

Az autofágia és a programozott sejthalál kapcsolata az ecetmus- lica szemfejlődése során

OTDK dolgozat
XXXI. OTDK Biológia Szekció

készítette:
Szincsák Sára

Biológus Msc, 2. évfolyam

témavezetők:
Billes Viktor és Dr. Vellai Tibor
Genetikai Tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2013.

Tartalomjegyzék

1.	<i>Bevezető</i>	3
1.1	Az autofágia	3
1.2	Az autofágia és a szemfejlődés	5
1.3	Az apoptózis.....	7
2.	<i>Célkitűzések</i>	9
3.	<i>Anyagok és módszerek</i>	10
3.1	Törzsek fenntartása	10
3.2	Használt törzsek	10
3.3	Keresztezések.....	11
3.4	Alkalmazott módszerek	12
3.5	Acridine Orange (AO) festés	14
3.6	Immunhisztokémia.....	14
3.7	TUNEL-próba	15
4.	<i>Eredmények és megvitatásuk</i>	16
4.1	Előkísérletek	16
4.2	Az apoptózis mértékének változása <i>Atg14</i> és <i>Atg101</i> gének csendesítése során...	17
4.3	Az apoptózis mértékének változása <i>EDTP</i> deficiens hátterekben	19
4.4	Következtetések	23
5.	<i>Összefoglaló</i>	24
6.	<i>Köszönetnyilvánítás</i>	25
7.	<i>Irodalom</i>	26
8.	<i>Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez</i>	28

1. Bevezető

1.1 Az autofágia

Az autofágia az eukarióta sejtekre jellemző, szabályozott lizoszóma-közvetített önemésztő folyamat. Három típusát különböztetjük meg aszerint, hogy az emésztendő sejtalkotók hogyan jutnak be a lizoszómába. Ez alapján makroautofágiáról, mikroautofágiáról és chaperon-mediált autofágiáról beszélünk (1. ábra).

A chaperon-mediált autofágia során a rosszul feltekeredett fehérjék kerülnek lebontásra a lizoszómában. A folyamat során a hsc70 (70kD *heat shock cognate protein*) chaperon szállítja a degradálásra ítélt fehérjéket a lizoszómához, amelyek a LAMP-2A fehérjékből felépülő csatornán jutnak be a lizoszómába (1. ábra).

A mikroautofágia során a citoplazma egy része a lizoszóma membrán betűrődésének következtében kerül be a lizoszóma belsejébe (1. ábra).

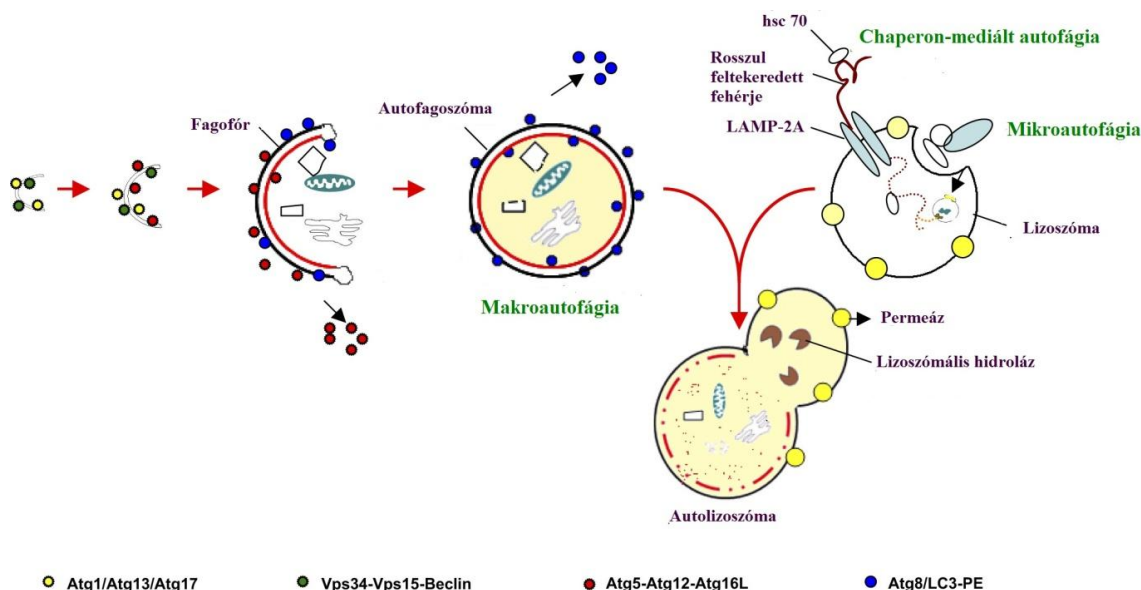
A makroautofágia során egy kettős izolálómembrán, a fagofór keletkezik a degradálandó citoplazmarészlet/sejtkomponens körül. A fagofór később bezáródik, ekkor már autofagoszómának nevezzük, ezután az autofagoszóma lizoszómákkal fúzióvál, autolizoszóma keletkezik. A belső membrán, és a benne lévő citoplazmarészlet a sejtkomponensekkel együtt megemésztődik (1. ábra). Továbbiakban az autofágia alatt a makroautofágiát értem.

Az autofágia folyamatát négy fehérje komplex szabályozza. Az Atg1 (*Autophagy related gene 1*) kináz komplex indukálja az autofágiát. A komplex tagjai az Atg1/ULK1/2, Atg13, Atg17/FIP200 és Atg101 fehérje. A komplex működése függ a TOR (*target of rapamycin*) fehérjétől, ha jelen van, gátolja az indukáló komplex működését.

A következő fehérje komplex a PI3K (foszfatidil-inozitol 3 kináz) komplex. A komplexbe tartozik az Atg6/Vps30/Beclin, a Vps34, a Vps15, és az Atg14, a komplex a fagofór képzésben játszik szerepet és további Atg fehérjék toborzását segíti.

A harmadik fehérje komplexet két ubikvitinszerű protein konjugációs rendszer alkotja. Tagjai az Atg3, Atg4 Atg5, Atg7, Atg8/LC3, Atg10 Atg12 és Atg16. A komplex működése során az Atg8 kovalensen (foszfatidil-etanolaminon keresztül) kapcsolódik az izolálómembránhoz.

A negyedik komplexet az Atg2, Atg9 és Atg18 fehérjék alkotják, amelyek az autofagoszóma kialakulásában részt vevő autofág fehérjék reciklizálásában játszanak szerepet (1. ábra)



1. ábra Az autofágia három típusa: makroautofágia, mikroautofágia, chaperon-mediált autofágia. A makroautofágia során egy kettős izolálómembrán, fagofór keletkezik, ami bekebelezi a citoplazma egy részét, a fagofór záródása után egy lizoszómával fúzionál. Az autolizoszóma kialakulásához szükség van az Atg1 kináz komplex (sárga kör), a PI3K komplex (zöld kör) és a két ubikvitinszerű protein konjugációs rendszer (piros és kék kör) működésére. Az Atg1 kináz komplex indukálja az autofágiát, tagjai az Atg1/ULK1, Atg13, Atg17/FIP200 és Atg101. A PI3K komplex a fagofór képzésben játszik szerepet és további Atg fehérjék toborzását segíti, tagjai az Atg6/Vps30/Bec1in, a Vps34, a Vps15, és az Atg14. A két ubikvitinszerű protein konjugációs rendszer működése során az Atg8 kovalensen (foszfadil-etanolaminon keresztül) kapcsolódik az izolálómembránhoz, tagjai az Atg3, Atg4 Atg5, Atg7, Atg8/LC3, Atg10 Atg12 és Atg16. A mikroautofágia során a citoplazma egy része közvetlenül a lizoszómába jut. A chaperon-mediált autofágia során a rosszul feltekeredett fehérjék jutnak be a lizoszómába a hsc70 chaperon és a LAMP-2A receptor közvetítésével. Mindegyik esetben a bejutott sejt komponenseket a lizoszómális hidrolázok bontják le. (PE: foszfadiletanolamin) (Periyasamy-Thandavan és mtsai., 2009, módosítva)

Az autofagoszóma képződéshez kulcsfontosságú lipidszignalizációs lépés a foszfadilinozitol (PI) foszfadilinozitol-3-foszfáttá (PI3P) történő átalakulása, melyet a Vps34 katalizál. A PI3P létrejötté szabályozási pont is egyben: a defoszforilációját (a PI3P → PI átalakítást) a Myotubularin típusú (MTM) foszfatazok végzik, és így gátolják az autofág folyamatot. (Vergne és mtsai., 2009). Az eddigi ismeretek szerint a Myotubularinok közül az MTMR14 (*Myotubularin related protein 14*) a leghatékonyabb autofágia szabályozó (Vergne és mtsai., 2009). Az MTMR14 ecetmuslica ortológja a dJumpy avagy EDTP.

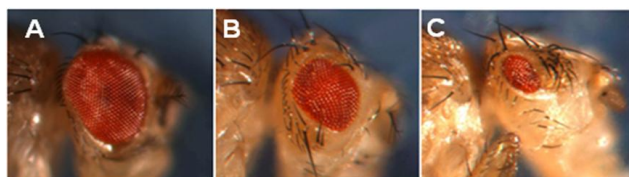
Az alapszinten zajló autofágia biztosítja a hosszú féléletidejű fehérjék és organellek turnoverét. Számos környezeti és endogén tényező képes fokozni az autofág aktivitást. Ilyenek pl. a különböző stresszállapotok (éhezés, hypoxia, magas hőmérséklet, növekedési faktor megvonás, és minden olyan körülmény, amikor a sejtes funkciók gyors megváltozására van

szükség). Ezzel összhangban az autofágiának fontos szerepe van a sejtnövekedésben, a sejtosztódásban és az intracelluláris patogének elleni védekezésben. Emberben az autofágia működésének zavara rák, neurodegeneratív betegségek, agyvérzés, izomsorvadás, májelégtelenség és szívinfarktus kialakulásához vezethet. (Levine és Kroemer, 2008)

Az autofágiának elsődlegesen citoprotektív funkciója van, ezzel együtt a sejthalálban is szerepet játszik; a II-es típusú programozott sejthalálként tartják számon: a *Drosophila* metamorfózisa során részt vesz a lárvális szövetek lebomlásában. (Denton és mtsai., 2009; Mizushima és Levine, 2010).

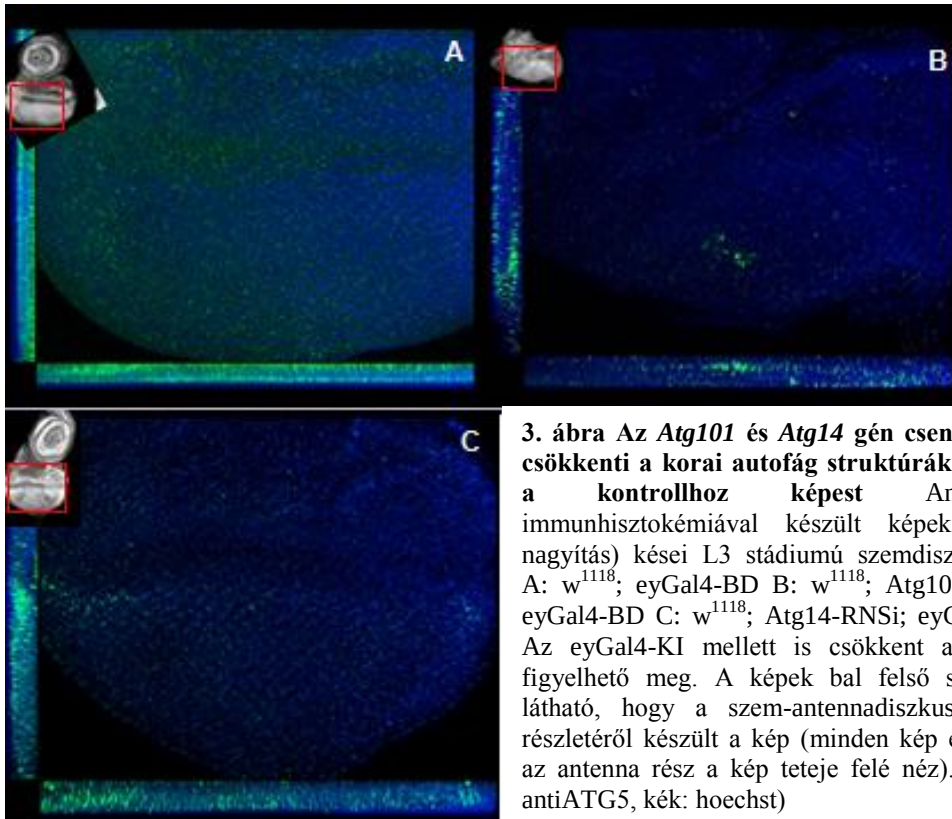
1.2 Az autofágia és a szemfejlődés

Munkacsoportunk az autofágia szervfejlődésben betöltött szerepével foglalkozik az ecetmuslica összetett szemének kialakulását vizsgálva. Megfigyeléseink szerint a szemfejlődés során rendellenes autofág aktivitással rendelkező állatoknak csökevényes szeme alakul ki (a vad típushoz képest kisebb méretű szemük lesz, vagy egyáltalán nem fejlődik ki) (2. ábra).

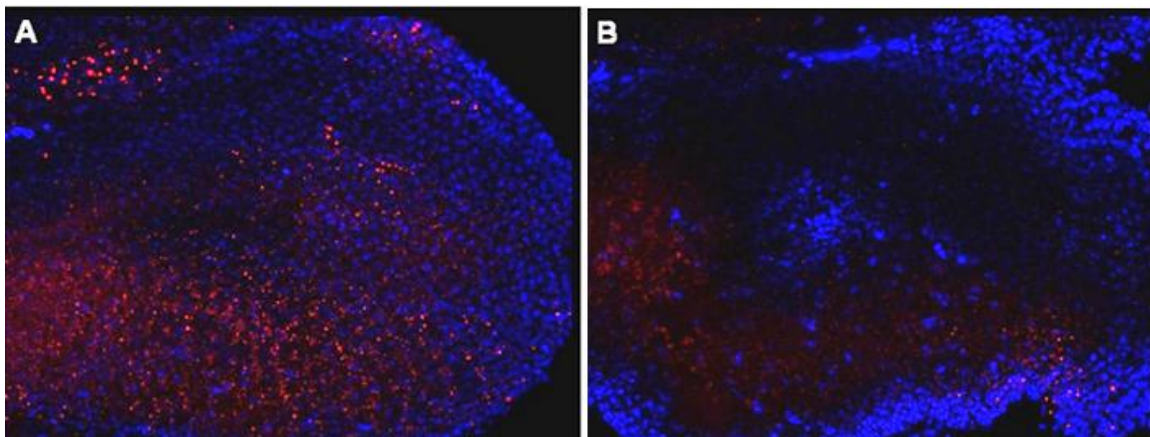


2. ábra Az autofág gének csendesítése csökevényes szemet eredményez A: Oregon (vad típus) B: w^{1118} , eyGal4-KI, Atg14-RNSi / CyO C: w^{1118} , eyGal4-KI, Atg101RNSi / CyO.

Előzetes vizsgálatok alapján az *Atg14* és az *Atg101* gén csendesítése kései L3 stádiumú lárvák szemdiszkuszában csökkent autofágiához vezet, amely mind a korai autofág struktúrák megnyírásiában (antiATG5 jelölés - korai autofág struktúrák, 3. ábra), mind pedig az autolizoszómák számának csökkenésében megmutatkozik (LysoTracker Red festés, 4. ábra).

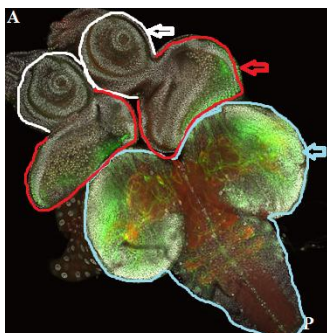


3. ábra Az *Atg101* és *Atg14* gén csendesítése csökkenti a korai autofág struktúrák számát a kontrollhoz képest AntiATG5 immunhisztokémiával készült képek (400x nagyítás) kései L3 stádiumú szemdiszkuszról. A: w^{1118} ; eyGal4-BD B: w^{1118} ; Atg101-RNSi; eyGal4-BD C: w^{1118} ; Atg14-RNSi; eyGal4-BD Az eyGal4-KI mellett is csökkent autofágia figyelhető meg. A képek bal felső sarkában látható, hogy a szem-antennadiszkus mely részletéről készült a kép (minden kép esetében az antenna rész a kép teteje felé néz). (zöld: antiATG5, kék: hoechst)



4. ábra Az *Atg14* gén csendesítése csökkent autofágiához vezet a kontrollhoz képest LysoTracker Red festéssel készült képek A: w^{1118} ; eyGal4-KI/+ (kontroll) B: w^{1118} ; eyGal4-KI/Atg14-RNSi. (piros: LysoTracker Red, kék: hoechst)

A felnőtt állat testfüggelékei (szem, csáp, láb, szárny, billér, stb.) ún. imaginális korongokból (diszkuszköböl) fejlődnek. A *Drosophila* egyedfejlődése során a három lárvaállapotot (L1-L3) követi a bábállapot, amely fejlődési stádiumok során az összetett szem kifejlődik az ún. szem-antennadiszkuszból (5. ábra).



5. ábra Kései L3-as lárvastádiumú állat szem-antennadiszkusza, aggyal. A fehér nyíl az antenna-részt, a piros nyíl a szemrészt jelöli a szem-antennadiszkusznak. A kék nyíl a lárvális agyat jelöli. (Anand Krishna Tiwari felvétele)

Az összetett szemén kívül még ebből fejlődik ki az antenna, a palpus és a feji kutikula (Pappu és Mardon 2004). A mintázatképződés a szemben a morfogenetikai árok megjelenésével (*morphogenetic furrow*, MF) kezdődik. Ez egy jól látható és könnyen azonosítható vonal a diszkuszban. A MF a szem-antennadiszkusz poszterior szélén jelenik meg, és innen anterior irányban végighalad a szemdiszkuszon, a tőle anterior elhelyezkedésű sejtek proliferációja mindaddig folytatódik, amíg a MF el nem éri őket. Az árok az, ahol szignalizációs kaszkádja-inak köszönhetően a szemsejtek differenciációja megindul (fotoreceptorokká ill. ún. járulékos sejtekké) (Kumar, 2009).

Az ecetmuslica szemfejlődésének egyik mestergénje a Pax6 homológ *eyeless* (*ey*). Expressziója a MF előtti sejtekben figyelhető meg. (Quiring és mtsai., 1994)

Az autofág-deficiens muslicák csökevényes szemének kialakulására három magyarázat lehetséges: nem alakul ki kellő számú sejt, vagy nem történik meg a differenciáció, esetleg a már kialakult (és akár differenciálódott) sejtek elpusztulnak apoptózissal. Én ezt az utolsó lehetőséget vizsgáltam. Az autofágia és az apoptózis kapcsolata intenzíven kutatott tudományterület. Az Atg6 (PI3 kináz komplex) és az antiapoptotikus Bcl-2 fehérje között közvetlen kapcsolatot mutattak ki *Caenorhabditis elegans*-ban (Takács-Vellai és mtsai., 2005) és humán HeLa sejtenyészetben (Maiuri és mtsai., 2007).

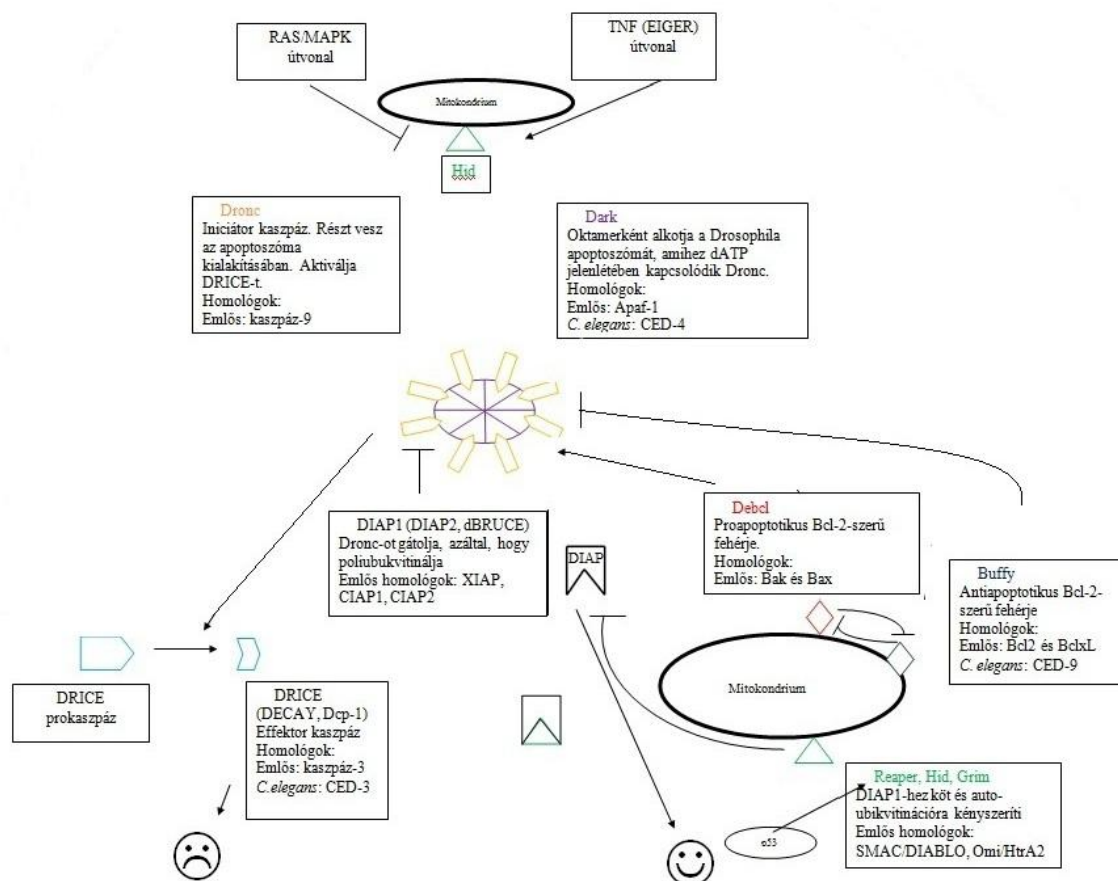
1.3 Az apoptózis

Az I.-es típusú programozott sejthalálnak, más néven az apoptózisnak általános megjelenése a sejt zsugorodása, a membrán „blebbing” (buborékosodás), a kromatin kondenzáció, a DNS fragmentálódása. A cisztein proteázok családjába tartozó kaszpázok aktivitása idézi elő ezeket

a morfológiai jellegzetességeket. Az apoptotikus sejtek maradványait a szomszédos sejtek vagy fagociták kebelezik be és bontják le.

Többsejtű élőlényekben a programozott sejthalálnak nagy jelentősége van az egyedfejlődés során és a homeosztázis fenntartásában. Azokban a sejtekben, amelyekre a szervezetnek nincs szüksége, lezajlik a sejthalál folyamata. A programozott sejthalál alapvető genetikai útvonala konzervált a törzsfejlődés során. A programozott sejthalál abnormális működésének következtében különböző rendellenességek alakulhatnak ki, izomsorvadás, neurodegeneratív betegségek, rákos elváltozások, autoimmun betegségek.

Továbbiakban az apoptózis folyamatát az ecetmuslicán mutatnám be. A sejthalál a *Drosophila* sejtekben az IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) fehérjék (DIAP1, DIAP2, dBRUCE) állapotától függ (Wang és mtsai., 1999). Ezek a fehérjék a tőlük *downstream* ható kaszpázokat gátolják. Az IAP fehérjéket gátolni képesek az AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) fehérjék, (Reaper, Hid és Grim) (Goyal és mtsai., 2000), ekkor a kaszpázok aktiválódni tudnak, először az iniciátor kaszpázok (NC vagy Dronc, DREDD) és azok fogják aktiválni az effektor kaszpázokat (DRICE, DCP-1, DECAY), amelyek tulajdonképpen az apoptózis végrehajtói. Az ecetmuslicában is megtalálhatóak a Bcl-2-szerű fehérjék, amelyek a mitokondrium membránján találhatók. Van antiapoptotikus (Buffy) és proapoptotikus (Debcl) Bcl-2-szerű fehérje, ezek egymás aktivitását gátolják. Az ecetmuslicában nem tisztázott még a pontos mechanizmus, hogy hogyan kerekedik fölül az egyik Bcl-2-szerű fehérje a másikon, de mindkét típusú, a pro- és az antiapoptotikus is az apoptoszóma aktivitását befolyásolja (Danial és Korsmeyer, 2004). Az apoptoszóma egy kaszpázaktiváló fehérjekomplex, nyolc iniciátor kaszpázból és nyolc *Drosophila* Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor*) (Dark) fehérjéből épül fel (6. ábra).



6. ábra Az ecetmuslica programozott sejthalála. A programozott sejthalál genetikai kaszkádjában az effektor kaszpázok (*drice*, *decay*, *dcp-1*) helyezkednek el a leginkább *downtstream*. Az általuk kódolt fehérjék hajtják végre az apoptózist. Tőlük *upstream* található az apoptoszóma (iniciátor kaszpáz *dronc* + *dark*), amely feladata az effektor kaszpázok aktiválása. Az apoptoszóma aktivitását befolyásolják a Bcl2-szerű gének működése (*debcl* proapoptotikus aktivátor, *buffy* antipoptotikus gátló). A kaszpázok aktiválását gátolják a *diap1*, *diap2*, *dbruce* által kódolt IAP fehérjék. Az IAP-ek működését gátolják a *reaper*, *hid*, *grim* által kódolt AIF-ok. Ezeket aktiválni képes a p53 fehérje és a TNF útvonál, valamint RAS/MAPK szignalizáció gátolja.

2. Céltűzések

A fejlődő szemben rendellenes autofág aktivitással rendelkező imágók szeme csökevényes a vad típushoz képest (kisebb vagy egyáltalán nem fejlődik ki). Az egyik lehetséges magyarázat, hogy a kialakult (és akár differenciálódott) sejtek apoptózissal elpusztulnak. Én ezt a lehetőséget vizsgáltam.

Célul tűztem ki a szem fejlődése során, a kései L3-as lárvastádiumú lárvák szemdiszkuszaiban a különböző komplexekből származó *Atg* gének (*Atg101*, *Atg14*) géncsen-desítése mellett az apoptózis mértékének változásának vizsgálatát. További vizsgálataimba be

kívántam vonni az autofágia egy biokémiai szabályozó faktorát: tanulmányozni, hogy az EDTP genetikai manipulálása (túltermeltetése illetve géncsendesítése) milyen hatással van az apoptózis mértékére.

Laborunk eddigi eredményei alapján a kései L3 stádiumú lárva szemdiszkuszában az *Atg14* és az *Atg101* gének csendesítése, ill. az EDTP gén overexpressziója csökkent autofágiához vezet, az EDTP gén csendesítése pedig fokozott autofág aktivitáshoz.

Az apoptotikus aktivitás vizsgálatát több független módszerrel egyaránt el kívántam végezni a különböző autofág-deficiens genetikai hátterekben. A sejthalál változásának mértékét az apoptotikus testeket jelölő Acridine Orange festéssel, a szabad DNS végek jelölésén alapuló TUNEL-próbával, a kaszpázaktivitást kimutató Apoliner használatával és elektronmikroszkópiával vizsgáltam.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Törzsek fenntartása

Az *ecetmuslica* törzsek fenntartása standard körülmények között, agaros-kukoricaliszes táptalajon, 25°C-on történt. A kísérleteket is 25°C-on végeztem. Abban az esetben, amikor ettől eltértem, külön jelzem. A táptalaj készítése:

Szárazkeverék: 320g kukoricaliszt, 156g kristálycukor, 2,7g $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Egy liter meleg vízben kell feloldani 100g szárazkeveréket. Ezután hozzá kell adni 13g agart és 26g porított élesztőt. Ezután össze kell főzni, hogy az agar teljesen feloldódjon, majd amikor 60°C-ra lehűlt hozzáadni 10ml 25vegyesszázalékos nipagint (4-hidroximetil-benzoát) (A nipagint 96%-os etanolban oldjuk).

3.2 Használt törzsek

A munkám során használt törzseket törzsközpontokból (Bloomington *Drosophila* Stock Center - BDSC, Vienna *Drosophila* RNAi Center – VDRC, *Drosophila* Genetic Research Center - DGRC) szereztük be, vagy magam állítottam elő keresztezés útján (1. táblázat). A w;

eyGal4-BD és w; eyGal4-KI törzseket Mihály József bocsátotta rendelkezésünkre (MTA SzBK Genetikai Intézet).

y,w; (EP)EDTP ^{EY22967} (BDSC: 22600)	w;eyGal4-BD, EDTP-RNSi/TM6	UAS-Apoliner(1); (EP)EDTP ^{EY22967} , eyGal4-KI
y,w; EDTP ^{KG04513} (BDSC: 13605)	w;(EP)EDTP ^{EY22967} ; eyGal4-BD	w, UAS-Apoliner(2); eyGal4-BD; ey ²
w ¹¹¹⁸ ; P(EP)EDTP ^{EP2390} (BDSC: 17050)	w; eyGal4-KI; UAS-p35	UAS-Apoliner(1); (EP)EDTP ^{EY22967} ; eyGal4-BD
w ¹¹¹⁸	w; Atg14-RNSi (VDRC: v108559)	w; UAS-Apoliner(2); eyGal4-BD
Oregon (vad típus)	w; Atg101-RNSi (VDRC: v106176)	w; UAS-Apoliner(2),eyGal4-KI
ey ² (BDSC: 648)	w; (EP)EDTP ^{EY22967} , eyGal4-KI	w; P{RS5}EDTP ^{5-SZ-3559} (DGRC:126130)
w; eyGal4-BD	UAS-Apoliner(1); eyGal4-BD	w; UAS-Dicer-2, eyGal4-KI
w; eyGal4-KI	UAS-Apoliner(1); eyGal4-KI	

1. táblázat Az általam használt ecetmuslica törzsek

3.3 Keresztezések

UAS-Apoliner(2); UAS-EDTP-RNSi, eyGal4-BD törzs létrehozása:

Első lépésként a w*; CyO/Sp; letális mutáció/TM6B; + x w*; +; UAS-EDTP-RNSi, eyGal4-BD; + keresztezést végeztem el. A CyO markerre szüzeket szedtem az utódnemzedékből és kereszteztem w*;Apoliner(2); MRS/TM6B; + hímekkel. CyO és TM6B állatokat, szüzeket és hímeket válogattam az utódnemzedékből és összekereszteztem egymással (w*; UAS-Apoliner(2)/CyO; UAS-EDTP-RNSi, eyGal4-BD/TM6B; + x w*; UAS-Apoliner(2)/CyO; UAS-EDTP-RNSi, eyGal4-BD/TM6B; +) Végül a balanszereket nem hordozó w*; UAS-Apoliner(2); UAS-EDTP-RNSi, eyGal4-BD; + szüzeket és hímeket válogattam és összekereszteztem.

UAS-Dicer-2, eyGal4-KI törzs létrehozása rekombináns keresztezéssel:

w*; UAS-Dicer-2; +; + szüzeket kereszteztem w*; eyGal4-KI; +; + hímekkel. A transzheterozigóta (w*; UAS-Dicer-2/eyGal4-KI; +; +) utódokat w*; CyO/Bc, Gla; +; + hímekkel kereszteztem.

teztem. Ezzel egy időben kontroll keresztezéseket is összeraktam; a kiindulási törzseket is összekeresztettem w*; CyO/Bc, Gla; +; + állatokkal. Az egyidős (3-4 napos imágó) utódokat összehasonlítottam: a w* mutáció következtében fehér szeműek az állatok, de az UAS-Dicer-2 és az eyGal4-KI is tartalmaz „mini-white” menekítő konstrukciót, így az állatoknak narancssárga szemszínük van. Rekombinánsok esetén fehér ill. a kontrolloknál sötétebb szemszínű utódok keletkeztek, az utóbbiak hordozták az UAS-Dicer-2, eyGal4-KI rekombináns kromoszómát (és így két kópia „mini-white”-ot) . Az utódokból w*; UAS-Dicer-2, eyGal4-KI/CyO; +; + szüzeket válogattam és újra bekeresztettem w*; CyO/Bc, Gla; +; + állatokkal. Az utódokból ismét w*; UAS-Dicer-2, eyGal4-KI/CyO; +; + utódokat válogattam és kereszteztem egymással. Öt rekombináns vonalat készítettem, ebből az általam legjobban működő „E” vonalat használtam a későbbi vizsgálatokhoz.

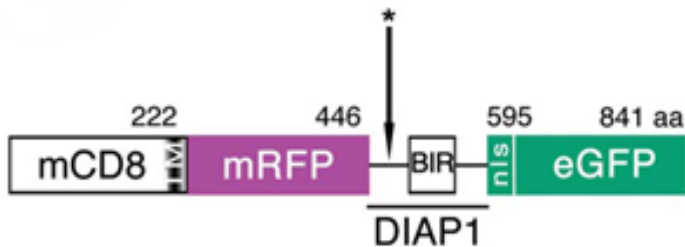
UAS-Apoliner(1); (EP)EDTP^{EY22967}, eyGal4-KI; +; + törzs létrehozása:
w*; (EP)EDTP^{EY22967}, eyGal4-KI; +, + szüzeket UAS-Apoliner(1); Sb;+/ST6; +; + hímekkel kereszteztem össze. Az utódnemzedékből ST6 markerre válogatva UAS-Apoliner(1)/Y; (EP)EDTP^{EY22967}, eyGal4-KI;+/ST6; +; + hímeket válogattam és kereszteztem UAS-Apoliner(1); Sb;+/ST6; +; + szüzekkel. Az utódnemzedékből a sötétebb szemű, az első kromoszómán UAS-Apoliner(1)-re homozigóta szüzeket és hemizigóta hímeket összekeresztettem (UAS-Apoliner(1); (EP)EDTP^{EY22967}, eyGal4-KI;+/ST6; +; + x UAS-Apoliner(1)/Y; (EP)EDTP^{EY22967}, eyGal4-KI;+/ST6; +). Az utódok közül az ST6 markert már nem hordozó, a második kromoszómán (EP)EDTP^{EY22967}, eyGal4-KI;-re homozigóta utódokat összekeresztettem egymással. (UAS-Apoliner(1); (EP)EDTP^{EY22967}, eyGal4-KI; +; +; x UAS-Apoliner(1)/Y; (EP)EDTP^{EY22967}, eyGal4-KI; +; +). Az UAS-Apoliner(1); (EP)EDTP^{EY22967}; eyGal4-BD; +; törzs ugyenezen séma szerint készült.

3.4 Alkalmazott módszerek

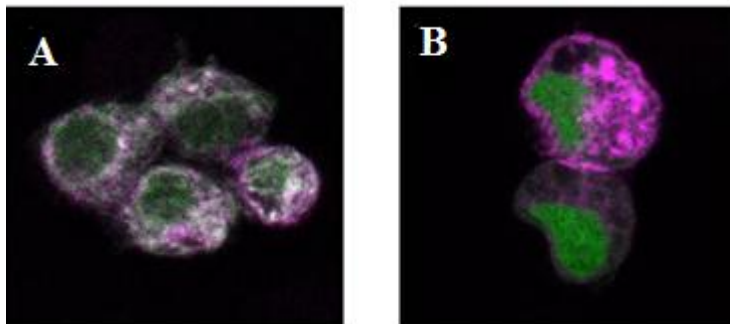
Az UAS-Apoliner konstrukció:

Az Apoliner egy kaszpázaktivitást detektáló mesterséges fehérje. Az N-terminálistól a C-terminális felé haladva tartalmaz egy transzmembrán domént (egér CD8), egy mRFP-t (*monomeric Red Fluorescent Protein*), mögötte egy kaszpáz érzékeny régiót a DIAP1 fehérjéből, majd egy nukleáris lokalizációs szignállal (NLS) ellátott eGFP-t (*enhanced Green*

Fluorescent Protein) (7. ábra) (Bardet és mtsai., 2008). A molekulát az apoptózis során az aktív kaszpázok (DRICE, DCP-1) elhasítják, ekkor az eGFP a sejtmagba vándorol (8. ábra) (Bardet és mtsai., 2008).



7. ábra Az Apoliner molekula felépítése. mCD8: transzmembrán domént tartalmazó egér CD8, mRFP: vörös fluoreszcens fehérje, DIAP1: részlet a DIAP1 fehérjéből, nls-eGFP: sejtmagi lokalizációs szignállal ellátott eGFP: zöld fluoreszcens fehérje. A nyíl jelöli a kaszpázhasító helyet (Bardet és mtsai., 2008)



8. ábra Az Apoliner molekula működése. Az A képen látható fehéren, hogy a nem apoptotizáló sejtben az mRFP és az eGFP kolokalizálnak. A B képen az apoptotizáló sejtben elkülönül a zöld sejtmag az mRFP-től. (Bardet és mtsai., 2008).

Az UAS-GAL4 rendszer:

A GAL4 egy élesztőben (*Saccharomyces cerevisiae*) ismert transzkripciós faktor, ami a cél-gének átírását azáltal szabályozza, hogy a GAL4 fehérjék az UAS (*Upstream Activating Sequences*) szekvenciához kapcsolódnak. Ez az UAS-től *downstream* elhelyezkedő célgén átíródását aktiválja. (Brand és Perrimon, 1993) Az elmúlt két évtizedben számos transzgenikus *Drosophila*-törzset hoztak létre, amely tartalmazza a Gal4 kódoló régióját és a Gal4 expressziója *Drosophila* szövetspecifikus promótereiről történik. Ugyanígy készítettek az UAS elemmel kapcsolt vizsgálandó DNS konstrukciókra transzgenikus muslicákat. Ha keresztezés eredményeként a két konstrukció egy egyedbe kerül, akkor a GAL4 forrás a rá jellemző szövetspecifikus promóternek megfelelő szövetekben aktiválja az UAS-konstrukció kifejeződését. (A GAL4 DNS-hez való kötődésének optimuma 29°-on van). Így nyílik lehetőség gének ectopikus expressziójára (cDNS található az UAS mögött) vagy RNS interferencia közvetített géncsendesítésre (dsRNS-t kódoló DNS szekvencia van az UAS mögött). (Duffy, 2002) Egy gén túltermeltetésére egy másik lehetőség az Enhanced P (EP) elemes konstrukció használata, mely a P elem inszerciós mutagenézis és az UAS-Gal4 rendszer előnyeit egyesíti. Az EP elem esetében a mutagenizáláshoz használt transzpozábilis P elem UAS szekvenciát is

tartalmaz. Az endogén gén elé beugrott EP elemre transzgenikus állat Gal4 forrás hiányában inszerciós mutánsként viselkedik, ha Gal4-et adunk a rendszerhez, akkor a gén működése fokozódik, overexpresszió következik be (Rorth, 1996). Munkám során kétféle GAL4-gyel dolgoztam, mindkettő az *eyeless* gén promóterének egy részletét tartalmazza, az eyGal4-BD csak a morfogenetikai árok mögött (tőle poszterior irányban, a differenciálódó régióban), az eyGal4-KI pedig az egész szemdiszkuszban kifejeződik (az *ey* gén endogén expressziójától eltérően).

3.5 Acridine Orange (AO) festés

A kései L3 stádiumú lárvákat PBS-ben boncoltam, miután kiboncoltam a szemdiszkuszokat leszívtam a PBS-t és 30µl 0,01mg/ml AO/Hoechst+PBS-sel (1 Hoechst : 50 PBS) festettem két percig. Öblítés PBS-sel, majd mostam még három percig PBS-sel. Glicerines PBS-sel (80% glicerin, 20% PBS) fedtem le a mintákat. A képeket Zeiss AxioImager Z1 epifluoreszcens mikroszkóppal ApoTome szemikonfokális feltétellel készítette Lőrincz Péter. A fotózáshoz, és a képek szerkesztéséhez használt program: Zeiss AxioVision 4.82.

3.6 Immunhisztokémia

Az Apoliner-t tartalmazó törzseken a mikroszkópia előtt anti-GFP-vel immunhisztokémiát végeztem, a GFP jel felerősítéséhez. A kései L3 stádiumú lárvákat PBS-ben boncoltam, miután kiboncoltam a szemdiszkuszokat a garatot is meghagyva, azokat 100µl 4%-os PBS+formaldehidben fixáltam 30 percet, ezután háromszor 20 percig mostam 100µl PBT-ben. Ezután következett a blokkolás 100µl 5%-os BSA/PBT-ben 30 percig, majd 75µl anti-GFP-t (Merck Millipore) tettem a mintákra és egy éjszakán át inkubáltam 4°C-on. (A vakra, nem kerül elsődleges ellenanyag, mert az a másodlagos ellenanyag specifikitását teszteli, azt 100µl PBT-ben inkubáltam.) A második napon az elsődleges ellenanyag leszívása után 100µl PBT+NaCl-val (0,024mg/ml) történő 20 perces mosás következett, ezután 100µl PBT-s mosás 20 percig. Újrablokkolás 100µl 5%-os BSA/PBT-ben 20 percig, ezt már a vakra is tettem. Ezután tettem rá 75µl kecskében termelt Alexa Fluor 488-cal konjugált anti-egér másodlagos ellenanyagot (Invitrogen), 1 órán át inkubáltam. Ezután 20 perces mosás 100µl PBT-ben, majd festés 0,1µl/ml Hoechst+PBT-vel 4 percig. Ezután megint egy 20 perces mosás 100µl PBT-ben, majd még egyszer, csak PBT helyett PBS-sel. Ezután boncolás PBS-ben, a

szemdiszkuszok boncolása után pedig 18µl PVA-DABCO-ban (Invitrogen) 50 mp-ig inkubáltam és végül lefedtem. Ezután 4°C-on tároltam a mintákat mikroszkópiáig. A képeket Zeiss AxioImager Z1 epifluoreszcens mikroszkóppal ApoTome szemikonfokális feltétellel készítette Lőrincz Péter. A fotózáshoz, és a képek szerkesztéséhez használt program: Zeiss AxioVision 4.82.

3.7 TUNEL-próba

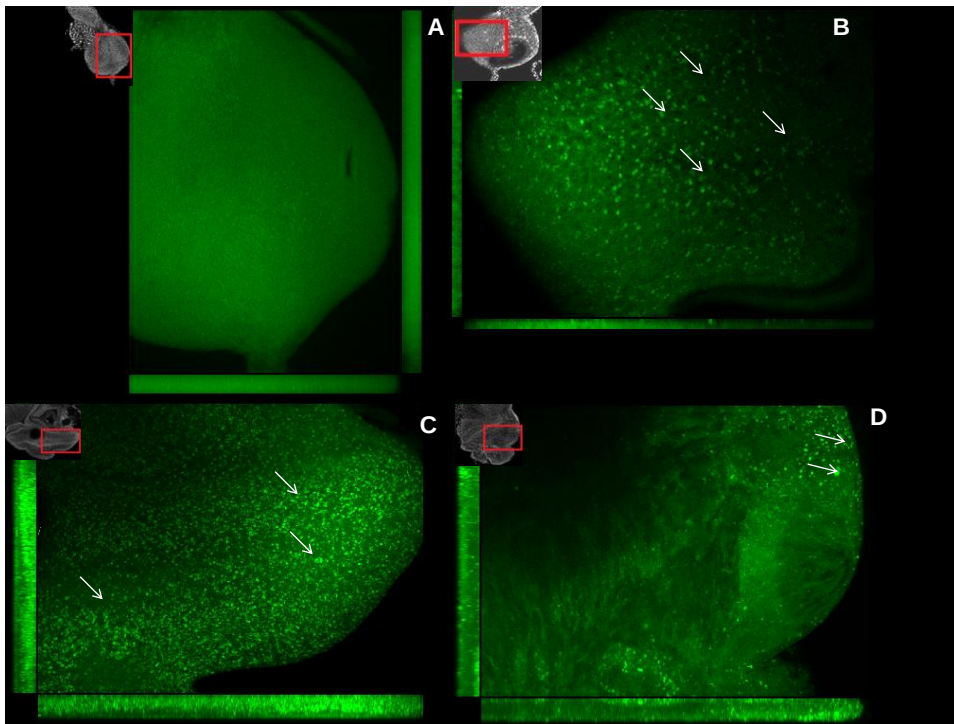
Az apoptózis során fragmentálódott DNS-t TUNEL-próbával (TUNEL: *Terminal deoxynucleotidyl Transferase mediated dUTP Nick-End Labeling*) mutatják ki, amely a fragmentálódott DNS szakaszok végeinek jelölésén alapszik.

A kései L3 stádiumú lárvákat PBS-ben boncoltam, miután kiboncoltam a szemdiszkuszokat a garatot is meghagyva, azokat 100µl 4%-os PBS+formaldehidben fixáltam 30 percet, ezután háromszor öblítettem 400µl metanollal. Ezután öt percig mostam 75% metanol/PBST-ben majd 50% metanol/PBST-ben végül 25% metanol/PBST-ben. Háromszor öt perces 400µl PBST-s mosás következett, és ezután két perces Proteinase K permeabilizáció 400µl 1µl/ml Proteinase K/PBST-ben. Kétszer egy percig mostam 400µl PBST-ben, és újra fixáltam 400µl PBS+formaldehiddel 20 percig. Ezután ötször öt percet mostam 400µl PBST-ben a mintákat, majd 400µl -20°C-os 2:1 etanol:acetonban inkubáltam 10 percig. Háromszor öt percig mostam 400µl PBST-ben. Ezután egy órát inkubáltam 200µl ekvibrációs pufferben. Ezután egy mintára számolva 12µl reakciós puffer + 6µl Tdt + 0,5µl Tritonból készült oldatból 15µl-t tettem minden mintára és 37°C-on egy éjszakán át inkubáltam. A második napon háromszor öblítettem 400µl PBST-vel, utána kétszer 30 percig mostam PBST-vel 37°C-on, aztán egy órán át mostam PBST-vel szobahőn. Két órán át blokkoltam 400µl MABR/PBST-vel (0,1µl/ml) és egy éjszakán át inkubáltam 400µl anti-DIG/MABR-ben (1:4000) 4°C-on. A harmadik napon hatszor mostam 20 percig 400µl PBST-vel, aztán háromszor öt percig AP pufferben. Utána rátettem a festéket (1ml AP puffer:4,5µl NBT:3,5µl Bcip) 400µl-t, alufóliával lefedtem és öt perc után néztem, hogy mennyire erősen festődött, amikor elégnek ítéltam leállítottam a festést, háromszor öblítettem 400µl PBS-sel. Újra fixáltam 400µl 4%-os PBS+formaldehiddel 20 percen át, majd 15 percig mostam 400µl PBST-vel. Ezután PBS-ben kiboncoltam a szemdiszkuszokat és 12µl glicerines PBS-sel (80% glicerin, 20% PBS) fedtem. A képeket Olympus BX-51 mikroszkóppal, Nomarski optikával készítette Billes Viktor.

4. Eredmények és megvitatásuk

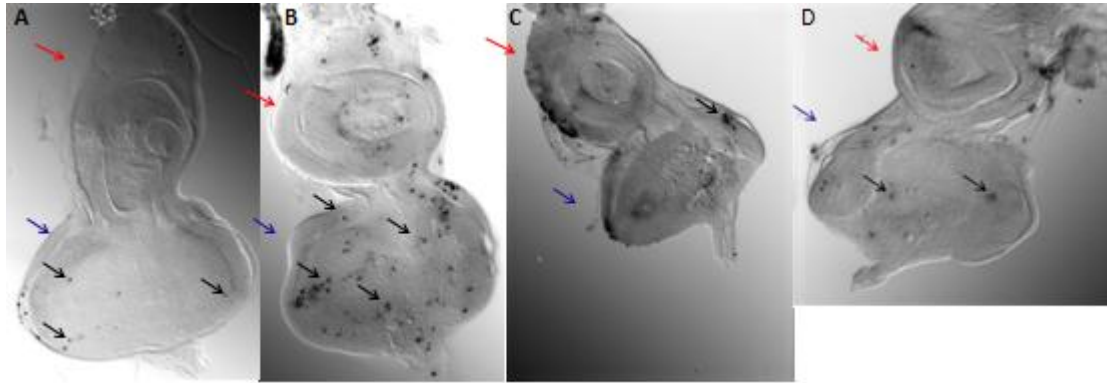
4.1 Előkísérletek

Első lépésként azt kívántam eldönteni, hogy az Acridine Orange (AO) festés alkalmazható-e a szemdiszkusz vizsgálatára. Ezért a vizsgálatra olyan törzseket választottam, melyben a szakirodalmi adatok alapján ismert, hogy a szemdiszkuszokban nagymértékű sejthalál figyelhető meg, illetve melyben az apoptózis gátolt. Az ey^2 mutáns állatok szemdiszkuszában magas szintű apoptózis van (pozitív kontroll) (Halder és mtsai., 1998). A baculovírus p35 fehérjéje *Drosophila* sejtekben expresszálva (UAS-p35) a sejtek nagy hányadában gátolja az apoptózist (negatív kontroll) (Hay és mtsai., 1994). A vad típusú szemdiszkuszokban nem volt AO jelölés, az ey^2 mutáns szemdiszkuszokban fokozott mértékű AO jelölést figyeltem meg (9. A, B. ábra), az $eyGal4-KI$; UAS-p35 szemdiszkuszban kisebb mértékű jelölést detektáltam, mint az $eyGal4-KI$ állatok szemdiszkuszaiban (9. C, D. ábra).



9. ábra Az ey^2 mutáns fokozott mértékű apoptózist mutat az Oregonhoz képest, míg az $eyGal4-KI$; UAS-p35 kevesebbet az $eyGal4-KI$ -hoz képest Acridine Orange festéssel készült képek (400x nagyítás) kései L3 stádiumú szemdiszkuszról A: Oregon (vad típus) B: ey^2 C: $eyGal4-KI$ D: $eyGal4-KI$; UAS-p35. A nyilak az apoptózist jelölő AO pozitív struktúrák egy részét mutatják. A képek bal felső sarkában látható, hogy a szem-antenna diszkusz mely részletéről készült a kép (minden kép esetében az antenna rész a kép teteje felé néz).

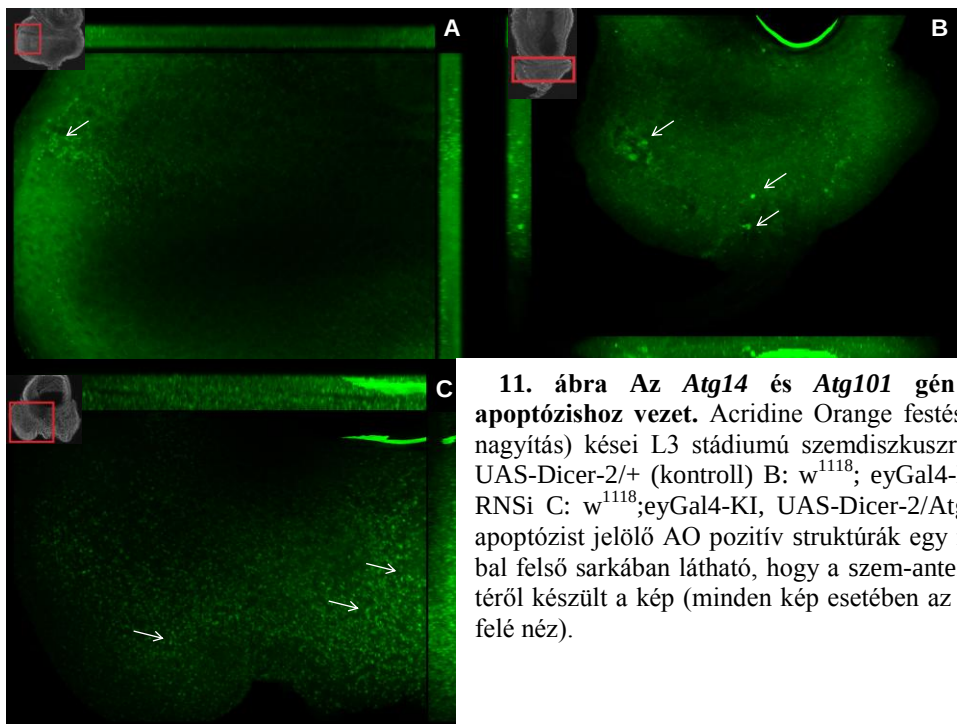
A TUNEL-próbát is ugyanígy teszteltem, ez esetben a vad típusban kismértékű TUNEL-pozitív jelölést kaptam, az ey^2 mutánsnál magasabb szintű jelölést láttam, mint a vad típusnál (10. A, B ábra) és az $eyGal4-KI$; $UAS-p35$ esetében kevesebb jelölést tapasztaltam, mint az $eyGal4-KI$ esetében (10. C, D ábra).



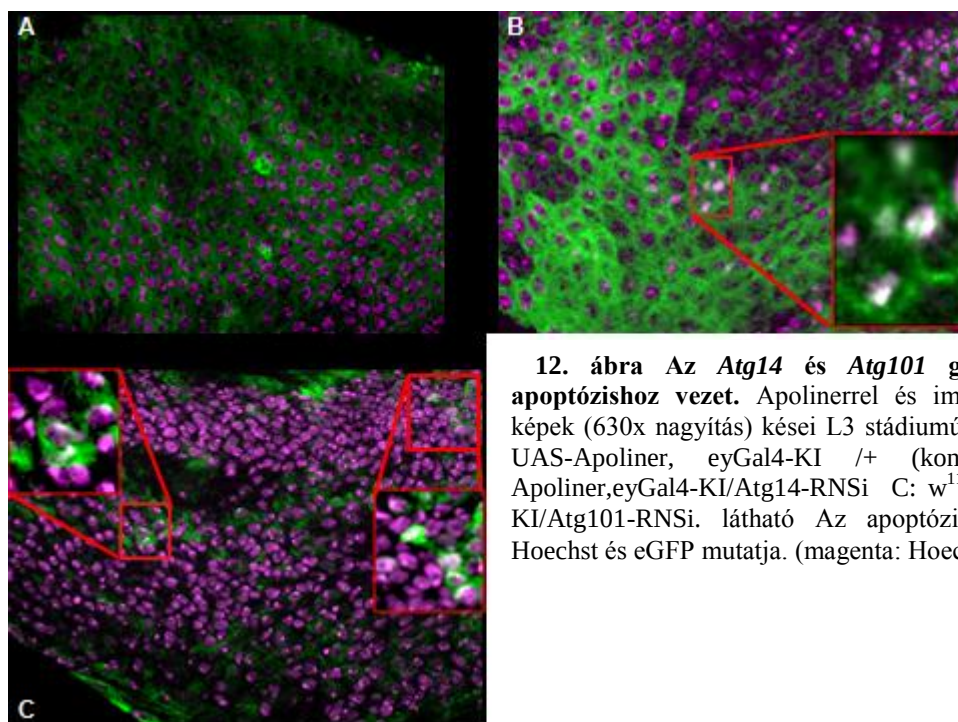
10. ábra Az ey^2 mutáns fokozott mértékű apoptózist mutat az Oregonhoz képest, míg az $eyGal4-KI$; $UAS-p35$ csökkent mértékű apoptózist mutat az $eyGal4-KI$ -hoz képest. TUNEL-próbával készült képek (400x nagyítás) kései L3 stádiumú szemdiszkszról A: Oregon (vad típus) B: ey^2 (pozitív kontroll) C: $eyGal4-KI$; $UAS-p35$ (negatív kontroll) D: $eyGal4-KI$. A fekete nyilak az apoptózist mutató TUNEL pozitív jelöléseket (vagy azok egy részét) mutatják. A piros nyíl a szem-antennadiszksz antenna részét jelöli, a kék a szemrészt.

4.2 Az apoptózis mértékének változása *Atg14* és *Atg101* gének csendesítése során

Az apoptózis mértékének változását az autofágia egy-egy komplexéből származó gén csendesítésével vizsgáltam. Az $Atg101-RNSi$ ($Atg1$ kináz komplex) és $Atg14-RNSi$ (PI3K komplex) RNS interferencia konstrukciót tartalmazó állatokat $eyGal4-KI$ -t és $UAS-Dicer-2$ -t egyaránt tartalmazó állatokkal kereszteztem. (Az $UAS-Dicer-2$, $eyGal4-KI$ mellett fokozza a szemdiszkszban a RNS interferencia hatékonyságát.) A vizsgált szemdiszkszokban, az $Atg14-RNSi$ és az $Atg101-RNSi$ esetében is fokozott AO jelölést figyeltem meg (11. ábra). Apolinerrel is megvizsgáltam az $Atg101-RNSi$ és $Atg14-RNSi$ konstrukciókat $eyGal4-KI$ használatával, mindkét konstrukció esetén fokozott apoptózist detektáltam a kontrollhoz képest (12. ábra).

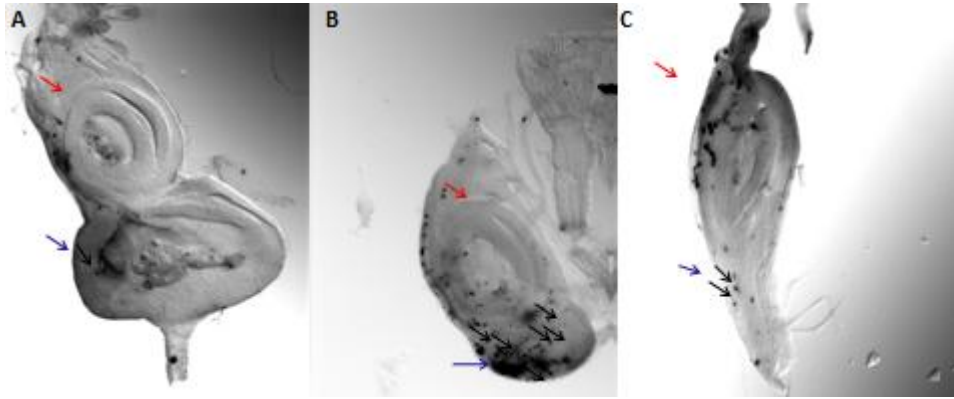


11. ábra Az *Atg14* és *Atg101* gén csendesítése fokozott apoptózishoz vezet. Acridine Orange festéssel készült képek (400x nagyítás) kései L3 stádiumú szemdiszkszról. A: w^{1118} ; eyGal4-KI, UAS-Dicer-2/+ (kontroll) B: w^{1118} ; eyGal4-KI, UAS-Dicer-2/Atg14-RNSi C: w^{1118} ; eyGal4-KI, UAS-Dicer-2/Atg101-RNSi. A nyilak az apoptózist jelölő AO pozitív struktúrák egy részét mutatják. A képek bal felső sarkában látható, hogy a szem-antennadiskusz mely részletről készült a kép (minden kép esetében az antenna rész a kép teteje felé néz).



12. ábra Az *Atg14* és *Atg101* gén csendesítése fokozott apoptózishoz vezet. Apolinerrel és immunhisztokémiával készült képek (630x nagyítás) kései L3 stádiumú szemdiszkszról. A: w^{1118} ; UAS-Apoliner, eyGal4-KI /+ (kontroll) B: w^{1118} ; UAS-Apoliner, eyGal4-KI/Atg14-RNSi C: w^{1118} ; UAS-Apoliner, eyGal4-KI/Atg101-RNSi. látható Az apoptózist a fehérén kolokalizáló Hoechst és eGFP mutatja. (magenta: Hoechst, zöld: eGFP)

TUNEL-próbát végezve rajtuk, az *Atg101*-RNSi állatokban nagyobb mértékű apoptózist detektáltam, viszont az *Atg14*-RNSi állatok szemdiszkusza olyan nagy mértékben csökevényes, hogy az apoptózis mértékét nem tudtam megállapítani (13. ábra). Az erősen csökevényes szemdiszkuszok esetén már a kései L3 stádium előtt kellett történnie apoptózisnak, vagy ki sem alakultak a sejtek.

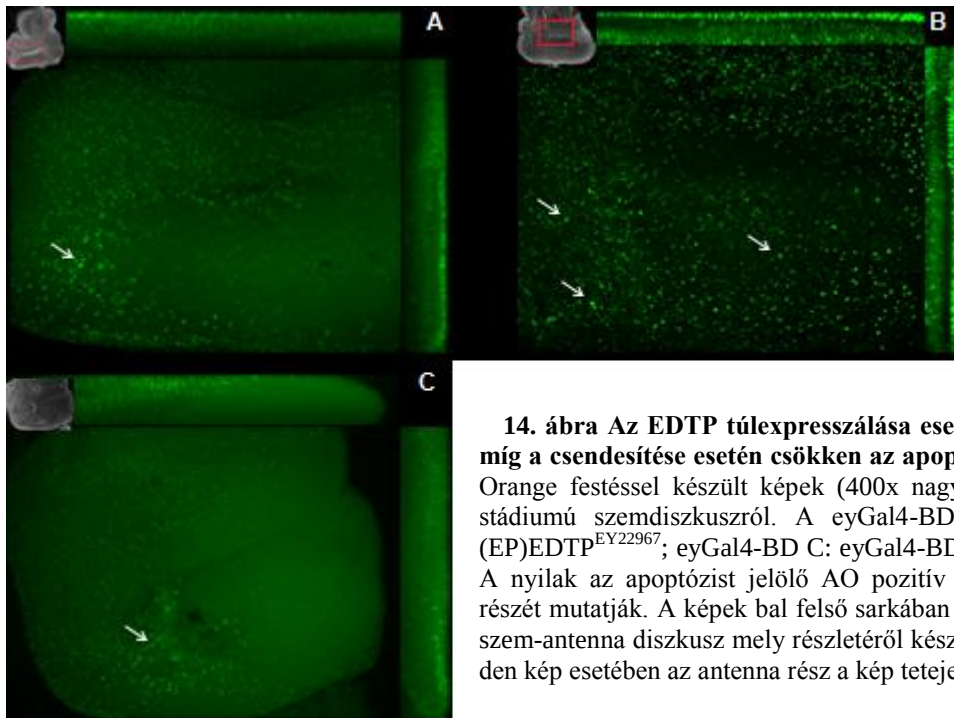


13. ábra Az *Atg14* és *Atg101* gén csendesítése fokozott apoptózishoz vezet. TUNEL-próbával készült képek (400x nagyítás) 29°C-on nevelt kései L3 stádiumú szemdiszkuszról. A: *w¹¹¹⁸*; *eyGal4*-KI, *UAS-Dicer-2/+* (kontroll) B: *w¹¹¹⁸*; *eyGal4*-KI, *UAS-Dicer-2/Atg101*-RNSi C: *w¹¹¹⁸*; *eyGal4*-KI, *UAS-Dicer-2/Atg14*-RNSi. A fekete nyilak az apoptózist mutató TUNEL pozitív jelöléseket mutatják. A piros nyíl a szem-antennadiszkus antenna részét jelöli, a kék a szemrészt.

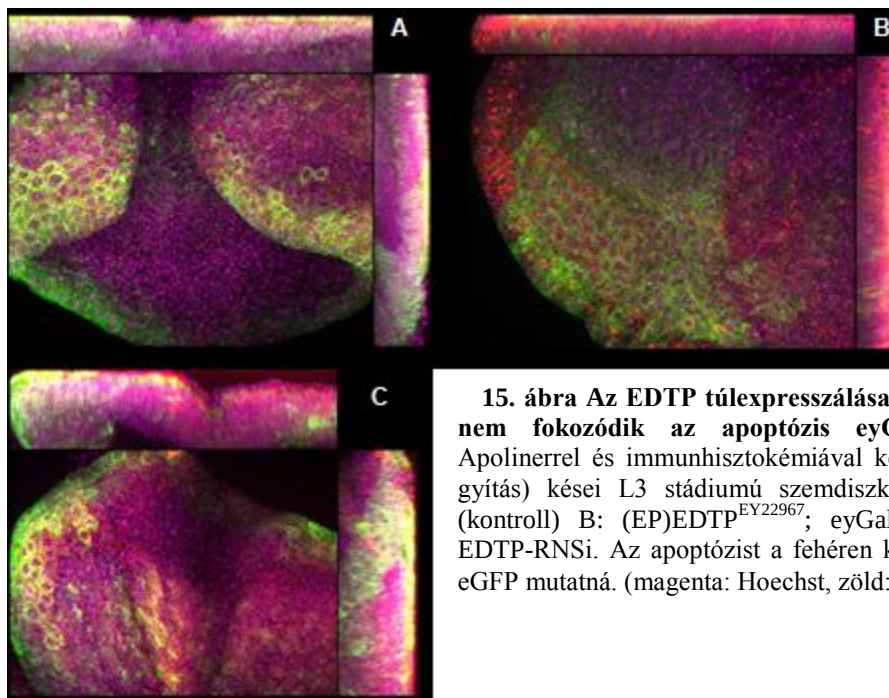
4.3 Az apoptózis mértékének változása *EDTP* deficiens hátterekben

A továbbiakban az apoptózis mértékének változását az *EDTP* deficiens genetikai hátterekben vizsgáltam. Ez magában foglalja a gén *UAS-GAL4* rendszer vezérelt csendesítését és túltermeltetését (EP elem), valamint *EDTP* inszerciós mutánsok tanulmányozását. Az *EDTP*-RNSi *eyGal4*-BD-vel kisebb mértékű AO jelölést mutatott, mint az *eyGal4*-BD kontroll (14. A, C ábra), és Apolinerrel vizsgálva nem lehetett kimutatni apoptózist (15. A,C ábra). Az (EP)*EDTP^{EY22967}*; *eyGal4*-BD-t vizsgálva magasabb AO jelölést észleltem (14. A,B ábra), de az Apoliner használatával itt sem detektáltam apoptózist (15. A,B. ábra).

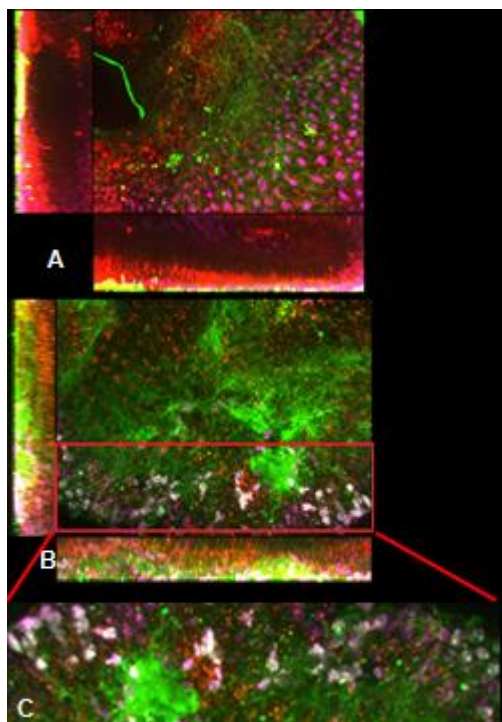
Az AO festés és az Apoliner vizsgálat során eltérő eredményeket kaptam ezért megvizsgáltam az (EP)*EDTP^{EY22967}*, *eyGal4*-KI állatok szemdiszkuszait is Apolinerrel (mivel az *eyGal4*-BD csak a morfogenetikai árok után mutat aktivitást, az *eyGal4*-KI viszont az egész szemdiszkuszban expresszál). Az *eyGal4*-KI használata mellett az *EDTP* túlexpresszálása apoptózishoz vezetett, miközben a kontrollban nem detektáltam apoptózist (16. ábra).



14. ábra Az EDTP túlexpresszállása esetén fokozódik, míg a csendesítése esetén csökken az apoptózis. Acridine Orange festéssel készült képek (400x nagyítás) kései L3 stádiumú szemdiszkuuszról. A: eyGal4-BD (kontroll) B: (EP)EDTP^{EY22967}; eyGal4-BD C: eyGal4-BD, EDTP-RNSi. A nyilak az apoptózist jelölő AO pozitív struktúrák egy részét mutatják. A képek bal felső sarkában látható, hogy a szem-antenna diszkusz mely részletéről készült a kép (minden kép esetében az antenna rész a kép teteje felé néz).

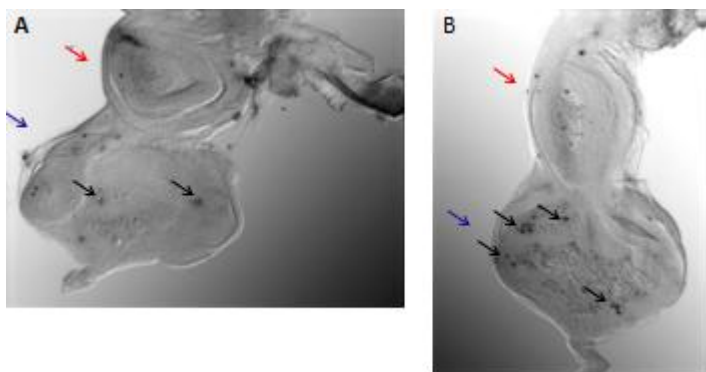


15. ábra Az EDTP túlexpresszállása és csendesítése esetén nem fokozódik az apoptózis eyGal4-BD-t használva. Apolinerrel és immunhisztokémiával készült képek (630x nagyítás) kései L3 stádiumú szemdiszkuuszról. A: eyGal4-BD (kontroll) B: (EP)EDTP^{EY22967}; eyGal4-BD C: eyGal4-BD, EDTP-RNSi. Az apoptózist a fehérén kolokalizáló Hoechst és eGFP mutatná. (magenta: Hoechst, zöld: eGFP, vörös mRFP)



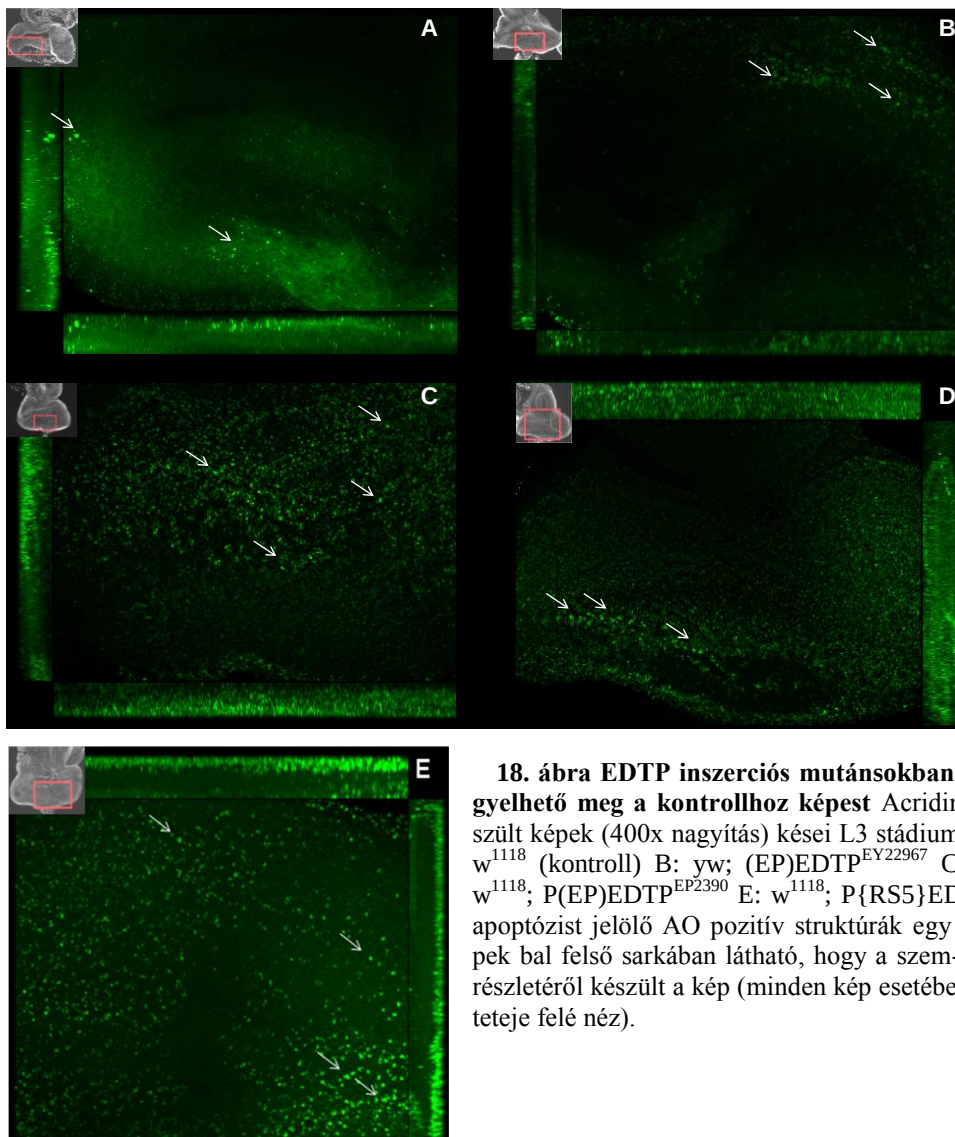
16. ábra Az EDTP túlexpresszáása apoptózishoz vezet eyGal4-KI használatával, a kontrollban nem volt apoptózis Apolinerrel és immunhisztokémiával készült képek (630x nagyítás) kései L3 stádiumú szemdiszkszról. A: eyGal4-KI, B és C: (EP)EDTP^{EY22967}, eyGal4-KI C: B képen pirossal keretezett rész nagyítása látható Az apoptózist a fehérén kolocalizáló Hoechst és eGFP mutatja. (magenta: Hoechst, zöld: eGFP, vörös: mRFP)

Az (EP)EDTP^{EY22967}, eyGal4-KI törzset TUNEL-próbával is megvizsgáltam, és fokozott apoptózist tapasztaltam a kontrollhoz képest (17. ábra).



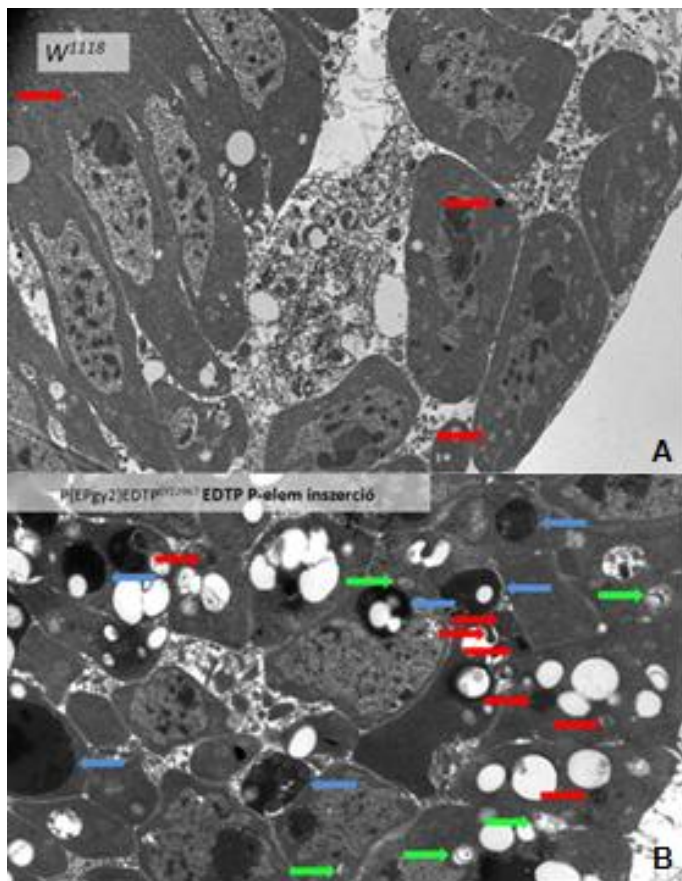
17. ábra Az (EP)EDTP^{EY22967}, eyGal4-KI fokozott apoptózist mutat a kontrollhoz képest TUNEL-próbával készült képek (400x nagyítás) kései L3 stádiumú szemdiszkszról. A eyGal4-KI (kontroll) B: (EP)EDTP^{EY22967}, eyGal4-KI. A fekete nyilak az apoptózist mutató TUNEL pozitív jelölések egy részét mutatják. A piros nyíl a szem-antennadiszksz antenna részét jelöli, a kék a szemrészt

Ezután négy P elem inszerciós EDTP mutánst vizsgáltam meg AO festéssel. Mindegyik esetben fokozott apoptózist detektáltam a kontrollhoz képest (18. ábra).



18. ábra EDTP inszerciós mutánsokban fokozott apoptózis figyelhető meg a kontrollhoz képest Acridine Orange festéssel készült képek (400x nagyítás) kései L3 stádiumú szemdiszkuszról. A: w^{1118} (kontroll) B: yw ; (EP)EDTP^{EY22967} C: yw ; EDTP^{KG04513} D: w^{1118} ; P(EP)EDTP^{EP2390} E: w^{1118} ; P{RS5}EDTP^{5-SZ-3559} A nyilak az apoptózist jelölő AO pozitív struktúrák egy részét mutatják. A képek bal felső sarkában látható, hogy a szem-antenna diszkusz mely részletéről készült a kép (minden kép esetében az antenna rész a kép teteje felé néz).

Az (EP)EDTP^{EY22967} inszerciós mutáns törzsről elektronmikroszkópos felvételek is készültek, melyek szintén azt mutatják, hogy EDTP funkciósökkenéses mutáns genetikai háttérben fokozott apoptózis történik a kontrollhoz képest (19. ábra). (Egyúttal a megnövekedett autofág aktivitás is jól látható.)



19. ábra Az (EP)EDTP^{EY22967} inserciós mutánsban fokozott apoptózis figyelhető meg a kontrollhoz képest. Elektronmikroszkópia kései L3 stádiumú szemdiszkuszról. A: w¹¹¹⁸ (kontroll) B: yw; (EP)EDTP^{EY22967}. A piros nyilak az autofág struktúrákat, a kék nyilak az apoptotikus struktúrákat és a zöld nyilak a multivezikuláris testeket mutatják. A képeket Dr. Sass Miklós készítette.

4.4 Következtetések

Acridine Orange, Apoliner és TUNEL eredményeim szerint az *Atg14* és *Atg101* autofág gének csendesítésének hatására fokozódik az apoptózis mértéke kései L3 szemdiszkuszokban. Az EDTP túltermeltetése révén gátolt autofágia szintén intenzív sejthalálhoz vezet ebben a stádiumban (AO, Apoliner, TUNEL). Ezen eredményekből azt feltételezem, hogy az autofág-deficiens egyedekben a szem redukálódásának legalább részben magyarázata, hogy a normális fejlődés során szemet kialakító sejtek egy része elpusztul apoptózissal. Ezt támaszthatja alá a még nem vizsgált két komplexbe (az ubiquitinszerű protein konjugációs rendszerbe és reciklizációs komplexbe) tartozó autofág gének analízise is, mely terveim között szerepel. Másrészt azt is megfigyeltem, hogy az *Atg14* és *Atg101* gének csendesítésének hatására a szemdiszkuszok morfológiája rendellenes, méretük redukált. Elképzelhető, hogy az apoptózis nagy része a kései L3 stádium előtt megy végbe a szemdiszkuszokban, de ezzel szemben vagy e mellett lehet, hogy a sejtek egy része ki sem alakul. Ezért további céljaim közé tartozik korábbi lárvastádiumok vizsgálata is. Hogy a fokozott mértékű autofág aktivitás szintén vezet-e

fokozott mértékű apoptózishoz, eredményeink alapján egyelőre nem megválaszolható kérdés, mert az EDTP RNS interferencia általi géncsendesítése és a P elem inszerciós mutánsok vizsgálata eltérő eredményre vezetett.

Amennyiben munkám során bizonyítást nyer, hogy a csökkent autofág aktivitás következtében meghalnak a szemsejtek apoptózissal, akkor szeretném kideríteni, hogy az autofág működés milyen módon akadályozza meg a programozott sejthalált, mi az autofágia funkciója az összetett szem morfogenezise során.

5. Összefoglaló

Az autofágia az eukarióta sejtek szabályozott, lizoszóma-közvetített önemésztő folyamata. A károsodott sejtalkotók és fehérjék lebontását végzi, így a differenciálódott sejtek fő citoprotektív mechanizmusa, ezzel összhangban szerepe van a stresszválaszban, az öregedési folyamatban és az időskori betegségek kialakulásában. Az autofág folyamat jelentősége az egyedfejlődés során is megfigyelhető: a sejtek átépülésében, differenciálódásában és a sejtméret kialakulásában is részt vesz.

Munkacsoportunk az autofágia fejlődésbiológiai szerepével foglalkozik az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) szem kialakulása során. A fejlődő szemben rendellenes autofág aktivitással rendelkező imágók szeme csökevényes a vad típushoz képest (kisebb vagy egyáltalán nem fejlődik ki). Az egyik lehetséges magyarázat, hogy a kialakult (és akár differenciálódott) sejtek apoptózissal elpusztulnak.

Az apoptózis, más néven I.-es típusú programozott sejthalál, a sejt szabályozott önpusztító folyamata, melyben a sejt fehérjéinek bontását kaspázok végzik. Az autofágia (sejt védelem) és az apoptózis (sejt önpusztulás) kapcsolata intenzív kutatás tárgya.

Az apoptózist a fejlődő szemben Acridine Orange festéssel, (kaspázaktivitást detektáló) Apolinerrel és TUNEL-próbával vizsgáltam. A csökkent autofág aktivitás mellett magasabb szintű sejtpusztulást észleltem. Eredményeink alapján azt feltételezem, hogy a rendellenesen működő autofágia valamilyen módon növeli az apoptózis mértékét.

6. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Vellai Tibornak, hogy sokrétű vizsgálatokat végezhettem; Billes Viktornak a munkámhoz és az írásban való sok segítségéért; Lőrincz Péternek a mikroszkópiában; Dr. Varga Máténak és Kovács Tibornak a vizsgálati módszerek elsajátításában nyújtott segítségéért és Dr. Sass Miklósnak az elektron-mikroszkópiában való segítségéért.

7. Irodalom

- Bardet P, Kolahgar G, Mynett A, Miguel-Aliaga I, Briscoe J, Meier P, Vincent J. (2008) A fluorescent reporter of caspase activity for live imaging. PNAS 37(105):13901–13905
- Danial NN, Korsmeyer SJ. (2004) Cell Death: Critical Control Points Review. Cell 116:205-219
- Denton D, Shrivage B, Simin R, Mills K, Berry DL, Baehrecke EH, Kumar S. (2009) Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in Drosophila. Curr Biol. 19(20):1741-6
- Duffy JB. (2002) GAL4 System in Drosophila: A Fly Geneticist's Swiss Army Knife. Genesis 34:1–15
- Halder G, Callaerts P, Flister S, Walldorf U, Kloter U, Gehring WJ. (1998). Eyeless initiates the expression of both sine oculis and eyes absent during Drosophila compound eye development. Development 125(12): 2181--2191.
- Hay BA, Wolff T, Rubin GM. (1994) Expression of baculovirus P35 prevents cell death in Drosophila. Development 120:2121-2129
- Goyal L, McCall K, Agapite J, Hartwig E, Steller H. (2000) Induction of apoptosis by Drosophila reaper, hid and grim through inhibition of IAP function. EMBO J. 19, 589±597.
- Kumar JP. (2009) The Molecular Circuitry Governing Retinal Determination. Biochim Biophys Acta. 1789(4): 306–314.
- Maiuri MC, Toumelin G, Criollo A, Rain J, Gautier F, Juin P, Tasdemir E, Pierron G, Troulinaki K, Tavernarakis N, Hickman JA, Geneste O, Kroemer G. (2007) Functional and physical interaction between Bcl-XL and a BH3-like domain in Beclin-1. EMBO J. 26, 2527 - 2539
- Mizushima N. (2008) The role of PI3P phosphatases in the regulation of autophagy. EMBO reports 9:859 - 864
- Mizushima N, Levine B. (2010) Autophagy in mammalian development and differentiation. Nature cell biology 9(12):823-830
- Pappu KS, Mardon G. (2004) Genetic control of retinal specification and determination in Drosophila. Int. J. Dev. Biol. 48: 913-924

Periyasamy-Thandavan S, Jiang M, Schoenlein P, Zheng Dong Z. (2009) Autophagy: molecular machinery, regulation, and implications for renal pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 297(2):F244-56.

Quiring R, Walldorf U, Kloter U, Gehring WJ. (1994) Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans. *Science*. 265(5173):785-9.

Rorth P. (1996) A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93(22): 12418-12422

Vergne I, Roberts E, Elmaoued RA, Tosch V, Delgado MA, Proikas-Cezanne T, Laporte J, Deretic V. (2009) Control of autophagy initiation by phosphoinositide 3-phosphatase Jumpy. *EMBO J.* 28(15):2244-58.

Wang SL, Hawkins CJ, Yoo SJ. (1999) The *Drosophila* caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively Rregulated by HID. *Cell* 98:453-463

8. Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott Szincsik Sára a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- törzsek és utódnemzedékek létrehozását,
- Acridine Orange festést,
- Apolineres vizsgálatokat,
- TUNEL-próbát,

végeztem el.

.....

aláírás

Érd, 2012 január 08.