

XXXII. OTDK Biológia szekció

**Az autofág gének és az *uvrag* szerepe a
Drosophila bélőssejtek osztódásában**

Tudományos Diákköri Konferencia Pályamunka

Biológus M. Sc., 1. évfolyam

készítette:

Kovács Laura

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Témavezető:

Dr. Nagy Péter, tudományos segédmunkatárs

Dr. Juhász Gábor, tudományos főmunkatárs

Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2014

Tartalom

Összefoglaló	3
Rövidítések jegyzéke	4
Bevezetés	5
Célkitűzések	7
Anyagok és módszerek	8
Eredmények	12
Kitekintés	20

Összefoglaló

A külvilágból származó anyagok károsító hatásainak egyik leginkább kitett szerv az emésztőrendszer. A különféle bélsejtek szöveti összejtekből folyamatosan pótlódnak, melyek így fenntartják a bél homeosztázisát és regeneratív kapacitását. A bélössejtek osztódása szigorúan szabályozott, hiszen a nem megfelelő osztódás patológiás elváltozásokhoz vezethet. Az autofágia megfelelő működése bizonyítottan elengedhetetlen az idegsejtek funkciójának fenntartásában, így megvizsgáltam *Drosophila melanogaster* bélössejtjeiben az autofág aktivitást, és annak a bél normál homeosztázisának fenntartásában játszott szerepét. Kimutattam, hogy a *Drosophila* bélössejtekben folyamatosan magas szintű autofágia zajlik, mely változatlan marad az autofágiával korábban kapcsolatba hozott *uvrag* tumorsuppresszor funkcióvesztése esetén is. Azt találtam, hogy az autofágia gátlása az összejtek számának csökkenéséhez, míg az *uvrag* hiánya azok hiperproliferációjához vezet. Eredményeim szerint az utóbbi fenotípus a sejtpolaritás kóros megváltozásával lehet összefüggésben. Episztázis analízissel kimutattam, hogy az autofágia gátlása teljes mértékben szuppresszálja az *uvrag* hiánya esetén bekövetkező összejt hiperproliferációt. Azt találtam, hogy akár az autofág gének, akár az *uvrag* bélössejt-specifikus csendesítésekor csökken a legyek élethossza, feltehetően a bél integritásának hibája miatt.

Rövidítések jegyzéke

Apc: adenomatous polyposis coli

ATG: autophagy related gene

ATP: adenosin-5'-trifoszfát (adenosine-5'-triphosphate)

BSA: szarvasmarha szérum albumin (bovine serum albumin)

dsRNS: dupla szálú RNS (double-stranded RNA)

GFP: zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein)

FIP200: fokális adhéziós kináz családot kötő 200kDa-os fehérje (focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa)

FLP: flip rekombinááz (flip recombinase)

FRT: flip rekombinááz célfehérje (flip recombinase target)

mCherry: monomerikus cherry (monomeric cherry)

PAS: pre-autofagoszómális struktúra (pre-autophagosomal structure)

PBST: phosphate buffered saline + 0,5% Triton X-100

PH3: foszforilált hiszton-3 (phosphorilated histone-3)

UAS: upstream aktiváló szekvencia (upstream activating sequence)

UVRAG: UV radiation resistance-associated gene

Vps: vakuoláris fehérje válogatás (vacuolar protein sorting)

W: white (vad típus)

Bevezetés

A magasabbrendű élőlények által a környezetből felvett anyagok legelőször a bélrendszer sejtjeivel érintkeznek. A felszívódáson kívül a bekerült anyagok károsíthatják a sejteket, különböző abnormális elváltozásokhoz vezetve, ezért nélkülözhetetlen azon folyamatok részletes ismerete, melyek szükségesek a normális bél homeosztázis fenntartásához. Ezeknek a modellezésére kiválóan alkalmas a *Drosophila melanogaster*. A *Drosophila* emésztőrendszerét előbélre, előgyomorra, középbélre és utóbélre tagolhatjuk. Az egyes szakaszok funkciójuk, valamint az őket felépítő sejtek tekintetében nagymértékben megfeleltethetők az emberi emésztőrendszer egyes szakaszaival (Apidianakis és Rahme 2011). Az *ecetmuslica* emésztőrendszerének jellemző sejtjei az őssejtek, amelyek aszimmetrikus osztódásuk során őssejteket illetve enteroblasztokat hoznak létre. Ezek az ún. szöveti őssejtek kifejezett állatokban az adott szövet sejttypusait képesek létrehozni. Ezzel egy javító/regeneratív szerepet töltenek be, ugyanis pótolják az adott szövet sérült, előregedett sejtjeit, így regenerálva a szövetet és fenntartva a homeosztázist. Az őssejtekből leszármazó enteroblasztok további osztódás nélkül hozzák létre a terminálisan differenciálódott enteroendokrin, vagy enterocita sejteket (Ohlstein és Spradling 2007).

A *Drosophila* belében található egyes sejttypusok megfeleltethetők az emberi bélben található sejtféleségekkel: a *Drosophila* és emlős bélben egyaránt őssejtek hozzák létre az új őssejteket ill. enteroblasztokat, az enteroblasztok emlős megfelelői az átmeneti vagy tranzienst sejtek, az enteroendokrin sejtekkel megfeleltethetők az emlősök Lieberkühn-kriptáiban található nyálkatermelő kehely sejtek és a Paneth-sejtek, az enterocitákkal pedig a mikrobolyhos felszívó sejtek (Apidianakis és Rahme 2011). Ezen okok miatt a *Drosophila* laboratóriumi körülmények között megfelelő modell szervezet az egyes humán bélbetegségek modellezésére és vizsgálatára (Allenspach, Maillard, és mtsai. 2002; Cordero, Stefanatos, és mtsai. 2012).

A bélőssejtek leszármazási vonalában működő jelátviteli útvonalak erősen konzerváltak. Ilyen konzervált jelátviteli útvonal többek között a Wingless (Wnt) útvonal. Az útvonalban szereplő fontos molekula az Apc fehérje, ami lényeges a bélőssejtek osztódásának szabályozásában. Az Apc tumorsuppresszor negatívan szabályozza a Wnt útvonalat, így hiányában az útvonal folyamatosan aktív, ami az őssejtek hiperproliferációjához vezet. Ez hiperpláziát és tumor képződést okoz a bélben. Az Apc-t kódoló génszakasz megtalálható a *Drosophilában* valamint emlősökben is. Emlősök esetében egy örökletes, familiáris adenómás polypozis nevű tumoros elváltozásnál figyelték meg a gén delécióját a sejtekben (Sansom, Meniel, és mtsai. 2007; Lee, Beebe, és mtsai. 2009).

Korábbi kutatások során hemopoetikus- és idegrendszeri őssejtekben egyaránt megfigyelték, hogy az őssejtek normál homeodinamikájában fontos szerepet tölt be az autofágia. A szövetregeneráló funkciót betöltő őssejtek is előregednek és az idő előre haladtával rájuk is hatnak különböző stressz hatások, például éhezés okozta metabolikus stressz, amik károsodásokat okozhatnak a sejtben. Az autofágia az őssejteket ezektől a károsító hatásoktól védi meg azáltal, hogy az önlebontó folyamat során keletkező metabolitok segítenek túlélni a tápanyagban szegény periódusokat. Amennyiben az autofágia defektusa miatt az őssejtek nem tudják reciklizálni anyagaikat az éhezés alatt, aktiválódik az apoptózis, és a sejt elpusztul (Wang, Liang, és mtsai. 2013; Warr, Binnewies, és mtsai. 2013). Az autofágia fontos szerepet tölt be abban, hogy az őssejtek megőrizhessék osztódási kapacitásukat. A legkülönbözőbb őssejt típusokban azt találták, hogy a normálisan működő autofágia szükséges a differenciálódáshoz és az önmegújításhoz. Ilyenek például a hematopoietikus, az epidermális és a mezenchimális őssejtek. Azt is megfigyelték, hogy ezekben a mezenchimális őssejtekben az autofágia gátlása a sejtek apoptózisához vezet. További érdekes megfigyelés, hogy az indukált pluripotens őssejtek létrehozásakor, vagyis az „újraprogramozás” magasabb hatékonysággal működött, ha aktiválták mesterségesen az autofágiát (Pan és mtsai. 2013).

Az autofágia konzervált lizoszómális lebontó folyamat, amelynek nélkülözhetetlen szerepe van a sejtek homeodinamikájának fenntartásában. Feladata a sérült, előregedett sejtorganellek és a hibás konformációjú fehérjék eltávolítása a sejtekből. A folyamat során a feleslegessé vált organellek illetve citoplazma részletek kettős membránba csomagolódnak, így létrejön az autofagoszóma. A lizoszómákkal való fúzió után autolizoszómákká alakulnak, és bennük savas környezetben aktív emésztőenzimekkel megkezdődik a bekebelezett anyagok lebontása. A sejt, a lebontás során keletkező metabolitok egy részét reciklizálja, azaz felhasználja új anyagainak szintéziséhez (Klionsky 2013). Autofág defektus esetén a hibás sejtalkotók felszaporodhatnak a sejtben, ami számos humán betegség kialakulásához vezethet. Ilyenek például a különböző tumoros elváltozások, amiket a sejtekben felszaporodó hibás mitokondriumok okozta oxidatív-, genotoxikus stressz által kiváltott mutációk alakíthatnak ki. Autofágia hiányában az immunitás is lecsökken, így a fertőzésekkel szemben nem tud kialakulni megfelelő immunválasz. Az autofágia hibája különböző krónikus neurodegeneratív betegségek kialakulásához is vezethet. A neurodegeneratív betegségeknél általában megfigyelhető különböző fehérje aggregátumok felhalmozódása az idegsejtekben. Ezek az aggregátumok lecsökkentik az intracelluláris teret,

illetve transzkripcionális faktorokat inaktiválhatnak. Ilyen betegség például az Alzheimer-kór, amely során nagy mértékű autofagoszóma felhalmozódás figyelhető meg az idegsejtekben. Ennek oka, hogy az autofagoszómák és lizoszómák fúziója nem történik meg, így nem tudnak lebomlani a már bekebelezett anyagok. További, az autofágia hibája miatt kialakuló krónikus neurodegeneratív betegségek még a Parkinson-kór, vagy a Huntington-kór, amelyek esetében különböző fehérje típusok felhalmozódását figyelték meg (Kesidou 2013).

Az autofagoszóma kialakulásában számos fehérje játszik szerepet, ezek a fehérjék az *atg* génekről íródnak át, és különböző komplexeket alkotnak. A különböző géntermékek között hierarchikus kapcsolat áll fenn, az autofagoszóma kialakulása során meghatározott rendben követik egymást. A folyamat első lépése az iniciáció, ami után kialakul a pre-autofág struktúra (PAS). Ebben központi szerepe van az Atg1 kináz komplexnek. A pre-autofág struktúrához az Atg9 fehérje szállítja a PAS képződéséhez szükséges membrán részeket. Az iniciációt az izoláló membrán kialakulása, másnéven nukleáció követi, amiben a Vps34 lipid kináz komplex tagjai (ide tartozik az Atg6 és Atg14) és azt követően az Atg18a foszfolipid effektor vesznek részt. A következő lépés során az izoláló membrán érése, záródása (ehhez nélkülözhetetlen az Atg2) és az autofagoszóma kialakulása következik. Ehhez ubiquitin szerű konjugációs rendszerek szükségesek, aminek tagjai például az Atg7, az Atg3, az Atg4 és az Atg8a. A további lépések során az autofagoszóma lizoszómákkal kapcsolódik és fuzionál. A kialakult autolizoszómák savas környezetében aktiválódó emésztőenzimek megkezdik a bekebelezett anyagok lebontását (Klinosky és mtsai. 2003; Itakura és Mizushima 2010; Mizushima 2010; Knaevelsrud 2010; Mari és mtsai. 2010; Hanada és mtsai. 2007; Chen és Klionsky 2011). A vps34 lipid kináz komplexnek két, alegység összetételében és ezáltal valószínűleg funkciójában eltérő komplexe található meg a sejtekben. Az első típusban az Atg6, Vps34 és Vps15 mellett az Atg14 van jelen a komplexben, és autofágia specifikus funkciót ellátva a nukleációt irányítja. A második típusban Atg14 helyett az UVRAG található meg, ami az endocitózis során játszik szerepet és az autofágia szabályozásában betöltött szerepe erősen vitatott (Itakura és mtsai. 2008; Itakura és Mizushima 2009; Lorincz és mtsai. 2014; Song és mtsai. 2014). Az *uvrag* tumor szupresszor gén, ugyanis vastagbél carcinómából származó sejtvonalakon végzett kísérletek során kimutatták funkcióvesztéses mutációját. Azonban az *uvrag* mutációval rendelkező, és vad típusú sejtekben hasonló szintű autofágia volt megfigyelhető (Knaevelsrud 2010).

Célkitűzések

- Autofág aktivitás vizsgálata a *Drosophila melanogaster* bélőssejtekben

- Az autofágia és *uvrag* funkcióvesztésének vizsgálata bélőssejtekben
- Az autofágia gátlás és az *uvrag* funkcióvesztés hatása az életképességre
- Az autofágia gátlás hatásának vizsgálata az *uvrag* funkcióvesztéses bélőssejtekben

Anyagok és módszerek

A Drosophila melanogaster, mint kísérleti modell állat

A *Drosophila melanogaster* (hétköznapi nevén ecetmuslica) széles körben alkalmazott genetikai modell organizmus. Tartása és szaporítása olcsó, nem igényel nagy helyet. Testmérete kicsi, fenntartása és szaporítása laboratóriumi körülmények között könnyen kivitelezhető. A hímek és nőtények könnyen megkülönböztethetők és a keresztezések szempontjából fontos szűz nőtények is jól elkülöníthetők a nem szűz példányoktól.

Mindössze négy kromoszómája van, ebből három autoszóma és egy ivari kromoszóma. Genetikailag könnyen manipulálható élőlények, így könnyű különböző mutáns és transzgén egyedek létrehozása. A *Drosophila melanogaster* teljes genomjának nukleotid szekvenciája 2000 óta ismert.

Vizsgálataim közelebbi objektuma a kifejlett állatokból eltávolított bélrendszer volt. Az ecetmuslica emésztő rendszere előbélre, előgyomorra, középbélre és utóbélre tagolódik. Az ecetmuslica emésztőrendszerének jellemző sejtípusai az őssejtek. Ezek asszimétrikus osztódás után megújítják önmagukat, tehát további őssejteket valamint ún. enteroblasztokat hoznak létre. Az enteroblasztok enterocitákká vagy enteroendokrin sejtekké differenciálódhatnak. A sejtek leszármazási vonalában konzervált jelátviteli útvonalak befolyásolják a sejtek differenciálódását.

Az ecetmuslica teljes átalakulással fejlődő holometabola rovar. Egyedfejlődése laboratóriumi körülmények között 10 napig tart. Az egyes fejlődési szakaszok egymástól jól elkülöníthetők. Három lárvastádiumot követően a harmadik stádium végén az állat pre-pupává alakul, kültakarója megkeményedik. A bábból 110-120 óra elteltével alakul ki az imágó. A kikelést közvetlenül megelőző stádium a farátadult fázis, amelyben a bábbőrön áttetszenek és már jól elkülöníthetővé válnak a felnőtt állatokra jellemző struktúrák, mint például a szemek és a szárnyak. Az adult stádium 45-60 napig tart általában, de ez erősen függ a környezeti tényezőktől.

Törzsek fenntartása

Az állatokat standard élesztő/kukoricaliszt/agar táptalajon tartottam vattadugóval elzárt üvegcsővekben, 12-12 óra sötét-fény periódus mellett. A törzseket és keresztezéseket 25°C-on tartottam, a páratartalom 50% volt. A hőérzékeny Gal80 inaktivációjának eléréséhez a legtöbb kísérlet során a törzseket 29°C-on tartottuk.

A kísérleti rendszer

A használt törzsekben a génexpresszió az UAS/Gal4 rendszer által szabályozott (Duffy, 2002). Ennek lényege, hogy a Gal4 fehérje expresszióját tetszőleges promóter szabályozza, ezzel a promóterrel befolyásolható, hogy a Gal4 melyik szövettípusban és mikor fejeződjön ki. Amikor a Gal4 fehérje az UAS promóterhez kötődik, megindul az UAS szabályozása alatt álló DNS szakaszból (transzgénről) a transzkripció. Azt, hogy a génexpresszió az állat melyik életszakaszában következzen be, hőérzékeny fehérjével szabályozható. A tubulin promóterrel (minden szövetben kifejeződik) szabályozott Gal80^{ts} hőérzékeny (ts: thermo-sensitive) fehérje 28 °C hőmérséklet alatt a Gal4 fehérjéhez kötődve meggátolja, hogy a Gal4 az UAS promóterhez kapcsolódva beindítsa a transzkripciót. A génexpresszió így térben és időben is szabályozott. A hőérzékeny fehérje konformációja a hőmérséklet emelkedésének hatására megváltozik és leválik a Gal4 fehérjéről, így megindulhat a Gal4 által bekapcsolt fluoreszcens riporter gén kifejeződése vagy az RNS interferencia, ami poszttranszkripcionális géncsökkentésre alkalmas elemek átíródása által valósul meg. A mutáns klónok vizsgálatán kívül minden kísérlet során 29°C-ra helyeztem a farát adult állatokat, egy-két nap elteltével friss táptalajra ráztam a kikelt legyeket és ezt 2-3 naponta megismétltem, amíg a kísérletekhez megfelelő korú legyeket kaptam.

A kísérletekben használt törzsekben az escargot promóterrel szabályozott Gal4 kifejeződése összejt és enteroblaszt specifikus, így a riporter gének illetve az RNS interferencia általi géncsökkentés kizárólag az összejtekben és az enteroblaszt sejtekben történik meg. A kísérletekben felhasznált törzsek a következők voltak; kontroll w[1118], UVRAG [HMS01357], Atg14 [KK108559], Atg2 [JF02786], Atg6 [JF02897], vps34 [HMS00261], Atg18 [JF02898], Atg3 [KK101364], Atg5 [JF02703], Atg8a [KK109654], esgGFP [esg-Gal4, UAS-GFP, Tub-Gal80^{ts}] - köszönet érte Phillip Karpowicz-nak (Department of Genetics, Harvard Medical School), uvrag^{B21} [FRT40A uvrag^{B21}], atg13^{Δ81} [FRT82B atg13^{Δ81} / TM6], fip200^{Δ130} [FRT82B fip200^{Δ130} / TM6], vps34^{Δm22} [FRT42D vps34^{Δm22} / ST6], kontroll [hsFLP; 40AQS, et49-QF, QUAS-GFP-CD8 / ST6].

RNS interferencia

Az RNS interferencia egy RNS-függő géncsendesítési folyamat, amelynek során RNS molekulák poszttranszkripcionálisan gátolják a génexpressziót. A folyamat során dsRNS-ek (double stranded RNA: dupla szálú RNS) által csökken annak a génnek a kifejeződése, amelynek az mRNS-ével kapcsolódni tud. A folyamatban részt vevő fontosabb fehérje komplexek, a DICER és a RISC (RNA induced silencing complex).

A DICER a duplaszálú dsRNS-t feldarabolja rövid siRNS-ekre (small interfering RNA). A RISC-hez kötődik az siRNS egyik szála. A RISC feladata, hogy felismerje az siRNS-el komplementer szekvenciájú mRNS-eket és kötődjön hozzájuk. Ezzel lehetővé válik, hogy a cél mRNS-t endonukleázok hasítsák, majd exonukleázok lebontsák, ami géncsendesítést eredményez, hiszen a „csendesített” génről nem képződik fehérje. Az RNS interferencia természetes körülmények között is jelen van és nélkülözhetetlen szerepe van a vírusok vagy idegen eredetű duplaszálú-RNS-ek ellen irányuló immunválasznak (Cerutti és Casas-Mollano 2006; Kurreck 2009) .

A MARCM rendszer

A MARCM kísérlet során GFP-vel jelölt mutáns klónok vizsgálata történik, az Flp/FRT rendszer segítségével létrehozott genetikai mozaik állatokban. A általam felhasznált törzsek a hsFlp; QUAS-GFP; et49QF, FRT82B, tub-QS, a hsFLP; FRT40A,tub-QS; et49-QF; QUAS-GFP és hsFLP; FRT42D,tub-QS; et49-QF; QUAS-GFP. Az et49 és tubulin promóterek folyamatosan aktívak a sejtekben, így a QS és QF is folyamatosan kifejeződik a sejtekben. Vad típusú sejtekben a tubulin promoterről folyamatosan képződő QS kötődik a QF transzkripció faktorhoz, ez pedig gátolja a QF QUAS szekvenciához való kötődését, így a GFP-riporter átíródását. Abban az esetben, ha keresztezzük a fenti törzseket egy FRT40A-n, FRT82B-n vagy FRT42D-n lévő mutációt hordozó törzsszel, a heterozigóta utódokban a flippáz-enzim működésbe lép. A szomatikus rekombinációt követően a homozigóta mutáns sejtekben megszűnik a QS expressziója. A QS hiányában QF tud kötődni QUAS-GFP-hez és a riporter gén átíródása megindul, jelölve a homozigóta mutáns sejteket. Az osztódó sejt utód sejtjeiben szintén expresszálódik a GFP. Mivel a *Drosophila* bélben kizárólag az őssejtek osztódnak, ezért a felnőtt stádium első hetében 45 percre 37°C-on tartott legyek belében bekövetkező mitotikus rekombináció során mutáns GFP pozitív őssejtek jönnek létre. Bizonyos idő elteltével vizsgálhatjuk az őssejtek osztódásának mértékét, hiszen a GFP pozitív

össajt leszármazott sejtjei is GFP pozitívak lesznek. Az egy GFP pozitív klónszigeten belül található sejtek számából következtethetünk a mitotikus aktivitásra.

Életképességi vizsgálatok

Az életképességi vizsgálatok elvégzéséhez a bebábozódott állatokat a farátadult stádiumba lépésük után 29°C-ra helyeztem. A kikelt állatokat három naponta friss táptalajra ráztam, és az egyes törzsekben regisztráltam az elhullott példányok számát. A vizsgálatot addig folytattam, amíg az utolsó állat is elhullott.

Immuncitokémia

A vizsgálathoz adult állatok középbelét sztereomikroszkóp alatt, csipeszekkel eltávolítottam, majd azokat 9:1 arányú PBST és 36,5%-os para-formaldehid oldat keverékében 1 órán át fixáltam szobahőmérsékleten. Fixálás után a beleket 2X20 percig mostam PBST oldatban, majd 2 órán keresztül blokkoltam PBST 3%-os BSA (szarvasmarha szérum albumin) oldatban (10 ml PBST-ben feloldottam 0,3 g BSA-t) szobahőmérsékleten. A blokkolást követően PBST 1%-os BSA oldatba kevertem az elsődleges ellenanyagokat és ezzel a keverékkel inkubáltam a beleket egy éjszakán keresztül 4°C-on. Az immuncitokémia második napján az első mosást 2X20 percig PBST 4%-os NaCl oldattal (10 ml PBST-ben 0,4g NaCl-ot oldottam fel) végeztem. A sóoldatos mosást követően PBST 1%-os BSA oldatba kevert másodlagos antitestekkel inkubáltam a mintákat 2 órán keresztül szobahőmérsékleten, alufóliába csomagolva. Az inkubáció után ismét 4%-os sóoldattal mostam a beleket 20 percig. Mosás után egy éjszakán keresztül 4°C-on tartottam a beleket PBST oldatban.

A felhasznált elsődleges antitestek és hígításuk: csirke anti-GFP 1:1500 (Pircs, Nagy, és mtsai. 2012), nyúl anti-PH3 1:300 (Millipore 06-570), egér anti-Armadillo 1:50 (DSHB N2 7A1), egér anti-Integrin 1:50 (DSHB 7E2), egér anti-Delta 1:100 (DSHB C594.9B-C). Másodlagos antitestek és hígításuk; Alexa 488-konjugált kecske anti-csirke 1:1500 (Thermo Scientific SA5-10070), Alexa 568-konjugált kecske anti-egér 1:1500 (Invitrogen A11019), Alexa 546-konjugált kecske anti-nyúl 1:1500 (Invitrogen A11035).

Mikroszkópia

Az állatokból kiboncolt, majd kipreparált beleket 50%-os PBS/glicerín DAPI (1:2500) oldattal fedtem le. A képeket Plan-NeoFluar 10x 0.3 NA és 40x 0.75 NA objektívekkel,

Axiocam Mrm kamerával és ApoTome2 szemikonfokális feltétellel kiegészített Zeiss Axioimager mikroszkóppal valamint AxioVision Rel. 4.8 szoftverrel készítettem.

Elektron mikroszkópia

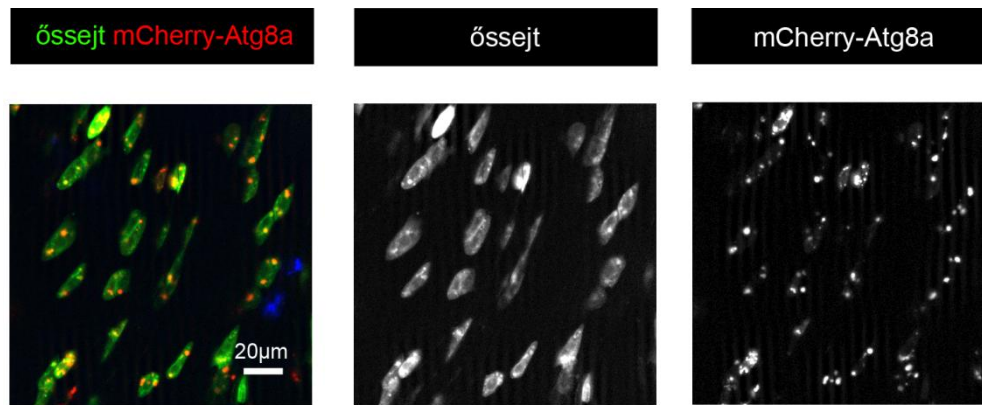
A mintákat az előkészítéshez csipesszel kiboncoltuk. A minták fixálása 3,2%-os formalin és 0,5%-os glutáraldehid keverékében történt, 4°C-on egy éjszakán keresztül. Az elektronmikroszkópos mintákhoz használt fixálószer pH-ja 7,4. A fixálószer kimosása nátrium-kakodilát 0,1 M-os oldatával történt. A beágyazás során először ozmium-tetroxid 0,5%-os oldatában kontrasztosítottuk a mintákat 1 órán át. Az ozmium-tetroxid kimosása 10%-os autonnal (kétszer cserélve). A mintákat ezután 2%-os uranil-acetátoldatba helyeztük 20 percre. Ezt követően a mintákat víztelenítettük felszálló alkohol sorban, majd intermedier propilénoxiddal itattuk át 15 percig. Végül a mintákat propilénoxid és araldit keverékébe ágyaztuk be. Az utolsó lépésben a mintákat moldokba öntöttük ki és polimerizáltattuk a keveréket (termosztátba helyeztük overnight, 37°C-ra, majd 2 napra 60°C-ra). A minták faragás után metszhetők üveggéssel. A metszetek további kontrasztosítása ólom-citráttal történt. A képek JEOL JEM 1011 Transzmissziós Elektron Mikroszkóppal, Olympus Morada 11 megapixeles kamerával és Olympus iTEM szoftverrel készültek.

Statisztika

A kísérletek során kapott eredmények adatsorainak normalitás eloszlásának vizsgálatát követően az eltérések közötti szignifikanciát medián-, ill. Kruskal-Wallis és ANOVA teszt alkalmazásával végeztem. Az életképességi vizsgálat eredményeit, Kaplan-Meier analízissel értékeltem, ami során a szignifikanciát Log Rank (Mantel-Cox) teszt segítségével határoztam meg. A statisztika készítését az IBM SPSS Advanced Statistics 20.0 statisztikai programmal végeztem.

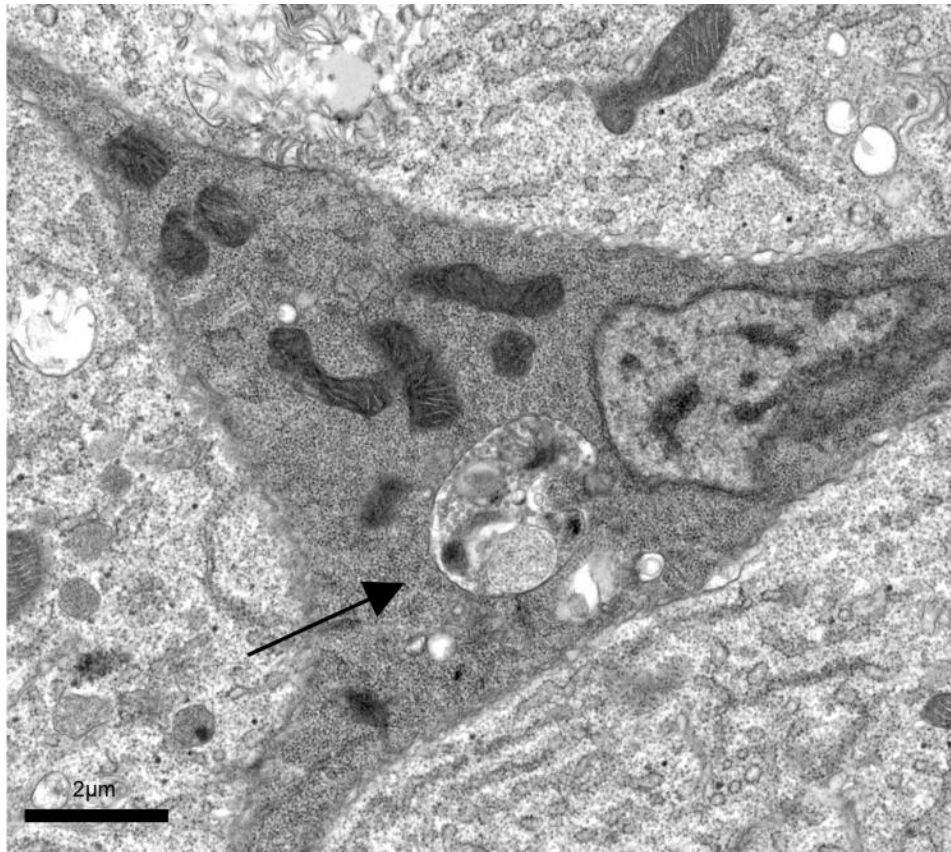
Eredmények

A vizsgálatok során elsődleges volt, hogy megvizsgáljam a bélőssejtekben zajló autofágiát. Ennek kimutatására legmegfelelőbb molekula az mCherry-Atg8a. Ez a géntermék megtalálható minden autofág struktúrán az izoláló membránoktól kezdve az autolizozómáig. A fluoreszcens mikroszkóppal készült képeken zölddel jelölt sejtek a GFP pozitív őssejtek. Az őssejtekben jól látszottak a nagymennyiségben jelenlévő pirossal jelölt, mCherry pozitív autofág struktúrák (1. ábra). Ezen megfigyelés arra utal, hogy a bélőssejtekben alapszinten nagymértékű autofág aktivitás zajlik.



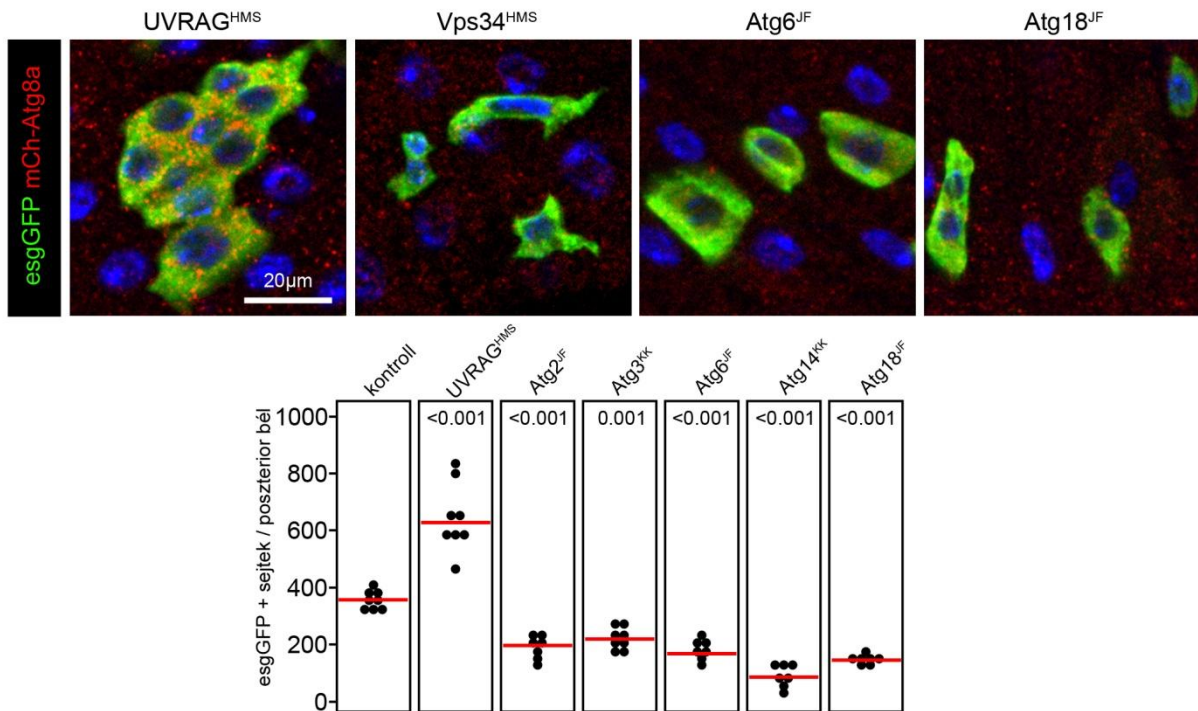
1. ábra GFP pozitív őssejtek és a bennük található, pirossal jelölt mCherry-Atg8 pozitív autofág struktúrák.

Az autofág fenotípus további megerősítéséhez ultrastrukturális vizsgálatokat végeztünk. Ezek során ultravékony metszeteket készítettünk a bélből és ezeket elektronmikroszkóppal vizsgáltuk meg. Az elkészült képeken jól elkülöníthetőek voltak környezetüktől az őssejtek sötétebb citoplazmájuk miatt. Az őssejtekben az elektronmikroszkópos képeken is megtalálhatóak voltak a nagyméretű, denz autofág struktúrák, (a citoplazmától eltérő kinézetű beltartalom arra utal, hogy az autolizoszómákban megfelelően zajlik a lebontás), méghozzá igen gyakran: 27 lefotózott őssejt metszetéből 23 tartalmazott autofág struktúrákat (2. ábra). Kísérletünk tehát megerősíti, hogy az őssejtekben magas szinten zajlik az autofágia.



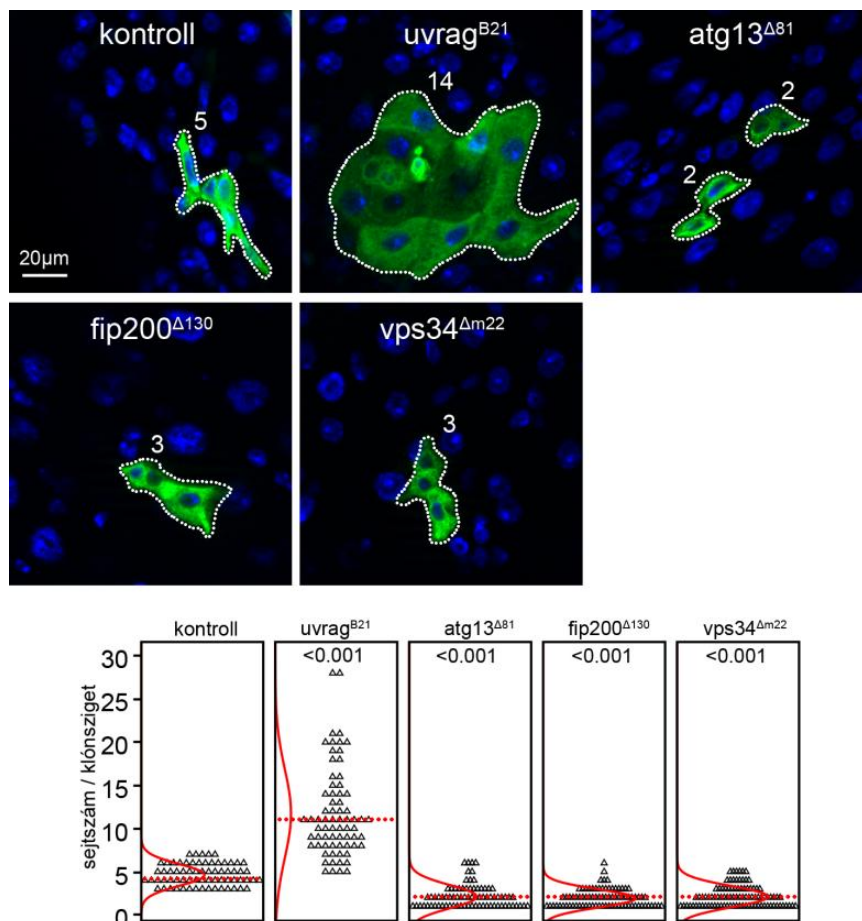
2. ábra Az elektronmikroszkópos felvételen jól látható a nagyméretű autofág struktúra (fekete nyíllal jelölve).

Következő kísérletem az autofágia összejt specifikus funkcióvesztésének megfigyelését célozta. Ehhez különböző *atg* gének csendesítését előidéző RNS interferencia (RNSi) vonalakat kereszteztem egy olyan törzzsel, amelyben a GFP riporter és az mCherry-Atg8a kifejeződése összejt specifikus. A zölddel jelölt bélőssejtekben az *atg* RNSi (*vps34*, *atg6*, *atg18*) hatására lecsökken a piros mCherry-Atg8 pozitív struktúrák jelenléte (3.ábra, kontroll összehasonlításként lásd: 1. ábra), tehát az autofágia csökkent mértékben működött a sejtekben. Az autofágia gátlás mellett megvizsgáltam, hogy az *uvrag* funkcióvesztés milyen hatással van az összejtekre és a bennük zajló autofágiára. Azt találtam, hogy az mCherry-Atg8 nagy mennyiségben jelen van a sejtekben az *uvrag* funkcióvesztés mellett is, tehát az autofágia folyamatára nincs hatással az *uvrag* tumorsuppresszor hiánya (3. ábra). Ezen kísérletekkel igazoltam, hogy az összejtekben zajló autofágia *atg* gén függő módon zajlik és az *uvrag* nincs hatással a folyamat végbemenetelére. Az autofágia aktivitásának vizsgálata során azt is tapasztaltam, hogy az autofágia bélőssejt specifikus csendesítésekor lecsökken az összejtek száma, míg az *uvrag* hiánya esetén megnövekszik a számuk (3. ábra grafikon).



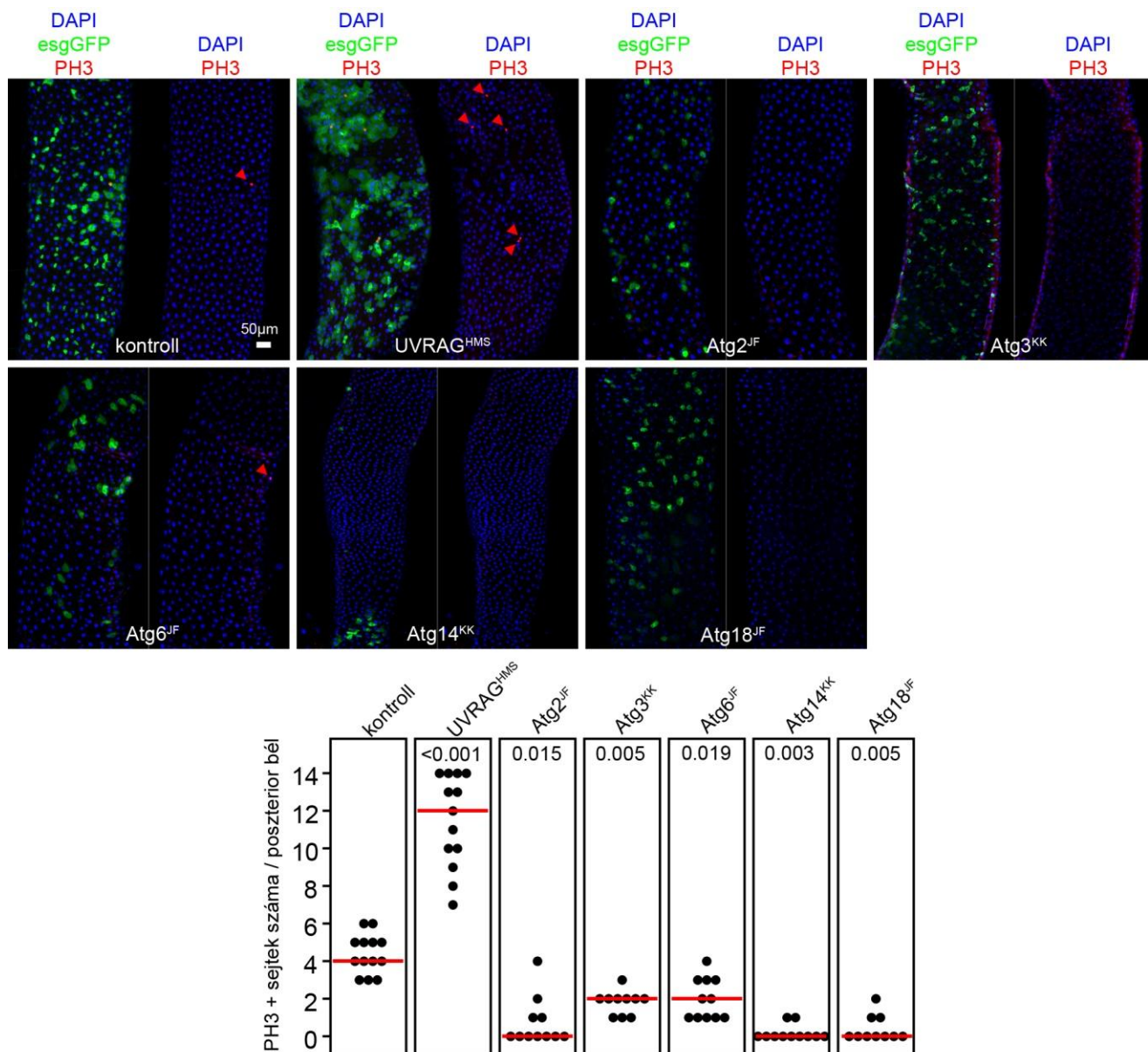
3. ábra Különböző autofág gének, és az *uvrag* összejspecifikus funkcióvesztésének vizsgálata. Zöld színnel vannak jelölve a GFP pozitív őssejtek, piros szín jelzi az mCherry-Atg8a molekulát. A diagramon minden egyes pont egyetlen bél poszterior szakaszában számolt őssejtek számát, míg a piros egyenes a mediánt jelöli. A számok szignifikanciát (p-érték) jelölnek a kontrollhoz viszonyítva (ANOVA teszt, post-hoc korrekciós teszt: Bonferroni). Ahol nincs relációs jel, ott a feltüntetett érték egyenlő a p-értékkel.

Ezeket az eredményeket a mitotikus aktivitás vizsgálata is megerősítette. Az őssejtek számának csökkenésén kívül megvizsgáltam osztódási képességüket is autofágia valamint *uvrag* funkcióvesztés esetén. Mivel a *Drosophila* középbelében csak az őssejtek osztódnak, ezért is lehetséges alkalmazni a MARCM rendszert az osztódási kapacitás vizsgálatára. Ez a kísérlet lehetővé teszi, hogy egyetlen sejt leszármazott sejtjeit vizsgáljuk. Az eredmények azt mutatták, hogy az autofágia gátlása esetén csökken a GFP pozitív klónszigetben található sejtek száma a kontrollhoz viszonyítva. Az *uvrag* funkcióvesztése mellett viszont őssejtek hiperproliferációja volt megfigyelhető, hiszen a kontroll állatokhoz képest az egy klónszigetben lévő sejtek száma szignifikánsan magasabb volt *uvrag* funkcióvesztés esetén (4. ábra).



4. ábra Az autofágia specifikus gének gátlásakor csökken, ezzel szemben az *uvrag* funkcióvesztése esetén nő a klónszigetekben megtalálható sejtek száma. A fehér számok a GFP pozitív klónszigetekben található sejtek számát jelölik a bemutatott területen, ahol a fehér szaggatott vonal jelzi az egyes klónszigetek határát. A grafikonon a háromszögek a kiértékelt klónszigetekben számolt klónsejtek számát mutatják egyenként. A szaggatott piros vonal a mediánt, míg a folyamatos piros vonal eloszlást jelöl. A számok szignifikanciát (p-érték) jelölnek a kontrollhoz viszonyítva (Kruskal-Wallis teszt, másodlagosan korrigált p-értékek).

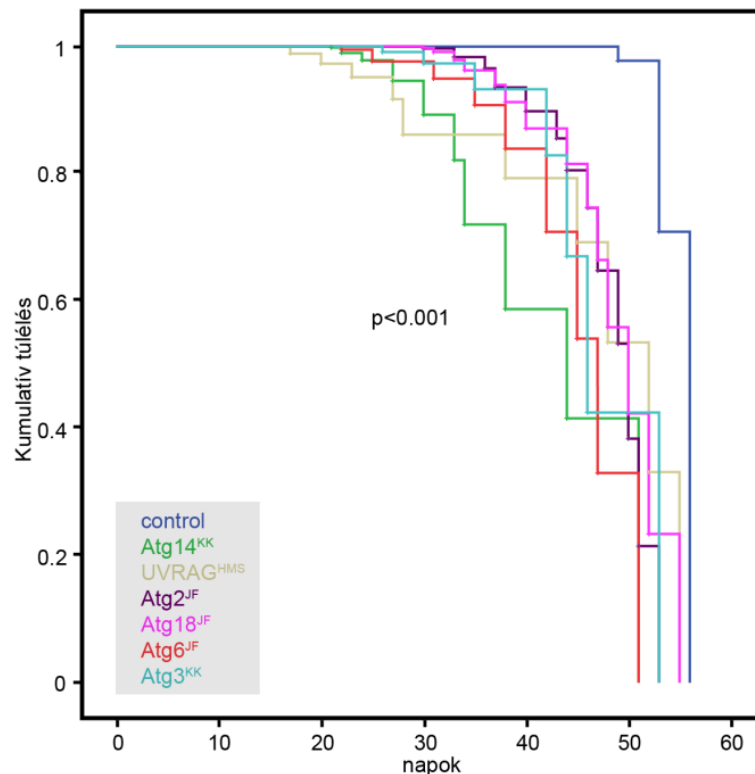
Az összejt szám változás megfigyelésének következtében megvizsgáltam azok osztódási aktivitását. Ennek követésére kiválóan alkalmas a foszforilált hiszton-3 (PH3) molekula jelölése, ugyanis a hiszton-3 a mitotikusan aktív sejtekben foszforilálódik. Az *uvrag* funkcióvesztés esetén a mitotikus aktivitás megnő a kontroll állatok beléhez képest. Az autofágia gátlásának következtében pedig lecsökken az összejtek mitotikus aktivitása (5. ábra).



5. ábra Az autofágia funkcióvesztése esetén csökken a mitózisok és a poszterior bélben található GFP pozitív őssejtek száma, ezzel szemben *uvrag* funkcióvesztés esetén megnő a mitotikus aktivitás és a GFP pozitív őssejtek száma a kontrollhoz viszonyítva. Piros nyílfejek mutatják a mitotikusan aktív sejteket. A diagramon minden egyes pont egyetlen bél poszterior szakaszában számolt mitotikusan aktív sejtek számát, míg a piros egyenes a mediánt jelöli. Ahol nincs relációs jel, ott a feltüntetett érték egyenlő a p értékkel. A számok szignifikanciát jelölnek a kontrollhoz viszonyítva (Medián teszt, másodlagosan korrigált p-értékek).

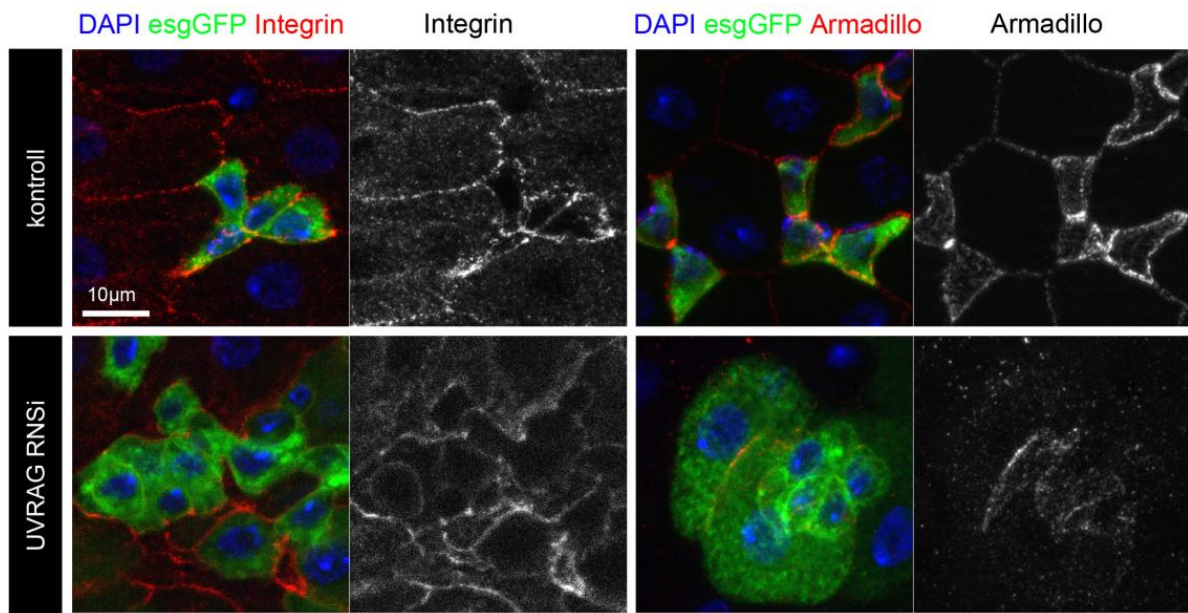
Annak megállapítására, hogy az állatok élethosszára miként hat az autofágia illetve az *uvrag* bélőssejt specifikus funkcióvesztés, életképességi vizsgálatot végeztem. Az őssejt-specifikus autofágiagátlás és *uvrag* funkcióvesztés az állatok életképességére is hatást gyakorolt. Az autofágia bélőssejt specifikus gátlása esetén az állatok szignifikánsan hamarabb pusztultak el a kontroll állatokhoz hasonlítva. Az *uvrag* funkcióvesztés esetén ehhez hasonló eredményt kaptam (6. ábra). Úgy tűnik, hogy az őssejtekben zajló autofágia és az *uvrag* által

irányított endocitózis nélkülözhetetlenek a normális bél homeosztázis fenntartásához, aminek hiányában csökken az élethossz.



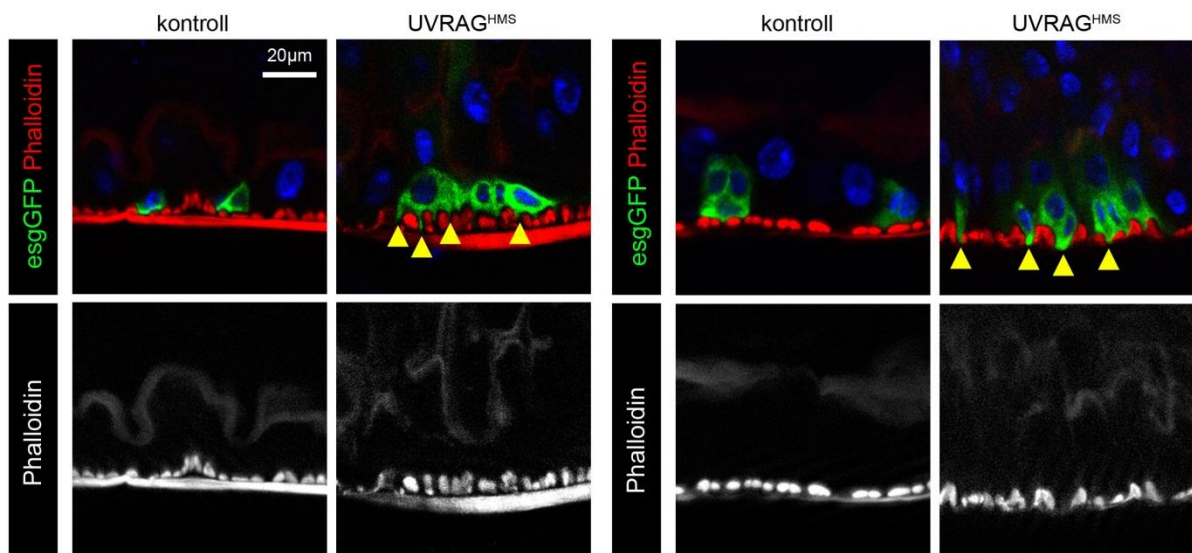
6. ábra Az élethossz vizsgálatok megmutatták, hogy az autofágia gátlása és *uvrag* funkcióvesztés mellett jelentősen csökken az életképesség a kontroll állatokhoz képest.

Mind az autofágia gátlás, mind az *uvrag* funkcióvesztés mellett az állatok élethosszának csökkenését tapasztaltam, ugyanakkor *uvrag* funkcióvesztésnél az őssejtek hiperproliferációját is megfigyeltem. Ezen megfigyelések miatt megvizsgáltam, hogy a felszaporodó sejtek betöltik-e megfelelően hám funkciójukat, meg vannak-e rajtuk a szükséges sejtkapcsolati struktúrák. Az *uvrag* funkcióvesztése esetén a tumoros elváltozások során megfigyelhető fenotípust tapasztaltunk: a bélőssejtek szabályozatlanul, szinte korlátlanul osztódtak. További kísérletek során megvizsgáltam, hogy a sejt kapcsoló struktúrákra van-e hatása a funkcióvesztésnek. A sejtek egymáshoz való rögzülésében lényeges szerepe van a különböző sejt kapcsoló struktúráknak. Tumoros elváltozások esetében megfigyelhető a sejt kapcsoló struktúrák megváltozása, és a csökkent sejt adhézió miatt a tumoros sejtek könnyebben kiszakadnak eredeti szöveti környezetükből. Az integrin egy, a hemidezmoszómaiban csoportosuló membránfehérje a sejt váz intermedier elemeivel kapcsolódik, az armadillo pedig az adherens sejt adhézióban játszik szerepet. Az armadillo, más néven β -catenin a wingless jelátvitel központi molekulája. A kísérletek során azt tapasztaltam, hogy az *uvrag* tumorszuppresszor hiánya esetén a sejt adhéziós molekulák mennyisége csökken, eloszlása pedig drasztikusan megváltozik az őssejtek felszínén (7. ábra).



7. ábra A sejtadhéziós molekulák mennyiségének és eloszlásának változása *uvrag* funkcióvesztés esetén. A GFP pozitív zöld sejtek az összejtek.

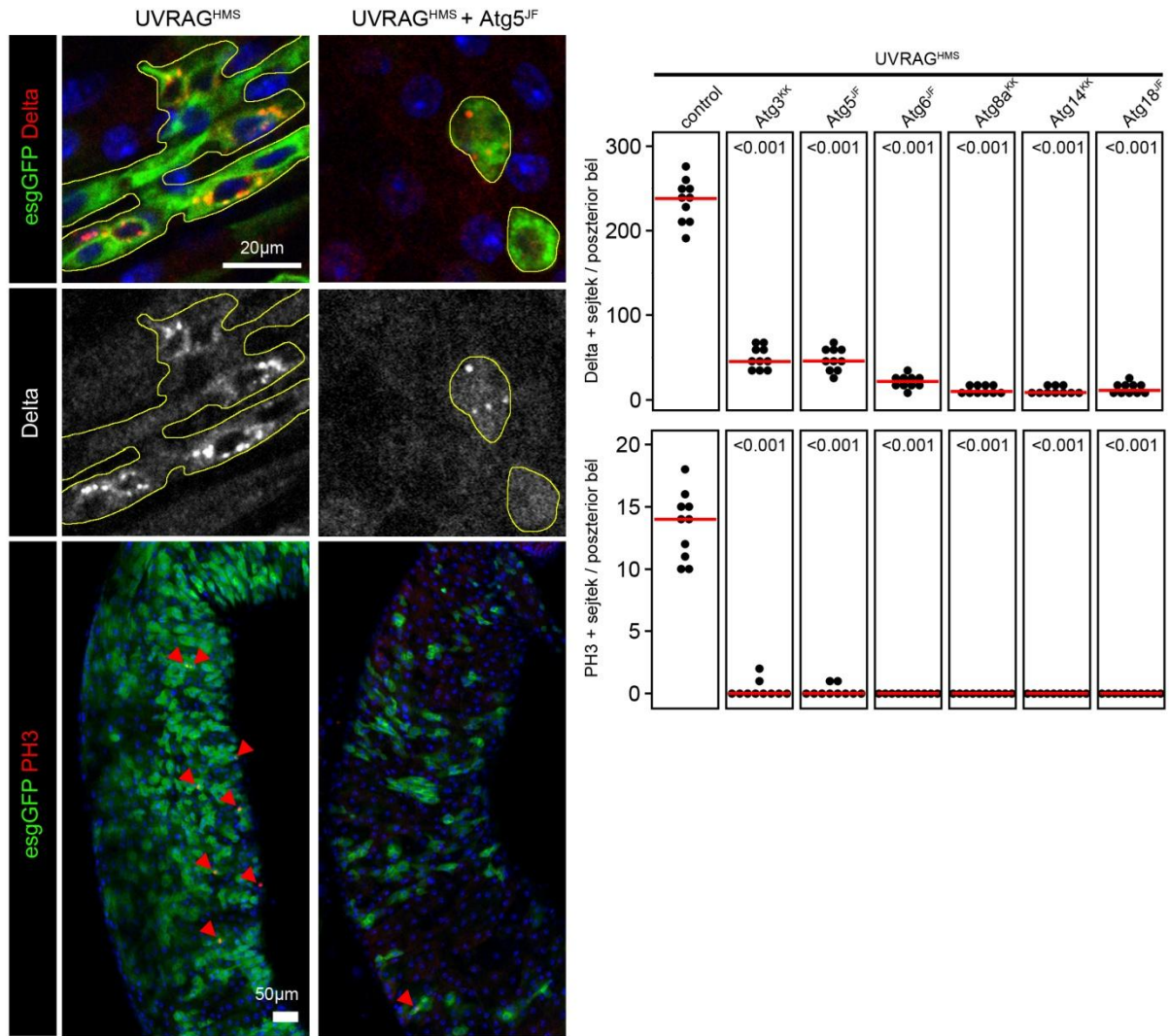
Az *uvrag* funkcióvesztés mellett a sejtek morfológiájának változását is megfigyeltem. A Phalloidin festés a sejtekben lévő aktint festi meg, így jelzi az izomsejteket. A felvételeken jól látszik, hogy a kontroll állatok bél őssejtjei az izomréteg felett helyezkednek el, ezzel szemben az *uvrag* funkcióvesztés esetében az őssejtek nyúlványokat növesztettek és ezek az izomsejtek közé ékelődtek (8. ábra).



8. ábra Az őssejtek morfológiájának változása is megfigyelhető *uvrag* funkcióvesztés esetén

A fenti kísérletekből kiderült, hogy az őssejtek normál működéséhez az *uvrag* és az Atg14 egyaránt szükséges így azt is megvizsgáltam, hogy egymással milyen kapcsolatban

állhatnak. Az tumorszuppresszor *uvrag* hiánya miatt kialakuló kóros fenotípus azonban szuppresszáható az autofágia gátlásával. Az episztázis analízis eredményeiből kiderült, hogy ha az autofágia gátolt, akkor csökken a sejtek hiperproliferációja, vagyis csökken a mitotikusan aktív sejtek és a GFP pozitív összejtek száma, annak ellenére, hogy az *uvrag* nincs jelen a sejtekben (9. ábra).

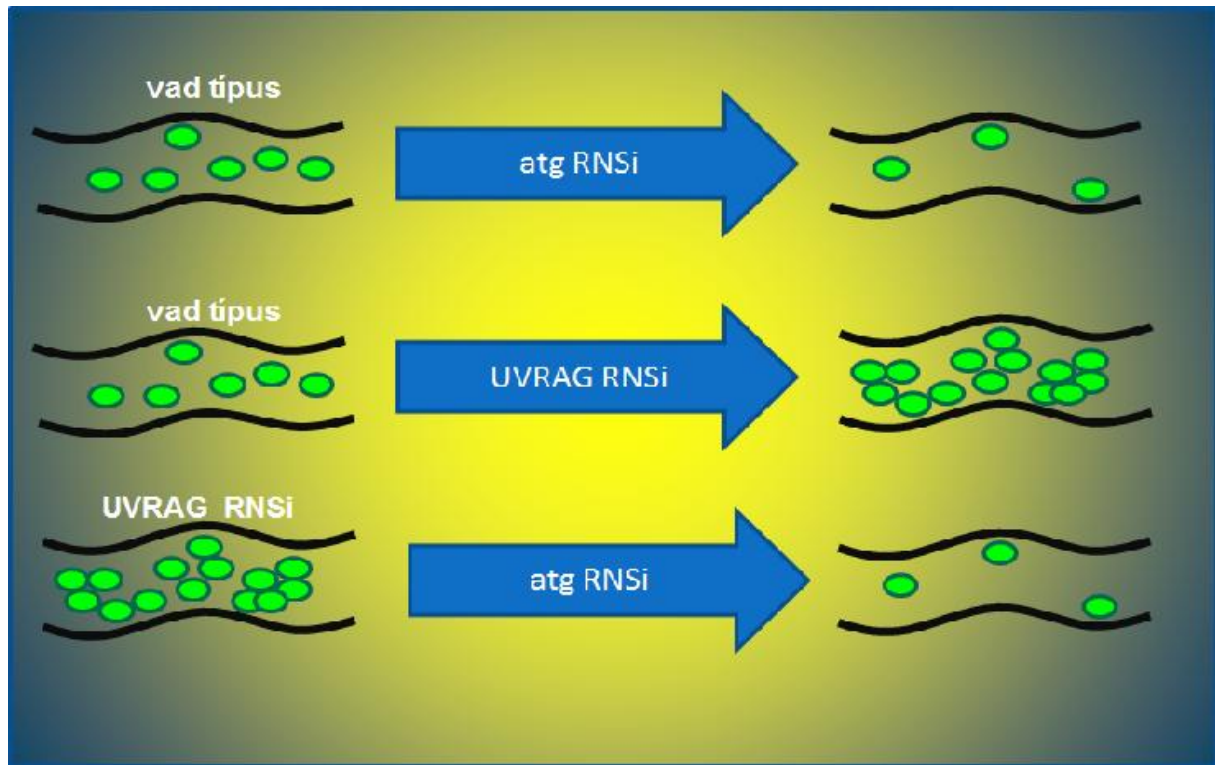


9. ábra Episztázis analízis. Az *uvrag* funkcióvesztés fenotípusa szuppresszáható az autofágia gátlásával. A diagramon minden egyes pont egyetlen bél posztterior szakaszában számolt összejtek és PH3 pozitív sejtek számát, míg a piros egyenes a mediánt jelöli. A számok szignifikanciát jelölnek a kontrollhoz viszonyítva (ANOVA teszt, post-hoc korrekciós teszt: Bonferroni).

Kitekintés

Összefoglalásképpen elmondható hogy az autofágia bél ősejt-specifikus gátlása esetén a bélben lecsökken az őssejtek száma. Ezzel szemben *uvrag* funkcióvesztés mellett a sejtek hiperproliferációja figyelhető meg. A *uvrag* funkcióvesztés kóros fenotípusa azonban

szupresszálnak az autofágia gátlásával és ez esetben az autofágia gátlás fenotípusát kapjuk vissza (10. ábra).



10. ábra Az autofágia gátlása a bélőssejtek számának csökkenéséhez vezet, ezzel szemben az *uvrag* funkcióvesztés az őssejtek hiperproliferációját okozza. Az *uvrag* funkcióvesztés kóros fenotípusa azonban szupresszálnak az autofágia gátlásával, és *uvrag* hiányában sincs hiperproliferáció. Az *uvrag* funkcióvesztés mellett alkalmazott autofágia gátlás esetén az autofágia hiányának fenotípusát kapjuk vissza.

Az *uvrag* funkcióvesztést korábban is vizsgálták más szövetekben, például fejlődő szemben vagy zsírtestben, de a sejtek hiperproliferációja csak a bélben volt megfigyelhető (Lőrincz és mtsai. 2014, Takáts és mtsai. 2014). Emellett emberi bélkarcinómából származó sejtvonalakon végzett vizsgálatok során is megfigyelték az *uvrag* funkcióvesztését (Knaevelsrud 2010). Az ilyen típusú béldaganatokban esetleges terápiás célpont lehet az autofágia gátlása (bár specifikusan autofágiát gátló szer nem ismert a klinikumban).

Vizsgálataim során elsőként sikerült kimutatnom, hogy az autofágia központi szerepet játszik a bél őssejtek homeodinamikájának fenntartásában, mely nélkülözhetetlen a normális bélfunkció megőrzésében. Igazoltam továbbá, hogy az autofágia, mint effektor útvonal szükséges az *uvrag* tumorszuppresszor hiányában kialakuló hiperplázia fenntartásában. Ez egyrészt kiszélesíti ismereteinket az autofágia tumoros elváltozásokban betöltött erősen kontextusfüggő szerepével kapcsolatban (Pérez és mtsai. 2014; Nagy és mtsai. 2013), továbbá hozzájárulhat a szöveti őssejtekkel kapcsolatos kutatások eredményeihez és az őssejtekkel

kapcsolatos betegségek kialakulásának megértéséhez. Kimutatták ugyanis, hogy az őssejtek osztódásának szabályozásában központi szereppel bíró Wnt jelátvitel Apc mutációja által bekövetkezett hiperaktivitása őssejt hiperpláziához vezet, amit egér tumor modellen is igazoltak. Ezért további vizsgálatok célját képezheti majd az autofágia kontextus függő szerepének vizsgálata különböző mutációk által előidézett őssejt hiperpláziák esetén.

Az autofágiának kettős szerepe van a tumoros elváltozások kialakulásában. Egyrészt megvédi a sejteket a különböző stresszhatásoktól, melyek tumorok kialakulását előidéző sérülésekhez vezethetnek. Másrészt a tumoros elváltozások során a sejtek nagymértékű elszaporodása és hiperplázia figyelhető meg, melyhez a sejtekben zajló magas autofágia szolgáltathat energiát. Továbbá tumorok kialakulásának korai fázisában a nem vaszkularizált állapotban a tumor belsejében lévő sejtek autofágia hiányában nem jutnak az osztódásukhoz szükséges, megfelelő mennyiségű energiához. Későbbi stádiumban, a tumoros sejtek áttét képzése figyelhető meg. Ehhez nem csupán energiára van szükség, hanem a sejtkapcsoló struktúrák meggyengülésére is. Tumorszuppresszor gének funkcióvesztéses mutációja esetén a sejtek hiperproliferációja, valamint a sejtdhézió gyengülése figyelhető meg. Ezekben a sejtekben az autofágia szintje is sokszor megnő. (Sansom, Meniel, és mtsai. 2007; Pérez és mtsai. 2014). Kísérleteim során először igazoltam, hogy az *uvrag* hiányában a kóros sejtpolaritás által kialakított bélőssejt hiperplázia fenntartásához szükséges az autofágia normális működése. Továbbá úgy tűnik, hogy az *uvrag* nem szükséges az autofágia normális működéséhez, ami egybevág más szakirodalmi és más modellrendszerekből származó adatokkal.

A bél őssejtekben zajló autofágia fontosságának kérdése további érdekes problémákat vet fel. Különböző hatású gyógyszereket szedve ugyanis azok felszívódása alapján kapcsolatba kerülhetnek a bélőssejtekkel és mellékhatásként gátolhatják a bennük zajló autofágiát, ami az őssejtek csökkent mitotikus kapacitásához és végül csökkent bél regenerációs képességhez vezethetnek. Ezzel csökkenhet az immunológiai védelmi rendszer hatékonysága is, ami megnövekedett érzékenységet idézhet elő különböző fertőzésekkel szemben. Ennek kialakulása pedig kulcsfontosságú lehet számos orvosi kezelés eredményes kimenetelének szempontjából. A gyógyszerek továbbá toxikusak is lehetnek önmagukban, ami az enterociták pusztulása miatt beinduló kompenzációs őssejtosztódás magas aktivitását megemelve szintén hiperpláziához vezethet (Markstein, Dettorre és mtsai. 2014).