

XXXII. OTDK Biológia Szekció

A Hps1 és a Hps4 fehérje autofágiában betöltött szerepének vizsgálata

Tóth Sarolta

Biológus M.Sc. 2. évfolyam

ELTE TTK Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai tanszék

Témavezetők:

Takáts Szabolcs, tudományos munkatárs

Dr. Juhász Gábor, tudományos főmunkatárs



Tartalom

1. Összefoglaló	3
2. Bevezető	4
2.1. Az autofágia	4
2.2. A Hermansky-Pudlak szindróma (HPS).....	5
2.3. Modellállatom, a <i>Drosophila</i>	6
3. Célkitűzések	7
4. Anyagok és módszerek.....	7
5. Eredmények.....	11
5.1. A Hps1 és Hps4 mutáns vonalak szemszínének tesztelése	11
5.2. Az autofág struktúrák képződésének vizsgálata Hps1 illetve Hps4 fehérjék hiányában:.....	12
5.3. Az autolizoszómák emésztőképességének vizsgálata Hps1 hiányos sejtekben	14
5.4. A Hps1 és Hps4 mutáns állatok élethosszának vizsgálata	16
5.5. A <i>Hps1</i> más lizoszóma fejlődésben részt vevő génekkel való viszonyának vizsgálata	17
6. Diskusszió.....	20

1. Összefoglaló

A lizoszómális kompartment megfelelő fejlődése, és az ehhez köthető lebontó útvonalak, az endocitózis és az autofágia megfelelő működése alapvető fontosságú egy sejt homeodinamikájának fenntartásához.

A Hermansky-Pudlak szindróma (HPS) egy genetikai betegség, kialakulásáért a *Hps* gének mutációi felelősek. A *Hps1* és *Hps4* alkotja a BLOC-3 komplexet, amely a lizoszóma-szerű organelumok kialakulásához szükséges. Dolgozatom célja annak kiderítése volt, hogy a BLOC-3 kiesése milyen hatással van az autofágiára, azaz a lizoszómákban zajló önmérsztésre.

Munkámhoz *Hps1* és *Hps4* mutáns *Drosophila melanogaster* vonalakat használtam. Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálataim során azt találtam, hogy az autolizoszómák kialakulnak ugyan, de bel tartalmuk nem bomlik le megfelelően. Ezt ultrastrukturális analízissel is megerősítettük: a mutáns állatok zsírtestében a normális kinézetűek mellett számos aberráns autolizoszómát figyeltem meg. Továbbá mind a *Hps1*, mind a *Hps4* mutáns vonalak esetén élethosszbeli rövidülést találtam.

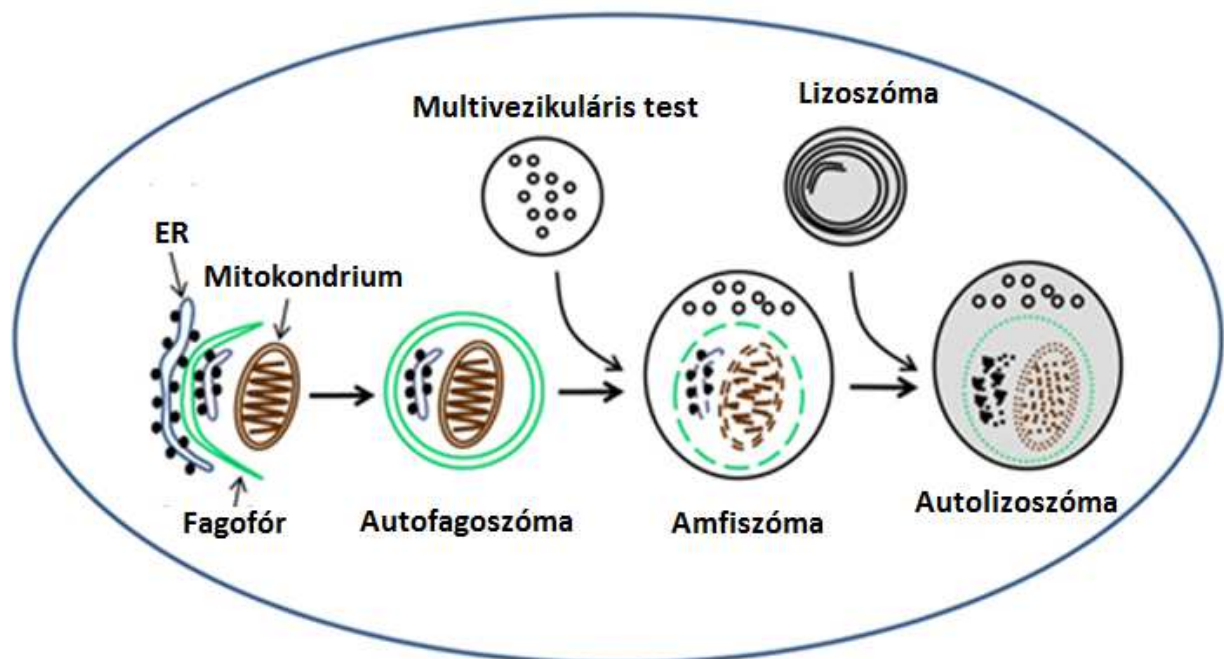
Mivel a BLOC-3 gének viszonylag enyhe autofág fenotípust mutattak, szerettem volna megtudni, hogy a *Hps1* és a hozzá hasonló szerkezetű, ám endoszóma érésben szereplő *Mon1* fehérje működésében fennáll-e valamilyen redundancia. Ezért a *Hps1* életképes, és a *Mon1* gén szemiletális mutáns alléljait összerekombináltam. A kettősmutánsok szintetikus lárvaletalitást és a szimpla mutánsokéhoz képest erősebb endocitózis és autofág defektust mutattak, ezenfelül más endocitózis-hibát okozó mutánsokhoz hasonlóan melanizált szövetsomókat figyeltem meg bennük.

Eredményeim tehát azt mutatják, hogy a BLOC-3 hiánya következtében csökken az autofág lebontás mértéke, mely valószínűleg a lizoszómák kialakulási hibájának tudható be. A *Hps1* és a *Mon1* genetikai interakciója pedig felveti a két gén közötti funkcionális redundancia lehetőségét.

2. Bevezető

2.1. Az autofágia

Az autofágia elnevezése Christian de Duve-től, a lizoszómák felfedezőjétől származik [1], és egy olyan katabolikus, eukariótákra jellemző celluláris folyamatot takar, amely során a citoplazma egy részlete lebontást végző lizoszómákba kerül [2, 3]. Három típusát ismerjük, ezek a chaperon-mediált autofágia, a mikroautofágia és a makroautofágia [4], dolgozatomban az utóbbival foglalkozom és a továbbiakban egyszerűen csak „autofágia” néven említem.



1. ábra. Az autofágia folyamatának főbb lépései. A fagofór záródásával kialakuló autofagoszóma, ami endoszómával (pl. multivezikuláris test) fúzionálva amfiszómát hoz létre, mely egy lizoszómával egyesülve autolizoszómává alakul. Forrás: <http://www.helsinki.fi/biosciences/biochemistry/eskelinen>.

Az autofágia során a sejt citoplazmájának részben szelektív módon történő elkülönítése, majd lebontása történik [5]. A folyamat első lépéseként egy membránciszterna, az ún. fagofór (izoláló membrán) alakul ki, amely körülöveli a lebontandó anyagot, majd záródásával létrejön a kettős membránnal rendelkező vezikula, az autofagoszóma, ami lizoszómával és endoszómával is képes fúzionálni. Előbbi esetben egy autolizoszóma, utóbbiban pedig egy amfiszóma jön létre, mely végül maga is egy lizoszómával egyesülve autolizoszómává alakul (**1. ábra**). Az autolizoszóma egy savas beltartalmú kompartment, melynek lumenében a lizoszómális hidrolázok lebontják az autofagoszóma belső membránját, illetve a citoplazmából

származó komponenseket. Végül az így felszabaduló monomerek, például az aminosavak, visszajutnak a citoplazmába és újrahasznosításra kerülnek [2].

Az autofágia alacsony szinten minden eukarióta sejtben működik, ezt háztartási, vagy bazális folyamatnak nevezzük [6]. Szintje azonban jelentősen megnőhet különböző stressz faktorok (pl.: tápanyag hiány), vagy fejlődési szignál (pl. ekdizon) hatására [7].

Tudásunk az autofágiáról nagymértékben megnőtt az elmúlt 20 évben, köszönhetően a folyamatban kulcsszerepet játszó, ún. *Atg* (Autophagy-related) gének élesztőben történő felfedezésének. Ezeknek a géneknek a termékei, az *Atg* fehérjék, evolúciósan konzerváltak és szükségesek az autofagoszómák hatékony kialakulásához minden többsejtű szervezet sejtjeiben. Az *Atg* gének funkcionális analízise rávilágított, hogy az autofágia fontos szerepet játszik különböző fejlődési, fiziológiai és patológiai folyamatokban [8]. Az indukált és a bazális autofágia szintje is fontos tényező különböző humán betegségek kialakulásában, a túl magas és a túl alacsony szintű autofágia is káros hatással van a szervezetre [9].

2.2. A Hermansky-Pudlak szindróma (HPS)

A *Hps* fehérjék nevüket a Hermansky-Pudlak szindrómáról (HPS) kapták, ami egy olyan autoszómás recesszív genetikai betegség, amely során sérül a lizoszóma-szerű organellumok, (például a melanoszómák és a vérlemezkék denz granulumai) kialakulása. Jellegzetes következményei az albinizmus, a vérzékenység és a lizoszómális tárolási betegségek [10-12].

A lizoszóma-szerű organellumok sok tulajdonsága megegyezik a lizoszómákkal, de tartalmazznak sejt típusra specifikus fehérjéket, kialakulásuk pedig speciális mechanizmust igényelhet. A lizoszómák és a lizoszóma-szerű organellumok sokféle fiziológiai folyamatban szerepet játszanak, mint például a koleszterin homeosztázis, a plazmamembrán helyreállítása, a csont- illetve a szövet helyreállítás, a patogének elleni védelem, a sejthalál és a jelátviteli útvonalak [13].

Emberben 9 gént (*Hps1-9*) hoztak összefüggésbe a HPS-sel [14], míg egérben 16 különböző lókuszt okoz HPS-szerű mutáns fenotípust [12]. Ilyen gének a *Hps1* és a *Hps4* is, melyek géntermékei egymással kapcsolódva az ún. BLOC-3 (Biogenesis of lysosome-related organelle complex 3) heterodimer komplexet alakítják ki [12], ami szolubilis és membránkötött formában is megtalálható a sejtekben [15, 16]. A *Hps1* mutációja okozta HPS a leggyakoribb a betegség altípusai közül [12]. A HPS1 és a HPS4 betegeknek megnő a kockázata a tüdőfibrózis és a granulomatózus kolitisz kialakulásának, míg más HPS típusokra ez nem jellemző [17]. A

Hps4-ről azt is leírták, hogy összefüggésbe hozható a skizofréniával, illetve a rövidtávú memória egészséges fenntartásával [18].

A BLOC-3 komplexről kimutatták, hogy erős és specifikus, GTP-kötés függő kölcsönhatást képes kialakítani a Rab9-cel [12]. A Rab fehérjék a Ras-szerű GTP-áz szupercsaládba tartoznak. Jellemző rájuk, hogy van egy GTP kötött aktív és egy GDP kötött inaktív állapotuk. Megfelelő működésükhöz szükségük van guanin nukleotid cserélő faktorokra (GEF, guanin nucleotide exchange factor) és GTP-áz aktiváló fehérjékre (GAP, GTP-ase-activating protein). A Rab9 szerepet játszik a késői endoszómák és a transz-Golgi közötti szállítási folyamatokban, az autofágia során pedig az autofagoszóma kialakulásában van szerepe, hiányában felhalmozódnak az izoláló membránok [19].

Az is ismert, hogy a BLOC-3 komplex a Rab32 és a Rab38 fehérjék GEF-jeként működik [20]. A Rab32 megtalálható a mitokondriumokon, illetve a lizoszóma szerű organellek közé tartozó melanoszóma membránján, szabályozza a membrán transzportot és a mitokondriumok hasadását. Ezen kívül az ER membránjában is előfordul és segíti az autofagoszóma kialakulását [19]. Utóbbi szerepét a Rab32 másik ismert aktivátora, a Claret irányítja, melynek hiánya a Rab32 funkcióvesztéshez hasonló autofág fenotípust eredményez [21]. Ezzel szemben a BLOC-3-nak, mint Rab32 GEF-nek, az autofágiában betöltött szerepe nem volt ismert. Munkám során ezért tűztem ki célként annak tisztázását, hogy a Hps1 és Hps4 fehérjék részt vesznek-e az autofágia szabályozásában.

2.3. Modellállatom, a *Drosophila*

Vizsgálataimhoz modellszervezetként az ecetmuslicát (*Drosophila melanogaster*) használtam. Az ecetmuslica életsiklusa pete, lárva, báb és imágó szakaszokra különíthető. Az embrió egy napig fejlődik, mielőtt a szintén egy napig tartó L1-es lárvastádiumba kerül, amelyet egy újabb egy napos L2 stádium, majd egy két napos L3 stádium követ. Utóbbi két szakaszra bontható: az első szakasz során az állatok még táplálkoznak, majd a második szakaszban ezzel felhagynak és vándorolni kezdenek, hogy megfelelő helyet találjanak a bebábozódáshoz (vándorló lárva). Ekkor a lárvák energiaszükségletüket a zsírtestben felhalmozott tápanyagok lebontásából nyerik. Az imágó a 10. nap környékén kel ki a bábból.

Az L3-as lárvastádium első szakaszában lévő állatok alkalmasak a bazális és a stressz indukált autofágia vizsgálatára is. A jól táplált korai L3-as lárvákon jól vizsgálható az alapszintű autofágia. Ha viszont ugyanilyen korú lárvákat rövid éhezésnek teszünk ki, zsírtestükben az autofágia mértéke nagymértékben megnő. A késői L3-as stádium vándorló szakaszában lévő állatokban az autofágiának egy harmadik típusa a fejlődési jel indukálta autofágia lép

működésbe, melyet a bábozódás előtt álló állatok hemolimfájának megnövekedett ecdizonszintje okoz [7]. E folyamat során szabadulnak fel az átalakuláshoz szükséges tápanyagok.

Az ecetmuslicát rövid életciklusa mellett egyéb tulajdonságai is kiválóan alkalmassá teszik genetikai, illetve sejtbiológiai kutatásokra. Ezek közé tartozik, hogy csupán 4 pár kromoszómából álló genommal rendelkezik, melynek teljes szekvenciája ismert. További nagy előny, hogy törzsközpontok kiterjedt mutáns- és transzgén gyűjteményéből nagyszámú muslicavonal elérhető.

A genetikai munkát segíti, hogy a muslica genom első három pár kromoszómájához jól ismert és széles körben alkalmazott balanszer kromoszómák is hozzáférhetőek. Ezek segítségével fenntarthatóak a homozigóta formában letális mutációk is. A balanszer kromoszómák a vad típushoz képest inverziókat tartalmaznak, melyek a rekombinációt hivatottak megakadályozni, illetve a felismerhetőséget segítő marker mutációkat hordoznak. Mivel számos ilyen marker homozigóta formában letális, mellettük a mutációk könnyen fenntarthatók heterozigóta (mutáció/balanszer) formában.

A muslicában is gyakran használt genetikai technika az UAS-Gal4 rendszer. A Gal4 az élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) egyik transzkripció aktivátor fehérjéje, képes specifikusan kötődni az UAS enhanszer szekvenciához és így indukálni az UAS mögött található gén transzkripcióját [22]. Tehát így lehetőség nyílik arra, hogy a *Gal4*-et meghajtó promóter elem szabályozza az UAS mögött található gén kifejeződését.

3. Célkitűzések

Munkám során az alábbi kérdések megválaszolását tűztem ki célként:

1. A *Hps1* és *Hps4* fehérjék hiányában létrejönnek-e autofág struktúrák?
2. Megfelelő-e a *Hps1* és *Hps4* hiányában esetlegesen létrejövő autofág struktúrák működése?
3. A *Hps1* és a *Hps4* gének hiányát kompenzálhatják-e más, velük párhuzamos útvonalban szereplő, szintén a lizoszóma fejlődésben részt vevő gének?

4. Anyagok és módszerek

4.1. Légymunka:

A muslicák fenntartása és előkészítése vizsgálatra:

A kísérletekhez használt legyeket üvegcsövekben, agar-kukoricaliszt-élesztő tartalmú táptalajon neveltem szobahőmérsékleten, illetve 25°C-os termosztátban (60%-os páratartalom).

A stressz-indukált autofágia vizsgálatához korai L3-as stádiumú állatokat használtam, melyeket 3-4 óráig 20%-os szacharóz oldatban tartottam, így nitrogénéhezésnek tettem ki őket. A fejlődési autofágia megfigyelése során késői L3-as stádiumú, vándorló lárvákat vizsgáltam.

Élethossz vizsgálat:

A kísérlethez csak hím állatokat használtam, melyeket szobahőmérsékleten tartottam. Két-három naponta feljegyeztem az elpusztult állatok számát, majd az adatok kiértékelését SPSS Statistics (IBM) programmal és Kaplan-Meier analízissel végeztem.

Felhasznált muslica törzsek:

Hps1[LL] mutáns törzs: LL03937 (Drosophila Genomics Resource Center törzsközpont). *Hps4[w515x]* mutáns törzs: 32063 (Bloomington Drosophila Stock Center/BDSC törzsközpont). *Hps4Df* deficiencia vonal: (2R)BSC347 (BDSC törzsközpont). *Hps1RNSi*: 12855R-1 (NigFly törzsközpont). *Mon1[d4]* mutáns törzs: Thomas Klein laboratóriumából kaptuk [23]. *Mon1Df*: ED7853 (BDSC törzsközpont).

Az általam használt muslica balanszerek:

- 2. kromoszóma: BcGla, CyO, CyO-GFP,
- 3. kromoszóma: TM6,
- 2. és 3. kromoszóma: SM6-TM6 (ST6).

Klonális analízis:

A klonális analízis során non-meiotikus, helyspecifikus rekombinációval egy egyeden belül hozunk létre olyan sejtklónokat, melyek genotípusa eltér az őket körülvevő sejtektől. A technika nagy előnye, hogy az ilyen módszerrel létrehozott klónokat tartalmazó szövet nagy része nem rekombináns sejtekből épül fel, így azok jó kontrolljai lehetnek a kezelt sejteknek. Mivel a klónok és a kontroll sejtek egyazon egyedben keletkeznek, ezért a fenotípusok közti különbséget nem torzíthatják környezeti hatások.

Az autofág struktúrák vizsgálata során az *UAS-Hps1RNSi* vonallal bekeresztettem *hsFlp; Act>CD2>Gal4,UAS-GFP; r4mCherry-Atg8a,UAS-Dcr2* legyeket, így lehetőségem nyílt genetikai mozaik állatokat létrehozni. A muslicákat 25°C-on tartottam, így néhány sejtben átíródott a hősokk promóter hajtotta FLP rekombináza, ami az általa specifikusan felismert DNS szekvenciák, az úgynevezett FRT helyek mentén rekombinációt képes indukálni. Azon sejtekben, melyekben a FLP aktív volt, kivágódott a két FRT felismerő hellyel (>) körülvett CD2 szakasz, mely addig távol tartotta egymástól a *Gal4* gént és a konstitutív *Actin* promótert. Így az erős promóter mögé került *Gal4*-ről igen nagyszámú géntermék keletkezett, mely

megindította az *UAS* mögött található *GFP*, *Dcr2* (Dicer2, az RNSi hatékonyságot növeli) és *UAS-Hps1RNSi* transzgének átírását. Ezzel párhuzamosan a zsírtest specifikus *r4* promóterrel rendelkező *mCherry-Atg8a* riporter is nagy számban termelődött valamennyi zsírsejtben.

Az autofagoszóma-lizoszóma fúzió vizsgálatához az *UAS-mCherry-Atg8a*; *Hps1RNSi* törzset egy *hsFlp*; *UAS-Lamp-GFP*; *Act>CD2>Gal4,UAS-Dcr2* vonallal kereszteztem, amelyben szintén hősokk promóterrel ellátott FLP működik, ami itt is felismeri és kivágja a *CD2* kazettát, az *Actin* promóter a *Gal4* elé kerül. Az ily módon nagy mennyiségben jelenlévő *Gal4* indukálja az *UAS-Dcr2*, az *UAS-Lamp-GFP*, az *UAS-mCherry-Atg8a* és az *UAS-Hps1RNSi* transzgének expresszióját. Az állatokat ebben az esetben is 25°C-on tartottam.

Az autofág flux megfigyelésekor az *UAS-Hps1RNSi*-ből szedett állatokat *hsFLP*; *UAS-mCherry-GFP-Atg8a*; *Act>CD2>Gal4, UAS-Dcr2* genotípusú állatokkal kereszteztem össze. Így (az állatokat 25°C-on tartva) az előző két esethez hasonlóan, itt is *Gal4* transzkripció faktort nagy mennyiségben kifejező klónsejteket kaptam, melyekben az RNSi transzgén és egy kettős riporter, az *mCherry-GFP-Atg8a* expresszált.

4.2. Fénymikroszkópos vizsgálatok:

Az állatok preparálása és vizsgálata fluoreszcens mikroszkóppal:

Az autofágia indukálását követően a lárvákat sztereomikroszkóp alatt felboncoltam, zsírtestüket kipreparáltam és 50%-os glicerín/PBS és 0,2 µg/ml koncentrációjú DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (PBS-DAPI-glicerín) fluoreszcens sejtmagfestéket tartalmazó oldattal fedtem le.

A savas kompartmentumok kimutatásához a zsírtestet 25 pmol/ml LysoTracker Red oldatban boncoltam ki sztereomikroszkóp alatt. A mintáról a festéket 5-10 perc után pipettával leszívtam és PBS-DAPI-glicerín oldattal fedtem le. A fluoreszcensen jelölt minták vizsgálatához Apotome feltétellel ellátott Carl Zeiss AxioImager M2 mikroszkópot használtam. A sztereomikroszkópos képeket Carl Zeiss Lumar V12 típusú mikroszkóppal készítettem.

Endocitózis teszt ezüst-nitráttal:

Az ezüst-nitrát etetési vizsgálathoz AgNO_3 tartalmú agar-élesztő keveréken petéztettem a megfelelő genotípusú állatokat. Az ezüst-nitrát tartalmú tápot úgy készítettem, hogy 3,5 ml táp tartalmazott 2 g élesztőt, az AgNO_3 tartalma pedig 0,005% volt [24]. A garland sejtek vizsgálatához vándorló L3-as állatokat boncoltam. A preparálást PBS (Phosphate Buffered Saline) oldatban végeztem, majd fixáltam a mintákat 3,7%-os paraformaldehidet tartalmazó PBS-ben szobahőn, 20 percig. Ezt követően a fixálót PBS-sel kimostam és a mintákat lefedtem PBS-DAPI-Glicerínben. Az elkészült preparátumokat Carl Zeiss

AxioImager M2 fénymikroszkóppal vizsgáltam látható fénnel megvilágítva, 20 másodperces kék fénnel való besugárzást követően.

4.3. Elektronmikroszkópia:

A minták vándorló korú lárvákból készültek. A lárvákat csipesszel széthúztam és 2 napot 4°C-on fixáltam Na-kakodilátot tartalmazó oldatban (3,2% formaldehid, 0,5% glutáraldehid, 2 nM CaCl₂, 1% szacharóz, ami 0,1 M-os Na-kakodilát oldatban van feloldva (pH 7,4)). A kimosás 0,1 M-os Na-kakodilát oldattal történt (pH 7,4). A beágyazás első lépése 0,5%-os ozmium-tetroxid oldattal történő inkubálás volt 1 órán át szobahőmérsékleten, majd ezt 10%-os acetonnal történő kimosás követte és 30 perc inkubálás 2%-os uranil-acetáttal. Ezután a víztelenítés felszálló alkoholsorral és a műgyantával történő átitatás következett, amit propilén-oxid és araldit műgyanta 2:1 (1 óra), 1:1 (1 óra) és 1:2 (egy éjszaka) arányú keverékeivel történt. A folyamat végső lépéseként tiszta aralditot használtunk, majd formába öntöttük. A mintákat ezután egy éjszakára 37°C-os termosztátba, majd 2 napra 60°C-os termosztátba tettük. Megszilárdulás után faragás és metszetkészítés (70nm) történt. A metszeteket JEOL JEM-1011 típusú transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

A minták leszedését én, a beágyazást és a metszést Pálfia Zsoltné kolleganóm, az elektronmikroszkópos vizsgálatot pedig dr. Kovács Attila Lajos kollégám végezte.

4.4. Western blot analízis:

A fehérjeminták készítésekor az állatokat lemértem, majd testsúly-milligrammonként 20µl PBS-Laemmli puffer 1:1 arányú keverékét adagoltam hozzájuk. Ezt követően a mintákat homogenizáltam, 5-5 percet forraltam és centrifugáltam, végül a fehérjéket tartalmazó felülúszót leszívтам és -20°C-on tároltam.

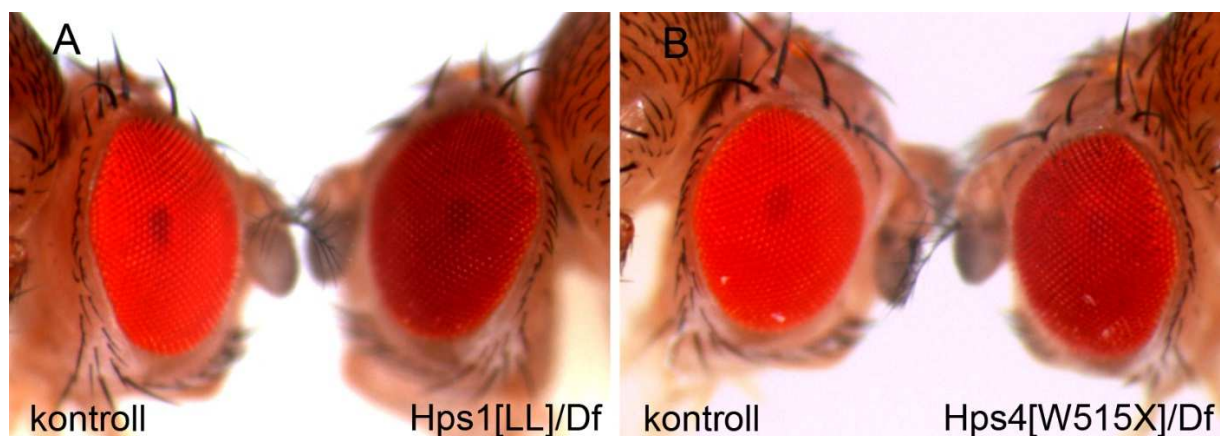
A fehérje minták futtatása 0,05% SDS (nátrium-dodecilszulfát) tartalmú poliakrilamid gélen történt, ami a fehérjék méret szerinti szeparációját teszi lehetővé. A fehérjéket ezt követően átfuttattuk egy Immobilon-P pWDF-típusú membránra, melynek pórusátmérője 0,45 µm. A membránt ezután egy éjszakán keresztül blokkoltuk 0,5%-os kazein oldatban, 4°C-on. Ezt követően az adott fehérjére specifikus, elsődleges ellenanyagot a megfelelő hígításban (nyúl anti-p62: 1:5000, egér anti-Tubulin: 1:2000) tartalmazó blokkoló és TBST (Tris Buffered Saline, pH 7,4 és 0,1% Tween 20) 1:1 arányú keverékében (kazein-TBST), egy órát inkubáltuk a membránt szobahőn. Az alkalikus foszfátázzal (AP) konjugáltatott másodlagos ellenanyag (anti-egér-AP és anti-nyúl-AP mindkettő: 1:5000) felvitele szintén kazein-TBST-ben történt, ebben az oldatban a membránt újabb egy 1 órát inkubáltuk. A két ellenanyag felvitele között és a másodlagos után is 3-3 db 10 perces mosási lépést végeztünk TBST-vel. A membránokon

a fehérjéket AP pufferben (100 mM Trisma base, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,05 % Tween20, pH: 9,5) 1:50-szeresére hígított NBT-BCIP (NitroBlue Tetrazolium-5-Bromo-4Chloro-3-Indolyl Phosphate) (Sigma) oldattal hívtuk elő. Az NBT-BCIP az alkalikus foszfatáz szubsztrátja és lila csapadékot képez ott, ahol a specifikusan jelölt fehérjénk található a membránon. A Western blot kísérleteket Tóth Lilla kolleganőmmel közösen végeztük.

5. Eredmények

5.1. A *Hps1* és *Hps4* mutáns vonalak szemszínének tesztelése

Hogy megbizonyosodjam róla, hogy a rendelkezésemre álló *Hps1* és *Hps4* mutáns vonalakban valóban sérül-e a lizoszóma eredetű organellumok keletkezése, megvizsgáltam az állatok szemszínét, ugyanis a muslica szemszínének kialakításában szerepet játszó pigmentgranulumok is lizoszóma szerű organellumok. A *Hps5*-ről korábban már leírták, hogy hiányában megváltozik a szemszín [25], azonban a *Hps1*-ről és a *Hps4*-ről nem találtam hasonló adatot a szakirodalomban.



2. ábra. A *Hps1*[LL] és a *Hps4*[W515X] mutáns állatok szemszínének vizsgálata. (A) A *Hps1*[LL]/Df mutáns és (B) a *Hps4*[W515X]/Df mutáns adult állat szemszíne eltér a kontroll állatétól.

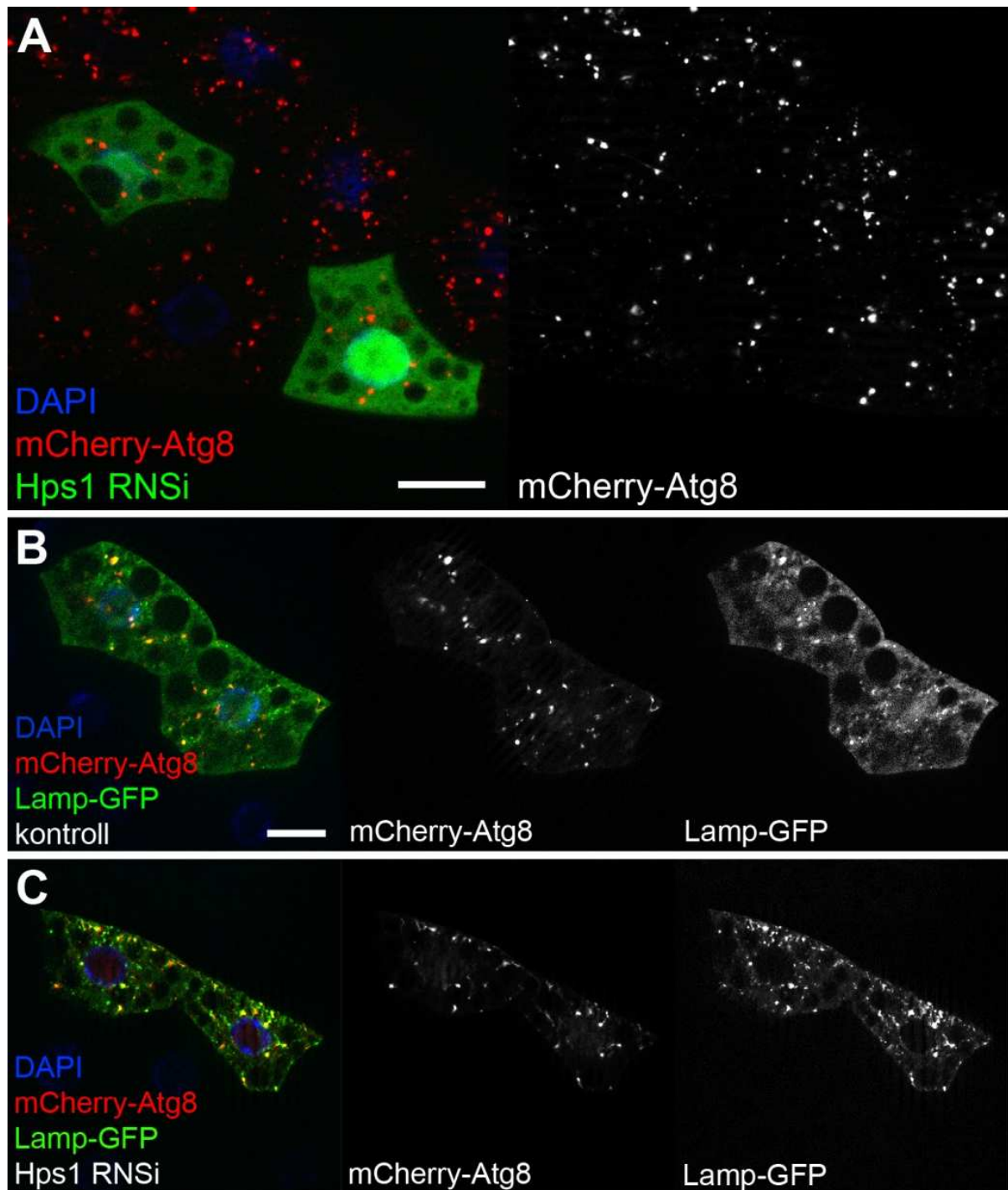
A *Hps1*[LL] és *Hps4*[W515X] mutáns allélok mellé keresztezéssel bejuttattam a piros szemet eredményező *white* (*w*) gén vad típusú (*w*+) allélját. Homozigóta mutánsok esetén gyakori jelenség, hogy a mutáns allélokat hordozó kromoszómák recesszív háttér mutációkat tartalmaznak, melyek homozigóta formában torzíthatják a vizsgált allél fenotípusát. Ennek kiküszöbölése érdekében a *Hps1* és *Hps4* mutáns állatokat bekeresztettem olyan vonalakkal, melyek az említett génekkel szemben nagyméretű deficienciákat (*Hps1Df* és *Hps4Df*) hordoznak. A keresztezésből *w*+/w-; *Hps1*[LL]/*Hps1Df* és *w*+/w-; *Hps4*[W515X]/*Hps4Df* nőtény egyedeket válogattam és szemszínüket sztereomikroszkóppal vizsgáltam. Mindkét mutáns vonal esetében enyhe, de azért a vad típusú *w*+-étől jól elkülöníthető szemszín

fenotípust találtam (**2. ábra**), így igazoltnak tekintettem azt, hogy valóban sérül a lizoszóma-szerű organellek biogenezeise a mutáns törzseimben.

5.2. Az autofág struktúrák képződésének vizsgálata Hps1 illetve Hps4 fehérjék hiányában:

Mivel a Hps1 és a Hps4 fehérje funkcióvesztése esetén sérül a lizoszóma-szerű organellek keletkezése, első lépésként szerettem volna megismerni a két fehérje autofágiában betöltött szerepét. Ennek érdekében fontosnak tartottam megvizsgálni, hogy autofág struktúrák kialakulnak-e valamelyik BLOC-3 gén hiányában. A kísérlet során *UAS-Hps1RNSi* legyeket kereszteztem a *hsFlp; Act>CD2>Gal4,UAS-GFP; r4mCherry-Atg8a, UAS-Dcr2* genotípusú törzsszel. Így az utódok zsírsejtjében Hps1 csendesített GFP pozitív klónok keletkeztek, továbbá valamennyi zsírsejtben kifejeződött az mCherry-Atg8a riporter. Az mCherry-Atg8a fehérje a fagofór és az autofagoszóma membránjához is képes kötődni a C-terminusán található lipid horgony segítségével. Továbbá az mCherry-Atg8a kapcsolódik az autofagoszóma belső membránjához, így szelektíven bejut az autolizoszómákba is [26]. A funkcióvesztéses klónokban éheztetés hatására nagyméretű mCherry-Atg8a pozitív autofág granulumok jöttek létre, melyeknek sem mennyisége, sem mérete nem különbözött azokról, melyeket a kontroll sejtekben figyeltem meg (**3. A ábra**). A Hps1 hiánya tehát nem gátolta az autofág struktúrák kialakulását.

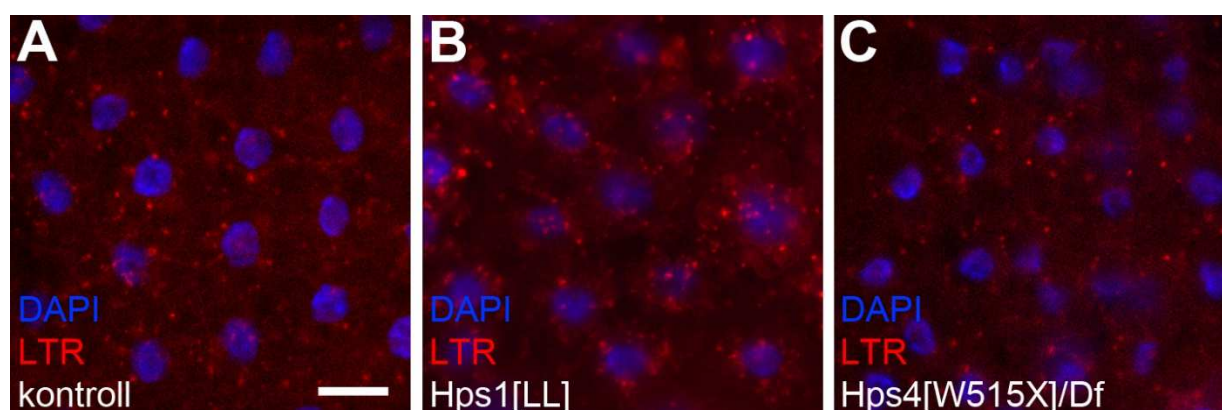
Egy másik teszttel arra voltam kíváncsi, hogy a Hps1 befolyásolja-e autofagoszómák és a lizoszómák fúzióját. A kísérlet során összekereszteztem *hsFLP; UAS-Lamp-GFP; Act>CD2>Gal4, UAS-Dcr2* állatokkal az *UAS-mCherry-Atg8; Hps1RNSi* törzset, így az utódokban két riporter is megtalálható volt. A Lamp-GFP a lizoszómákat, az mCherry-Atg8a az autofagoszómákat, a két marker együttes jelenléte pedig az autolizoszómákat jelölte. A fluoreszcens riporterekkel jelölt RNSi sejtekben, a kontrollhoz hasonlóan, erős kolokalizáció volt megfigyelhető a Lamp-GFP és az mCherry-Atg8a között, tehát a Hps1 nem szükséges a lizoszómák és az autofagoszómák fúziójához (**3. B, C ábra**).



3. ábra. Az autofág struktúrák képződésének vizsgálata RNSi konstrukciót expresszáló sejtekben. (A) A zöld színnel látható GFP pozitív, Hps1 csendesített sejtekben, a körülöttük található kontroll sejtekhez képest nem látszik eltérés az autofág struktúrák mennyiségében és eloszlásában. (B) A kontroll sejtekben nagymértékű a Lamp-GFP és az mCherry-Atg8 kolokalizációja. (C) A *Hps1* RNSi konstrukciót kifejező sejtekben nincs eltérés a kontrollhoz képest a két marker kolokalizációját tekintve. Skála (A és B) egységesen: 20µm, a B-n található skála a C-re is vonatkozik.

Mivel a BLOC-3 komplex a lizoszóma-szerű organellek kialakulásához szükséges, érdemesnek találtam megvizsgálni, hogy hiányukban sérül-e az autolizoszómák keletkezése.

Ennek érdekében LysoTracker Red (LTR) festést alkalmaztam. A LTR egy olyan vitális festék, ami lehetővé teszi a savas kompartmentumok jelölését, mint például a lizoszómák és az autolizoszómák. Korai L3-as éhezettett lárvákban pöttyös mintázat jelenik meg vad típus esetén, hiszen a stressz-indukált autofágia aktív lesz bennük és a sejtekben kialakulnak a lebontást végző autolizoszómák. Ezzel szemben jól táplált, korai L3-as lárvákban nem figyelhetők meg piros pöttyök [27]. A vizsgálat során azt tapasztaltam, hogy a *Hps1[LL]* homozigóta mutáns és a *Hps4[W515X]/Df* állatok sejtjeiben is a kontrollhoz hasonló számú és méretű LTR pozitív struktúra található, tehát a savas autolizoszómák normálisan kialakultak bennük (4. ábra).



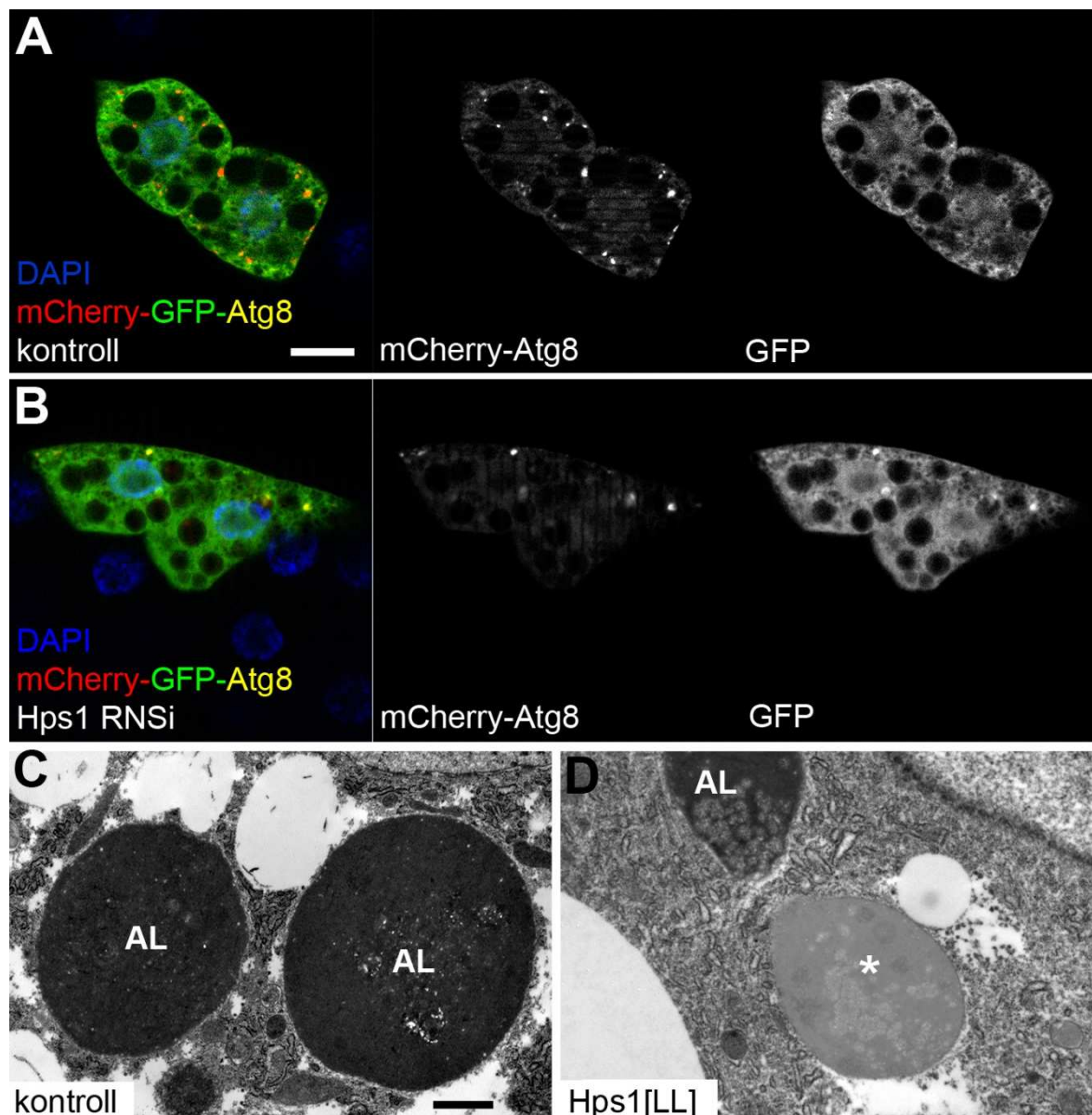
4. ábra. A *Hps1[LL]* és a *Hps4[W515X]* mutánsok autofág fenotípusának vizsgálata LTR festéssel. (A) Éhezés hatására a LTR pozitív autolizoszómák jelennek meg a kontrollak zsírsejtjeiben. (B-C) A *Hps1[LL]* és *Hps4[W515X]/Df* állatok fenotípusa megegyezett a kontrollal. Skála (A): 20 μ m, mely vonatkozik B-C-re is.

5.3. Az autolizoszómák emésztőképességének vizsgálata *Hps1* hiányos sejtekben

Bár a BLOC-3 fontos a lizoszóma-szerű organellumok fejlődésében, funkcióvesztése mégsem volt hatással az autolizoszómák létrejöttére. A keletkezésük mellett fontosnak tartottam az autolizoszómák működésének vizsgálatát is, a lizoszóma fejlődésben bekövetkező hibák ugyanis az organellum emésztőképességének romlását eredményezhetik [28]. Első kísérletként arra voltam kíváncsi, hogy a *Hps1* csendesítése befolyásolja-e az autofág lebontás mértékét (autofág flux). Ehhez *hsFLP; UAS-mCherry-GFP-Atg8a; Act>CD2>Gal4, UAS-Dcr2* állatokkal kereszteztem az *UAS-Hps1RNSi* vonalat. Így az utódokban Gal4-et expresszáló klónok alakultak ki, melyekben kifejeződött az mCherry-GFP-Atg8a riporter. A dupla fluoreszcens tag-gel ellátott mCherry-GFP-Atg8a előnye az, hogy míg a savas pH-ra érzékeny GFP gyorsan inaktiválódik a lizoszómákban, addig az mCherry jól bírja ezt a közeget és még sokáig képes jelet kibocsátani [29]. Így normális autofág lebontás mellett az autofagoszómák apró sárga, míg az autolizoszómák nagy, piros színű pöttyként fognak megjelenni a mikroszkópban. Az előbbieken leírtaknak megfelelően, éheztetés hatására a kontroll sejtekben

nagyméretű, piros autolizoszómákat figyeltem meg, szemben a *Hps1* RNS interferenciával csendesített sejtekkel, ugyanis ezekben nagyszámú sárga, GFP-re és mCherry-re egyaránt pozitív struktúrákat találtam, melyek méretük és eloszlásuk alapján valószínűleg olyan autolizoszómák lehettek, melyekben a lebontás nem zajlott megfelelően. (5. A, B ábra).

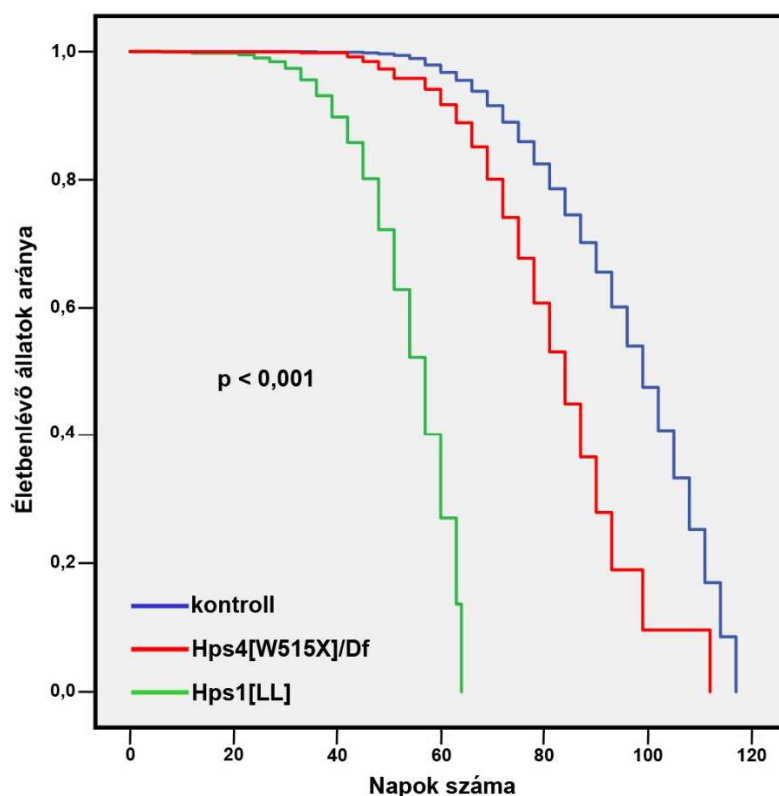
A lizoszómák hibás működését *Hps1*[LL] homozigóta mutáns állatokban ultrastrukturális vizsgálatokkal is megerősítettük. Az elektronmikroszkópos felvételeken ugyanis a késői L3 vándorló korú mutáns állatok zsírtestéből származó metszeteken a normális kinézetű autolizoszómák mellett rendellenes, kevésbé denz autolizoszómákat is megfigyeltünk (5. C, D ábra). A *Hps1* gén hiányának következtében tehát az autolizoszómák emésztőképessége romlik, mely feltehetőleg a lizoszómák fejlődési hibájának tudható be.



5. ábra. Az autolizoszómák emésztőképességének vizsgálata. (A) A kontroll sejtekben mCherry-GFP-Atg8a riporterrel nagyméretű piros autolizoszómák jelennek meg. (B) *Hps1RNSi* sejtekben szintén nagy, de sárgán jelölődő autofág struktúrák jelennek meg. (C) A kontroll vándorló lárvákban számos nagy, denz autolizoszóma (AL) figyelhető meg. (D) A *Hps1[LL]* mutánsokban a normális autolizoszómák mellett, csökkent denzitású aberráns lizoszómák (csillag) is megjelennek. (A): Skála: 20µm, mely B-re is érvényes; Skála (C): 1 µm, mely D-re is érvényes.

5.4. A Hps1 és Hps4 mutáns állatok élethosszának vizsgálata

A lizoszómális lebontás, és így az autofágia is, fontos szerepet játszik a sejtek normális működésében. Ez különösen igaz a terminálisan differenciálódott sejtekre, amilyenek például a neuronok is [30]. Korábban leírták, hogy az autofágia sérülése gyakran együtt jár különböző neurodegenerációs betegségek megjelenésével [4], továbbá egyes *Atg* gének (például az *Atg7*) hiánya következtében az állatok élethossza jelentősen lecsökken [31]. Az autofágia hibája mellett más lizoszómális rendszert érintő genetikai elváltozásokat is ismerünk, melyek szintén lerövidítik a mutáns egyedek élettartamát, ilyenek például a lizoszómális tárolási betegségek [32]. Mivel a *Hps1* és *Hps4* is szerepet játszik a lizoszóma-szerű organellumok fejlődésében, érdemesnek tűnt megvizsgálni, hogy hiányuk befolyásolja-e az állatok élettartamát.



6. ábra. A *Hps1* és a *Hps4* mutáns állatok élethosszának vizsgálata. A diagramon kékekkel jelölve látható a kontroll, pirossal a *Hps4[w515X]/Df* mutáns, zölddel pedig a *Hps1[LL]* mutáns állatok élethossza. Mindkét mutáns vonal esetében szignifikáns élettartam csökkenés figyelhető meg.

A vizsgálat során mindkét mutáns vonal esetében szignifikáns eltérést, élethosszbeli csökkenést tapasztaltam a kontroll állatokhoz képest. A *Hps1[LL]* mutánsok esetében az eltérés látványosabb volt, ezek élethossza körülbelül a normális felére csökkent (**6. ábra**).

Ez az eredmény alátámasztani látszik azt, hogy ezekben a *Hps1* és a *Hps4* mutáns állatokban valóban sérül a lizoszómális lebontás folyamata.

5.5. A *Hps1* más lizoszóma fejlődésben részt vevő génekkel való viszonyának vizsgálata

A lizoszóma-szerű organellek keletkezését szabályozó Hps1-Hps4 komplexről korábban kimutatták, hogy rokonságot mutat egy másik lizoszóma fejlődést irányító GEF komplexszel, a Mon1-Ccz1 heterodimerrel. Bioinformatikai vizsgálatok alapján a Hps1 a Mon1-gyel, a Hps4 a Ccz1-gyel mutatott bizonyos szintű homológiát [20]. A Mon1-Ccz1 a Rab7 fehérjének a GEF-je, mely a késői endoszómák és a lizoszómák fúziós eseményeinek fő szabályozó faktora, így döntő szerepe van az autolizoszómák kialakulásában is [33].

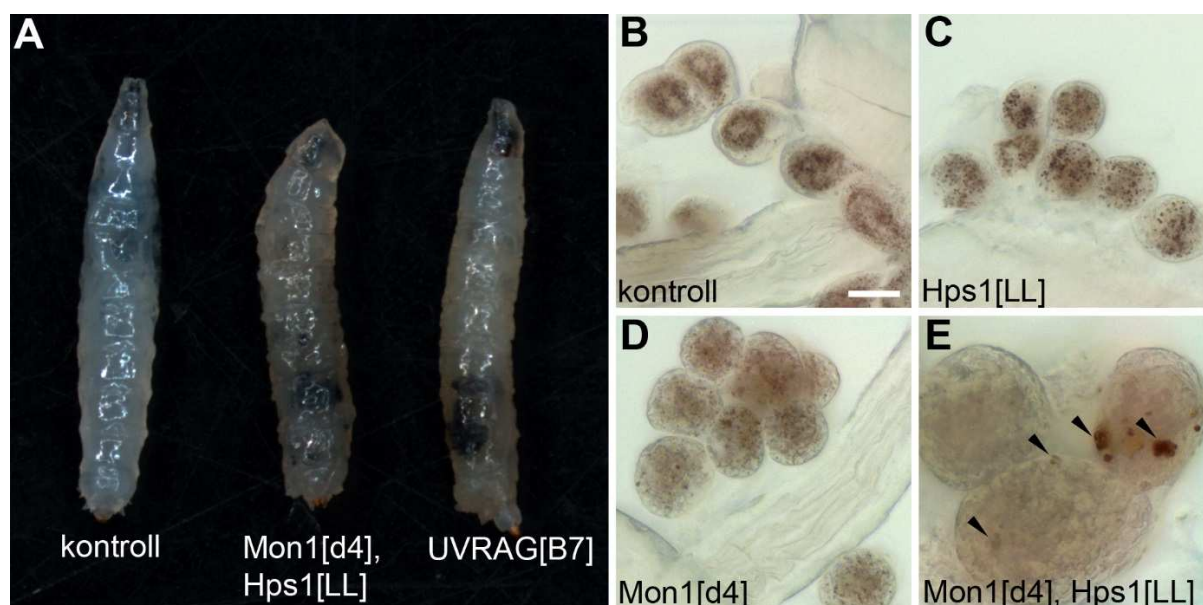
Ezek alapján tehát a Mon1-Ccz1-Rab7 modul a lizoszómák, a Hps1-Hps4-Rab32 pedig a lizoszóma-szerű organellek létrejöttéért felelős. A két útvonal egymással többé-kevésbé párhuzamosnak tűnik.

Annak eldöntése érdekében, hogy a fenti két modul milyen hierarchia viszonyban van egymással, episztázis analízist végeztem, a *Mon1[4]* és a *Hps1[LL]* mutáns allélek segítségével. Ehhez elő kellett állítanom egy *Hps1[LL]*, *Mon1[4]* duplamutáns vonalat. Mivel mindkét gén a második kromoszómán található, ezért egy kromoszómára kellett összerombinálnom a két mutációt.

Az episztázis analízis során először a különböző mutánsok életképességét vizsgáltam meg. Azt korábbi kísérleteim során is megfigyeltem, hogy a *Hps1[LL]* állatok homozigóta formában életképesek voltak, a *Mon1[4]*-ek pedig szemiletalitást mutattak, vagyis az állatok a bábból való kikelés előtt, közben, vagy röviddel utána elpusztultak. Ezzel szemben a homozigóta kettősmutánsok, több független rekombináns vonalat vizsgálva is, késői L3 lárvastádiumú letalitást mutattak. A kettős mutáns tehát szintetikus lárvaletalitást mutatott, azaz a két útvonal együttes gátlása esetén az egyedek korábban pusztultak, mint azok, melyekben csak az egyik, vagy a másik modul hiányzott.

A kettősmutáns lárvákon egy másik érdekes megfigyelést is tettem, miszerint fekete, melanotikus sejtcsoportok látszanak az állatok testében. Ilyen jelenséget már több, endocitózisban szereplő gén mutációja esetén is tapasztaltak, mint például az UVRAG (UV-resistance associated gene) [34] vagy az Atg6 [35] (**7. A ábra**).

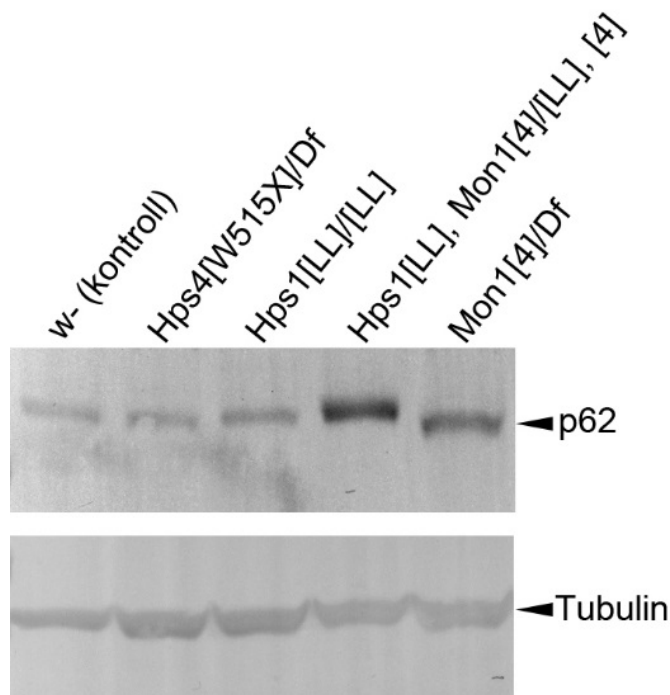
Egy újabb kísérletben arra kerestem a választ, hogy a mutánsokban mennyire sérül az endocitózis folyamata. Ennek során vándorló lárvákban végeztem ezüst-nitrát jelölést. A táplálékba kevert ezüst a bél falon át bejut az állat hemolimfájába, ahonnan a fém szemcséket a kiválasztó funkcióval rendelkező garland sejtek endocitózissal felveszik és reziduális testekben eltárolják [36]. A kontrollokról készült képeken jól látszik, hogy a sejtekben számos, közepes méretű, sötét reziduális test jelenik meg a sejtmag körül (**7. B ábra**). Ugyanezt tapasztaltam a *Hps1[LL]* homozigóták esetén is (**7. C ábra**). A *Mon1[4]* homozigóta mutánsok ezzel szemben, az egész sejtben arányosan eloszló granulumokban tárolták el az ezüstöt, jelezve, hogy a gén hiánya megzavarja a reziduális testek felé irányuló membránforgalmat (**7. D ábra**). Végül a *Hps1[LL]*, *Mon1[4]* homozigótákat vizsgálva azt tapasztaltam, hogy bennük az ezüst kisszámú, de igen nagyméretű kompartmentben tárolódik a sejtek perifériáján (**7. E ábra**). Ez arra utal, hogy a kettős mutánsokban bár megtörténik az ezüst felvétele, a reziduális testek felé tartó membránforgalom, már korán, a sejtek perifériáján megakad. Szintén érdekes megfigyelés volt, hogy a *Hps1[LL]*, *Mon1[4]* kettősmutáns állatok esetében a sejtméret drasztikus megnövekedését is tapasztaltuk.



7. ábra. A *Hps1[LL]*, *Mon1[d4]* kettős mutáns állatok vizsgálata. (A) A *Hps1[LL]*, *Mon1[4]* kettős mutáns L3-as stádiumú lárvákban, hasonlóan az *UVRAG[B7]* mutánsokhoz, fekete, melanotikus sejtcsoportok látszanak. (B) A kontroll garland sejtekben és a (C) *Hps1[LL]* mutáns garland sejtekben az ezüst-nitrát a sejtmag körül halmozódik fel, míg a (D) *Mon1[4]* mutáns garland sejtekben diffúz felhalmozódás látszik. (E) A *Hps1[LL]*, *Mon1[4]* kettősmutáns állatok garland sejtjeiben néhány nagy, ezüst-nitrát tartalmú struktúra látható a sejtek perifériáján. Skála: 20 μ m, ami a C, D, E ábrákra is vonatkozik.

Miután megállapítottuk, hogy a *Hps1[LL]*, *Mon1[4]* kettősmutánsokban súlyosan sérül az endocitózis, arra is kíváncsiak voltunk, hogy a két gén hiánya milyen hatással van az autofágiára. Ehhez éhező L3-as *Hps1[LL]*, *Hps4[W515X]/Df* és *Mon [4]/Df* mutánsokból,

illetve a *Hps1*[*LL*], *Mon1*[4] kettős mutáns lárvákból készítettem fehérjemintákat, melyekben western blot-tal vizsgáltuk a p62 (*Drosophila* homológja a Ref(2)P) fehérje mennyiségét. A p62 az autofágia során specifikusan lebomló fehérje, mely a fagofór felszínén megkötve jut az autofagoszómákba, majd az autolizoszómákba. Így amennyiben az autofág útvonalban zavar történik, a p62 mennyisége megnő a sejtekben, így e fehérje szintjéből következtethetünk arra, hogy az adott genotípusú állatokban az autofág lebontás megfelelően zajlik-e.



8. ábra. Western blot analízis. A *Hps1*[*LL*], *Mon1*[4] kettős mutáns állatokban a *Hps1*[*LL*], a *Hps4*[*W515X*]/*Df* és a *Mon1*[4]/*Df* mutánsoknál is nagyobb p62 felhalmozódást tapasztaltunk.

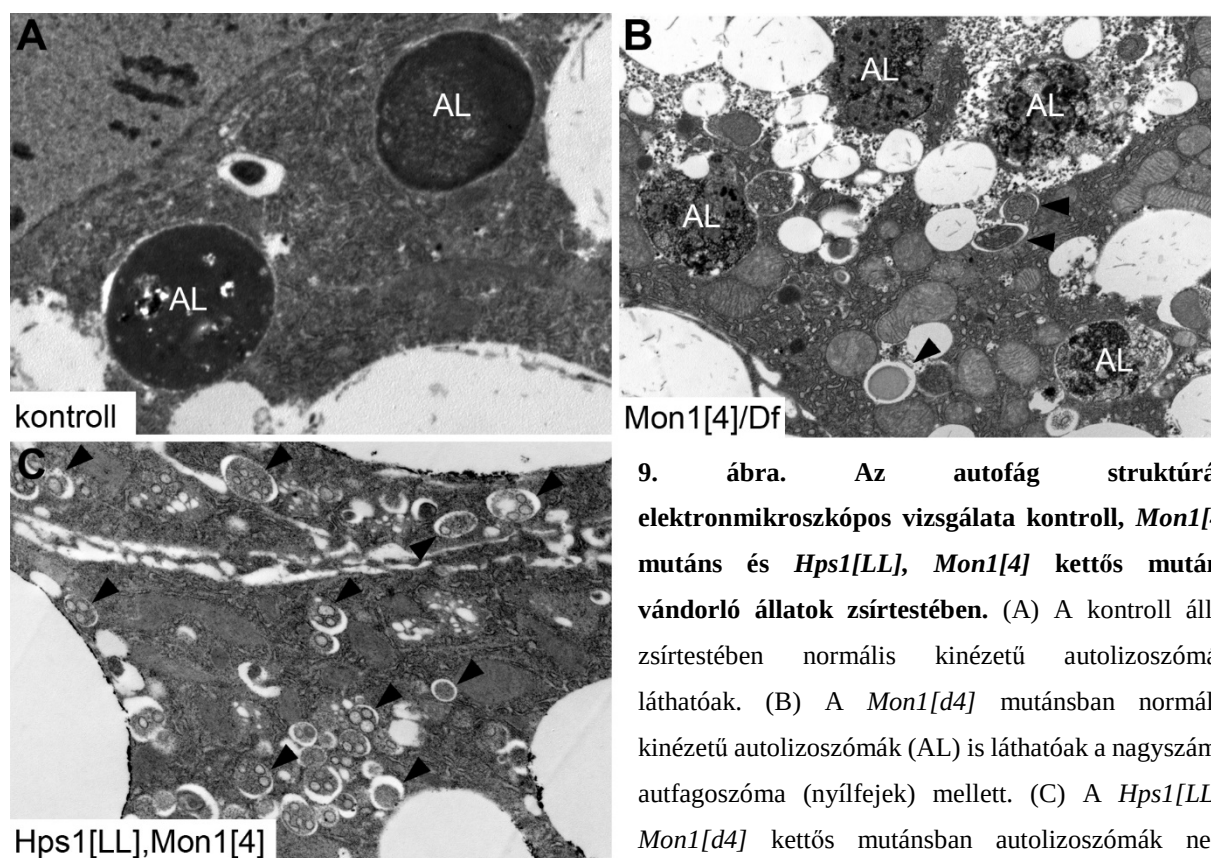
A kísérlet eredményeként azt kaptuk, hogy várakozásainknak megfelelően a *Mon1*[4] mutánsokban a p62 szintje jelentősen, a *Hps1*[*LL*] és *Hps4*[*W515X*]/*Df*-ekben viszont csak alig láthatóan emelkedett a kontrollhoz képest. Ezzel szemben a kettős mutánsokban, még a *Mon1*[4]-hez viszonyítva is nagymértékben megemelkedett a felhalmozódott p62 mennyisége (8. ábra).

Ultrastrukturális vizsgálatot is végeztünk az autofágia sérülésének vizsgálatára. Vándorló korban a fejlődési autofágia és az endocitózis egyszerre aktiválódik, így az állatok zsírtestében rengeteg autolizoszóma keletkezik (9. A ábra). Korábban már láttuk, hogy a

Hps1[*LL*] mutáns vándorló állatok zsírszövetében sérült autolizoszómák is előfordulnak (5. D ábra). A *Mon1*-ről ismert, hogy fontos szerepet játszik a lizoszómák fejlődésében és az autofagoszóma-lizoszóma fúzióban. Ennek megfelelően a vándorló *Mon1*[4] mutáns állatok zsírtestében a kontrollhoz képest megnő az autofagoszómák száma, ugyanakkor meglepő módon számos autolizoszóma is megfigyelhető (9. B ábra). Ez arra utal, hogy a *Mon1* hiányos vándorló lárvákban bár akadozik, de teljesen nem gátolt az autofagoszóma-lizoszóma fúzió. Így felmerül annak a lehetősége, hogy létezhet egy másik, a *Mon1*-től független útvonala az autolizoszómák keletkezésének. Annak érdekében, hogy megtudjuk, ebben az alternatív útvonalban szerepel-e a *Hps1*-*Hps4*-komplex, megvizsgáltuk a *Hps1*[*LL*], *Mon1*[4] kettősmutáns állatokat is. Ennek során azt láttuk, hogy bennük, ellentétben a *Mon1*[4]

mutánsokkal, nem alakulnak ki sem endo-, sem autolizoszómák (**9. C ábra**). Ez arra utal, hogy a vándorló korú *Mon1[4]* mutánsokban valóban létezik egy alternatív a *Hps1*-től függő útvonal, melyen keresztül továbbra is folyhat az endoszóma és az autolizoszómák képződése. Ha viszont mindkét gént elrontjuk, azzal a lizoszóma fejlődést gátoljuk, melynek eredményeként az autofagoszómák felhalmozódnak.

Ezen eredményeink tehát megerősítették feltételezésünket, hogy a *Hps1*-*Hps4* és a *Mon1*-*Ccz1* útvonal az endoszóma és az autolizoszóma érés során párhuzamosan, részben egymással redundáns módon működik.



9. ábra. Az autofág struktúrák elektronmikroszkópos vizsgálata kontroll, *Mon1[4]* mutáns és *Hps1[LL]*, *Mon1[4]* kettős mutáns vándorló állatok zsírtestében. (A) A kontroll állat zsírtestében normális kinézetű autolizoszómák láthatóak. (B) A *Mon1[d4]* mutánsban normális kinézetű autolizoszómák (AL) is láthatóak a nagyszámú autofagoszóma (nyílfejek) mellett. (C) A *Hps1[LL]*, *Mon1[d4]* kettős mutánsban autolizoszómák nem láthatóak, az autofagoszómák (nyílfejek) azonban felhalmozódtak. Skála: 0,5 μ m, ami B-re és C-re is érvényes.

6. Diszkusszió

A *Hps1* és a *Hps4* fehérjék által alkotott BLOC-3 komplex pontos szerepe még máig tisztázatlan. Az bizonyos, hogy a *Rab32* és a *Rab38* fehérjék GEF-jeként képesek működni és befolyásolják a lizoszóma-szerű organellek keletkezését, de hogy ezt pontosan milyen útvonalakon keresztül teszi, az nem ismert pontosan. A *Rab32*-nek és *Drosophila* homológjának, a *Lightoid*-nak a korai autofágiában betöltött szerepéről már több publikáció is megjelent [21, 37]. Munkám során azonban meglepő módon a *Hps1* és a *Hps4* mutáns

állatokban nem figyeltem meg ilyen szintű autofág defektust. Az autofág struktúrák kialakultak mindkét BLOC-3 gén funkcióvesztése esetén és az autofagoszóma-lizoszóma fúzió is megtörtént bennük, így az általam észlelt egyedüli autofág fenotípus az volt, hogy az autofág lebontás mértéke némileg csökkent bennük.

Mi okozhatja ezt az autofág funkcióban való eltérést a Rab32 és aktivátora, a BLOC-3 komplex között? Erre egy lehetséges választ kapunk Ma és munkatársai cikkében, melyben a Lightoid GEF-jeként a Claret-et valószínűsítik [38]. Egy másik tanulmányban azt is leírták, hogy a *claret* funkcióvesztése szintén befolyásolja a pigmentgranulumok keletkezését, illetve a *lightoid*-hoz hasonló autofág fenotípust eredményez [39]. Ez arra utal, hogy Rab32 többféle módon aktiválódhat, egyrészt a Claret-en, másrészt a BLOC-3 komplexen keresztül, feltételezhetően az autofágia során az előbbi útvonal a domináns.

Ha nem a Lightoidon keresztül, akkor hogyan hat mégis a Hps1 és a Hps4 az autofágiára? A lizoszómák fejlődésének fő szabályozója a Rab7 fehérje, melynek GEF-je, a Mon1-Ccz1 komplex, jól ismert [40]. Ugyanakkor egy 2012-es publikációban megjelent eredmény szerint a BLOC-3 a RAB32/38 után Rab7 felé mutatja a legerősebb, noha még így is igen gyenge GEF aktivitást. Bioinformatikai vizsgálatokkal kimutatták, hogy a Mon1 és a Hps1, valamint a Ccz1 és a Hps4 között is megfigyelhető bizonyos szintű homológia [20]. Egy másik figyelemre méltó publikációban pedig Delahaye és munkatársai arról írnak, hogy *Caenorhabditis elegans*-ban a Hps1 homológja, a Glo-3 fehérje képes egy másik kötőpartnerrel, a Ccz1-gyel komplexet alkotni, és így részt venni a bél granulumainak kialakulásában, amik lizoszóma-szerű organellek [41]. A Mon1 tehát közeli rokonságban áll a Hps1-gyel, így feltételezhető, hogy bizonyos feladatok során egymással redundánsan működhetnek [20, 41].

Episztázis analízisünk eredménye, miszerint a *Hps1[LL]*, *Mon1[4]* kettősmutánsok korábban pusztulnak, valamint súlyosabb endocitózis, illetve autofág defektust mutatnak a *Hps1[LL]* és *Mon1[d4]* szimpla mutánsokhoz képest, jól magyarázható volna a Hps1-Hps4 és Mon1-Ccz1 komplexek, valamint tagjaik közti redundancia hipotézisével. Ez a gondolatmenet azt feltételezi, hogy a Mon1 és a Hps1, vagy akár maguk a heterodimer komplexek egymással redundánsan működhetnek, így amennyiben valamelyik szereplő hiányzik a rendszerből, funkcióját a másik legalább részben képes lenne pótolni, ha azonban mindkettő hiányozik, jóval súlyosabb hiba lép fel, ahogy ezt a kettősmutánsok esetén is tapasztaltuk. Fontos azonban hozzátenni, hogy a bemutatott hipotézis számos spekulatív elemet is tartalmaz, így a Hps1-Hps4 és a Mon1-Ccz1 komplexek és tagjaik között fennálló pontos hierarchia viszonyok, illetve redundancia bizonyításához még számos további kísérlet elvégzése szükséges a jövőben.

Munkám összegzéseként elmondhatom, hogy *Drosophila*-ban a Hps1-Hps4 komplex funkcióvesztésének hatására hiba lép fel a lizoszóma szerű organellumok biogenezise során, de csak enyhe autofág defektus tapasztalható. Ha viszont a *Hps1* és a lizoszómák fejlődésében fontos *Mon1* gén funkciója egyszerre esik ki, mind az endocitotikus, mind az autofág útvonal súlyosan, az egyszeres *Mon1* mutánsénál is nagyobb mértékben, sérül. Eredményeink tehát azt mutatják, hogy a Hps1-Hps4 és a Mon1-Ccz1 komplexek az autofágia és az endocitózis során egymással párhuzamosan, részben egymást kiegészítve működnek.