

XXXII. OTDK Biológia Szekció

A Drosophila Mon1-Ccz1 Rab7 GEF komplex szerepe az autofágiában

Boda Attila

biológus M.Sc., 1. évfolyam

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Témavezetők:

dr. Hegedűs Krisztina, tudományos munkatárs

dr. Juhász Gábor, tudományos főmunkatárs

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	3
1. Bevezetés.....	4
1.1. Az autofágia	4
1.2. Az endocitózis és az autofágia kapcsolata	5
1.3. A <i>Drosophila</i> , mint modellállat az autofágia-kutatásban	6
2. Célkitűzések	7
3. Anyagok és módszerek.....	7
3.1. <i>Muslica</i> genetika	7
3.2. Fluoreszcens mikroszkópia és klonális analízis	9
3.3. Elektronmikroszkópia.....	11
3.4. Western blot.....	11
4. Eredmények és megvitatásuk	12
4.1. <i>Ccz1</i> null mutáció előállítása transzpozon-ugratással.....	12
4.2. A Rab7-modul szerepe az endocitózisban	13
4.3. A Rab7-modul autofágiában betöltött szerepének vizsgálata	14
4.4. A Rab7-modul mutánsok fenotípusának vizsgálata elektronmikroszkópiával	17
4.5. A Rab5-funkcióvesztés hatása az autofágiára és a lizoszómák fejlődésére	17
4.6. A Rab5 szelektív autofágiában betöltött szerepének vizsgálata	22
4.7. Konklúzió	23
5. Összefoglaló.....	25

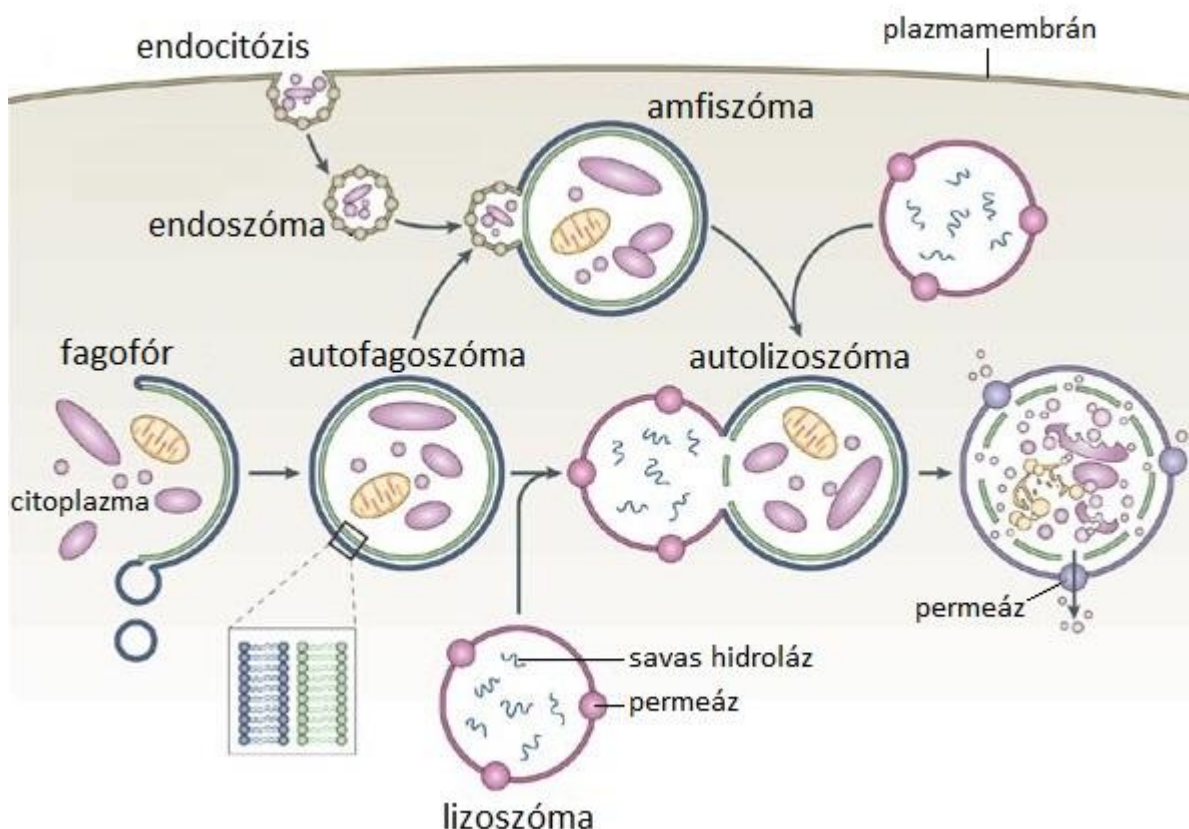
Rövidítésjegyzék

Act	Actin-promoter
AP	alkalikus foszfatáz
Atg	Autophagy-related Gene
BcGl	Black cell – Glazed
Boss	bride of Sevenless
Ccz1	Calcium-caffeine-zinc sensitivity protein 1
CyO	Curly O
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
Dcr2	Dicer2
EOS	ER-localized and oxidants sensitive protein 1
FRT	Flippase Recognition Target
FYVE	Fab1-YOTB-Vac1-EEA1
GAP	GTPase Activator Protein
GEF	Guanosine Exchange Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
HOPS	Homotypic Fusion and Vacuole Protein Sorting
hs-Flp	heat shock-activated Flippase
Lamp	Lysosome Associated Membrane Protein
LTR	LysoTracker Red
MARCM	Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker
Mon1	Monensin Sensitivity Protein 1
NBT-BCIP	Tetrazolium-5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphate
nls	nuclear localization signal
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBTX-DOC	PBS+Triton X-100+nátrium-dezoxikolát
PI3K	foszfatidil-inozitol-3-kináz
PI3P	foszfatidil-inozitol-3-foszfát
QF	Q Factor
QS	Q Supressor
QUAS	Q Upstream Activating Sequence
Rab	Ras-related proteins in brain
Ref(2)P	refractory to sigma P
Sev	Sevenless
SNAP29	Soluble N-methylmaleimide sensitive factor Attachment Protein 29
SNARE	SNAP Receptor
TBST	Tris Buffered Saline + Tween20
tub	Tubulin-promoter
UAS	Upstream Activating Sequence
UC8	UAS-mCherry-Atg8a
VAMP7/8	Vesicle Associated Membrane Protein 7/8

1. Bevezetés

1.1. Az autofágia

Az autofágia az eukarióta sejtek önmérsztő folyamata, amely nélkülözhetetlen azok normális működéséhez. Legfontosabb típusa a makroautofágia (a továbbiakban az egyszerűség kedvéért autofágia). Ennek során először egy membránciszterna, a fagofór alakul ki, amely növekedése során a lebontandó citoplazma-részletet a benne lévő organelumokkal együtt fokozatosan körülfogja. A fagofór záródásával egy kettős membránnal határolt vezikula, autofagoszóma jön létre, amely lizoszómával egyesülve autolizoszómává alakul [2]. Emellett az autofagoszómák képesek endoszómákkal is fúzionálni, ennek eredményeként amfiszómákat hoznak létre, amelyek végül szintén lizoszómákkal egyesülnek [3] (1. ábra). Az autolizoszómák savas belső terében hidrolázok aktiválódnak, amelyek a bejutott anyagot lebontják. Az autofagoszóma-képződés a konzervált és sokat tanulmányozott Atg



1. ábra. A lizoszóma felé irányuló lebontó útvonalak. Az endoszómák kívülről felvett anyagokat, míg az autofagoszómák a sejt saját anyagait szállítják a lizoszóma felé. A két útvonal az amfiszómák szintjén találkozik egymással. A lizoszómába került anyagok a savas hidrolázok működése révén lebomlanak. A lebontásból származó, újra felhasználható molekulák permeázokon keresztül visszakerülhetnek a citoplazmába. [1]

(Autophagy-related Genes) gének működése révén valósul meg [4]. Ezeket először élesztőben [5] [6], majd később állatokban is leírták [7]. Állati rendszerekben a lizoszómával történő fúzióban szereplő gének is konzerváltak, ebben a lépésben a HOPS-komplex (Homotypic Fusion and Vacuole Protein Sorting) és bizonyos SNARE- (SNAP Receptor) fehérjék (ecetmuslica/egér: Syntaxin17, VAMP7/VAMP8 (Vesicle Associated Membrane Protein 7/8), ubisnap/SNAP29 (Soluble N-methylmaleimide sensitive factor Attachment Protein 29)) vesznek részt [8] [9].

Általánosan elmondható, hogy az autofágia alapvető fontosságú a sejtek normális homeodinamikájának fenntartásában. Ha működése zavart szenved, különféle betegségek alakulhatnak ki. A sejtekre állandó, alapszintű autofág aktivitás jellemző (bazális autofágia), de az autofágia mértéke növekedhet stressz hatására (stresszindukált autofágia, pl. éhezés vagy oxidatív stressz) [10] [11], vagy a fejlődés adott szakaszában megfelelő hormonok jelenlétében (fejlődési autofágia) [12].

Az utóbbi időben a sejtszociológia igen fontos területévé vált az autofágia kutatása. Bár már nagy mennyiségű eredmény áll rendelkezésünkre, az autofágia folyamatában szereplő komponenseket és azok pontos funkcióját még nem ismerjük kellő részletességgel.

1.2. Az endocitózis és az autofágia kapcsolata

A sejtek membránforgalmának, így például az endocitózisnak egyik legfőbb szabályozói a Rab- (Ras-related proteins in brain) családba tartozó fehérjék. Ezek kis méretű GTP-ázok, amelyek azáltal aktiválódnak, hogy rajtuk a GEF fehérjék (guanine exchange factor) a GDP-t GTP-re cserélik. Aktivált formában a Rab-ok képesek effektoraihoz kötni és rajtuk keresztül töltik be szabályozó szerepüket a membránok szállításában és fúziójában. A Rab-ok inaktiválását a hozzájuk kapcsolódó GAP (GTPase Activator Protein) fehérjék végzik, melyek aktiválják a GTP-áz funkciót, így az immár GDP-t hordozó Rab már nem képes effektoraihoz kötni [13].

Az endolizoszómális útvonal fő szabályozói a Rab5 és a Rab7. A Rab5 a korai endoszómák fúziós eseményeiben játszik szerepet (endoszómák egymással és endocitotikus vezikulákkal történő fúziói) [14], míg a Rab7 a késői endoszómális fúziók szabályozója (késői endoszómák egymással, lizoszómákkal és autofagoszómákkal történő fúziói) [15].

A Rab7 szerepe az autofágiában is ismert [16]. Ezt a szerepét minden bizonnyal egyik effektorán, a HOPS-komplexeen keresztül gyakorolja, amely az autofagoszóma-lizoszóma fúzióhoz szükséges [17]. A Rab5 autofágiában betöltött szerepe sokkal ellentmondásosabb. Élesztőben leírták róla, hogy hiányában az autofagoszómák nem képesek fuzionálni a

vakuólummal (lizoszóma analóg) [18], ezzel szemben egy Rab5-csendesített egerekről szóló tanulmányban nem találtak autofagoszóma-felhalmozódást májsejtekben [19].

A normális ütemű lizoszómális lebontás szempontjából tehát fontos, hogy a Rab5 és Rab7 aránya megfelelő legyen a kompartmenteken. Ebben a Mon1-Ccz1 heterodimer (Calcium-Caffeine-Zinc sensitivity protein 1; Monensin Sensitivity Protein 1) játszik kulcsszerepet, amely a Rab7-et aktiváló GEF-komplex. Működése során az endoszómák felszínén a Rab5 fehérjék Rab7-re való cserélésében (Rab-konverzió) is részt vesz, ezáltal a korai endoszómák késői endoszómákká alakulnak [20] [21]. A Mon1-Ccz1 komplexnek és a Rab7-nek ezt a rendszerét Rab7-modulnak nevezzük [22].

A Mon1-Ccz1 részvétele az autofágiában élesztőben már le van írva [23], ugyanakkor muslicában kérdéses a szerepe, hiszen egy nemrég megjelent publikáció szerint a Mon1 nem szükséges az autofágiához [24]. Ez meglepő eredmény, hiszen kutatócsoportunk korábban kimutatta a muslica Rab7-effektorok szerepét az autofágiában [17]. Ezért célul tűztem ki, hogy tisztázzam a Mon1-Ccz1 komplex, a Rab7 és a Rab5 funkcióját és egymáshoz való viszonyát az autofágiában.

1.3. A *Drosophila*, mint modellállat az autofágia-kutatásban

A kutatáshoz használt modellállatom a *Drosophila melanogaster* (ecetmuslica) volt. A muslica a genetikai kutatások egyik legkedveltebb modellje. Ennek okai többek között az egyszerű genomszerveződés (a muslicák mindössze 4 pár kromoszómával rendelkeznek), a számos, transzgénikus és mutáns vonal a törzsgyűjteményekben, az egyszerű és olcsó fenntartás, valamint a rövid generációs idő [25].

A muslica egyedfejlődése alig 10 napos: a petéből 1 nap után kibújnak a lárvák, amelyek fejlődése L1, L2 és L3 stádiumra osztható. Az L1 és az L2 stádium 1-1 napig, míg az L3 nagyjából 2 napig tart. Az L3 fázis további két részre bontható: egy korai, táplálkozó fázisra, amikor a lárvák a táptalajban folyamatosan táplálkoznak, valamint egy késői, vándorló fázisra, amikor elhagyják a tápot és elindulnak a bebábozódásra alkalmas hely felé. Ekkor már nem táplálkoznak, hanem a zsírtestjükben felhalmozott tápanyagok bontásából fedezik energiaszükségletüket. A bebábozódás után néhány nap elteltével kikelnek az imágók.

A muslica lárváinak zsírtestje különösen alkalmas az autofágia vizsgálatára, ugyanis nagyméretű, poliploid sejtek egyetlen rétegéből áll, melyek remekül vizsgálhatóak fénymikroszkóppal. A zsírtestben az életciklus két szakaszában is vizsgálható az autofágia: az L3 stádium táplálkozó időszakában az alapszintű folyamat és pár órás éhezés után a stresszindukált autofágia is megfigyelhető. A másik időpont az L3 vándorló szakasz, mely

során fejlődési jel (ekdizon hormon) hatására indul be az autofágia, az átalakuláshoz szükséges tápanyagok felszabadítása céljából [12].

A muslicában viszonylag egyszerűen hozhatunk létre mutációkat, irányított mutagenézissel. Ennek egyik elterjedt módszere a P-elem-ugratás. A P-elem egy *Drosophilában* széles körben használt transzpozon, amelynek módosított változata nem tartalmaz transzpozázt, így nem képes mozogni a genomban, viszont transzpozáz-forrást tartalmazó muslicákkal való keresztezéssel remobilizálható [26]. A mutagenézishez olyan törzset használtam, amely a célgénben hordoz egy P-elemet. A kiugratás az esetek kis százalékában nem pontos, így kisebb-nagyobb deléciós és inszerciós mutánsok jöhetnek létre. A P-elem mozgását a benne lévő marker allél segítségével nyomon követhetjük. Ez leggyakrabban a *white* gén vad típusú allélja (w^+), amely piros szemszínt ad. A P-elemet hordozó állatok tehát w^-/w^- hátteren dolgozva is piros szemszínt mutatnak. Így mutagenézis során a transzpozon kiugrása detektálható a piros szemszín elvesztésével. A transzpozázra és a P-elemre heterozigóta állatok (ún. jump starter-ek) sejtjeiben képes ugrani a P-elem, mely az ugrást követően egyes sejtekből el is veszhet. Ezek utódai közül azokat keressük, akik olyan ivarsejtből kapták a genetikai anyagukat, amelyben a P-elem kiugrott. Ezek fehér szeműek lesznek. Az ilyen utódokat egyenként keresztezzük és kiválasztjuk közülük azokat a vonalakat, amelyben a kiugrás során a célgén egy darabja is kiesett, azaz deléciós mutáns allél jött létre (erre komplementációs teszttel és PCR-rel következtethetünk).

2. Célkitűzések

1. *Ccz1* null mutáns vonalak előállítása transzpozon-ugratással.
2. A létrehozott mutációk és az ismert *Mon1[d4]* mutáns fenotípusának karakterizálása különböző módszerekkel; a Rab7-modul szerepének tanulmányozása az autofágiában.
3. A Rab7-modul funkcióvesztés fenotípusának menekítése vad típusú transzgénekkel.
4. A Rab5 autofágiában betöltött szerepének és a Rab7-modulhoz való viszonyának tisztázása.

3. Anyagok és módszerek

3.1. *Muslica* genetika

A muslicák fenntartása: muslicákat üvegcsővekben, kukoricaliszt-alapú, agart és élesztőt is tartalmazó táptalajon tartottam fenn. A vizsgálatokhoz a törzseket és keresztezéseket tartalmazó üvegcsőveket termosztátban (25°C, 60%-os páratartalom) tartottam. A

stresszindukált autofágia tanulmányozásához L3 táplálkozó stádiumú lárvákat éheztettem 20%-os szacharóz-oldatban. A fejlődési autofágiát L3 vándorló korú állatokon vizsgáltam.

Ccz1 null mutáció előállítás: a transzpozon-ugratáshoz egy, a *Ccz1* génben P-elemet hordozó törzset (EY16389, BDSC törzsközpont) használtam. Az ugratás sikerességét ún. egylégy-PCR-el ellenőriztem Phire® Animal Tissue Direct PCR Kit (Finnzymes) segítségével. A megrendelt primereket 0,5 µM végkoncentrációban alkalmaztam. A PCR-termékeket gélelektroforézissel futtattam 1%-os agaróz gélben (A létra típusa: GeneRuler™ 1 kb Plus). A generált deléciós allélok szekvenálásához a PCR terméket fragmentizolálásra alkalmas, speciális agaróz gélen (1%-os) futtattam, amelyből a fragmenteket visszaizoláltam GeneJet™ Gel Extraction Kit (Fermentas) segítségével. A szekvenálást a Biomi Kft. végezte.

RNSi vonalak: a vizsgálatokhoz használt UAS-RNS-interferencia transzgént hordozó törzsek: *Rab7* RNSi (40337), *Ccz1* RNSi (18479), *Mon1* RNSi (11926R-3 és 11926R-1). Az első kettőt a Vienna Drosophila RNAi Center-ből, a másik kettőt pedig a National Institute of Genetics-Fly gyűjteményből rendeltük.

További felhasznált muslica vonalak és forrásaik: A *Rab7[d1]* null mutációt Hegedűs Krisztina kollégám állította elő, szintén transzpozon-ugratással. A *Rab5[d2]*-mutációt (42702) és a *hs-Gal4* transzgént (2077) hordozó állatokat a BDSC (Bloomington Drosophila Stock Center) törzsközpontból rendeltük, a *Mon1[d4]* allélt dr. Thomas Klein-től (Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) kaptuk.

Az esetleges háttérmutációk hatásait kiküszöbölendő a mutáns alléleket nagyméretű deficienciákkal szemben, hemizigóta formában vizsgáltam. A felhasznált deléciók: *Ccz1Df* (EXEL6098), *Mon1Df* (ED7853), *Rab7Df* (EXEL16196). Ezek is a BDSC-ből származtak.

Menekítéses kísérleteimhez *UAS-YFP-Rab7* (vad típusú *Rab7*), *UAS-YFP-Rab7[Q67L]* (GTP kötött, állandóan aktív *Rab7*), *UAS-Mon1-HA* (vad típusú *Mon1*), *UAS-Ccz1-EOS* (vad típusú *Ccz1*) (EOS: ER-localized and oxidants sensitive protein 1) transzgéneket használtunk (az első kettőt a BDSC-ből, a másik kettőt dr. Thomas Klein-től kaptuk).

A felhasznált riporterok közül az *r4-mCherry-Atg8a*-t, az *UAS-FYVE-GFP*-t és az *UAS-p62-GFP*-t dr. Thomas Neufeld-től (Department of Genetics, Cell Biology and Development, University of Minnesota, Minneapolis), az *UAS-Lamp-GFP*-t dr. Helmut Kramer-től (Department of Cell Biology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas) kaptuk.

Alkalmazott balanszer kromoszómák: a különböző mutáns törzseket balanszer felett tartottam fenn. Ezek a következők voltak: II. kromoszóma: BcGl (Black Cell-Glazed) és

CyO-GFP (CurlyO-GFP); III. kromoszóma: TM3 és TM6; II. és III. kromoszóma együtt: SM6-TM6 (ST6).

3.2. Fluoreszcens mikroszkópia és klonális analízis

A fénymikroszkópos vizsgálatokhoz sztereomikroszkóp alatt, glicerín-PBS (Phosphate Buffered Saline) 1:1 oldatában boncoltam ki és fedtem le a lárvák zsírtestjét. Az oldatban 0,2 µg/ml higításban DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) sejtmagfesték is volt. A savas kompartmentek vizsgálatához LysoTracker Red (LTR) festékben boncoltam (25 pmol/ml, PBS-ben hígítva), majd a festék leszívása után glicerín-PBS-DAPI oldatban fedtem le. A kipreparált mintákat Apotome feltétellel ellátott Zeiss AxioImager M2 fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltam.

Autofág struktúrák vizsgálata RNSi klónsejtekben: az RNSi transzgének UAS-Gal4-rendszer segítségével hoztam működésbe. Ennek lényege, hogy a Gal4 transzkripciós aktivátor az UAS-promoterhez köt és kiváltja az UAS (Upstream Activating Sequence) által meghajtott gének transzkripcióját [27]. A keresztezéseket 25°C-on tartottam. Az RNSi törzseket elsőként *hs-Flp; r4-mCherry-Atg8a, UAS-Dcr2; Act>CD2>Gal4, UAS-GFPnls* (*nls*: nuclear localization signal; *Dcr2*: Dicer2) muslicákkal kereszteztem. 25°C-on a fejlődő embriók sejtjeiben véletlenszerűen aktiválódik a hősokk-promoter által meghajtott Flp-rekombináza, amely kivágja az *FRT* (flippase recognition target) helyekkel (>) határolt *CD2*-spacer régiót, ezáltal a Gal4 a konstitutívan aktív aktin-promoter (*Act*) közelébe kerül. Így a Gal4 csak bizonyos sejtekben, illetve azok utódaiban (klónok) expresszálódik és köt az UAS-promoterekhez. Ennek hatására ezen sejtekben kifejeződik a GFP (Green Fluorescent Protein), az RNSi, valamint a Dicer2 (RNSi hatás fokozására). Így azok a sejtek, amelyekben az RNSi működik, azonosíthatóak lesznek a GFP-jel alapján. Az *r4* egy zsírtest-specifikus promoter, tehát az *mCherry-Atg8a* riportert minden zsírtest-sejtben expresszálni fog.

Az autofagoszóma-lizoszóma fúzió vizsgálata RNSi klónsejtekben: az UAS-RNSi-t hordozó vonalakba bevitettem az *UAS-mCherry-Atg8a (UC8)* riportert, majd ezeket az állatokat *hs-Flp; UAS-Lamp-GFP; Act>CD2>Gal4, UAS-Dcr2* törzsszel kereszteztem. Így a Gal4-et termelő klónsejtekben átíródott az *mCherry-Atg8a* és a *Lamp-GFP* (Lysosome Associated Membrane Protein-GFP). A vizsgálathoz tartozó statisztikához a piros, a zöld és a kolokalizáló pöttyöket genotípusonként 8-8 sejtől, kézzel, sötétszobában számoltam le. A diagramokat az egyes pöttyszámok átlagából készítettem.

Szomatikus klónok generálása MARCM rendszerrel: amennyiben a mutációnk olyan kromoszóma-karon van, melyen a centromer közelében van egy *FRT* hely (pl.: 40A) és egy olyan vad típusú kromoszómával kerül heterozigóta helyzetbe, mely szintén ugyabban a

pozícióban hordoz egy *FRT* helyet, az Flp képes mitotikus rekombinációt indukálni az *FRT*-k között, így a két kromoszóma-kar kicserélődik. Az ezt követő mitózis során olyan rekombináns utódsejtek keletkezhetnek, melyek a mutációra homozigóták, az őket körülvevő sejtek viszont vad típusúak. Az általam használt *hs-Flp; FRT40A tubQS; et49QF, QUAS-GFP* a QF-*QUAS*-QS rendszer (MARCM, Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker) segítségével működött [28]. Ezen állatokban az *et49* konstitutív promóter miatt nagy mennyiségben termelődő QF (Q Factor) egy transzkripciós aktivátor, mely a *QUAS* (Q Upstream Activating Sequence) enhanszerhez kötve aktiválta volna a GFP átírását, de a szintén nagy számban jelenlevő, tubulin (*tub*) promóterrel hajtott, *FRT40A*-s kromoszómakaron lévő QS (Q Suppressor; a QF szuppresszora) ezt megakadályozta. Amennyiben a fenti törzsünket *FRT40A*-s kromoszómán mutációt hordozó vonallal kereszteztem, az embriók hősokkolása (*hs-Flp* aktiválása) után olyan utódokat kaptam, melyekben a *tubQS*/mutáció genotípusú sejtek mellett *tubQS/tubQS* és mutáció/mutáció rekombináns klónok is létrejöttek. Mivel a mutációra homozigóta sejtekben nem volt QS, ezekben megszólalt a GFP, a többi kontrollként szolgáló sejtben viszont néma maradt. Ezzel a módszerrel hoztunk létre *Rab5[d2]*, illetve *Mon1[d4]*, valamint *Rab5[d2]*, *Mon1[d4]* homozigóta mutáns és kettős mutáns klónokat.

Szomatikus klónok generálása klasszikus módszerrel: a klasszikus klónsejt-generálás során szintén a *hs-Flp* enzim okoz bizonyos valószínűségű szomatikus rekombinációt az *FRT*-helyek között. Ebben az esetben azonban nem a QS-QF rendszer működik, hanem az *FRT*-helyen lévő mutáns vonalat egy ugyanazon az *FRT*-pozíción lévő riporter gént hordozó vonallal keresztezzük. A szomatikus rekombináció során a két kromoszóma-kar kicserélődik, így lesznek riporter/riporter, riporter/mutáció és mutáció/mutáció genotípusú sejtjeink is. A MARCM-rendszerrel szemben tehát itt nem a riporter megléte, hanem a hiánya fogja jelölni a null mutáns klónsejteket. Ezzel a módszerrel is generáltam *Rab5[d2]* és *Mon1[d4]*, valamint *Rab5[d2]*, *Mon1[d4]* kettős mutáns homozigóta klónokat. Ezek létrehozásához az *FRT40A* helyet tartalmazó kromoszóma karon lévő *UAS-dsRed* riportert használtam, melyeket zsírtest specifikusan kifejeződő *fb-Gal4*-gyel hajtottam meg. Így ez esetben a mutáns klónokat a *dsRed* hiánya jelölte.

Endocitózis vizsgálatok: a Notch- és Boss-immujelöléshez L3-as vándorló lárvák szemcsáp-diszkuszait használtuk fel. A lárvákat kifordítottuk, majd szobahőmérsékleten fixáltuk 3,7% formaldehidet tartalmazó PBS-ben. A rögzített mintákat PBTX-DOC-ban (PBS+Triton X-100+nátrium-dezoxikolát) mostuk, majd egy éjszakát blokkoltuk 10% kecskeszérumot tartalmazó PBTX-DOC-ban 4°C-on. Ezt követte 90-90 perces inkubáció az elsődleges (egér

anti-Notch 1:50; nyúl anti-Boss 1:1000), majd a másodlagos (anti-egér-Alexa488; anti-nyúl-Alexa488) ellenanyagot tartalmazó oldatban (ellenanyag + 5% kecske szérum PBTX-DOC-ban), a kettő között PBTX-DOC-os mosással. Egy újabb PBTX-DOC-os mosást követően az állatokból kiboncoltuk a fejlődő szemeket, melyeket glicerín-PBS-DAPI oldatban fedtük le. Az anti-Notch és anti-Boss festést Nagy Péter kollégám készítette.

3.3. Elektronmikroszkópia

Az L3-as éhező és vándorló lárvákból kiboncolt szöveteket két éjszakán át fixáltam 4°C-on 3,2%-os paraformaldehidet, 0,5% glutáraldehidet, 1% szacharózt és 0,028% CaCl₂-t tartalmazó 1 N-os Na-kakodilát (pH 7,4) oldatban. Ezt követően a mintákat Pálfia Zsoltné kolléganőm, klasszikus eljárással műgyantába ágyazta, lemetszette és Reynolds-féle módszerrel kontrasztosította. Az ultravékony metszeteket, iTEM JEM-1011 (JEOL) transzmissziós elektronmikroszkóppal dr. Kovács Attila kollégám vizsgálta.

A *Rab5[d2]* és *Rab5[d2]*, *Mon1[d4]* klónsejtek elektronmikroszkópos vizsgálatához korrelatív elektronmikroszkópiát alkalmaztunk. Ennek során először fluoreszcens mikroszkóppal lefotóztam a klónsejteket, majd a fedőlemezen *in situ* rögzítve készítettük elő elektronmikroszkópiára ugyanezeket a mintákat. Az elektronmikroszkópban a fluoreszcens kép alapján azonosítottuk a klónsejteket.

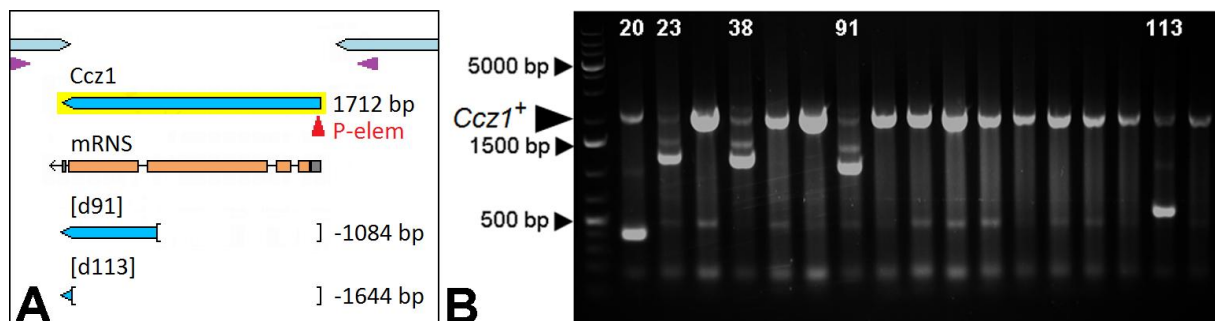
3.4. Western blot

A fehérjeminták készítése során a lárvákat lemértem, majd mg-onként 20 µl Laemmli-puffer és PBS 1:1 arányú oldatát hozzájuk mérve homogenizáltam és forraltam őket. Centrifugálást követően a fehérjét tartalmazó felülúszót leszívtam és -20°C-on tároltam. A Western blot során azonos mennyiségeket futtattam poliakrilamid-gélen, majd a fehérjéket Immobilon-P PVDF-típusú membránra futtattam át. Ezt egy éjszakán át blokkoltam 0,5%-os kazeinben 4°C-on, majd kazein és TBST (Tris Buffered Saline, pH 7.4 + 0.1% Tween20) 1:1 oldatában oldott, a célfehérjéket specifikusan felismerő elsődleges ellenanyagokkal (nyúl anti-p62 1:5000, nyúl anti-Atg8a 1:5000, egér anti-Tubulin 1:2000) inkubáltam 1 órát. Ezután az ugyanebben az oldatban oldott, alkalikus foszfatázzal (AP) konjugált másodlagos ellenanyagokkal inkubáltam 1 órát (anti-nyúl-AP és anti-egér-AP, mindkettő 1:5000). Mindkét inkubáció után 3x10 perc mosás következett TBST-ben. Végül NBT-BCIP-oldattal (NitroBlue Tetrazolium-5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphate) hívtam elő a fehérjéket (az NBT-BCIP az alkalikus foszfatáz szubsztrátja, amely az enzimreakció során színváltozást eredményez).

4. Eredmények és megvitatásuk

4.1. *Ccz1* null mutáció előállítása transzpozon-ugratással

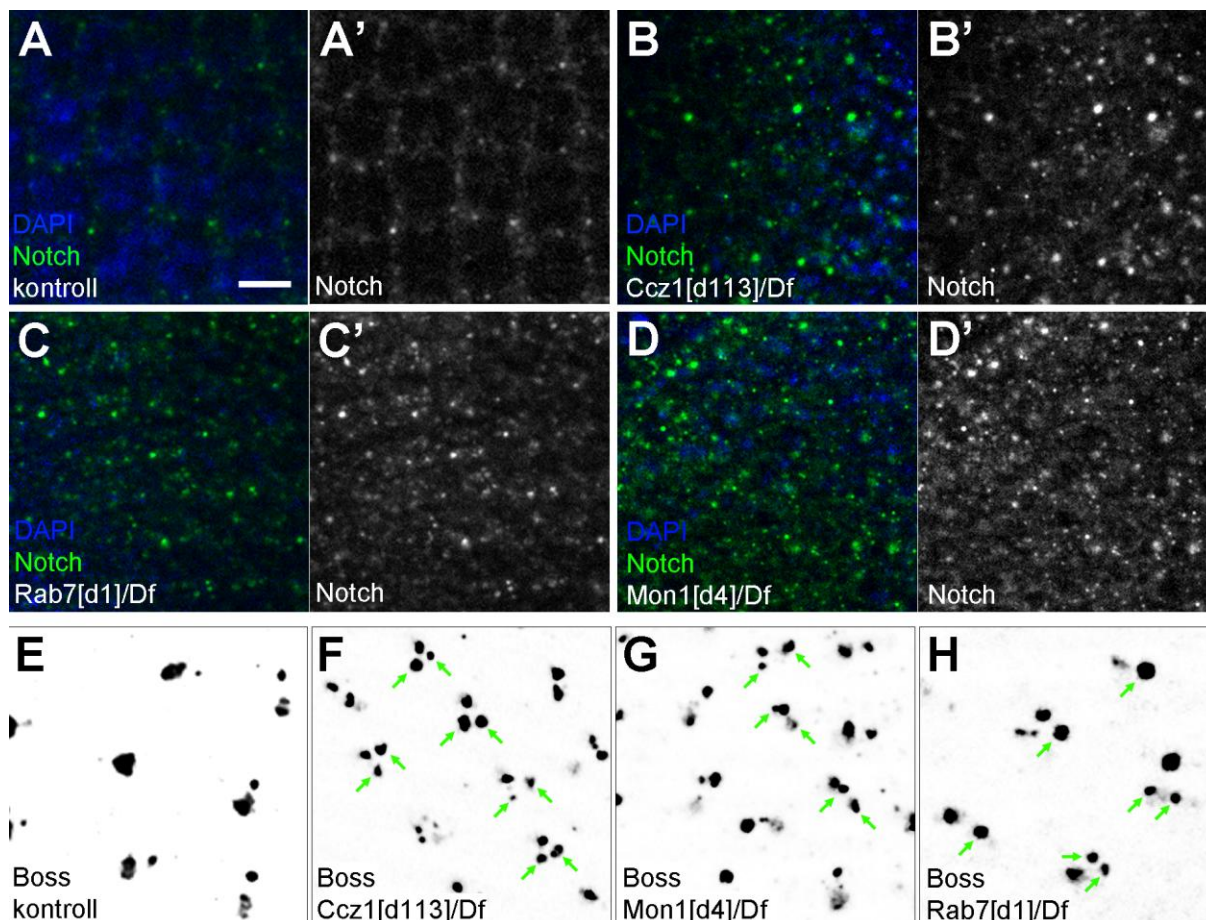
A *Ccz1* génre *Drosophilában* nem volt elérhető null mutáns allél, így ezt én állítottam elő transzpozon-ugratással (**2.A ábra**). Rendelkezésünkre állt az a vonal, mely az EY16389 számú P-elemet hordozta a *Ccz1* génben. Ezen törzs egyedeit transzpozázt ($\Delta 2-3$) hordozó muslicákkal kereszteztem, majd az 1.3. alfejezetben leírtak szerint végeztem a P-elem ugratást. Az esetlegesen létrejövő mutáció jelenlétét először komplementációs teszttel vizsgáltam. Ezt az tette lehetővé, hogy az ismert *Mon1[d4]/Mon1Df* hemizigóta egyedek szemiletalitást (bábból csak kevés imágó kel ki, és azok is pár napon belül elpusztulnak), illetve a szintén laborunk által létrehozott *Rab7[d1]/Rab7Df* állatok pedig pharate adult letalitást (közvetlenül a bábból való kikelés előtt pusztul el) mutattak, ezért feltételeztem, hogy a *Ccz1* null mutánsok fenotípusa is hasonló lesz. A P-elem ugratás után létrejövő, potenciálisan mutációt hordozó legyek közül a hímeket egyenként kereszteztem a *Ccz1Df*-át hordozó szűz nőtényekhez. Az így elvégzett komplementációs vizsgálat alapján 17 letális vonalat azonosítottam, melyekből heterozigóta egyedeket választottam ki és PCR-el amplifikáltam belőlük a *Ccz1* lókuszt. A PCR-termékek futtatása alapján 5 db *Ccz1* deléciós mutáns allélt sikerült előállítanom (**2.A-B ábra**).



2. ábra. Irányított mutagenézis a *Ccz1* génre transzpozon-ugratással. (A) A vad típusú *Ccz1* gén és az általam létrehozott deléciós allélok. A lila nyílhegyek a primerek pozícióját mutatják. **(B)** A PCR-rel vizsgált 17 potenciális mutáns vonal géliképe. Mivel heterozigóta állatokon végeztem a reakciót, ezekben az oszlopokban a vad típusú allél PCR-terméke (*Ccz1*⁺) is megtalálható. bp=bázispár, L=létra. A létra típusa: GeneRulerTM 1 kb Plus.

A közülük kiválasztott *[d113]* és *[d91]* vonal szekvenálását követően megállapítottam, hogy az 1644 nukleotidos deléciót hordozó *[d113]*-as allél egyértelműen null mutáns, mert a gén teljes kódoló szakasza hiányzott. Ezzel szemben a *[d91]*-ből csak a gén fele (1084 bázispár) törlődött. Mivel azonban deléció fölött ugyanolyan fenotípust mutattak, ezért mindkét allélt genetikai nullként kezeltem, így további vizsgálataimhoz is ezeket használtam. Fontos megjegyezni, hogy a kapott *Ccz1*-allélok homozigóta formában és deficiencia fölött

fennálló szemiletális fenotípusát egy hőszökkel aktivált Gal4 által meghajtott vad típusú *UAS-Ccz1-EOS* transzgén expressziójával sikerült megmenekítenem.



3. ábra. Endocitózis-vizsgálatok fejlődő szemén. (A-D) Notch-immunjelölés. Látható, hogy a Rab7-modul mutánsokban **(B-D)** az endocitózissal felvett Notch felhalmozódik a kontrollhoz **(A)** képest. **(E-H)** Boss-immunjelölés. A Rab7-modul mutánsokban **(F-H)** torzul a kontrollban **(E)** megfigyelhető Boss mintázat és szám feletti Boss pozitív pöttyök (zöld nyilak) jelennek meg bennük. Skála **(A)**: 20 μm és egyformán érvényes **(B-H)**.

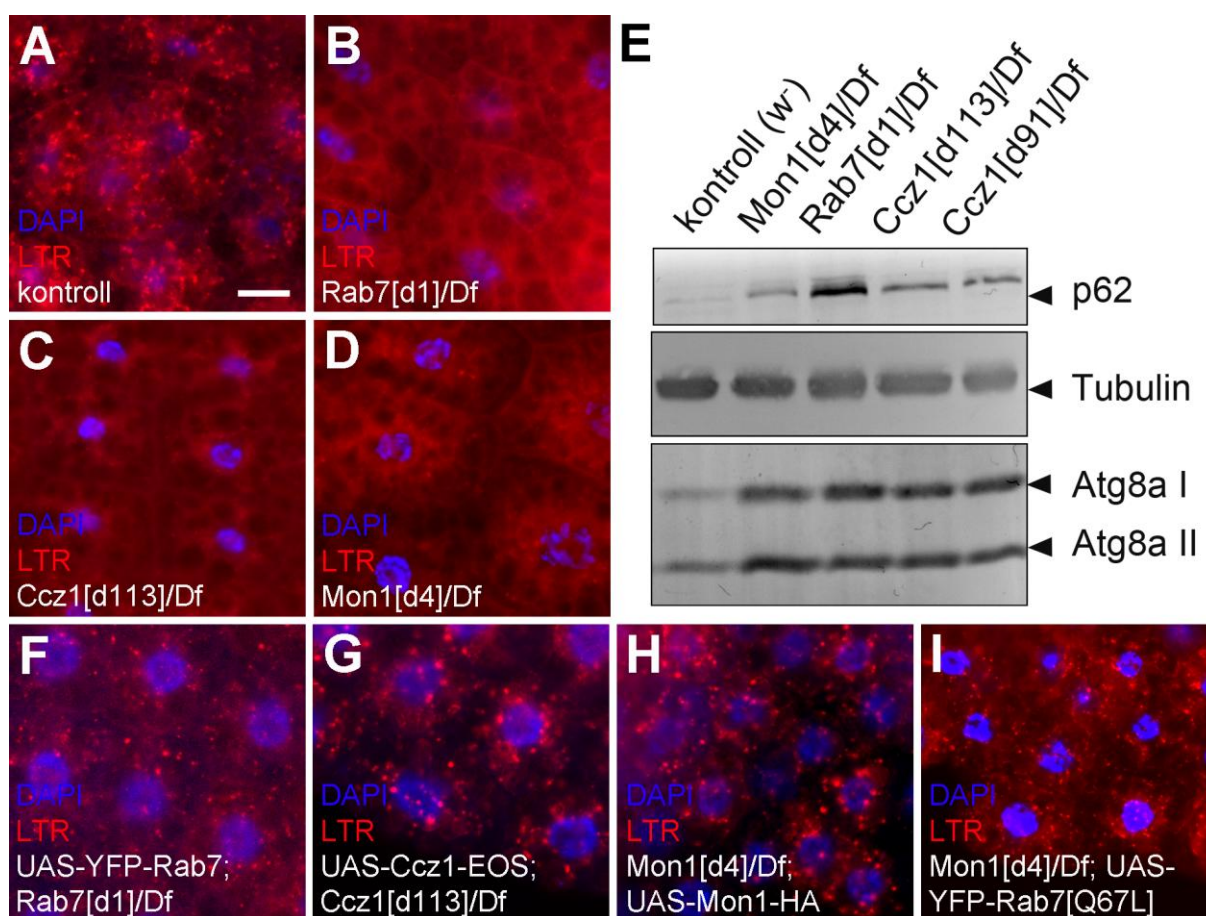
4.2. A Rab7-modul szerepe az endocitózisban

Mivel a Rab7-modul szerepe az endocitózisban már régóta ismert, így első célom annak letesztelése volt, hogy az újonnan létrehozott alléljaink is okoznak-e problémát az endocitózissal felvett receptorok lebomlásában. Ehhez Notch- és Boss-immunjelölést végeztünk fejlődő muslica szemeken. A Notch egy endocitózissal felvevődő és később a lizoszómákban lebomló transzmembrán receptor [29]. Ha az endoszómális útvonal valamilyen módon gátolva van, akkor a Notch nem bomlik le a lizoszómákban és felhalmozódik. Muslicában a fejlődő retinában 8 sejtől álló egységek, ommatidiumok találhatóak, amelyek egy központi, R8 (Retinula 8) sejtre és azt körülvevő R1-7 sejtekre tagolódnak. Az R8 sejtek kifejeznek egy Boss (Bride of Sevenless) nevű transzmembrán

fehérjét, amelyet az R7 sejtek Sevenless receptora köt meg. Ez a komplex az R7 sejtbe endocitotikusan felvevődik, majd lebomlik [30]. Alapesetben az R8 sejt egy nagyobb, az R7 pedig egy kicsi Boss-pozitív pöttyként látható egy ommatidiumban. Ha az endocitózissal probléma van, akkor több és eltérő méretű Boss-jel jelenik meg.

Az elvégzett immunfestések során a várakozásainknak megfelelően a kontrollokhoz viszonyítva, a Notch jelentősen felhalmozódott a Rab7-modul mutánsokban (**3.A-D ábra**). A Boss-jel mintázata is jelentősen eltért a mutánsokban a kontrollhoz képest (**3.E-H ábra**). Ezekből az eredményekből megállapítottam, hogy az általunk létrehozott mutációk valóban megzavarják endocitotikus útvonalat.

4.3. A Rab7-modul autofágiában betöltött szerepének vizsgálata

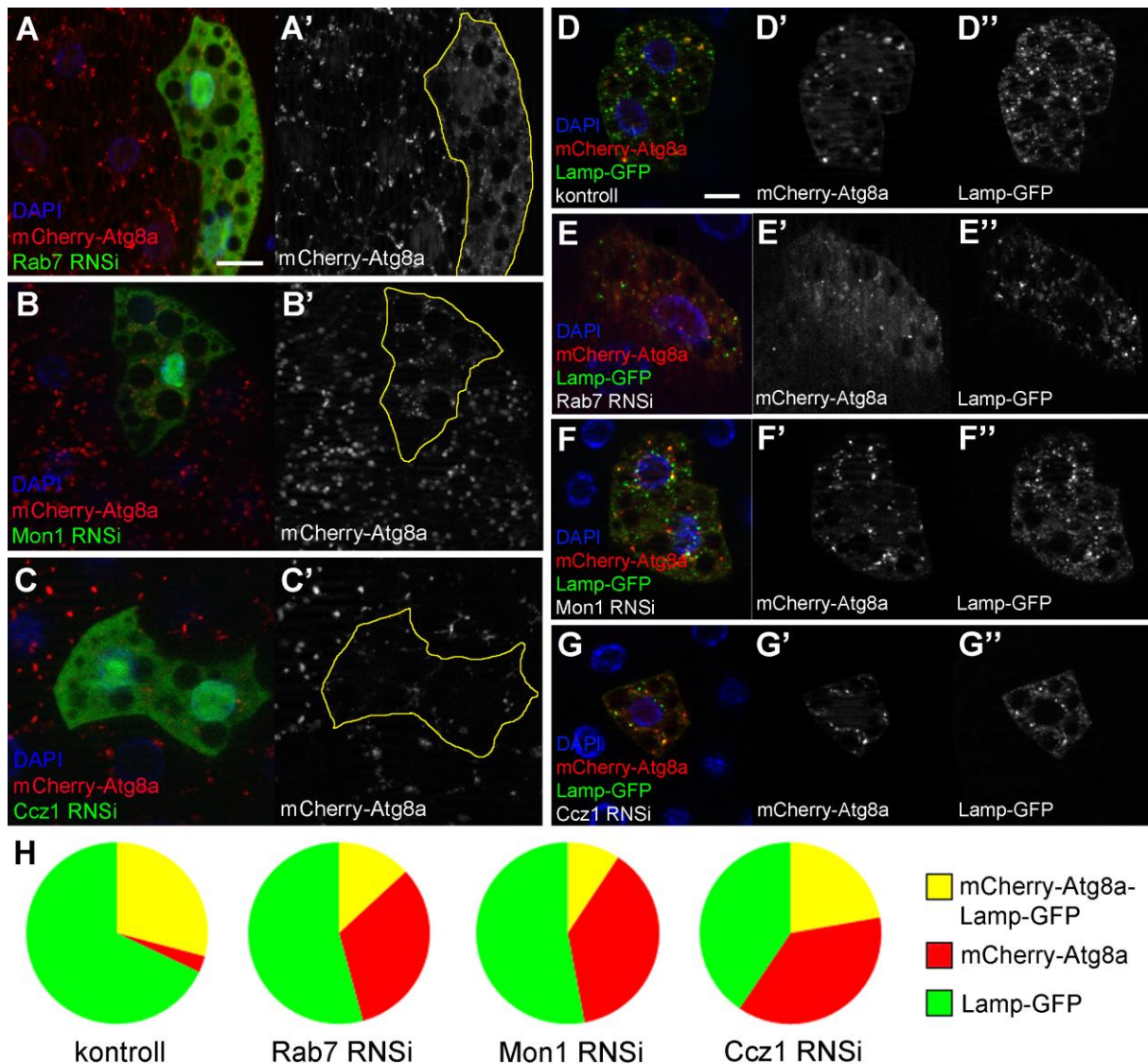


4. ábra. A mutációk hatása az autofág lebontásra. (A-D) A mutánsokban jóval kevesebb autolizoszóma található, mint a kontrollban. **(E)** A Western blot alapján a p62 és az Atg8a lipidált és lipidálatlan formája is felhalmozódik. **(F-I)** A funkcióvesztések menekítése vad típusú **(F-H)** és konstitutívan aktív **(I)** transzgénekkel. Skála **(A)**: 20 μ m és egyformán érvényes **(B-D és F-I)**.

A továbbiakban Rab7-, Ccz1- és Mon1-mutánsok autofág fenotípusát vizsgáltam.

Annak kiderítésére, hogy a lárvák zsírtestjében kialakulnak-e savas autolizoszómák, LysoTracker Red (LTR) festést használtam. A LTR egy vitális festék, mely a sejtek savas

kompartmentjeit (lizoszóma/autolizoszóma) jelöli. A jól táplált rovarok zsírtestjében a LTR nem ad jelet, éhezésre azonban számos LTR-pozitív granulum jelenik meg a zsírsejtekben, így az LTR ebben a szövetben jó markere az autolizozómáknak. A kontrollal szemben a Rab7-, Mon1- és Ccz1-mutáns zsírtestekben a savas kompartmentek szinte teljes hiányát figyeltem meg, ami arra utal, hogy bennük a savas autolizozómák nem alakulnak ki (**4.A-D ábra**).



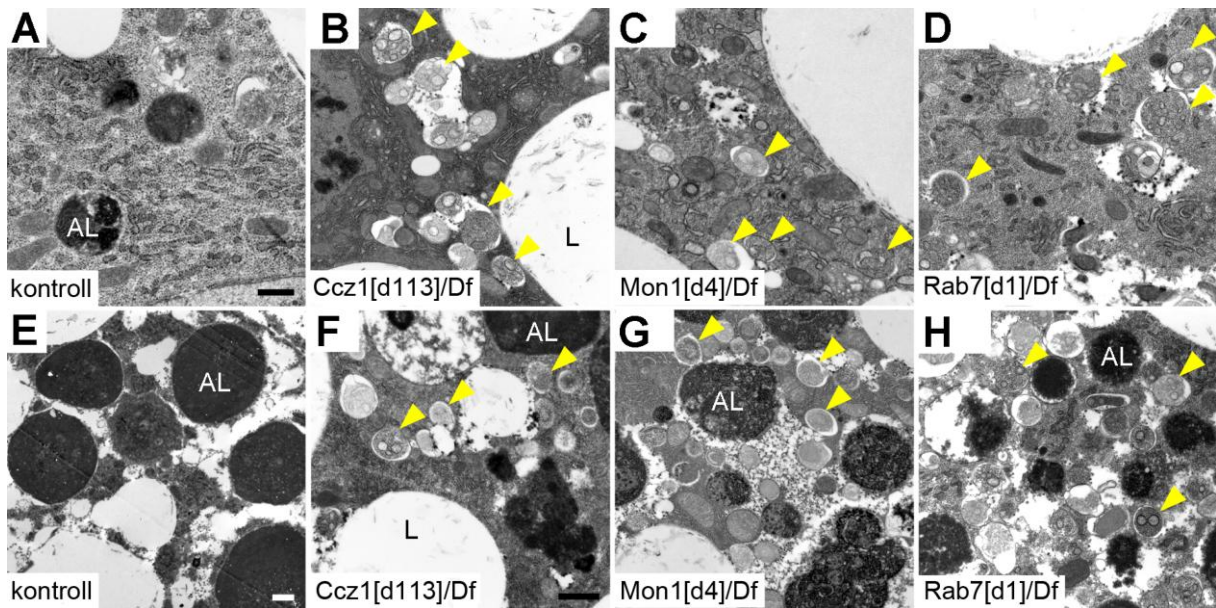
5. ábra. Az RNS-interferencia vizsgálatok eredményei. (A-C) A géncsendesített klónsejtekben (GFP+) kisebb mCherry-Atg8a-pozitív struktúrák halmozódnak fel, mint a kontrollokban (GFP-). **(D-G)** Az RNSi klónokban az autofág struktúrákat jelölő mCherry-Atg8a és a lizoszóma-marker Lamp-GFP kolokalizációja jóval kisebb mértékű, mint a kontrollban. **(H)** Az UC8; RNSi sejtekben felhalmozódnak az Atg8a-pozitív korai autofág struktúrák, a kolokalizáció mértéke pedig csökken a kontrollhoz képest. Skála **(A és D)**: 20 μ m és egyformán érvényes **(A-C és D-G)**.

Annak ellenőrzésére, hogy a fenti fenotípust valóban a Rab7-modul hibás működése okozta, menekítő vizsgálatokat végeztem. A kísérlethez a Rab7-modul mutációkra hemizigóta

egyedeket hoztam létre, melyek tartalmazták az adott mutáns gén vad típusú menekítő transzgénjét is. A transzgéneket *hs-Gal4*-gyel meghajtva a mutáns állatokban helyreállt a vad típusúakra jellemző LTR jel **(4.F-H ábra)**. A transzgénnek tehát nagymértékben menekítették a Rab7-modul tagjainak funkcióvesztését. Nagyon fontos eredmény volt számomra az is, hogy a Mon1 funkcióvesztést a konstitutívan aktív (GTP-kötött) Rab7[Q67L]-mutáns transzgénnel is menekíteni tudtam **(4.I ábra)**. Ez megerősítette azt a feltételezésemet, hogy a Mon1 mutánsokban a kieső GEF funkció következtében a Rab7 nem tud aktiválódni és ez vezet a hibás autofág fenotípushoz.

A mutációk karakterizálását Western blot-analízissel folytattam. L3-as, éheztetett lárvákból készítettem fehérjemintákat és kétféle fehérje mennyiségét vizsgáltam. Az egyik a p62, egy autofágiával specifikusan lebomló faktor volt, így ha a lebontás zavart szenved, a p62 felhalmozódik a sejtekben [31]. A másik vizsgált molekula az Atg8a, egy citoplazmatikus fehérje (Atg8a I), mely a fagofór képződése során foszfatidil-etanolaminhoz köt kovalensen, és ebben a formában bekerül a kialakuló fagofór és autofagoszóma membránjába, így ez a lipidált forma (Atg8a II) az autofág struktúrák markereként használható [32]. Az elvégzett vizsgálataim során a Rab7-modul mutánsokban mind a p62, mind az Atg8a felhalmozódott, ami arra utal, hogy bennük az autofág lebontás nem működik normálisan **(4.E ábra)**.

A mutánsokból származó eredményeimet megerősítettem az RNS-interferenciák vizsgálatával is. Az RNSi-transzgéneket hordozó muslicákat *hs-Flp; r4-mCherry-Atg8a, UAS-Dcr2; Act>CD2>Gal4, UAS-GFPnls* törzssel kereszteztem (lásd Anyagok és módszerek fejezet). A kísérlet során használt mCherry-Atg8a riporter valamennyi autofág struktúra jelölésére alkalmas. Éheztetés hatására a kontroll sejtekhez viszonyítva a géncsendesített sejtekben jóval több és kisebb Atg8a-pozitív struktúrát figyeltem meg, melyekről feltételeztem, hogy felhalmozódó autofagoszómák lehetnek, melyek nem voltak képesek lizoszómákkal fuzionálni. **(5.A-C ábra)**. A fúzió vizsgálatához *UAS-mCherry-Atg8a; RNSi* törzseket hoztam létre, amelyeket *hs-Flp; UAS-Lamp-GFP; Act>CD2>Gal4, UAS-Dcr2* legyekkel kereszteztem. Így külön riporter jelölte a lizoszómákat (Lamp-GFP) és az autofág struktúrákat (mCherry-Atg8a). A kísérlet során azt találtam, hogy éheztetés hatására a kontrollhoz képest a géncsendesített sejtekben jóval kisebb mértékű a két riporter kolokalizációja, ami arra utal, hogy az autofagoszóma-lizoszóma fúzió nagymértékben gátlődik a Rab7-modul hiányában **(5.D-G ábra)**. Ezen eredményeket számszerűsítettem is. végeztem. Az RNS-interferenciával csendesített klónsejtekben a kontrollhoz képest jelentősen megnőtt a korai autofág (Lamp-negatív, Atg8a-pozitív) struktúrák száma, míg a kolokalizáló sárga pöttyök száma csökkent **(5.H ábra)**.



6. ábra. A mutánsok vizsgálata elektronmikroszkópiával. (A-D) Éheztetett állatokban a kontrollhoz képest jelentős autofagoszóma-felhalmozódást figyelhetünk meg. (E-H) Vándorló lárvákban több autolizoszóma található, de még mindig jelentős az autofagoszómák felhalmozódása. Skála (A, E és F): 1 μ m és egyformán érvényes (A: B-D és F: G-H). AL=autolizoszóma, L=lipidcsepp; a sárga nyílhegyek autofagoszómákat jelölnek.

4.4. A Rab7-modul mutánsok fenotípusának vizsgálata elektronmikroszkópiával

Annak tisztázására, hogy valóban autofagoszómák halmozódnak-e fel a null mutáns lárvák zsírtestjében, elektronmikroszkópos vizsgálatokat végeztünk. Az L3-as, éheztetett lárvákban a kontrollhoz képest jelentős autofagoszóma-felhalmozódás látható, míg autolizoszómákból meglehetősen kevés van (6.A-D ábra). Vándorló állatokban bár valamivel több az autolizoszóma, de még mindig a kontrollénál jóval magasabb számban vannak jelen autofagoszómák (6.E-H ábra). Megállapíthatjuk tehát, hogy a Rab7-modul tagjainak a funkcióvesztése nagymértékben gátolja az autofagoszómák lizoszómákkal történő fúzióját.

4.5. A Rab5-funkcióvesztés hatása az autofágiára és a lizoszómák fejlődésére

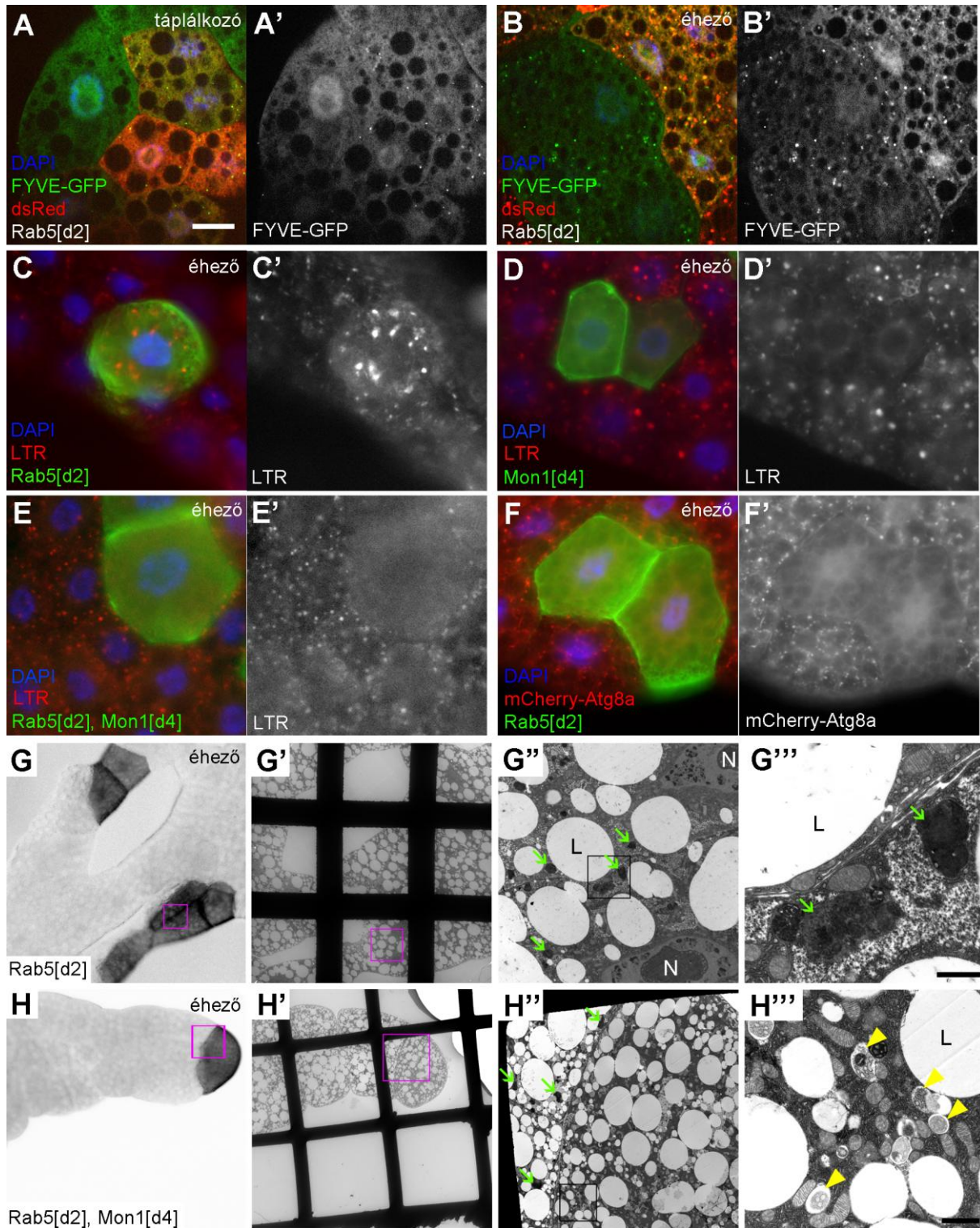
Miután megállapítottam, hogy a Rab7-modul az autofagoszóma-lizoszóma fúzió fontos szabályozója, célul tűztam ki a másik endocitózisban szereplő Rab, a Rab5 autofágiában betöltött szerepének vizsgálatát is. Utóbbiról, ahogy már az 1.2. alfejezetben is írtam, meglehetősen ellentmondásos adatok állnak rendelkezésünkre. Mivel az általunk beszerzett *Rab5*-mutáns törzsben a *Rab5[d2]* erős hipomorf allél embriofetaltást okozott, ezért az autofágiában játszott szerepének vizsgálatához genetikai mozaik lárvákat kellett létrehoznom.

Első kérdésünk az volt, hogy a Rab5 hiányában indukálódik-e az autofágia. Az endocitózis és az autofágia szabályozásának egyik közös pontja a III-as típusú Vps34 PI3K (foszfatidil-inozitol-3-kináz) komplex, mely a Rab5 egyik effektoraként is ismert az

endoszómák fejlődése során. A Vps34 komplex PI3P-t (foszfatidil-inozitol-3-foszfát) hoz létre, amely szükséges az endoszómák éréséhez és az autofágia során a fagofór képződéshez egyaránt [33] [34]. A membránban jelenlévő PI3P-t egyes fehérjék FYVE-doménje (Fab1-YOTB-Vac1-EEA1) képes specifikusan kötni. Így amennyiben a Vps34 komplex valóban a Rab5 effektoraként működik, a Rab5 funkcióvesztése a FYVE-doménnel rendelkező fehérjék membránlokalizációjának megváltozását vonná maga után. Annak tisztázására, hogy a Rab5-mutáns sejtekben megváltozik-e a Vps34 komplex endocitózishoz, illetve autofágiához köthető aktivitása, megvizsgáltam a FYVE-GFP riporter eloszlását. Ehhez *40A*, *Rab5[d2]*; *UAS-FYVE-GFP* állatokat kereszteztem *hs-Flp*; *40A*, *UAS-dsRed*; *fb-Gal4* legyekkel (lásd 3.2. fejezet). Táplálkozó lárvákban az autofágia mértéke minimális, így ilyenkor a FYVE-GFP jel eloszlása alapján a Vps34 komplexnek az endoszómákhoz köthető aktivitása figyelhető meg. Ha viszont éheztetéssel autofágiát indukálunk, a Vps34 komplex a képződő autofág struktúrákon is aktív lesz, így a FYVE-GFP ekkor döntően ezeket fogja jelölni. A táplálkozó állatok kontroll sejtjeinek periferiáján jól láthatóak a FYVE-GFP pozitív endoszómák, ezzel szemben a *Rab5[d2]* sejtekben szinte egyáltalán nincs FYVE-GFP pozitív struktúra (**7.A ábra**), amely arra utal, hogy a Vps34 PI3K komplex a Rab5 hiányában nem aktív az endoszómákon. Ezzel szemben az éhező állatok *Rab5[d2]* mutáns klónjaiban a kontroll sejtekhez hasonló számú és méretű FYVE-GFP-pozitív granulumot látunk (**7.B ábra**). Ez egyrészt arra utal, hogy a Rab5 funkcióvesztése esetén is indukálódik az autofágia, másrészt arra, hogy a Vps34 kináz komplex autofágiában betöltött funkciója független a Rab5-től.

Annak tisztázására, hogy Rab5 hiányában létrejönnek-e autolizoszómák, *Rab5[d2]* homozigóta szomatikus klónokat (lásd 3.2. alfejezet) hordozó L3-as, éheztetett lárvákat hoztam létre, melyeket LTR-del festettem. Ennek során a mutáns sejtekben jóval nagyobb savas LTR-pozitív struktúrákat figyeltem meg a kontroll sejtekhez képest (**7.C ábra**). Ez arra utal, hogy a Rab5 mutáns sejtekben nagyméretű, a kontrollnál is savasabb (LTR-del jobban festődő) granulumok alakulnak ki, melyek akár autolizoszómák is lehetnek. Ezt korrelatív elektronmikroszkópiával is bizonyítottuk: a *Rab5[d2]*-klónsejtekben a kontroll autolizoszómákhoz hasonló méretű és denzitású struktúrákat figyeltünk meg (**7.G ábra**).

Szintén érdekes megfigyelés volt, hogy a Rab5 null mutáns sejtek mérete jóval nagyobb a többi sejténél; ez feltehetően annak köszönhető, hogy az endoszómális útvonal gátlása révén az endocitózissal felvett, de nem lebomló receptorok tovább szignalizálnak.



7. ábra. A Rab5 autofág fenotípusa. (A-B) Táplálkozó állatok (A) kontroll sejtjeiben (RFP+) a FYVE-GFP a periférián lévő endoszómákat jelöli, ezzel szemben a Rab5 mutáns klónokban (RFP-) a riporter nem jelez semmilyen struktúrát. Éhezés (B) hatására azonban a kontroll (RFP+) mellett a Rab5 mutáns (RFP-) sejtben is megjelennek az autofág eredetű FYVE-GFP struktúrák. (C-E) *Rab5[d2]* (GFP+) (C) klónokban nagyobb és savasabb autolizoszómákat látunk, mint a kontrollokban (GFP-), míg a kettős mutánsban (GFP+) (E) a *Mon1[d4]*-hez (GFP+) (D) hasonlóan gátlódik ezek kialakulása. (F) A *Rab5[d2]* sejtben (GFP+) nincsenek jelen a környező kontroll (GFP-) sejtben látható mCherry-Atg8a-pozitív struktúrák. (G-H) A korrelatív elektronmikroszkó-

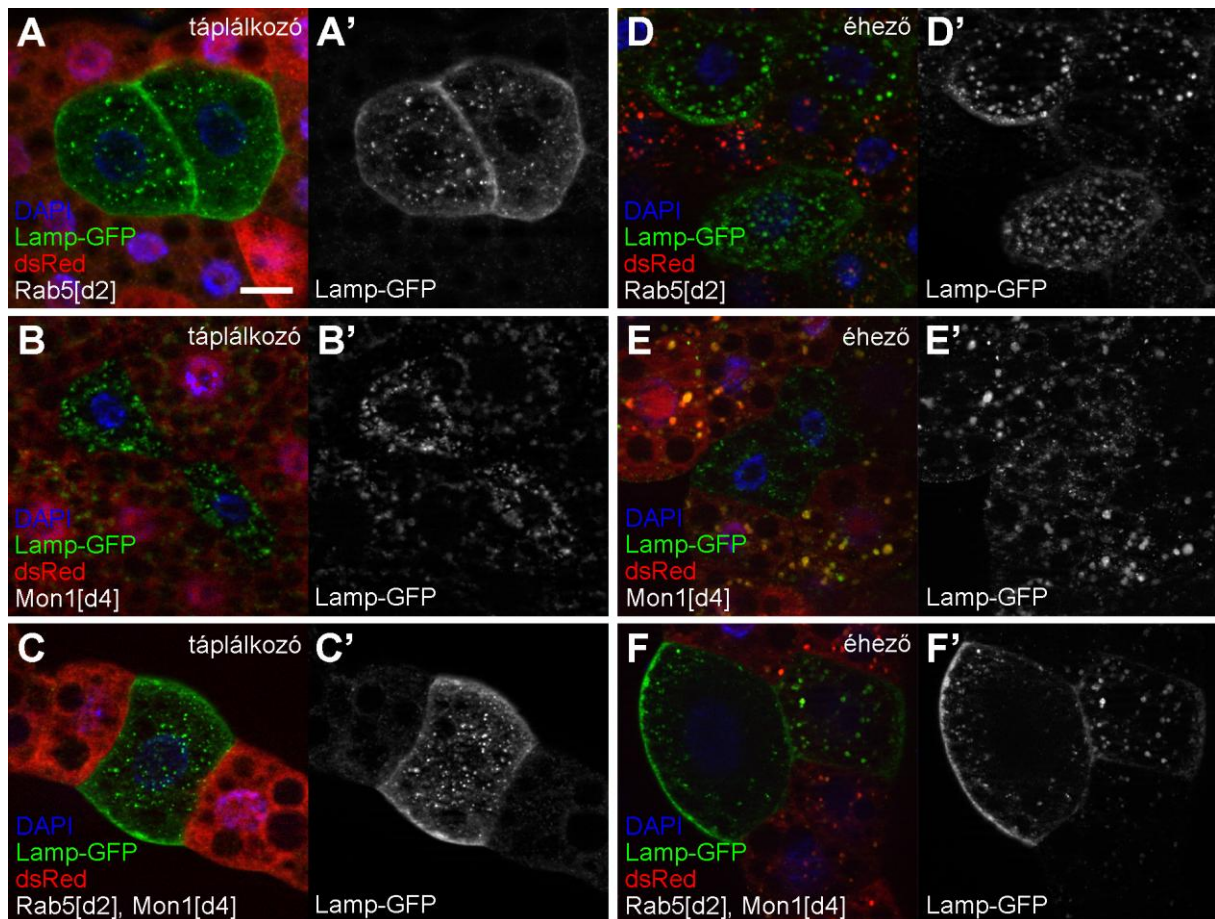
pos képek megerősítik a *Rab5[d2]* és a kettős mutáns fenotípusát. Az (**H''**) panel bal oldalán világosabb háttérrel egy kontroll sejt részlete látható, melyben számos autolizoszóma található. Az autolizoszómákat zöld nyilak, az autofagoszómákat sárga nyílhegyek jelölik; L=lipidcsepp, N=nucleus. Skála (**A**): 20 μ m és egyformán érvényes (**B-F**); Skála (**G'''** és **H'''**): 1 μ m.

Annak bizonyítására, hogy a *Rab5[d2]* homozigóta mutáns sejtekben látható lizoszómák valóban autofág eredetűek-e, episztázis-analízist végeztem a Rab5 és a Rab7-modul tagja, a Mon1 között. Ehhez *Rab5[d2]* és *Mon1[d4]* mutáns allélokat összerekombinálva, *Rab5[d2]*, *Mon1[d4]* kettős mutáns kromoszómát hordozó muslica vonalat hoztam létre. Mivel a két gén azonos kromoszóma-karon helyezkedett el, ezért e vonalakban a dupla mutációra homozigóta szomatikus klónokat lehetett indukálni. Éheztetés után a klónos lárvákat LTR-del megfestve, azt tapasztaltam, hogy a *Mon1[d4]* mutáns klónokhoz hasonlóan a kettős mutáns sejtekből is eltűntek a kontrollokban és a *Rab5[d2]* mutánsokban még meglévő LTR pozitív struktúrák (**7.C-E ábra**).

Korrelatív elektronmikroszkópiával vizsgálva a kettős mutáns klónokat szintén azt figyeltem meg, hogy bennük a *Mon1[d4]* mutánsokhoz hasonlóan felhalmozódnak az autofagoszómák és hiányoznak az autolizoszómák (**7.H ábra**). A *Drosophila Rab5[d2]* mutáns sejtekben tehát az autofágia korai lépései nem gátoltak, sőt a normálisnál savasabb nagyméretű autolizoszómák is létrejönnek. Ugyanakkor a *Rab5* és *Mon1* együttes hibája esetén a Mon1 autofág fenotípusa érvényesül.

Ezzel szemben amikor a *Rab5[d2]*, *Mon1[d4]* kettős mutáns sejtek méretét vizsgáltam, azt figyeltem meg, hogy a *Rab5[d2]*-höz hasonlóan jelentősen nagyobbak mint a környező kontrollok. A *Mon1[d4]* mutáns klónok sejtmérete viszont nem tért el látványosan a vad típusú sejtektől (**7.C-E ábra**), azaz a sejtméretet befolyásoló útvonal esetén a *Rab5[d2]*, *Mon1[d4]* kettős mutánsokban is a Rab5 fenotípusa érvényesül.

A LTR festéssel és az elektronmikroszkópiával nyert eredményeinket szerettem volna megerősíteni egy olyan vizsgálattal, mely során az autofág struktúrákat jelölő mCherry-Atg8a mennyiségét vizsgálom *Rab5[d2]* mutáns klónsejtekben. Ehhez 40A, *Rab5[d2]*; *r4-mCherry-Atg8a* legyeket kereszteztem MARCM 40A GFP állatokkal (lásd 3.2. fejezet). Az eredmény igencsak váratlan volt: az mCherry-Atg8a jele szinte teljesen hiányzott a mutáns klónokban (**7.F ábra**), mely azt sugallta, hogy ezen sejtekből hiányoznak az mCherry-Atg8a pozitív autofág struktúrák. Ez viszont elég nehezen összeegyeztethető a feljebb bemutatott eredményeinkkel, miszerint az éhező Rab5 mutáns sejtekben létrejönnek az autolizoszómák. Az ellentmondás feloldására a következő (4.6.) fejezetben tesztek kísérletet.



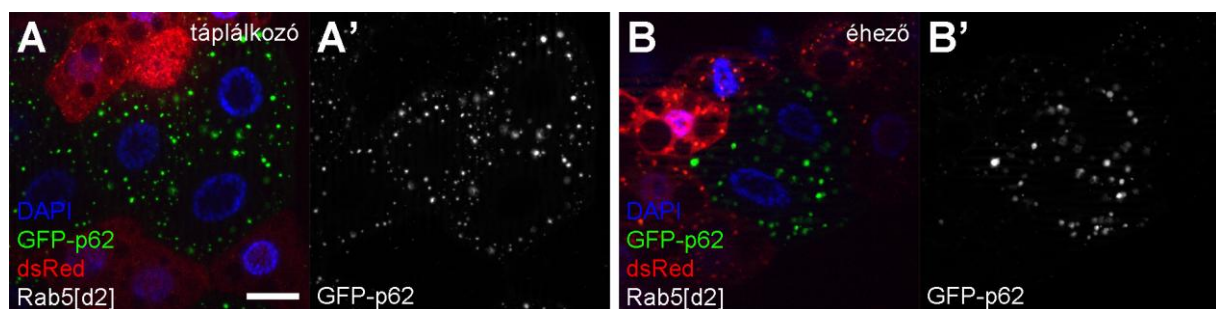
8.ábra. A Lamp-pozitív struktúrák eloszlása a Rab5- és Rab7-modul funkcióvesztése esetén. (A-C) Táplálkozó lárvákban a *Rab5[d2]* (A), valamint a *Rab5[d2]*, *Mon1[d4]* (C) kettős mutáns (RFP-) klónokban Lamp-GFP a plazmamembránban és a sejt belsejében nagyobb struktúrákon felhalmozódik. A *Mon1[d4]* sejtekben (RFP-) (B) is több Lamp-GFP figyelhető meg a kontrollokhoz (RFP+) képest, de a pöttyök mérete kisebb és eloszlásuk is más, mint a Rab5 mutánsokban. (D-F) Éhezést követően a *Rab5[d2]* (D) és a kettős mutáns (F) sejtek (RFP-) a táplálkozóknál látott módon halmozzák a Lamp-ot, míg a *Mon1[d4]* sejtekben (RFP-) (E) továbbra is a kontrollnál (RFP+) jóval kisebb struktúrák láthatóak. Skála (A): 20 μ m és egyformán érvényes (B-F).

A Rab5 funkcióvesztés autofág fenotípusának meghatározását követően arra is kíváncsi voltam, hogy a Rab7 modul és a Rab5, milyen hierarchia viszonyban áll egymással a lizoszómák keletkezése során. Ehhez először klasszikus klónsejt-generálással *Rab5[d2]* és *Mon1[d4]*, valamint *Rab5[d2]*, *Mon1[d4]* kettős mutáns klónokat hoztam létre, amelyekben a lizoszómákat jelölő Lamp-GFP riporter mennyiségét vizsgáltam. Ehhez *hs-Flp*; *40A*, *UAS-dsRed*; *fb-Gal4*, *UAS-Lamp-GFP* legyeket kereszteztem *40A*, *Rab5[d2]* muslicákkal (lásd 3.2. fejezet). Jól táplált lárvákban az autofág aktivitás minimális, ezért ilyenkor elsősorban az endolizoszómák figyelhetők meg. Ilyen állatokat vizsgálva azt tapasztaltam, hogy a *Rab5[d2]* sejtek plazmamembránjában és a sejteken belül nagyobb granulumokban felhalmozódik. Ezzel szemben a *Mon1[d4]* mutáns sejtekben, bár szintén több volt a riporter, mint a kontrollokban, de ez esetben a Lamp-GFP apróbb, diffúzabb elhelyezkedésű struktúrák

formájában jelent meg. A kettős mutánsokban a Rab5-mutáció fenotípusához hasonló felhalmozódás volt látható (**8.A-C ábra**). Éheztetett állatokban az autofág aktivitás dominál, így ilyenkor elsősorban az autolizoszómák vizsgálhatók. Ennek ellenére éhezőkben a tápláltnál megfigyelthez hasonló fenotípust látható mindhárom esetben. A *Rab5[d2]* és a kettős mutáns sejtek nagyobb struktúrák formájában felhalmozzák a Lamp-GFP-t, míg a *Mon1[d4]* klónokban jóval kisebb granulumokat figyelhetünk meg (**8.D-F ábra**). A megnövekedett autofág aktivitás tehát érdemben nem befolyásolta az egyszeres és a kettős mutáns sejtekben a Lamp-GFP méretét és eloszlását.

A Rab5-Mon1 episztázis analízis során nyert eredményeim tehát arra utalnak, hogy az autofagoszóma-lizoszóma fúzió esetén a Mon1 és valószínűleg a Rab7-modul többi tagja is episztatikusak a Rab5 felett. Ugyanakkor a lizoszómák felé áramló bioszintetikus anyagforgalom szabályozásában viszont a Rab5 szerepe a meghatározó, a Rab7 modulhoz képest.

4.6. A Rab5 szelektív autofágiában betöltött szerepének vizsgálata



9. ábra. A Rab5 hiányában gátolt a szelektív autofágia. (A-B) Mind a táplálkozó (**A**) mind az éhező (**B**) lárvák Rab5 mutáns (RFP-) klónjaiban felhalmozódik a GFP-p62 a környező kontroll (RFP+) sejtekhez képest. Skála (**A**): 20 μ m és érvényes (**B**)-re is.

A továbbiakban a Rab5 szelektív autofágiában betöltött szerepét vizsgáltam és megpróbáltam tisztázni, hogy minek köszönhető a nagy, savas autolizoszómák jelenléte és az Atg8a-pozitív struktúrák hiánya a Rab5 funkcióvesztése esetén.

Az ellentmondás feloldására egyetlen lehetséges forgatókönyvet tudtunk elképzelni. Az Atg8a-ról jól ismert, hogy adaptor fehérjéken (pl.: p62) keresztül fontos szerepe van bizonyos sejtalkotók (pl.: fehérjeaggregátumok) autofágiával való célzott eltávolításában. Így elképzelhető egy olyan magyarázat, hogy a Rab5 funkciójának hiányában gátlódik az Atg8a-függő, specifikus autofágia, ugyanakkor az éhezés hatására beinduló, nem-szelektív („bulk”) autofágia eredményeként, az Atg8a jelenléte nélkül is létrejöhetnek nagyméretű autolizoszómák. Ezt támasztják alá azok a megfigyelések is, melyek szerint emlős sejtekben az Atg8a lipidációjához szükséges Atg5-Atg12 komplex mennyisége Rab5 hiányában

csökken, valamint az, hogy a Rab5 hiányában a túltermeltetett Huntingtin fehérje aggregátumok formájában felhalmozódik [35]. Ezek alapján tehát elképzelhető, hogy a Rab5 funkcióvesztése csökkent Atg8a-lipidációt és a szelektív autofágia gátlását eredményezheti.

Arra, hogy a Rab5 mutáns sejtekben normálisan zajlik az éhezés indukálta, Atg8a-független autofágia, a 4.5-ös fejezetben számos bizonyítékot mutattam. Így az utolsó kísérlet során arra kerestem a választ, hogy Rab5 hiányában sérül-e a szelektív autofágia. Ehhez a p62-GFP riporter mennyiségét vizsgáltam *Rab5[d2]* klónokban. A p62, ahogy már az előbb céloztam rá, képes az Atg8a-t, valamint ubiquitin-t kötni és ezáltal adaptorként funkcionálni a lebontandó anyag (pl. ubiquitinált fehérjeaggregátumok) és a formálódó autofág membrán között [36]. Így a p62 maga is autofágiával bomlik le, mégpedig Atg8a-függő módon. A vizsgálathoz *40A, Rab5[d2]; UAS-p62-GFP* muslicákat és *hs-Flp; 40A, UAS-dsRed; fb-Gal4* legyeket kereszteztem (lásd 3.2. fejezet). Az utód lárvák *Rab5[d2]* mutáns klónjaiban, tápláltsági állapottól függetlenül a p62 jelentősen felhalmozódott (**9.A-B ábra**). Ez az eredmény megerősíti azt a feltételezésünket, hogy a Rab5 funkcióvesztése esetén valóban gátlódik az Atg8a-függő, szelektív autofágia, ugyanakkor az éhezés hatására beinduló nem-szelektív („bulk”) autofágia zavartalanul zajlik tovább a sejtekben.

4.7. Konklúzió

A Rab7-modul tagjainak hibája esetén az endolizoszómális lebontó útvonal gátlódik, amire az endocitotikusan felvett cargo felhalmozódásából következtethetünk. Az elvégzett mikroszkópos és biokémiai vizsgálataink alapján az autofagoszóma-lizoszóma fúzió is jelentősen sérül *Drosophilában*, tehát a Rab7-modul a lizoszómáknak nem csak az endoszómákkal, hanem az autofagoszómákkal történő fúziójában is fontos szerepet játszik. A *Mon1* és a *Ccz1* mutáns fenotípusa nagyjából azonos a *Rab7* mutáns fenotípusával, ami megerősíti, hogy ezek a Rab7 aktivátorai. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a muslica *Mon1* a szakirodalomban korábban megjelent állításokkal ellentétben [24] szükséges az autofágia normális működéséhez. Annak oka, hogy Yousefian és munkatársai tanulmányukban miért találták azt, hogy az általunk is vizsgált *Mon1[d4]* allél nem szükséges az autofágiához, feltehetően az, hogy ők zsírtest helyett a fejlődő szemet használták kísérleti rendszerként. Utóbbi szövet azonban erősen osztódó sejtekből áll, melyben nem tapasztalható jelentős autofág aktivitás. A Rab7-modul funkcióvesztésének autofág fenotípusa vad típusú transzgénekkel megmenekíthető.

A Rab7-modullal ellentétben a Rab5 hiányos sejtekben zajlik autofágia, hiszen autofágia-indukció (éheztetés) után a kontrollhoz hasonlóan megjelennek a PI3P-pozitív struktúrák és kialakulnak bennük az autolizoszómák. Ugyanakkor a képet árnyalja, hogy a Rab5 mutáns

sejtekben az Atg8a jele éheztesítés után sem mutatható ki, a p62-GFP mennyisége pedig megnő bennük. Ez arra utal, hogy a Rab5 funkcióvesztése esetén a sejtekben gátlódik az Atg8a-függő autofágia, a nem-szelektív autofágia viszont zavartalanul működik tovább.

Eredményeink szerint a Rab7-tel szemben a Rab5 nem szükséges az autofágia bizonyos típusaihoz, sőt hiányában a normálisnál jóval savasabb autolizoszómák alakulnak ki. Ezen adataink tehát ellentmondanak a szakirodalomban szereplő, élesztővel kapcsolatos adatoknak, miszerint Rab5 hiányában az élesztősejtben autofagoszómák halmozódnak fel [18]. Korábban egy japán csoporttal párhuzamosan a mi laborunk is leírta, hogy az élesztő autofagoszómavakuólum fúzióban szereplő faktoroknak csak egy része konzervált muslicában és emlősökben [8] [9], így nem volna meglepő, ha az élesztő Rab5 funkciója részben eltérne az emlős és muslica Rab5-étől. Eredményeinket emlős rendszerekből származó adatok is megerősítik. Egy egereken végzett *in vivo* kísérletsorozat során, Rab5-csendesített állatok májsejtjeiben nem találtak autofagoszóma-halmozódást [19]. Emellett egy a 4.6. fejezetben már említett, muslicákból és emlőssejtekből származó adatokat bemutató publikációból [35] az is kiderül, hogy a Rab5 funkcióvesztés hatására nagyszámú fehérjeaggregátum jelenik meg a sejtekben, melyeknek normálisan le kellene bomlaniuk szelektív autofágiával. Utóbbi cikk azt is említi, hogy a Rab5 hiányában csökken az Atg8a lipidáció mértéke, mellyel megmagyarázható, hogy ezekben a sejtekben miért gátolt a szelektív autofágia.

A Rab5- és Rab7-modul hierarchia-viszonyát vizsgálva azt az eredményt kaptuk, hogy az autofágia során (endocitózishoz hasonlóan) a Rab7-modul downstream helyezkedik el a Rab5-höz képest, hiszen a *Rab5[d2]*, *Mon1[d4]* kettős mutánsokban a Rab7-modul hiányára jellemző autofagoszóma-felhalmozódást eredményező fenotípus érvényesül. Ez a viszony azonban megváltozik a sejtméretet szabályozó útvonalak esetén. A Rab5 mutánsok nagy sejtméretet mutató fenotípusát ugyanis a Rab7-modul hiánya nem szuppresszálja. Ez utóbbihoz hasonló eredményeket kaptunk a késői endoszóma/lizoszóma-marker Lamp-GFP vizsgálata során is: a *Rab5[d2]* mutáns sejtekben a Lamp-GFP a plazmamembránban és nagyméretű intracelluláris granulumokban felhalmozódik, és ez a fenotípus nem tűnik el *Rab5[d2]*, *Mon1[d4]* kettős mutánsokban sem. Ezek alapján úgy tűnik, hogy míg a Rab5 az endocitózis korai lépéseiben és az endoszómák/lizoszómák fejlődésében, addig a Rab7-modul a lizoszómák késői endoszómákkal, illetve autofagoszómákkal való fúziójában játszik fontosabb szerepet.

5. Összefoglaló

Az eukarióta sejtek két fő lizoszómális lebontó útvonala, az endocitózis és az autofágia alapvető fontosságú a sejt normális működéséhez. A két folyamat szabályozása meglehetősen összetett és számos ponton kapcsolódik egymáshoz.

A sejtek membránforgalmát a Rab GTPázok irányítják. A Rab5 a korai, a Rab7 a késői endoszómák és a lizoszómák fejlődéséért felelős. Az endoszómák érése során a felületükön lévő Rab5 fokozatosan Rab7-re cserélődik. Ezt a Rab5 effektoraként működő Mon1-Ccz1 heterodimer komplex végzi, mely GEF-ként funkcionálva aktiválja a Rab7-et, így segítve a korai endoszómák későivé alakulását. A Rab7-et és a Mon1-Ccz1 komplexet együttesen Rab7-modulnak nevezzük.

A Mon1 szerepét az endoszóma-lizoszóma és autofagoszóma-lizoszóma fúzió során élesztőben leírták, azonban egy tavalyi publikáció szerint [24] a *Drosophila* homológ a sejtek önlebontó folyamatához, az autofágiához nem szükséges. A szakirodalom alapján a Rab5 és az autofágia kapcsolata szintén ellentmondásos, ezért célul tűztem ki ezen gén autofágiában betöltött szerepének tisztázását *Drosophilában*.

Ehhez új *Ccz1* és *Rab7* null mutáns vonalakat állítottunk elő. A *Mon1* és *Rab5* esetén meglévő null mutánsokat használtam. Fénymikroszkópos vizsgálataim során riporterek és vitális festékek felhasználásával kimutattam, hogy a Rab7-modul tagjainak hiányában az autofagoszóma-lizoszóma fúzió gátolt. Így a funkcióvesztéses sejtekben az autolizoszómák száma nagymértékben lecsökkent és felhalmozódtak az autofagoszómák. Western blot-on a normálisan autofágia révén lebomló p62 és lipidált Atg8a felhalmozódását tapasztaltam a mutánsokban.

Ezzel szemben a Rab5 funkcióvesztés érdekes fenotípust eredményezett. Az éheztetett Rab5 mutáns sejteket vitális festékekkel vizsgálva nagyméretű lizoszómákat figyeltem meg bennük, amelyek viszont nem voltak pozitívak az autofág struktúrákat jelölő mCherry-Atg8a riporterre. A Mon1 és Rab5 mutáns allélekkel végzett episztázis analízissel megállapítottam, hogy a Rab5, Mon1 kettős mutáns sejtek a Mon1 mutánsokhoz hasonló autofág fenotípust mutatnak, azaz a nagyméretű lizoszómák eltűntek belőlük. Ezen eredményeinket elektronmikroszkópiával is megerősítettük, mely során a dupla mutánsokban az autofagoszómák felhalmozódását tapasztaltuk. Ez azt jelenti, hogy a Rab5 mutáns sejtekben éheztetés hatására valóban autolizoszómák jelennek meg.

Az mCherry-Atg8a pozitív struktúrák hiánya ugyanakkor arra utalt, hogy a Rab5 hiányában esetleg sérülhetett az Atg8a-függő szelektív autofágia. Ezt az a vizsgálatom is

megerősítette, mely során a Rab5 mutáns sejtekben a GFP-p62 riporter felhalmozódását tapasztaltam.

Muslicában tehát az endocitózist szabályozó Rab-ok közül a Rab5-nek alapvető szerepe van a szelektív autofágiában az Atg8a pozitív struktúrák kialakulása során, ugyanakkor nem szükséges az éhezés indukálta nem-szelektív autofág lebontáshoz. Ezzel szemben a Rab7 modul tagjainak az autofágia egy későbbi lépésében, az autofagoszóma-lizoszóma fúzióban van szerepe.