváltozott szekrétrum összetétele, szerkezete és mennyisége magyarázhatja a szekréciós granulumok méretcsökkenését, továbbá a szekréció intenzitásának csökkenését is az L3 lárvastádiumú egyedekben tapasztaltakhoz képest. A kitágult lumen pedig a sejtek alakjának, méretének megváltozását mutatja, amely tehát a nagy mennyiségű anyagleadás (szekréció) és a funkcióváltás következtében alakulhat ki.

A **11. ábra D** felvételén egy 13 órás báb nyálmirigye látható: sejtjeiben szekréciós granulumokat már nem lehet kimutatni, valamint a lumen sem rajzolódik ki egyértelműen, mindez pedig azt mutatja, hogy a szekréciós tevékenység jelentősen lecsökkent a szervben. Továbbá a korai kaszpázaktivitás is kimutatható már az apoliner segítségével a 13 órás nyálmirigyekben: a magok zöldek, a membránok pedig piros színűek. Ebben a fejlődési állapotban már jelentős a sejtek alakjának és méretének változása a korai kaszpázaktivitás következtében zajló sejten belüli struktúrális átrendeződések következtében.

Apoliner segítségével tehát nemcsak a korai kaszpázaktivitás vált kimutathatóvá a fejlődés ezen szakaszában, amely kapcsolatot biztosít az autofágia és apoptózis folyamata közt, de expressziója révén nyomonkövethetővé váltak a sejtek struktúrájának és funkciójának változásai is a fejlődés során. Az autofágia és apoptózis folyamatok tehát szorosan együttműködve, egymást segítve járulhatnak hozzá az *ecetmuslica* lárvális nyálmirigyének degradációjához.

5 Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom a dolgozatom megírása során nyújtott önzetlen segítségéért témavezetőmnek, Dr. Löw Péternek, az Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék vezetőjének, a laboratóriumban dolgozó Vágó Eszternek és Kováts Zsófiának gyakorlati segítségükért. Továbbá köszönöm Pircs Karolinának és Nagy Péternek a 2,5x-es objektívvel rendelkező Zeiss Axioimager mikroszkóp használatában, valamint a mikrofotózásban nyújtott segítségét (7. ábra). Köszönettel tartozom családomnak, barátaimnak, és mindenkinek akik támogattak, és megértéssel fogadták, hogy azt az időt, amit velük kellett volna töltenem, ezen dolgozat megírásának szenteltem.

6 Szerzői hozzájárulás

a, Új, az autofágiában deficiens RNS interferenciás és egyben specifikus GAL4/UAS rendszerrel rendelkező törzseket hoztam létre keresztezéssel, melyek által nyálmirigyspecifikusan vizsgálható volt az autofágia folyamata és intenzitása.

b, A fent említett törzsek használatával nyálmirigyélethosszvizsgálattal megállapítottam a szerv pusztulási időpontját vad típusú állatokban, ami 17 és 19 óra közé tehető, majd megnéztem, az autofágiában mutáns törzsek esetében hogyan módosul a nyálmirigyek élethossza (kitolódott a sejtpusztulás ideje).

c, Fúziós fluoreszcens konstrukciót (apolinert) expresszáló törzs segítségével sikerült korai kaspázaktivitást kimutatnom 13 órás báb nyálmirigyében.

d, Törzseket tartottam fennt, preparátumokat készítettem a kísérletek tervezéséhez és kivitelezéséhez.

e, Fotókkal dokumentáltam a kísérletek eredményeit (**6., 7., 8., 9., 10. és 11. ábra**)

7 Irodalom

1. Bergmann A: Autophagy and cell death: no longer at odds. *Cell* 2007, 131(6):1032-1034.
2. Berry DL, Baehrecke EH: Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*. *Cell* 2007, 131(6):1137-1148.
3. Demerec M (ed.): *Biology of Drosophila*, first edn. New York: John Wiley and Sons, Inc.; 1950.
4. Martin DN, Baehrecke EH: Caspases function in autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Development* 2004, 131(2):275-284.
5. Das G, Shrivage BV, Baehrecke EH: Regulation and function of autophagy during cell survival and cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012, 4(6).
6. Csikós G: Az autofágia folyamatának vizsgálata rovar modellszervezeteken. Budapest: Eötvös Loránd Tudományegyetem; 2012.
7. Kosta A, Roisin-Bouffay C, Luciani MF, Otto GP, Kessin RH, Golstein P: Autophagy gene disruption reveals a non-vacuolar cell death pathway in *Dictyostelium*. *J Biol Chem* 2004, 279(46):48404-48409.
8. Lee CY, Baehrecke EH: Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. *Development* 2001, 128(8):1443-1455.
9. Denton D, Shrivage B, Simin R, Baehrecke EH, Kumar S: Larval midgut destruction in *Drosophila*: not dependent on caspases but suppressed by the loss of autophagy. *Autophagy* 2010, 6(1):163-165.
10. Akdemir F, Farkas R, Chen P, Juhasz G, Medved'ova L, Sass M, Wang L, Wang X, Chittaranjan S, Gorski SM *et al*: Autophagy occurs upstream or parallel to the apoptosome during histolytic cell death. *Development* 2006, 133(8):1457-1465.
11. Bardet PL, Kolahgar G, Mynett A, Miguel-Aliaga I, Briscoe J, Meier P, Vincent JP: A fluorescent reporter of caspase activity for live imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105(37):13901-13905.
12. Takemoto K, Kuranaga E, Tonoki A, Nagai T, Miyawaki A, Miura M: Local initiation of caspase activation in *Drosophila* salivary gland programmed cell death in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104(33):13367-13372.