

Savas lebontást szabályozó kis GTPáz fehérjék hatásának elemzése autofágia és öregedési modellekben

36. OTDK Biológia Szekció

készítette:

KERESZTES FANNI

Eötvös Loránd Tudományegyetem
Biológus MSc IV. félév

témavezető:

DR. KOVÁCS TIBOR

egyetemi adjunktus

Eötvös Loránd Tudományegyetem
Genetikai Tanszék

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	2
Bevezetés	3
Irodalmi áttekintés	4
A makroautofágia	4
Az autofágia kezdeti lépései	6
Az autofágia fúziós eseményei	7
Autofágia a neuronokban	9
<i>Drosophila melanogaster</i> mint idegrendszeri és autofágia modell	11
Célkitűzések	14
Anyag és módszer	15
Élethossz mérés	16
Mászás teszt	16
Western-blot	17
Mikroszkópia	18
Immunhisztokémia	19
Statisztika	19
Eredmények és megvitatásuk	20
A kis G fehérjék csendesítése csökkenti az élettartamot és rontja a kognitív funkciót	20
A Rab7-CA rontja, míg az Arl8-CA javítja a túlélési időt és a mászási képességet	23
A kis GTPázok együttes aktivációja tovább javíthatja az állatok mozgásképességét	28
Következtetés	31
Összefoglaló	33
Köszönetnyilvánítás	34
Hivatkozások	34

Rövidítésjegyzék

Arf	adenosine diphosphate- ribosylation factor	HOPS	homotypic fusion and vacuole protein sorting
Arl8	ADP-ribosylation factor-like protein 8	Luc	luciferáz
ATG	autophagy-related gene	PI3K	foszfatidil-inozitol-3-kináz
CA	konstitutívan aktív	PI3P	foszfatidil-inozitol-3-foszfát
Ddc	dopa decarboxylase	qPCR	kvantitatív polimeráz láncreakció
EM	elektron mikroszkópia	Rab	Ras-associated binding
Gal4	galactose-responsive transcription factor 4	Rab2	Ras-related protein Rab-2A
GAP	GTPáz aktiváló fehérje	Rab7	Ras-related protein Rab-7a
GDP	guanozin-difoszfát	Ref(2)P	refractory to sigma P
GEF	guanin nukleotid kicserélő faktor	RNSi	RNS interferencia
GFP	green fluorescent protein	SNARE	soluble NSF attachment protein receptor
GTP	guanozin-trifoszfát	Syx17	Syntaxin-17
GTPáz	guanozin-trifoszfát hidroláz	TOR	Target of Rapamycin
		UAS	upstream activation sequence

Bevezetés

Kutatásom témája az autofágia szabályozásában kiemelt jelentőségű kis GTPáz fehérjék vizsgálata. Az autofágia egy citoprotektív lebontó folyamat a sejtekben, amely biztosítja a károsodott citoplazmatikus komponensek eliminálását. Ez a degradációs útvonal létfontosságú a sejtek túlélése és homeosztázisának biztosítása érdekében, kiemelten olyan szövetek sejtjeiben, amik nem osztódnak és regenerációra sem képesek. Ilyen sejtek a neuronok, ahol a kor előrehaladtával hanyatló intenzitású autofágia nem képes a toxikus sejtalkotók eltávolítására és ezek felhalmozódása az idegsejtek pusztulását okozza.

Az autofágia kutatásának jelentőségét fokozza, hogy számos neurodegeneratív betegséget összefüggésbe hoztak az autofág útvonal elégtelen működésével, így orvosi biológiai szempontból is fontos a folyamat részletesebb megértése. Ezen felül a betegségek kezelésének potenciális útvonala lehet az autofágia serkentése, sok kutatás törekszik az autofágia aktiválására alkalmas célpontokat felkutatni.

Az autofágia serkentése a folyamat eltérő lépésein keresztül történhet, így egy upstream aktivátor az autofág vezikulák képződését, míg a downstream lépések fokozása a meglévő vezikulumok lebontását segíti elő. Az Alzheimer-kór szempontjából nem célravezető az új vezikulák képződését fokozni, mert a vezikulák izoláló közege elősegítheti a β -amiloid és Tau toxikus aggregátumok kialakulását. Az általam vizsgált fehérjék a lebontás késői lépéseiben, a fúziós lépések végrehajtásában játszanak szerepet.

A makroautofágia folyamata egy kettős membrán cisztterna, a fagofór iniciálásával kezdődik, amely záródásával kialakít egy citoplazma komponenseket tartalmazó autofagoszómát. Ez fúzió által egyesülhet a savas közeget és lebontó enzimeket biztosító lizoszómával, így kialakul az autolizoszóma, amely belsejében megtörténhet a lebontás.

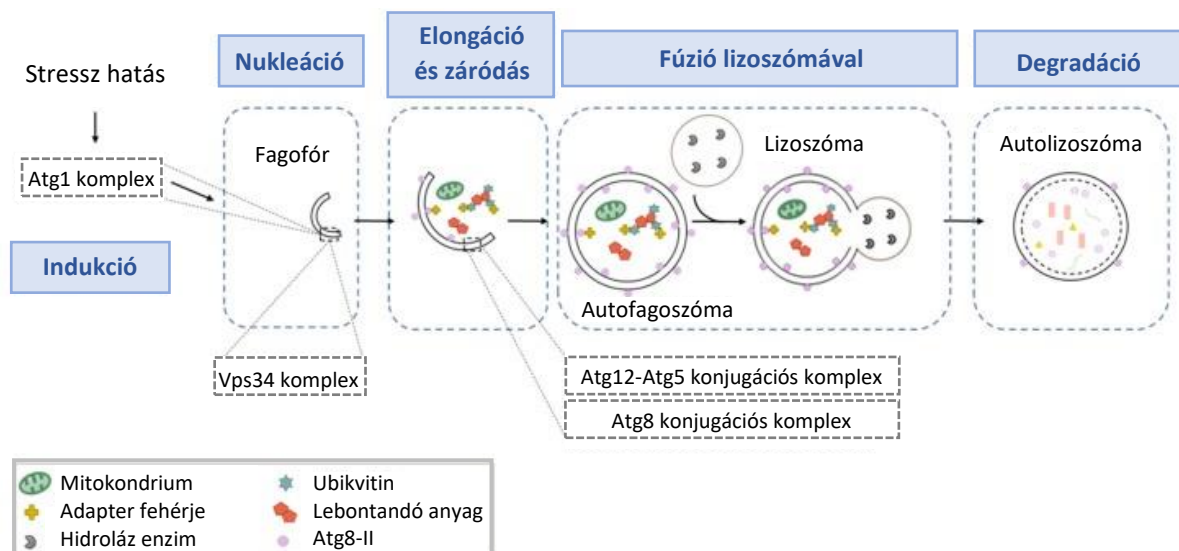
A kísérleteimet *Drosophila melanogaster*-ben végeztem, ami egy közkedvelt modellélőlény a genetikai kutatások során és számos kedvező tulajdonsággal rendelkezik, amik ideálissá teszik idegrendszeri és autofágia vizsgálatok kivitelezéséhez. Kutatásom során a Rab7 és az Arl8 szerepének részletes megismerését tűztem ki célul. Vizsgáltam ezen kis GTPáz fehérjék gátlásának és aktiválásának a hatását az autofágia és az életképesség szempontjából. Változatos módszertani eszköztár állt rendelkezésemre a kísérletek során: vizsgáltam az állatok élettartamát, mozgási képességét és az autofágia hatékonyságát többféle technikával: Western-blot és konfokális mikroszkópos módszerekkel.

Irodalmi áttekintés

A makroautofágia

Az autofágia egy lizoszomális degradációs útvonal az eukarióta sejtekben, ami jelentős citoprotektív szereppel bír, mivel eltávolítja a sejtekből a sérült organellumokat, megelőzi a toxikus fehérjék aggregálódását és elősegíti a homeosztázis fenntartását. Az élesztőktől az emlősökig az autofágia evolúciósan konzervált módon megy végbe és a folyamatban résztvevő fehérjék is jelentős hasonlóságot mutatnak (Feng és mtsai., [2014](#)). Szerepe kiemelt jelentőségű a posztmitotikus szövetek sejtjeiben, például az idegrendszerben, ahol létfontosságú a neuronok homeosztázisának és túlélésének biztosításában, mivel az idegsejtek jelentős része pusztulás után nem képes pótlódni (Tan és mtsai., [2014](#)).

Jelen kutatásban a makroautofágia az autofágia legjobban jellemzett fajtája lesz központi szerepben. A makroautofágia (továbbiakban csak autofágia) folyamata (1. ábra) egy dupla membrán formálódással, a fagofór képződésével kezdődik, ami egy citoplazma részletet vagy kiválasztott organellumokat körülölel, majd záródva létrehozza az autofagoszómát (Wong és Cuervo, [2010](#)). Az autofagoszóma formálódás a citoplazmában bárhol történhet, míg a késői endoszóma és a lizoszóma jellemzően a perinukleáris régióban található. Emiatt a képződött autofagoszómákat szállítani kell a mikrotubulus rendszer mentén, a dinein-dinaktin komplex segítségével a mínusz vég irányába, ahol egyesülhetnek lizoszómákkal (Nakamura és Yoshimori, [2017](#)). A fúzió egy autolizoszóma kialakulását eredményezi, vagy ezt megelőzően az autofagoszóma egy késői endoszómával kialakíthat egy köztes amfiszómát, ami végül a lizoszómával fog egyesülni. A lebontást a lizoszóma savas hidroláz enzimeik végzik, majd új monomerek képződnek, amik visszajutnak a citoplazmába, hogy felépítő folyamatok során makromolekulák építőelemei lehessenek (Tan és mtsai., [2014](#)).



1. ábra: A makroautofágia mechanizmusa. A makroautofágia indukcióját stressz hatására az Atg1 komplex végzi. Ezután egy izoláló membrán (fagofór) képződik, aminek formálódásában kiemelt szerepet játszik a VPS34 komplex. A fagofór záródását és autofagoszóma képződését az Atg12-Atg5 és Atg8 konjugációs komplexek irányítják. Végül az autofagoszóma lizosómával egyesül és autolizosómát eredményez, aminek a belsejében a savas hidroláz enzimek lebontják a bekerülő komponenseket (Frentzel és mtsai., [2017](#) alapján módosítva).

Az autofágia mechanizmusának megértése kiemelt orvosi biológiai jelentőséggel bír és elősegítheti terápiás kezelések kidolgozását különféle neurodegeneratív betegségek esetén. Ezen betegségek során kóros fehérjék képződnek, amelyek ha aggregálódnak, oligomerek vagy multimer komplexek jönnek létre, akkor eltávolításukat csak a makroautofágia végezheti (Tan és mtsai., [2014](#)). Ismert, hogy öregedés során csökken az autofágia aktivitása. A neuronok kiemelten érzékenyek az autofágia alulműködésére, mert a felhalmozódó toxikus sejtalkotók a neuronok funkcióvesztéséhez és pusztulásához vezetnek. Más szövetekkel ellentétben az idegszövet osztódással nem képes regenerációra (kevés kivételtől eltekintve). Kutatások kimutatták, hogy az autofágia aktiválásával a toxikus fehérje aggregátumok szintje csökkenthető, ami az öregedési és neurodegeneratív betegségmodellekben előnyös hatásúnak bizonyult (Billes és mtsai., [2016](#); Kovács és mtsai., [2017](#); Park és mtsai., [2020](#)).

Az autofágia kezdeti lépései

Az autofágia szabályozásában központi szerepet tölt be a környezet tápanyagellátottságát érzékelő TOR kináz (Target of Rapamycin) fehérje. Az autofágia iniciációja és a fagofór formálódása egy Atg1 kináz komplex (Atg1, Atg11, Atg13, Atg17, Atg29 és Atg31) aktiválódásával kezdődik. Tápanyagban gazdag környezetben az Atg1 komplexhez asszociálódik a TOR kináz, foszforilálja az Atg1 és Atg13 fehérjéket, ezzel inaktíválja őket. Élesztőben éhezés hatására a TOR leválik, a fehérjék defoszforilálódhatnak, így aktiválódhat a komplex, és elindulhat az autofágia (Feng és mtsai., [2014](#); McPhee és Baehrecke, [2009](#); Parzych és Klionsky, [2014](#)).

Az autofág membrán nukleációjához szükséges a foszfatidil-inozitol foszforilációja. Ezt egy Vps34/hármas típusú (class III) foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K) komplex végzi. Az összeszerelődő komplex része az Atg6, Atg14, Vps15 és Vps34. A komplex feladata, hogy a membránban létrehozza a foszfatidil-inozitol-3-foszfátot (PI3P), amihez fehérjék, mint az Atg18 specifikusan tudnak kötődni. Két fehérje is fontos szerepet tölt be a fagofór növekedésének biztosításában: az Atg18-hoz köthet az Atg2 lipid transzporter, amely lipideket szállít a fagofórhoz, míg az Atg9 transzmembrán fehérje a perifériáról kisméretű vezikulákhoz asszociálva érkezik a képződő autofág membránhoz (Feng és mtsai., [2014](#); McPhee és mtsai., [2009](#)).

Kétféle ubikvitin-szerű fehérjéket tartalmazó konjugációs rendszer működik a fagofór növekedését és záródását serkentve: Atg12-Atg5-Atg16 és Atg8/LC3 komplexek. Közös bennük, hogy E1-szerű enzimként az Atg7-et használják, míg eltérés közöttük az E2-szerű enzim: az Atg12 komplex az Atg10-et, az Atg8 rendszer az Atg3-at használja. Az autofagoszóma záródását követően az Atg12-Atg5-Atg16 komplex disszociál róla és visszakerül a citoplazmába (McPhee és mtsai., [2009](#); Pyo és mtsai., [2012](#)).

Az Atg4 cisztein proteáz képes az Atg8-at hasítani, így egy reaktív glicin marad szabadon a C-terminálison (Yu és mtsai., [2012](#)). Az Atg12-Atg5-Atg16 komplex E3-szerű enzimként katalizálja a folyamat utolsó lépését, és elősegíti, hogy az Atg8 kovalensen kötődjön foszfatidil-etanolaminhoz, tehát létrejön az autofagoszóma membránhoz asszociált Atg8 fehérje (Parzych és mtsai., [2014](#)). A lebontásra ítélt, ubikvitin tartalmú fehérje aggregátumok adaptor fehérjék (például: p62) segítségével kötődnek az Atg8 fehérjéhez és jutnak szelektíven az autofagoszóma belsejébe (Nezis és mtsai., [2008](#)).

Az autofágia fúziós eseményei

Az autofágia lépéseiről már részletes ismeretekkel rendelkezünk, de mind közül az autofagoszóma-lizoszóma fúziós lépés a legkevésbé megértett folyamat (Nakamura és Yoshimori, [2017](#)). A fúzióban szerepet játszanak kis G fehérjék, pányvázó faktorok, SNARE komplex, motor fehérjék és különféle adaptor molekulák. A kis G fehérjék közé tartoznak a Rab és az Arf alcsalád tagjai, amik képesek effektor fehérjéket toborozni és ezzel meghatározzák az adott organelum sorsát (Lőrincz és Juhász, [2020](#)). Ezen fehérjék azonos mechanizmussal dolgoznak, úgynevezett molekuláris kapcsolók, mivel a GDP és GTP kötött állapot között képesek váltani. A két forma eltérő funkció ellátásáért felelős és az egyensúlyt a környezet enzimek által szabályozza. A GEF (guanin nukleotid kicserélő faktor) a GDP-t cseréli GTP-re, tehát aktiválja a fehérjét, míg a GAP (GTPáz aktiváló fehérje) a GTP hidrolízisét serkenti, ezzel inaktíválja a fehérjét (Bernards és Settleman, [2004](#); Khatter és mtsai., [2015](#)). Kizárólag GTP kötött formában aktívak és lipid horgonnyal képesek membránhoz kötődni, a GDP kötött forma pedig inaktív és a citoplazmában található (Takáts és mtsai., [2018](#)).

A fúziós lépéshez elsősorban a két organelumnak térben találkoznia kell, ezt biztosítja a Rab7 és az Arl8, amik adaptorokhoz kapcsolódva motorfehérjék segítségével a mikrotubulus rendszer mentén szállítják az autofagoszómát és a lizoszómát egymás felé. Míg a Rab7 az autofagoszómákat a sejt központja felé szállítja, addig az Arl8 felelős a lizoszómák periféria felé történő mozgatásáért. A pányvázó faktor feladata, hogy a találkozó organelumokat egymáshoz rögzítse. A legjobban ismert pányvázó faktor a HOPS komplex. A SNARE komplexnek szerepe van a fúziós lépés kivitelezésében az élesztőtől egészen az emberig, de evolúciósan nem konzervált (Lőrincz és Juhász, [2020](#)). A Syntaxin-17 (Syx-17) az autofagoszóma-lizoszóma és autofagoszóma-endoszóma fúzióhoz szükséges SNARE fehérje. A Syx-17 mutáns *Drosophilában* felhalmozódnak az autofagoszómák a sejtekben a lebontás hiánya miatt (Maruzs és mtsai., [2019](#)).

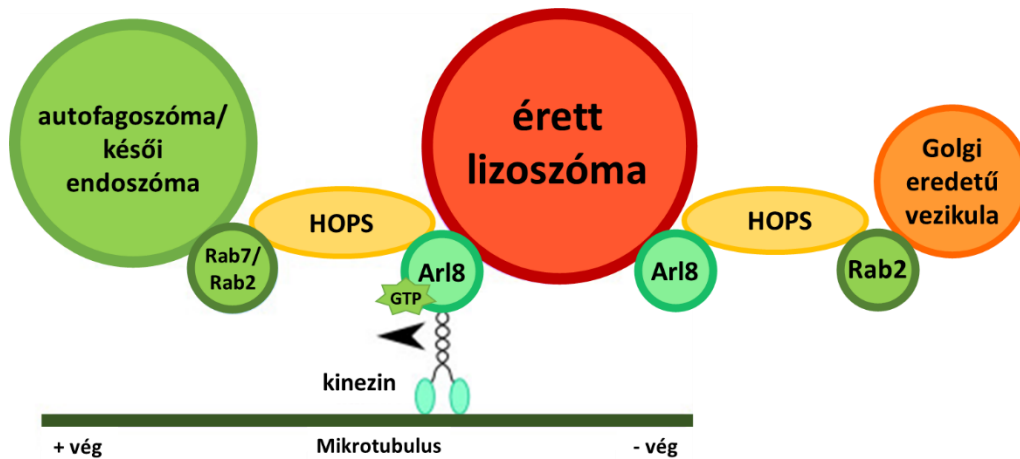
Az autofagoszóma-lizoszóma fúziós lépésben sokféle kis G fehérje vesz részt, mint például: Rab2, Rab7, Arl8, Rab21 és Rab24. A Rab33B a fúziós lépést negatívan szabályozza. Ezek közül a legjobban tanulmányozott fehérjék a Rab2, a Rab7 és az Arl8 (Lőrincz és Juhász, [2020](#)).

A Rab2 kis GTPáz fehérje erősen konzervált magasabb rendű eukarióta szervezetekben. Elhelyezkedését tekintve a Rab2 a késői endoszómák, Golgi eredetű vezikulák és lizoszómák membránján lokalizálódik (2. ábra). Szerepet játszik az autofagoszóma és endoszóma érésben, a lizoszóma megfelelő működésében és szabályozza a retrográd és anterográd szállítást a Golgi

és az endoplazmatikus retikulum között. Fontos funkciója biztosítani a LAMP fehérje szállítását a késői endoszómába, és fúzióját elősegíteni lizoszómával (Lőrincz, Tóth és mtsai., [2017](#); Lund és mtsai., [2018](#); Sinka és mtsai., [2008](#)). *Drosophila* és emlős modellben is leírták, hogy a Rab2 kötődik a HOPS komplexhez (Gillingham és mtsai., [2014](#)). A Rab2 fontos szerepet játszik az autofágia késői lépéseiben a *Drosophila* minden szövetében, de ezek eltérő érzékenységgel reagálnak a Rab2 csendesítésére. Izomszövetben a Rab2 az autofagoszómán lokalizálódik, ahol a HOPS komplexhez kötve elősegíti az autofagoszóma-lizoszóma fúziós lépést (Fujita és mtsai., [2017](#)).

A Rab7 kis G fehérjének szerepe van az autofág vezikulák szállításában a mikrotubulus rendszer mentén és a lizoszómával való fúzióban (Tan és mtsai., [2014](#)). Megtalálható az autofagoszómák és késői endoszómák felszínén (2. ábra) (Dinter és mtsai., [2016](#)). Az endoszóma érés során fontos lépés a Rab5 cseréje Rab7-re (Takáts és mtsai., [2018](#)). Szerepet játszik az apoptózisban, fagocitózisban és mitofágiában is. A Rab7-nek az idegsejtekben is sokféle funkciója ismert: kapcsolatban van a növekedési faktor receptorral, részt vesz a receptor endoszomális transzportjában és szabályozza a jelátvitelt. Fontos az axonális retrográd transzportban, az idegsejtek túlélésében és a neuronális migrációban is (Guerra és Bucci, [2016](#)).

Az Arl8 az Arf alcsaládba tartozó kis GTPáz fehérje, ami elsősorban az érett lizoszómákon lokalizálódik (2. ábra), és a legtöbb eukarióta élőlényben konzervált. Szükséges a lizoszómák megfelelő eloszlásának kialakításához emberi és *Drosophila* sejtekben is (Rosa-Ferreira és mtsai., [2018](#)). Túltermeltetése hatására a lizoszómák a sejt szélén perifériás eloszlást mutatnak. Emellett szerepe van az endocitózissal felvett komponensek lizoszóma felé irányításában és az axon mentén a szinaptikus vezikula prekursorok szállításában. *Drosophilában* is leírták, hogy nélkülözhetetlen az endocitotikus útvonal és az axonális transzport normál működéséhez. A lizoszóma pozicionálása mellett szükséges az endoszóma-lizoszóma és az autofagoszóma-lizoszóma fúzióhoz, mivel interakciós partnere a HOPS komplexnek (Boda és mtsai., [2019](#)).



2. ábra: A savas lebontást szabályozó kis GTPázok eltérő membránaffinitással rendelkeznek. A Rab2 a késői endoszómák és Golgi eredetű vezikulák membránján található. A Rab7 az autofagoszómák vagy endoszómák membránján helyezkedik el, míg az Arl8 a lizoszómán lokalizálódik (Boda és mtsai., [2019](#) alapján módosítva).

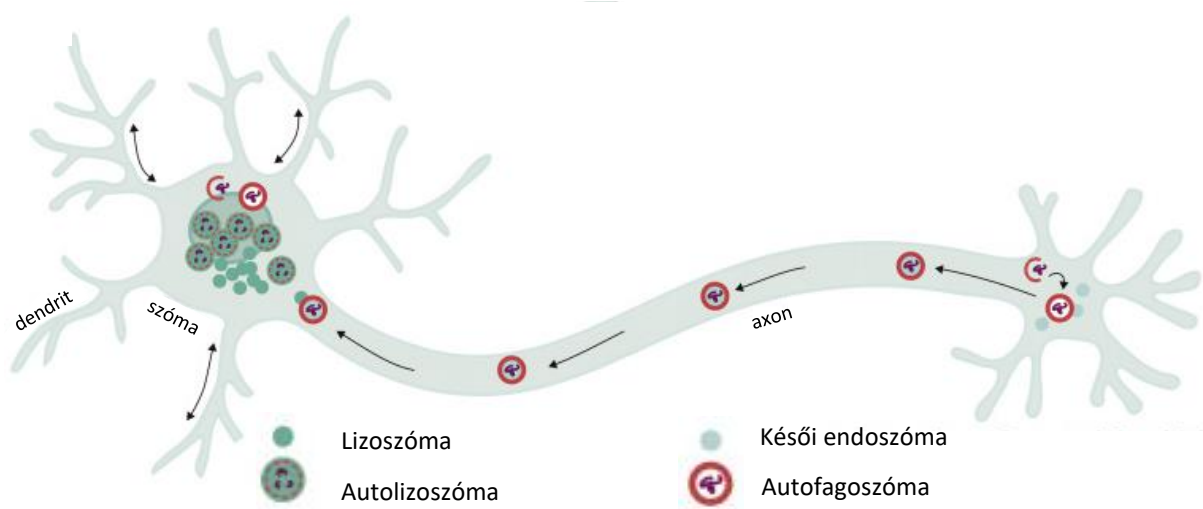
Autofágia a neuronokban

A neuronok morfológiailag és funkcionálisan is különleges sejtek. Ebből adódik, hogy az autofagoszómák formálódása és érere a neuronokban szigorú kontroll alatt áll (Damme és mtsai., [2015](#)). Az autofagoszómák a disztális axon végén keletkeznek, majd progresszív és egyirányú mozgásuk történik a szóma felé, dinein közvetítésével. A formálódást követően a disztális autofagoszómák késői endoszómákkal fuzionálhatnak. Ez az esemény serkenti a sejttestbe irányuló szállítás beindítását. Az axon végéről szállított autofagoszómák a szómába érkezve fuzionálnak az ott koncentrálódó lizoszómákkal, így autolizoszómává érnek (3. ábra). A retrográd transzport ilyen módon biztosítja, hogy távoli helyekről anyagfelvétel történjen, majd az axonon keresztül szállítva a sejttestben a makroautofágia biztosítsa a lebontást. Ez a folyamat fontos szerepet játszik a szinapszisok minőségellenőrzésében is, ahol a sejtalkotók túlhasználtak és hajlamosak károsodni. Az autofágia hiánya a szinapszisok kialakulását, fennmaradását és funkcióját is károsítja (Kulkarni és mtsai., [2018](#)).

Az autofágia fontos szerepet játszik a posztmitotikus idegsejtekben a káros és aggregálódott fehérjék, illetve sérült sejtorganellumok eltávolításában. A sérült mitokondriumok képesek reaktív oxigéngyököket képezni, ami DNS károsodást okozhat, illetve az apoptózist is serkenti citokróm c kibocsátása által, ezért eltávolításuk létfontosságú a sejt túlélése érdekében. Az autofágia aktivitása a kor előrehaladtával csökken. A makroautofágia serkentése képes növelni az élethosszt sokféle modellélőben, mint az élesztő, a fonálféreg, a muslica és

az egér. Ezen felül az Atg8a-nak az idegrendszeri túltermeltetése is képes az élettartam növelésére. Ezzel szemben a makroautofágia deficiens állatok fenotípusa a normális öregedéshez hasonló jellegzetességeket mutatott. Feltételezhető, hogy az autofágia kulcsfontosságú az öregedés megelőzésében (Damme és mtsai., [2015](#); Simonsen és mtsai., [2008](#)).

Az autofágiához szükséges gének neuronspecifikus kiütése axon degenerációt és az idegsejtek halálát okozza egérben. A neuronok pusztulása összefüggésben áll az ubikvitin pozitív fehérje aggregátumok mennyiségének növekedésével. Továbbá többféle fontos autofág fehérje mutációja kapcsolatban áll neurodegeneratív betegségek kialakulásával emberekben, ami megerősíti az elképzelést, hogy az autofágia kiemelt funkciója az egészséges neuronok megőrzése (Kulkarni és mtsai., [2018](#)). Alzheimer-kóros egér modellben igazolták, hogy az intracelluláris β -amiloid oligomerek a dinein motorfehérjéhez kapcsolódva gátolják azok toborzását az amfiszómákhoz, ezzel gátolva az axonális transzportot és az autofágiát a neuronokban (Tamminen és Cai, [2017](#)).



3. ábra: Az autofágia szerepe a neuronokban. Az axon disztális végén képződő autofagoszómák az axon mentén retrográd transzporttal szállítódnak dinein közvetítésével. A szómában megtörténik az autofagoszóma/amfiszóma fúziója az ott lokalizálódó lizoszómákkal, és így kialakul az autolizoszóma (Kulkarni és mtsai., [2018](#) alapján módosítva).

Drosophila melanogaster mint idegrendszeri és autofágia modell

A *Drosophila melanogaster* közkedvelt modellélőlény, több mint 100 éves múltra tekint vissza a genetikai kutatásokban, mivel számos kedvező tulajdonsága alkalmassá teszi a feladatra. A sokéves tapasztalat elősegíti napjaink kutatásait, ugyanis a *Drosophila* mára egy széleskörűen tanulmányozott és részletesen megismert élőlény lett, aminek a vizsgálatára változatos módszertan van kidolgozva.

Emberi betegségek modellezésére kifejezetten alkalmas a *Drosophila melanogaster*, amely 4 kromoszómán több mint 13 ezer gént tartalmaz és genomjában kisebb a redundancia, mint a gerincesekben. Számos géncsalád evolúciósan konzervált a gerinctelenektől a gerincesekig, ezek között találhatunk sokféle potenciális gyógyszercélpontot is. A emberi betegségeket okozó gének 70%-ának van muslicában ortológia (Moloney és mtsai., [2010](#)).

A *Drosophila* rövid generációs ideje és élethossza miatt kifejezetten alkalmas neurodegeneratív betegségek vizsgálatára. A rövid élettartam lehetővé teszi a gyors adatgyűjtést és nagy elemszámú minta vizsgálatát (Prüßing és mtsai., [2013](#)). Az emlős és a muslica agy sok hasonlóságot mutat: neuronok és támasztó glia sejtek alkotják, azonos neurotranszmittereket használnak és a muslica is rendelkezik egy vér-agy gáthoz hasonló (glia sejtek választják el a keringési rendszert a központi idegrendszertől) határfelülettel (Florence és mtsai., [2017](#)). A gyógyszerfejlesztés során nagyon fontos szempont, hogy a gyógyszerjelölt molekula milyen hatékonyan tud átjutni a vér-agy gáton és bejutni az agyba. A különféle gyógyszerjelöltek korai *in vivo* tesztelésénél célszerűbb a drága rágcsáló modellek helyett a *Drosophilát* választani (Hindle és Bainton, [2014](#)).

A *Drosophila melanogaster* rendkívül alkalmas modellélőlény az autofágia vizsgálatára, számos módszer lett kidolgozva a tanulmányozására. Az autofágia evolúciósan konzervált folyamat, a lépései és a szükséges fehérjék jelentős hasonlóságot mutatnak egymástól távoli fajok között is (Feng és mtsai., [2014](#)).

A fluoreszcens mikroszkópia az egyik legelterjedtebb módszer *Drosophilában* az autofágia vizsgálatára. Használhatunk fluoreszcens riportereket vagy vitális festékeket az autofág struktúrák jelölésére vagy indirekt módon ellenanyagokat is alkalmazhatunk az endogén fehérjék jelölésére (Lőrincz, Mauvezin és mtsai., [2017](#); Nagy és mtsai., [2015](#)). A leggyakrabban használt markere az autofág vezikulumoknak az Atg8a, ami az emlős LC3 ortológia. A makroautofágia során az Atg8a kötődik a formálódó fagofór membránjához, majd záródás után

az autofagoszóma külső és belső membránjában is megtalálható lesz. Később az Atg4 levágja a külső membránról, de a belsőhöz továbbra is kötve marad. A legtöbb riporter, például a GFP pH érzékeny, és a lizoszóma savas közegében gyorsan elveszíti a fluoreszcens jelet, de az RFP és társai stabilabbak és lassabban veszítik el a jelet, így az mCherry-Atg8a alkalmas minden autofág struktúra jelölésére (Lőrincz, Mauvezin és mtsai., [2017](#)).

Fluoreszcens jelöléssel vizsgálható a Ref(2)P/p62 is (pl.: GFP-p62), ami szelektíven kötődik az ubikvitinált fehérjékhez és autofágia során maga is lebomlik. Konfokális mikroszkópban vizsgálva a p62 pozitív aggregátumok mennyiségének megemelkedése az autofágia elegenden működését jelzi. Immuncitokémiához alkalmazható anti-p62 ellenanyag is, amivel az endogén fehérje jelölhető és nem szükséges a riporterrel ellátott fehérjét keresztezéssel az állatokba juttatni (Lőrincz, Mauvezin és mtsai., [2017](#); Nagy és mtsai., [2015](#)).

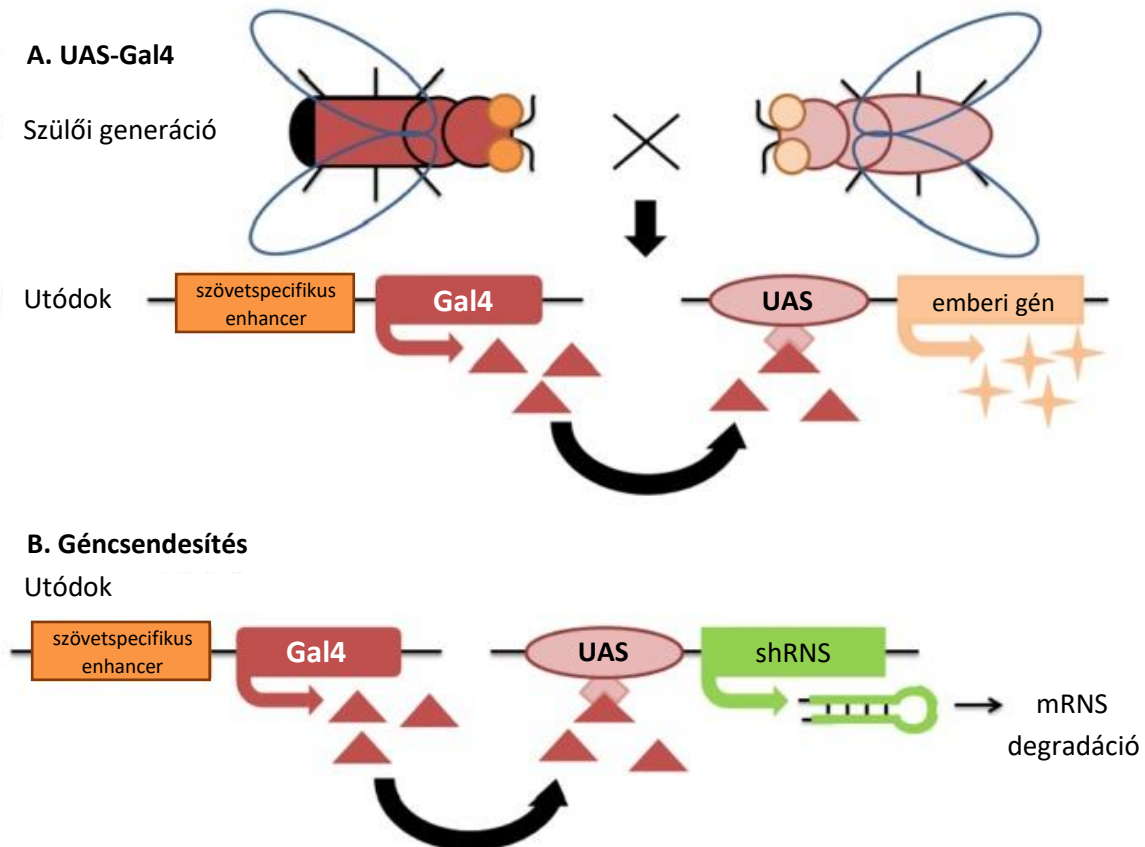
Az autofágia tanulmányozására a klasszikusan használt szövettípus a lárvális zsírtest, ezért a legtöbb fluoreszcens technika is erre lett kidolgozva és más szövetekben való vizsgálódásra nem feltétlenül alkalmas.

Western-blot vizsgálat is alkalmas autofágia vizsgálatára. Általában a fehérjemintát a teljes állatból, vagy kiboncolt szöveteiből készítik. A vizsgálat során rutinszerűen detektált fehérje az Atg8a, ami két csíkot ad eredményként: a lipidált, autofagoszóma kötött Atg8a II gyorsabban vándorol a gélben, mint a szolubilis Atg8a I. Az Atg8a II fehérje szintjének emelkedése utalhat megnövekedett autofagoszóma számra, amit az autofagoszóma-lizoszóma fúzió sérülése okoz. Az Atg8a II csökkenése jelezheti az autofagoszóma képződés hibáját vagy az elégtelen Atg8a lipidációt. A másik vizsgált fehérje a Ref(2)P/p62, aminek emelkedése az autofágia gátlását jelzi (Lőrincz, Mauvezin és mtsai., [2017](#); Nagy és mtsai., [2015](#)).

Az egyik legelterjedtebben alkalmazott módszer *Drosophilában* az UAS-Gal4 rendszer használata, ami lehetővé teszi gének specifikus helyen történő kifejeződését. Az UAS és a Gal4 komponensei a rendszernek külön törzsekben vannak fenntartva. Ennek előnye, hogy így a szülői vonalban a gén transzkripciósan inaktív, ezáltal lehetővé válik olyan gének fenntartása is, amiről toxikus vagy életképességet csökkentő fehérjék képződnek (Duffy, [2002](#)).

A Gal4 egy transzkripciós faktor, amely egy specifikus DNS szekvencia, az *upstream activation sequence* (UAS) felismerésére képes. Amennyiben a Gal4 átíródik, hozzákötve az UAS szekvenciához serkenti a hozzá kapcsolt gén kifejeződését (4. ábra). A rendszer változatosan szabályozható, az UAS szekvenciát követően bármilyen gén elhelyezhető, amivel gének túltermeltetése, RNS interferencia általi géncsendesítés vagy fluoreszcens riporter

fehérjék expresszálationa indukálható. A *Gal4* gén átíródását szövetspecifikus enhancerekkel lehet szabályozni, így elérhető, hogy a kiválasztott túltermeltetni kívánt génünk, ne a teljes állatban fejeződjön ki, hanem adott szövettípusra korlátozódjon (pl.: DdcGal4 specifikusan a dopaminerg és szerotonerg neuronokban fejeződik ki).



4. ábra: Az UAS-Gal4 rendszer működési mechanizmusa. A szülői generáció egyik tagja tartalmazza a szövetspecifikusan kifejeződő *Gal4* gént, míg a másik az UAS enhancerhez kapcsolt transzgént. A keresztezést követően a *Gal4* és az UAS azonos egyedben lesz megtalálható, így az átíródo *Gal4* fehérje megindíthatja az UAS utáni gén átírása. A módszer nagyon változatosan alkalmazható, sokféle kifejeződési mintázatot lehet előidézni alkalmazásával (Florence és mtsai., [2017](#) által módosítva).

Célkitűzések

Az autofágia hatékonyságának növelésével az élettartam és az aktívan tölthető időperiódus is meghosszabbítható (Simonsen és mtsai., [2008](#)), ezáltal az időskori megbetegedések kialakulása is elodázhatóvá vagy megelőzhetővé válhat. Az autofágia mechanizmusának részletesebb megértése és új, specifikus aktivációs célpontok keresése nagyon jelentős kutatási irány napjainkban. Idős korban az újabb autofagoszómák képződésének serkentése helyett hipotézisem szerint hatékonyabb lehet a már meglévő autofagoszómák lebontásának serkentése, tehát a fúziós lépés és a lizoszomális degradáció fokozása.

Előzetes eredményeink alapján a Rab2 aktivációja (Rab2-CA) javította az állatok mászásképpességét és serkentette az autofágiát neuronokban. Parkinson kórt modellező állatokban a Rab2-CA növelte az élethosszt, javította a mászásképpességet és serkentette az autofágiát (Szinyákovics és mtsai., [2020](#)).

Kutatásom célja volt, hogy a Rab7 és az Arl8 fehérjék idegrendszeri működéséről és funkciójáról is új információkat szerezzek és tanulmányozzam, hogy ezen fehérjék aktiválása milyen hatással van az élettartamra és a korrall hanyatló kognitív képességekre. Ehhez első lépésben azt terveztem megvizsgálni, hogyan befolyásolja az állatok túlélési képességét, ha idegrendszerre specifikusan csendesítem ezen kis G fehérjéket. Ezt követően a fehérjék aktivációját, folytonosan GTP kötött mutánsok idegrendszeri hatását kívántam tanulmányozni, hogyan hatnak az autofágiára és az élettartam során milyen kognitív változásokat okoznak. Végezetül célom volt, hogy a kis G fehérjék együttes aktivációjának lehetséges szinergikus és antagonisztikus hatását is tanulmányozzam.

Anyag és módszer

A mérésekhez használt állatok 29 °C-on voltak tartva, standard kukorica-cukor-agar alapú táptalajon. A törzsek 3 törzsközpontból származnak: Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC), Vienna Drosophila Resource Center (VDRC), Fly Stocks of National Institute of Genetics (NIG-Fly). Az Arl8-CA törzset Dr. Juhász Gábortól, a UAS-Luc törzset Dr. Lukácsovich Tamástól kaptuk. Néhány törzset keresztezéssel én hoztam létre.

A kísérletek során felhasznált törzsek		
Megnevezés	Genotípus	Származás
DdcGal4	w ¹¹¹⁸ ; P{w[+mC]=Ddc-GAL4.L}Lmpt[4.36]	BDSC:7009
izogenikus w (w kontroll)	w ¹¹¹⁸	BDSC:5905
UAS-Luc	y* w* ;P{UAS-Luc.VALIUM20}attP40	Lukácsovich Tamástól
Rab2-CA	y ¹ w*; P{w[+mC]=UASp-YFP.Rab2.Q65L}02	BDSC:9760
Rab7-CA (A)	y ¹ w*; P{w[+mC]=UASp-YFP.Rab7.Q67L}19	BDSC:24103
Rab7-CA (B)	y ¹ w*; P{w[+mC]=UASpYFP.Rab7.Q67L}awd[14]/TM3, Sb[1]	BDSC:9779
Rab7-CA (C)	y ¹ w*; P{w[+mC]=UASp-YFP.Rab7.Q67L}7	BDSC:50785
Arl8-CA	w*; UASpArl8.Q67L	Juhász Gábortól
RNSi kontroll	40D-UAS	VDRC: 60101
Rab7 RNSi	w ¹¹¹⁸ ; P{GD11800}v40337	VDRC: 40337
Arl8 RNSi	w*, Arl8 ^{NIG.7891R}	NIG-Fly: 7891R-2
3xmCherry-Atg8a, DdcGal4	y* w ¹¹¹⁸ ; 3xmCherry-Atg8a4-14 (II); P{w[+mC]=Ddc-GAL4.L}Lmpt[4.36]	általunk létrehozva
Luc-GFP	w*; P{UAS-Luc.VALIUM20}attP40; UAS-myr-GFP	általunk létrehozva
Rab7-CA, Luc	w*; P{w[+mC]=UASp-YFP.Rab7.Q67L}19; P{UAS-Luc.VALIUM20}attP40	általunk létrehozva
Rab7-CA, Rab2-CA	w*; P{w[+mC]=UASp-YFP.Rab7.Q67L}19; P{UASp-YFP.Rab2.Q65L}02	általunk létrehozva
Arl8-CA, Luc	w*; UASpArl8.Q67L; P{UAS-Luc.VALIUM20}attP40	általunk létrehozva
Arl8-CA, Rab2-CA	w*; UASpArl8.Q67L; P{UASp-YFP.Rab2.Q65L}02	általunk létrehozva

1. táblázat: A kísérleteimhez használt törzsek megnevezése, pontos genotípusa és a törzsek származási helye

Az általam használt DdcGal4 az agyban kizárólag dopaminerg és szerotonerg neuronokban fejeződik ki (Li és mtsai., [2000](#)). A DdcGal4 használatának az oka, hogy korábbi eredményeink szerint ezen az agyterületen kifejtett autofágia aktiválás pozitív hatással van az állatokra. Ezen kívül az Parkinson-kór esetében kifejezetten a dopaminerg neuronok érintettek a toxikus fehérjék felhalmozódásában, így orvosi biológiai szempontból is érdemes erre a területre összpontosítani.

Élethossz mérés

Az élethossz méréshez minden genotípusból 150 állatot használtam (75 nőstény és 75 hím), ezek 5 párhuzamos csőbe kerültek, 1 napos korban. Az állatokat végig 29 °C-on tartottam és naponta feljegyeztem az elpusztult állatok számát és nemét. Kétnaponta friss táptalajra helyeztem az állatokat. Az utolsó állat elpusztulásával zárult a mérés, majd következett az adatok statisztikai kiértékelése.

Mászás teszt

A mászás teszt célja, hogy közvetetten információt szerezzünk az idegrendszer állapotáról. A mérések során két mérési pontot különböztetünk meg: a rövidtávú (6 cm) az ingerfelfogó képesség gyorsaságát, míg a hosszútávú (23,5 cm) az inger megtartó képességet mutatja. A mászás teszthez az állatokat szén-dioxiddal altattam, majd 10-10 állatot helyeztem 25 centiméter hosszú vékony csövek aljára. Az altatást követően az állatok 1 órán át regenerálódtak. Külön vizsgáltam a hím és nőstény egyedeket, minden mérést két párhuzamos csoporttal végeztem és három alkalommal ismételtam, közöttük 30 perces szünetekkel (Kovács és mtsai., [2021](#)). A két nem külön történő vizsgálata indokolt, mivel ismert, hogy a hímekben nagyobb mennyiségben expresszálódnak a transzgenek, ami befolyásolhatja az állatok mászásképpességét is.

Minden mászást videón rögzítettem, ami a későbbi kiértékeléshez nélkülözhetetlen. A csöveket néhány határozott mozdulattal egy puha felületre leütöttem, ennek hatására az állatok negatív geotaxissal válaszoltak és a csőben felfele kezdtek mászni. A kiértékeléskor rögzítettem, hogy hány állat érte el a 6 vagy 23,5 cm magasságot 20, 40 és 60 másodperc alatt. A diagramok általában azonos tendenciát mutatnak, ezért az eredmények fejezetben egy kiválasztott diagramot tüntettem fel a kísérletekhez, ami legjobban jellemzi a változást. A kettős aktivációs kísérlet során bemutatom a rövid- és hosszútávú mászás diagramját is, mivel itt érdekes módon a két távolságon egymástól eltérő eredményt tapasztaltam.

Western-blot

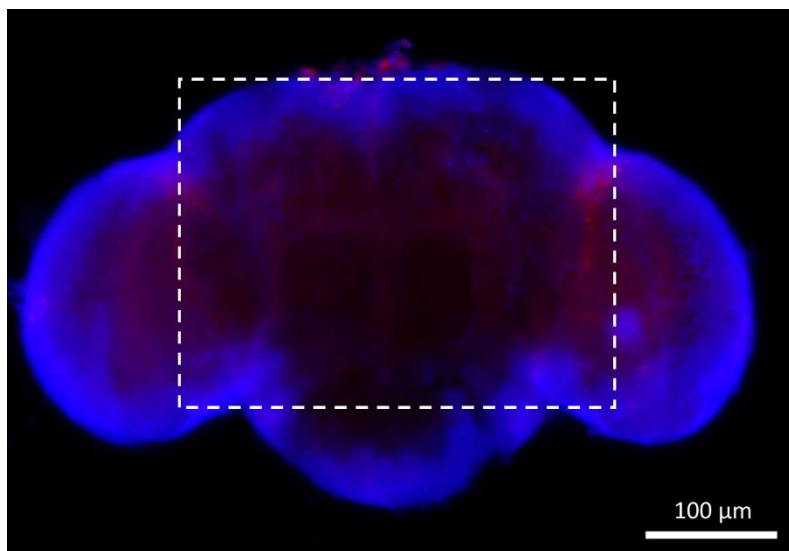
A Western-blothoz a fehérjemintákat két életkorban izoláltam nőstények fejéből: 7 napos fiatal és 28 napos idős állatokból. A kísérlet menetét Billes és munkatársai által leírt módszerrel végeztem (Billes és mtsai., [2016](#)). Az fehérje izoláláshoz 32 μ l fly lízis puffert és 32 μ l 2 $\times$ SDS loading oldatot adtam 10 fejhez, majd homogenizáló pálcával egységesítettem a mintát, végül 95 °C-on 5 perc alatt denaturáltam a fehérjéket. A Western-blot során 15 μ l fehérjemintát vittem fel a 4-20% grádiens poliakrilamid gélre (Mini-PROTEAN TGX Gels, Bio-Rad, 456-1093), illetve a minták két végére kaleidoszkópot (ProSieve QuadColor Protein Marker 4,6-300 kDa Cat.No. 00193837) helyeztem eltérő mennyiségben, hogy később tudjam a gél orientációját. A fehérjéket gélelektroforézissel méret szerint elválasztottam, majd nitrocellulóz membránra blottoltam a mintát. A blokkoláshoz 3%-os tejporos oldatot használtam 1 $\times$ TBST-ben. A következő elsődleges ellenanyagokat alkalmaztam: anti-Ref(2)P/p62 (rabbit, 1:2000, Pircs és mtsai., [2012](#)), alpha-Tub84B (mouse, 1:1000, Sigma, T6199), anti-Atg8a (rabbit, 1:2000, Takáts és mtsai., [2013](#), Nagy és mtsai., [2014](#)). Az elsődleges ellenanyaggal egy éjszakán át inkubáltam a mintát 4 °C-on. Másodlagos ellenanyagok: anti-rabbit IgG alkalikus foszfatáz (1:1000, Sigma, A3687), anti-mouse IgG alkalikus foszfatáz (1:1000, Sigma, A5153). Az előhíváshoz NBT-BCIP oldatot (1:50, Sigma, 72091) használtam.

Az eredmények fejezetben szereplő képeken az eltérő méretű fehérjék azonos membránról származnak, így a minták fehérje mennyisége összehasonlítható egymással, ha a kontrollként használt tubulin háztartási fehérje mennyiségéhez viszonyítunk. A képek kiértékeléséhez az ImageJ (1.52a) programot használtam, ami a csíkok intenzitását adta meg, majd ezeket az értékeket a tubulinhoz normalizáltam. Mivel a Western-blot módszer szemikvantitatív, ezért az eredményeket nem számszerűsítve mutatom be, csak a kiértékelés után látott változás irányát jelzem, hogy a mennyiség nő vagy csökken. A humán p62 fehérje ortológja a *Drosophila* Ref(2)P, ami egy 100kDa-os fehérje (Wyers és mtsai., [1993](#)). A Ref(2)P/p62 autofág szubsztrát, ami autofágia során lebomlik, tehát mennyiségi csökkenése az autofágia aktivációjára utal. Az Atg8a I a szolubilis, míg az Atg8a II a lipidált, autofág struktúrák membránjához kötött formája a fehérjének, ami autofágia során lebomlik. A foszfatidil-etanolaminhoz kötött, lipidált forma molekuláris tömege ugyan nagyobb, de a megnövekedett hidrofobicitás miatt nagyobb az elektroforetikus mobilitása (Mizushima és Yoshimori, [2007](#)).

Mikroszkópia

A mikroszkópos mérésekhez a nőtény állatokat 7 napos korban lefejeztem, eltávolítottam a fejekről a szájszervüket, majd fixáltam (4%-os formaldehid PBS-ben hígítva) őket 20 percig szobahőmérsékleten. Utána 3×5 percig mostam a mintát PBS-sel. A fixálást követően kiboncoltam az agyakat PBS-ben, majd Hoechst tartalmú fedőoldattal (glicerín:PBS - 4:1 arányban) lefedtem őket. A fluoreszcens mikroszkópos képek a Zeiss Axioimager Z1 mikroszkóppal készültek, (Plan-APOCHROMAT 20x 0,8 NA objektívvel), ami ApoTome2-vel van felszerelve.

A képek készítésénél a minta teljes vastagságában egymástól 1 µm távolságban készültek fotók, majd ezek voltak egyesítve. Az így készült kép a mintában található összes struktúrát mutatja, így kiküszöbölhető, hogy ne egy szubjektívan választott szeletet vizsgáljunk, ami alul- vagy felülreprezentálhatja a jelölt struktúrák mennyiségét. A képek kiértékeléséhez az ImageJ (1.52a) programot használtam. A kapott eredmények a jelölt struktúrák vizsgált területen mért arányát jelenti, mert nem csak a vezikulumok mennyisége, de azok mérete is számít, mivel több autofagoszóma is összeolvadhat egy lizoszómával, ami a fúziós lépés serkentését jelzi, de nem növeli a mikroszkópos képen látható struktúrák mennyiségét. Ezen kívül a p62 is tud nagyméretű fehérje aggregátumokhoz kötődni, ennek is számít a mérete és nem csak a száma.



5. ábra: Drosophila agy fluoreszcens mikroszkópos képe. A szaggatott vonallal jelzett terület látható az eredmények részénél szereplő képeken.

Immunhisztokémia

A méréshez 7 napos nőstény állatokat használtam, genotípusonként 5-8 agyról készült mikroszkópos felvétel. Az immunhisztokémia a mikroszkópos méréssel megegyező módon kezdődik: 7 napos állatokat lefejeztem, a szájszerveket eltávolítottam, majd fixáltam az agyakat (1 ml 4%-os formaldehid + 5 µl 20% Tween20) 30 percig szobahőmérsékleten. Ezt 3×20 perc mosás követte PBST-ben (0,1% Triton-X, PBS-ben). A fixálást az agyak kiboncolása követte PBS-ben. A blokkoláshoz PBST és fetal bovine serum (FBS) tartalmú oldatot használtam (1 ml PBST-hez kell 50 µl FBS), a folyamat 1 órán át szobahőmérsékleten, billegtetőn ment. Ezután a mintákra rákerült az elsődleges ellenanyag: anti-ubikvitin (mouse, 1:500, Merck, ST1200). Majd 4 °C-on, billegtető tálcán 2 éjszakát jelölődni hagytam a mintát. A 3. napon először PBST-vel mosást végeztem 3×20 percig. A másodlagos ellenanyagot: Alexa Fluor 488 anti-mouse (1:500, Life Technologies, A11001) szobahőmérsékleten 2 órán át hagytam a mintán. Ezt követte a magfestés 20 percig PBST + DAPI oldattal. Újabb mosási lépések következtek: 3×20 perc PBST, majd 5-10 perc PBS mosás. A mintákat lefedés után (fedő oldat: glicerin:PBS - 4:1) fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáljuk Kovács és munkatársai által leírt metodikát alkalmaztam a kísérlethez (Kovács és mtsai., [2021](#)).

Statisztika

Statisztikai elemzéshez az RStudio (2021.09.0+351) programot használtam. Először megvizsgáltam az adatok eloszlását (Lilliefors-teszt), majd normál eloszlású minták esetén kétmintás t-próbát végeztem. Ha az adatok nem normál eloszlást mutattak, Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztam. Az élethossz eredmények Kaplan-Meier görbéit az SPSS22.0 programmal készítettem. A diagramokon feltüntetett hibasávok a standard szórást, a csillagok pedig szignifikanciát és annak megbízhatósági fokát jelölik: $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***.

Eredmények és megvitatásuk

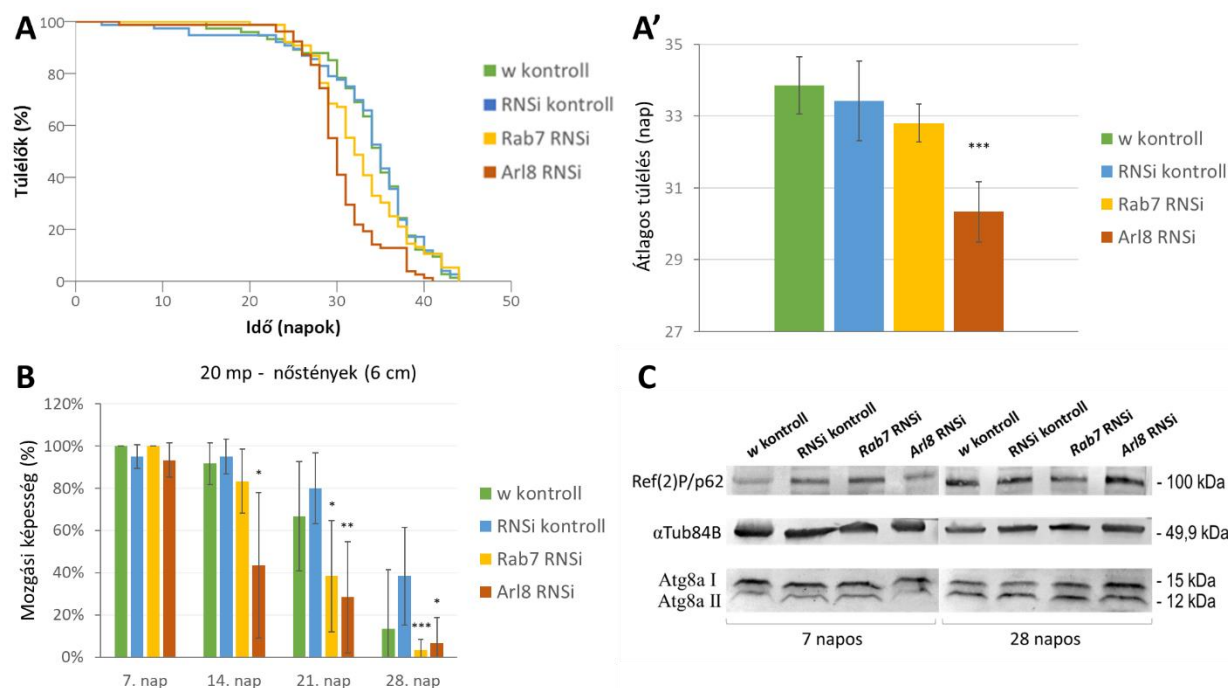
A kutatásom során kis G fehérjék idegrendszeri szerepét, lehetséges élettartam és autofágia befolyásoló hatását tanulmányoztam.

A kis G fehérjék csendesítése csökkenti az élettartamot és rontja a kognitív funkciót

Első kísérleteimben megvizsgáltam, hogyan hat a kis GTPáz fehérjék csendesítése az állatok élethosszára, mászáskéességére és hogyan befolyásolja az autofágiát. Feltételezésem szerint a *Rab2*, a *Rab7* és az *Arl8* csendesítése is autofág vezikulumok felhalmozódásához vezet, mivel hiányukban a fúziós lépések gátlódnak. Jelen kutatásban a *Rab7* és az *Arl8* csendesítését vizsgáltam. A géncsengesítéshez RNS interferencia (RNSi) törzseket, kontrollnak pedig az izogenikus *w¹¹¹⁸* (*white*) mutánst (továbbiakban *w* kontroll) és az RNSi kontroll törzset használtam, amiket a kísérletben használt Gal4 forrással kereszteztem. Minden transzgenről kifejeződő RNSi esetében aktiválódhat a RISC komplex pusztán azért, mert duplaszálú RNS-t termeltetünk túl. Az így aktiválódott RNS interferencia további gének kifejeződését szabályozhatja és így hatással lehet az élettartamra. Az ON-target nélküli RNSi kontroll törzs ezt a nem specifikus RNS interferencia aktiválódásból eredő különbséget hivatott kiküszöbölni (Alic és mtsai., [2012](#)). Korábbi eredményünk szerint a *Rab2* csengesítése rövidebb élettartamot és hanyatló kognitív képességet okoz. Az általam vizsgált RNSi gének egy UAS szekvencia után helyezkednek el, ezért az átíródás biztosításához egy Gal4-gyel kereszteztem össze az állatokat. Én a DdcGal4-et használtam kísérleteim során.

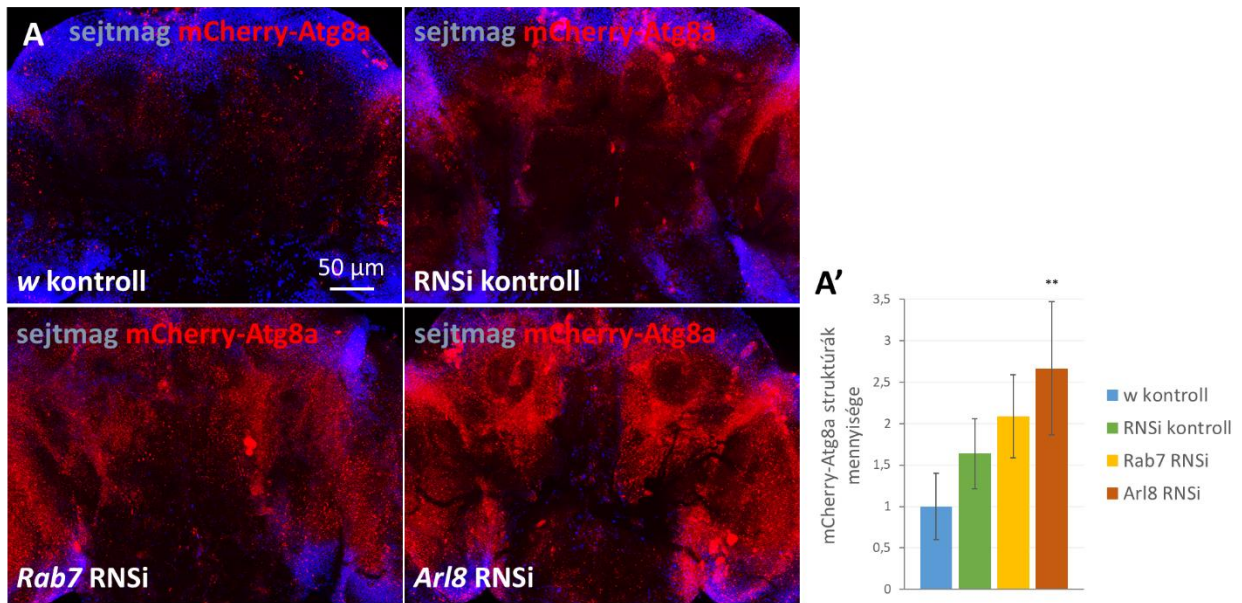
Elvégeztem az RNS interferencia konstrukciók vizsgálatát, hogy meghatározzam milyen hatékonyan csengesítik az adott géneket. A vizsgálatok kimutatták, hogy mindkét gén (*Rab7* és *Arl8*) expressziója csengesült az RNSi hatására.

Az állatok életképesség vizsgálatához mászás tesztet és élethossz mérést végeztem. A *Rab7* és az *Arl8* csengesítésének hatására csökkent az átlagos túlélési képesség a kontrollhoz képest (6. ábra/A'). Az *Arl8* RNSi hatására az életkor szignifikánsan csökkent az mindkét kontrollhoz viszonyítva, míg a *Rab7* csengesítése a *w* kontrollhoz képest mutatott szignifikáns hatást. A mászáskéesség romlott, a hosszú- és a rövidtávú mászás tekintetében egyaránt (*Arl8* és *Rab7* RNSi esetében is) (6. ábra/B). Továbbá megnéztem 7 és 28 napos állatok fejéből származó autofágiában érintett fehérjék mennyiségét Western-blottal. Az *Arl8* RNSi esetében mindkét életkorban megemelkedett a Ref(2)P/p62 mennyisége, amely eredmény az autofágia gátlását jelzi. Emellett az Atg8a szolubilis forma mennyisége is nőtt (6. ábra/C).



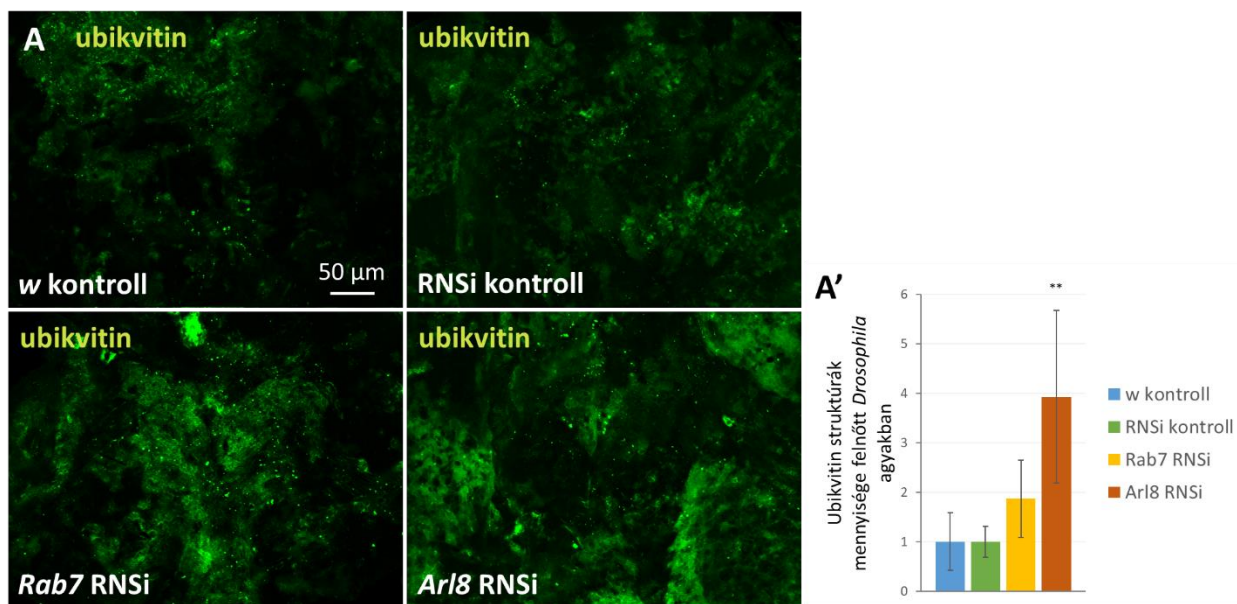
6. ábra: A Rab7 és az Arl8 egyaránt szükséges a megfelelő élethosszhoz és kognitív funkciókhoz. Mindkét fehérje gátlása rövidebb várható élettartamot és rosszabb mászási képességet okozott. A Western-blot eredmények az Arl8 RNSi mintában autofágia gátlást jeleznek, mivel a Ref(2)P/p62 szintje megnövekedett. A-A' kis G fehérje gátlás hatása az élettartamra, A: Kaplan-Meier élethossz görbék, A' állatok átlagos túlélése napokban, B: aktiváció hatása a mozgási képességre, rövidtávú mászás eredmények bemutatása, de azonos tendencia volt megfigyelhető hosszútávon is, C: Western-blot eredmények eltérő életkorban. A blot képétől balra a használt ellenanyagok, jobbra pedig a jelölt fehérjék mérete látható. A szinkódolás a különböző használt törzseket jelöli. Az oszlopdiagramon a hibasáv a standard szórás. A csillag a szignifikanciát és annak megbízhatósági fokát jelenti: $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***.

A mikroszkópos vizsgálatokhoz a Rab7 és az Arl8 RNSi állatokat a DdcGal4, mCherry-Atg8a törzzsel kereszteztem össze. A mikroszkópos felvételeken a piros színű, mCherry-Atg8a pozitív struktúrák az autofág struktúrákat jelölik (7. ábra/A). Az Arl8 csendesítésének hatására az autofág vezikulumok mennyisége szignifikánsan megemelkedett az mindkét kontrollhoz képest (7. ábra/A'). A Rab7 RNSi esetében is növekedés figyelhető meg, de ez csak a w kontrollhoz képest volt szignifikáns.



7. ábra Az *Arl8* RNSi hatására szignifikánsan növekedett az *mCherry-Atg8a*-val jelölt autofág vezikulumok mennyisége. A: fluoreszcens mikroszkópos képek *Drosophila* felnőtt agyáról, A': *mCherry-Atg8a* pozitív struktúrák mennyisége oszlopdiagramon ábrázolva. A színek a különböző használt törzseket jelöli. Az oszlopdiagramon a hibaszáv a standard szórás. A csillag a szignifikanciát és annak megbízhatósági fokát jelenti: $p < 0,01$: **.

Az RNS interferencia csendesítést anti-ubikvitin jelöléssel is tanulmányoztam. Az ubikvitinált fehérje aggregátumok és organellek autofágiával bomlanak le, így a mikroszkóposan megfigyelhető pontszerű ubikvitin struktúrák mennyisége az autofágia hatékonyságával arányos (Yao, 2010). A *Rab7* és az *Arl8* RNSi törzseknél az ubikvitin struktúrák mennyiségének növekedését tapasztaltam, ami az savas lebontás csökkent aktivitását jelzi (8. ábra/A'). Az eredmények megerősítik a Western-bloton tapasztaltakat, ami szintén az *Arl8* RNSi esetében autofágia gátlást mutatott.



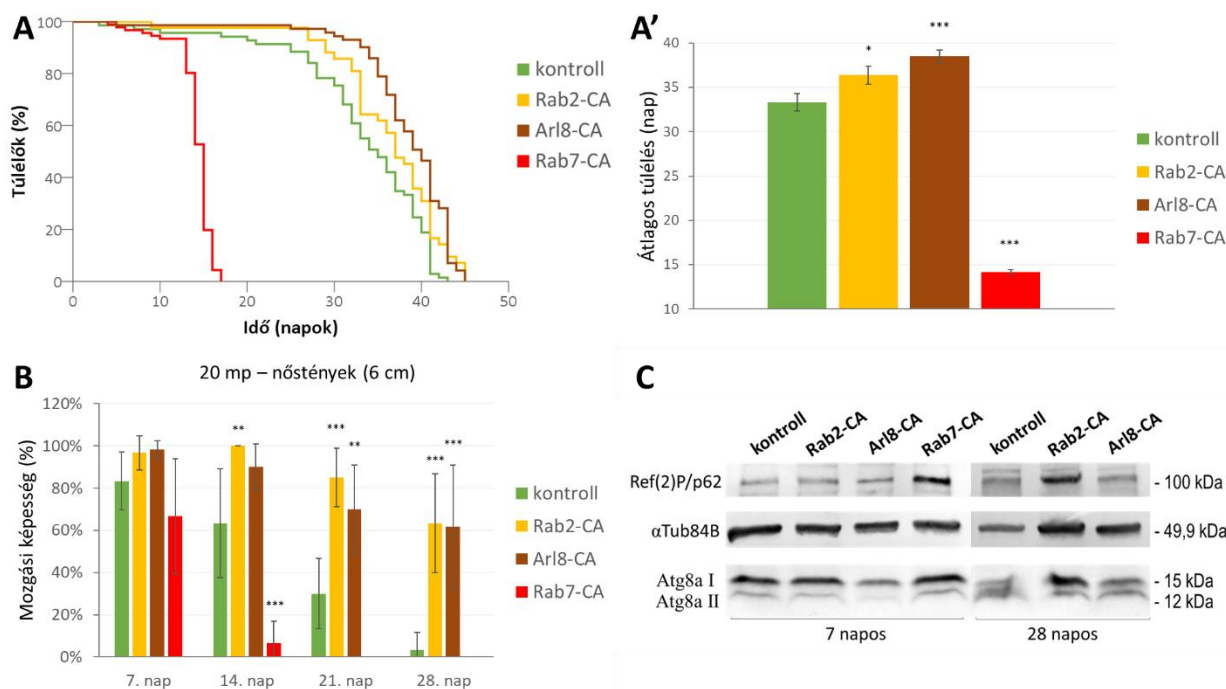
8. ábra: *A Rab7 és az Arl8 RNSi is gátolja az ubikvitin struktúrák lebontását. Az Arl8 gátlása szignifikánsan növelte az ubikvitinált aggregátumok mennyiségét. A: fluoreszcens mikroszkópos képek Drosophila felnőtt agyáról, A': ubikvitin struktúrák mennyisége oszlopdiagramon ábrázolva. A színek a különböző használt törzseket jelölik. Az oszlopdiagramon a hibaszál a standard szórás. A csillag a szignifikanciát és annak megbízhatósági fokát jelenti: $p < 0,01$; **.*

A Rab7-CA rontja, míg az Arl8-CA javítja a túlélési időt és a mászási képességet

A csendesítés mellett vizsgáltam az aktív fehérjeformák idegrendszeri expressziójának hatását is. Ehhez a kis G fehérjék konstitutíván aktív (CA) formáját használtam, aminek a működési mechanizmusa, hogy egy aminosav csere következtében a fehérje mindig GTP kötött, aktív állapotban van (Zhang és mtsai., 2007). A vizsgált állatokban a fehérjék aktivált formája kizárólag a DdcGal4-et kifejező sejtekben volt jelen. Megvizsgáltam hogyan hat a Rab2-, a Rab7- és az Arl8-CA kifejeződése az állatok túlélési- és mászáskéességére, illetve az autofágiára.

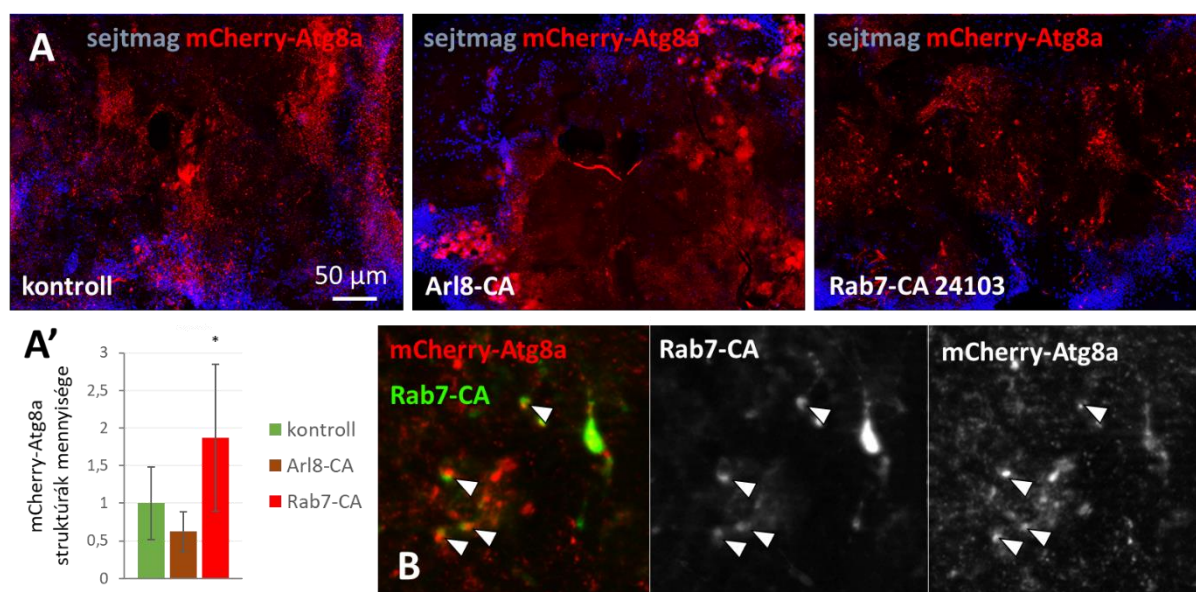
Az élethossz mérés során a Rab2-CA és az Arl8-CA egyaránt szignifikánsan növelte az állatok átlagos túlélését, viszont az Arl8-CA nagyobb mértékben növelte az élethosszt, mint a Rab2-CA (9. ábra/A-A'). A mászás teszt eredményei szerint a Rab2-CA és az Arl8-CA is javította az állatok rövid és hosszútávú mászáskéességét is a kontrollhoz képest (9. ábra/B). A Rab7-CA jelentősen rontotta a mozgási képességet (9. ábra/B), illetve szignifikánsan csökkentette az állatok élettartamát is: 16 napos életkort megelőzően az összes állat elpusztult

(9. ábra/A-A'). Western-blot mérést is végeztem, ahol a 7 napos állatokból származó fehérjék esetében a Rab7-CA mintákban jelentősen felhalmozódott a Ref(2)P/p62 autofág szubsztrát mennyisége, ami az autofágia gátlását jelzi. 28 napos korban a Rab7-CA állatok vizsgálata már nem volt lehetséges a rövid élettartam miatt. A 28 napos mintákban azt tapasztaltam, hogy az Arl8 aktivációjakor a Ref(2)P/p62 mennyisége csökkent, ami autofágia aktivációra utal (9. ábra/C).



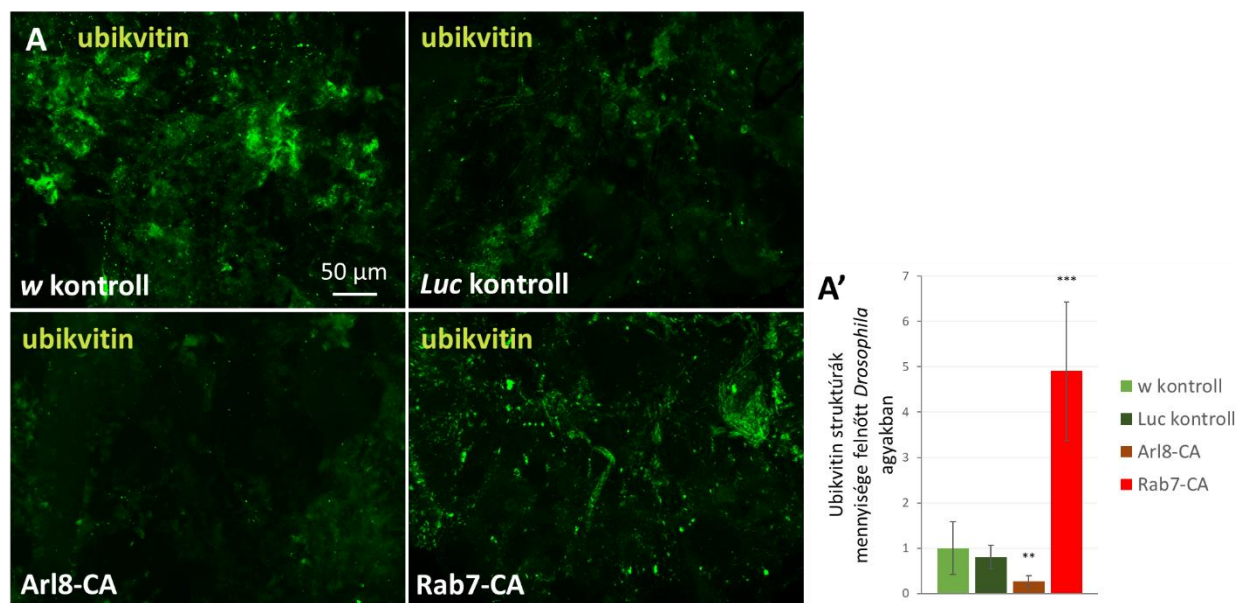
96. ábra: Az Arl8 aktivációja növelte az élettartamot, javította a mászásképeséget és autofágiát aktivált 28 napos korban. A Rab7-CA hatására csökkent a várható élettartam, romlott a mozgási képesség és gátlódott a savas lebontás. A-A' egyszeres kis G fehérje aktiváció hatása az élettartamra, A: Kaplan-Meier élethossz görbék, A' állatok átlagos túlélése napokban, B: aktiváció hatása a mozgási képességre, rövidtávú mászás eredmények bemutatása, de azonos tendencia volt megfigyelhető hosszútávon is, C: Western-blot eredmények eltérő életkorban. A blot képétől balra a használt ellenanyagok, jobbra pedig a jelölt fehérjék mérete látható. A színek a különböző használt törzseket jelölik. Az oszlopdiagramon a hibasáv a standard szórás. A csillag a szignifikanciát és annak megbízhatósági fokát jelenti: $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***.

Az mCherry-Atg8a pozitív autofág struktúrák mennyiségét is vizsgáltam mikroszkóppal, ami a Rab7-CA esetében megnőtt, míg az Arl8-CA esetében csökkent (10. ábra/A'). A Rab7-CA autofág struktúrák felhalmozódását eredményezhette, míg az Arl8-CA állatokban a 7 napig tartó hatékony lebontás okozhatta a kevesebb mCherry-Atg8a-pozitív vezikulumot. A Rab7-CA konstrukció egy YFP fúziós fehérjét kódol. Ez lehetővé tette, hogy mikroszkópos felvételen a zöld jelet is detektáljam, ami a Rab7 helyét mutatja. A szakirodalom alapján a Rab7 megtalálható az autofagoszómák és késői endoszómák felszínén is (Dinter és mtsai., [2016](#)). A felvételek alapján a piros és zöld jel nem mindenhol kolokalizált (10. ábra/B). Feltételezhetően itt az endoszomális eredetű vezikulumok fúziója (késői endoszóma-autofagoszóma vagy az endoszóma-autolizoszóma) sérül. Az endoszómák fúziójának hibája az axon transzportot is negatívan befolyásolja, ami esszenciális a neuronok túlélésében és működésében (Tammineni és mtsai., [2017](#)).



70. ábra: Az Arl8 és Rab7 fehérjék idegrendszeri aktiválása ellentétes hatású lehet az autofágia szabályozásában. A Rab7 aktiválása hatására szignifikánsan megemelkedett az autofág struktúrák mennyisége. Az mCherry-Atg8a és Rab7 jel kolokalizációjának hiánya arra utal, hogy sérült az endoszomális eredetű vezikulák fúziója, ami az axonális transzport károsodását okozza a neuronokban. A: felnőtt *Drosophila* agyak mikroszkópos képe, A': az mCherry-Atg8a pozitív struktúrák mennyisége. B: Az mCherry-Atg8a, Rab7-CA agyáról készült képeken megfigyelhető nem kolokalizáló piros és zöld struktúrák nyilakkal jelölve. A szinkódolás a különböző használt törzseket jelöli. Az oszlopdiagramon a hibasáv a standard szórás. A csillag a szignifikanciát és annak megbízhatósági fokát jelenti: $p < 0,05$: *.

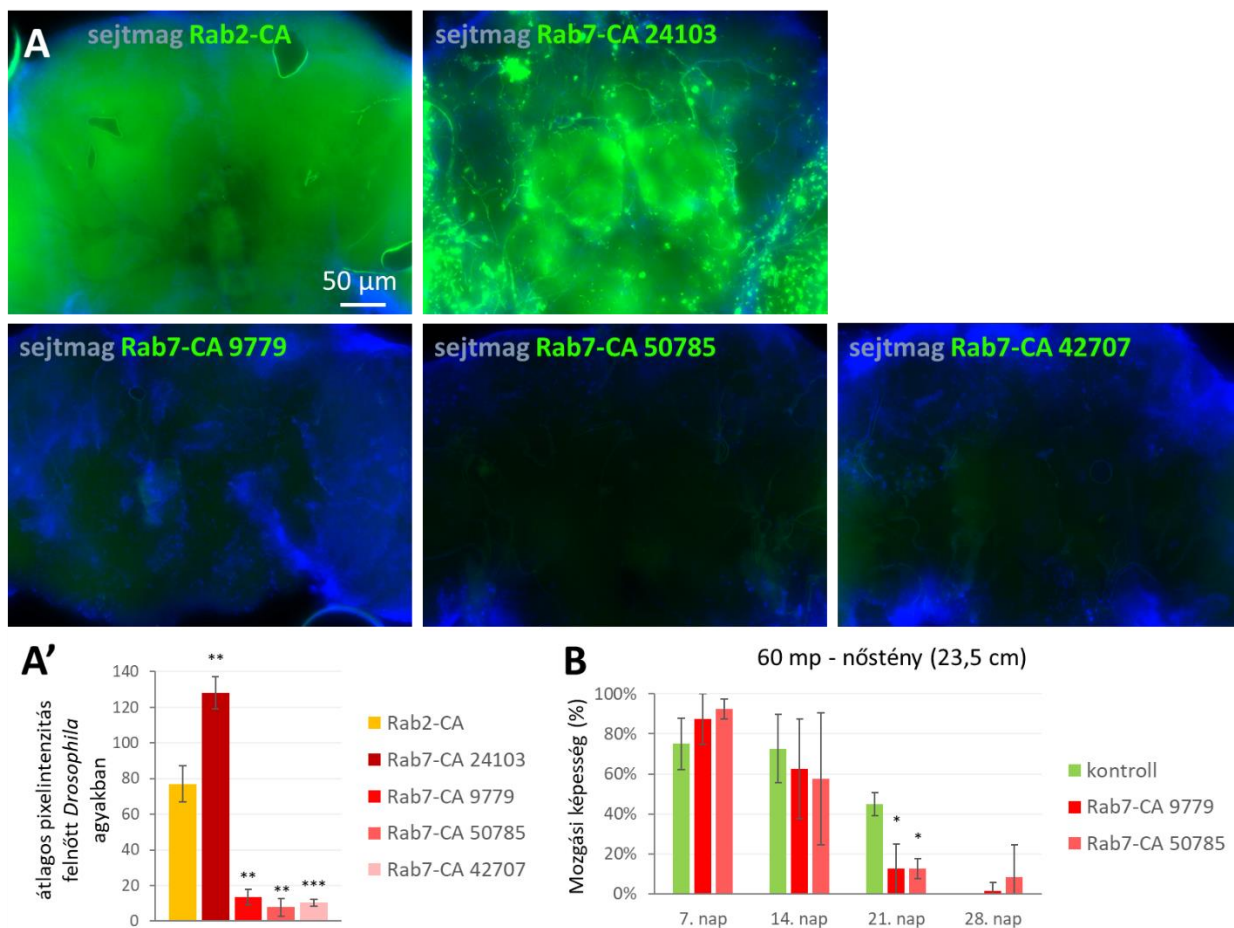
Ezt követően anti-ubikvitinnel végeztem immunhisztokémiai jelölést (11. ábra/A), melynek eredménye alapján látható, hogy a Rab7-CA-ban szignifikánsan nőtt, míg az Arl8-CA-ban szignifikánsan csökkent az ubikvitin pozitív aggregátumok mennyisége (11. ábra/A'). A Rab7-CA tehát csökkentette, míg az Arl8-CA növelte az autofágia hatékonyságát. Ez az eredmény megegyezik a Western-blottal tapasztaltakkal.



81. ábra: Az Arl8-CA csökkentette, a Rab7-CA növelte az ubikvitin struktúrák mennyiségét a *Drosophila* agyban. A: fluoreszcens mikroszkópos képek felnőtt *Drosophila* agyokról, A': ubikvitin struktúrák mennyisége oszlopdiagramon ábrázolva. A színek a különböző használt törzseket jelölik. Az oszlopdiagramon a hibaszál a standard szórás. A csillag a szignifikanciát és annak megbízhatósági fokát jelenti: $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***.

A Rab7-CA (24103) forma idegrendszeri kifejezése jelentősen rontotta az állatok mászásképpességét és csökkentette az élethosszt. A Rab2-CA és Rab7-CA konstrukciók is YFP transzgénnel jelöltek, így összehasonlítottam kifejeződésüket fluoreszcens mikroszkóppal. Eredményeim szerint a Rab7-CA nagyobb mennyiségben expresszálódik, mint a Rab2-CA (12. ábra/A-A'). Szerettem volna eldönteni, hogy a Rab7 aktivációjának van káros hatása az idegrendszerben, vagy a fehérje túlzott expressziója toxikus az állatokra. Ennek a kiderítésére megvizsgáltam további három Rab7-CA konstrukció (9779, 42707 és 50785) kifejeződését (azonos DdcGal4-gyel) (12. ábra/A). Az újonnan tesztelt Rab7-CA formák szignifikánsan gyengébben expresszálódnak, mint a korábbi Rab7-CA (24103) és Rab2-CA konstrukciók (12.

ábra/A'). Megismételttem a mászás tesztet a Rab7-CA-t gyengébben kifejező (9779 és 50785) állatokkal, amely alapján elmondható, hogy a mászásképeség romlott a kontrollhoz képest mindkét esetben (12. ábra/B). Tehát a Rab7 aktiválása alacsonyabb génexpresszió mellett is mozgásképeség romláshoz vezetett.

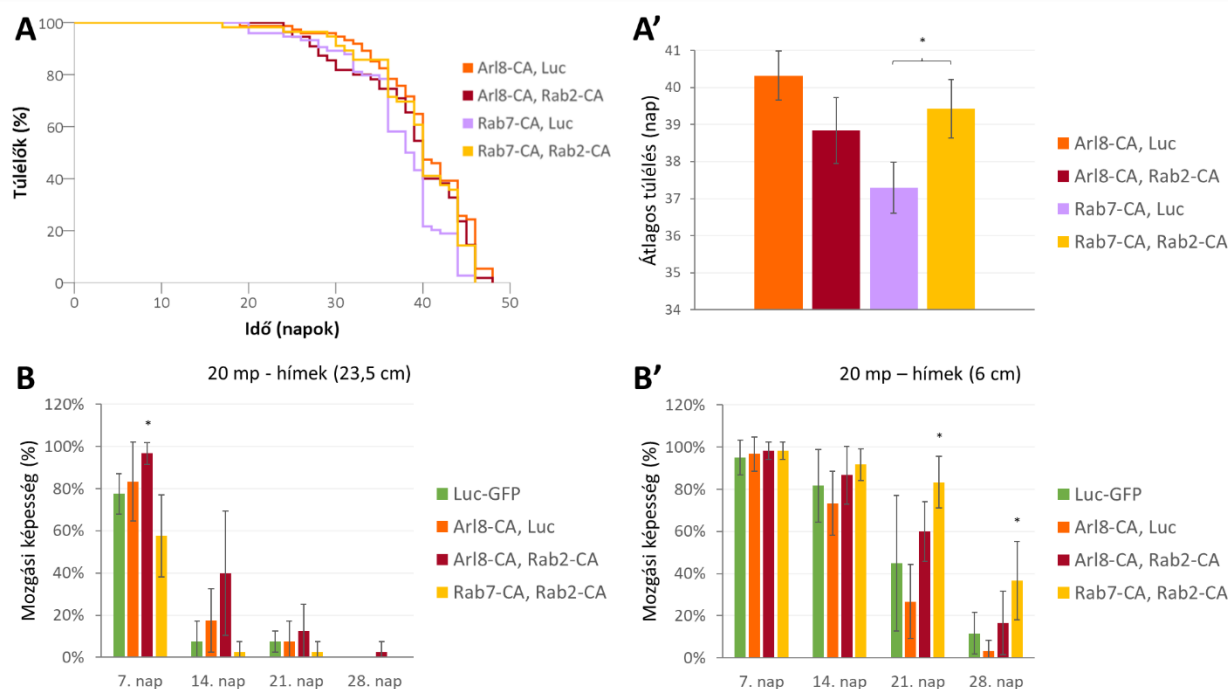


92. ábra: A különféle genomi pozíciójú Rab7-CA konstrukciók expressziója agyban. A Rab2-CA-hoz viszonyítva a Rab7-CA 24103 (ezzel végeztük az aktivációs vizsgálatokat a 10. 11. és 12. ábrán láthatók az eredmények) nagyobb mennyiségben expresszálódik. A három újonnan vizsgált konstrukció: Rab7-CA 9779, 42707 és 50785 viszont sokkal gyengébb expressziós szintet mutat a Rab2-CA-hoz képest. A mászás teszt kimutatta, hogy a gyengébben kifejeződő Rab7 aktivációs konstrukciók hatására is romlik a mozgási képesség. A: fluoreszcens mikroszkópos képek felnőtt *Drosophila* agyokról, A': a mikroszkópos képeken mérhető átlagos pixelintenzitás (zöld), B: mozgási képesség eltérő életkorban, százalékban kifejezve. A szinkódolás a különböző használt törzseket jelöli. Az oszlopdiagramon a hibasáv a standard szórás. A csillag a szignifikanciát és annak megbízhatósági fokát jelenti: $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***.

A kis GTPázok együttes aktivációja tovább javíthatja az állatok mozgáskéességét

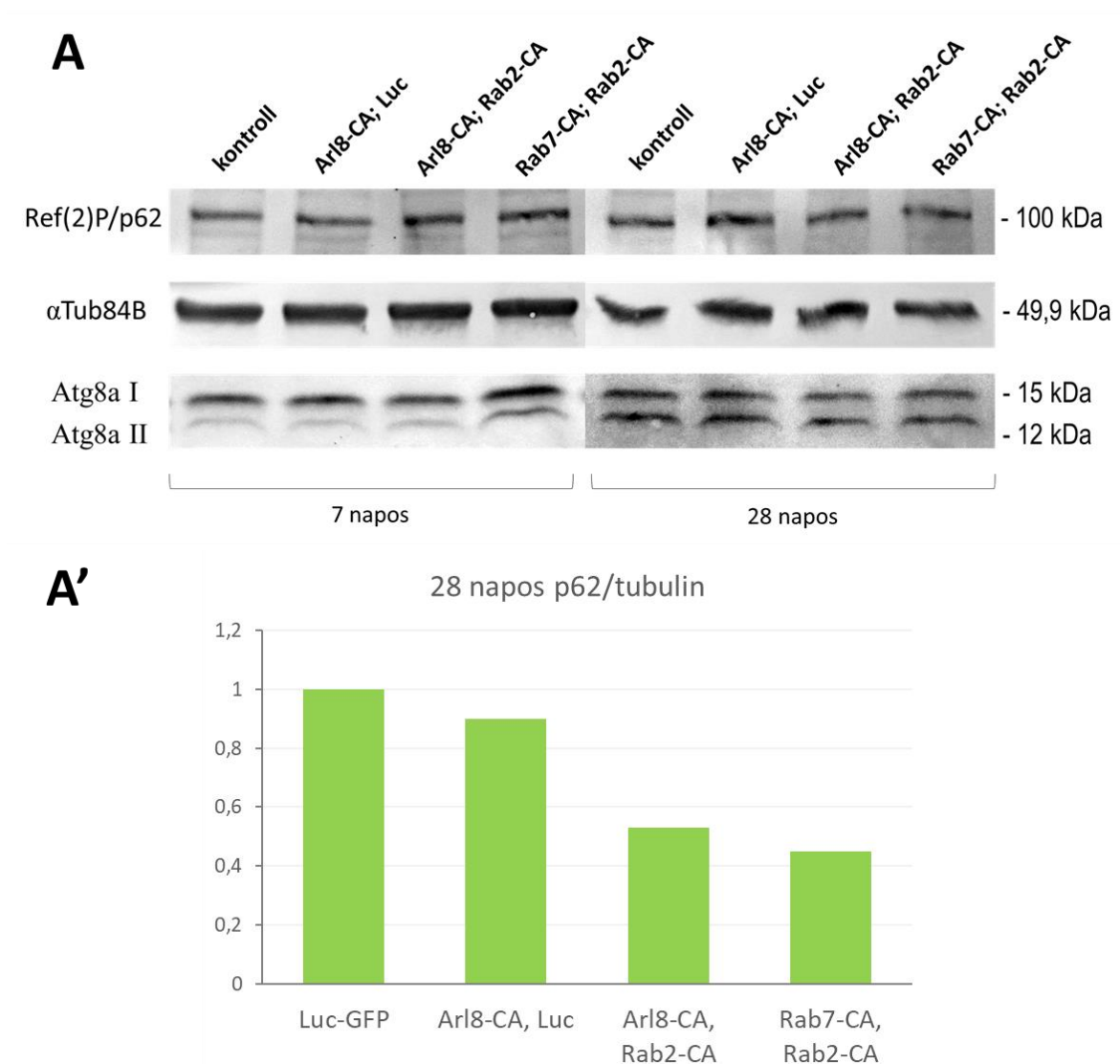
A továbbiakban érdekesnek találtam megvizsgálni, hogy milyen hatást okoz az állatokban, ha egyszerre aktiválok különböző kis G fehérjéket. A kettős aktivációk esetében a képződő Gal4 fehérje két UAS szekvencia között fog megoszlani, tehát az egyes fehérjék átíródása feltehetően kisebb mértékű lesz az egyszeres aktiválásukhoz képest, ezért a kettős aktivációs törzsek (pl.: UAS-Arl8-CA, UAS-Rab2-CA) mellé olyan kontrollokat választottam, ahol szintén kettő UAS transzgen között oszlik meg a Gal4 mennyisége (pl: UAS-Luc; UAS-GFP, UAS-Arl8-CA; UAS-Luc). A Rab7 aktivációja (UAS-Rab7-CA; UAS-Luc) ez esetben is csökkentette az állatok élettartamát, de a transzgen vélt alacsonyabb kifejeződése kevésbé volt toxikus az állatokra. A Rab2 – Rab7 kettős aktivációjú állatok tovább éltek a Rab7-CA, Luc kontrollnál, ami feltehetően annak köszönhető, hogy a Rab2-CA önmagában is pozitív hatással van az állatokra, ami „elnyomhatja” a Rab7 potenciális negatív hatását. Az Arl8-CA, Luc törzshöz képest, nem tapasztaltam hosszabb élettartamot, az Arl8-CA, Rab2-CA törzsben (14. ábra/A’).

A korábbi mérésektől eltérően a hím állatok mászási eredményeit mutatom be, mert csak itt tapasztaltam szignifikáns eltéréseket a mászásképeségek között (a hímekben gyakorta magasabb a transzgenek kifejeződésének mértéke, feltehetően csak itt volt elégséges a transzgenek expressziója). Az Arl8-CA, Rab2-CA transzgeneket együtt kifejező állatok mutatták a legjobb eredményt hosszútávon (13. ábra/B). Az egyszeres aktivációs eredményekben azt tapasztaltam, hogy a Rab2-CA önmagában pozitív hatású, míg a Rab7-CA negatív hatású, hosszú- és rövidtávon is. Ezzel szemben a Rab7-CA, Rab2-CA rövidtávú mászásképesége meghaladta a kontroll értékeit, kifejezetten idősebb korban (13. ábra/B’).



13. ábra: A Rab7-CA, Rab2-CA együttes aktivációja növelte az élettartamot a Rab7-CA, Luc törzshöz képest. Az Arl8-CA, Rab2-CA nem javította a túlélési időt (A'), de a hosszútávú mászásképeségre pozitív hatása volt (B). A-A' kétszeres kis G fehérje aktiváció hatása az élettartamra, A: Kaplan-Meier élethossz görbék, A' állatok átlagos túlélése napokban, B-B' aktiváció hatása a mozgási képességre, B: hosszútávú mászás, B': rövidtávú mászás eredmények. A szinkódolás a különböző használt törzseket jelöli. Az oszlopdiagramon a hibasáv a standard szórás. A csillag a szignifikanciát és annak megbízhatósági fokát jelenti: $p < 0,05$: *.

A 7 napos állatok fejéből izolált fehérjeminták alapján elmondható, hogy az Arl8-CA, Rab2-CA együttes kifejezése a Ref(2)P/p62 szintjének csökkenését eredményezte, ami az autofágia aktiválását jelzi. A 28 napos fehérjeminta esetében Az Arl8-CA, Rab2-CA és a Rab7-CA, Rab2-CA esetében is a Ref(2)P/p62 mennyiségének a csökkenését tapasztaltam az azonos korú kontrollhoz viszonyítva (14. ábra/A'). Az élethossz és a mozgási tesztek esetén nem volt lehetőségünk mindkét esetben az összes genotípus használatára, ezért a jövőben érdemesnek tartom a kísérletek megismétlését, a fejezetben szereplő valamennyi genotípus bevonásával.



104. ábra: Western-blot eredmények szerint az Arl8-CA, Rab2-CA fiatal és idős állatokban is aktiválta az autofágiát, mivel megemelkedett a Ref(2)P/p62 mennyisége. A nitrocellulóz membránról készített fotó alapján a változás nem tisztán kivehető, mivel a tubulin mennyisége nem azonos az eltérő mintákban. Az eredményeim alátámasztása érdekében oszlopdiagramon mutatom a tubulinnal normalizált Ref(2)P/p62 változást a 28 napos mintákban, ami a fehérje mennyiségének csökkenését mutatja. A blot képétől balra a használt ellenanyagok, jobbra pedig a jelölt fehérjék mérete látható.

Következtetés

Összefoglalásul elmondható, hogy a Rab7 és az Arl8 is szükséges a normális élethossz és mászáskéesség biztosításához és hiányukban az autofágia gátlása figyelhető meg. Bár a qPCR eredmény nem mutatott jelentős változást az RNSi törzsekben mért mRNS mennyiségben, de a Western-blot megerősítette a fehérjék szintjén történt mennyiségbeli csökkenést. Emellett a vizsgálataim során is jelentős fenotipikus hatást láttam az RNSi konstrukciók használatakor, ezért arra következtettem, hogy a csendesítés transzlációs gátlásként fejt ki a hatását. Az *Arl8* RNSi jelentősebb hatást okozott, viszont ez nem feltétlenül az *Arl8* fontosságára utal, hanem hogy az RNSi konstrukciók közül ez okozott jelentősebb csendesítést. A kis GTPázok aktivációjánál eltérő hatást tapasztaltam az *Arl8* és a Rab7 esetében. Az *Arl8* aktivációja képes volt megnövelni az állatok élettartamát, javítani a mászáskéességet és autofágiát aktivált idegrendszerben, míg a Rab7-CA jelentősen csökkentette a várható élettartamot, szignifikánsan rontotta az élettartamot és gátolta a savas lebontást. A kis G fehérjék együttes aktivációja tovább javította az állatok mozgási képességét és kis mértékben serkentette az autofágiát is. Az eredményeimet a jövőben érdemes ultrastrukturális vizsgálatokkal is kiegészíteni.

A Rab2 aktivációja pozitívan, míg a Rab7 negatívan befolyásolta a mászáskéességet. Ezen két kis GTPáz együttes aktivációjakor rövidtávon javult az állatok mozgási képessége, míg hosszútávon javulást nem figyeltem meg (13. ábra). A pozitív hatást valószínűleg azért csak rövidtávon tapasztaltam, mert a Rab7 hosszútávon jelentősebb mértékben fejtette ki negatív hatását. A szerotonerg és dopaminerg neuronok részben átfednek a memóriával kapcsolatos agyterületekkel, például a gombatest is tartalmaz dopaminerg neuronokat és ismert róla, hogy jelentős szerepe van tanulásban és memóriában (Aso és mtsai., [2014](#)), így a Rab7 aktivációja által okozott axonális transzport sérülése ronthatja az állatok memóriáját, tehát a hosszútávú mászás romlását okozza, ami az inger megtartó képességet jellemzi.

Az *Arl8* RNSi esetében a Western-blot eredményen azt tapasztaltam, hogy az *Atg8a* szolubilis forma mennyisége megemelkedett mindkét vizsgált életkorban (6. ábra). Ez utalhat arra, hogy a gátlódott lebontás miatt egy kompenzációs mechanizmusként a sejt megnöveli az *Atg8a* átíródását, vagy a fehérje nem képes hatékonyan beépülni az autofág struktúrák membránjába. Ennek eldöntésére további kísérletet terveznék, ahol kvantitatív PCR segítségével vizsgálnám az *Atg8a* mRNS szintjének változását az *Arl8* csendesített állatokban.

Megállapítható, hogy a Rab2 és az *Arl8* aktivációja is pozitív hatású és ígéretes autofágia aktivációs célpontok lehetnek és általuk az élettartam megnövelhetővé válhat. A Rab7

aktivációja kerülendő a negatív hatásai miatt. Ezen eredmények fontosak olyan jövőbeli kísérletekben, amik az autofágia aktiválását célozzák meg. Ez olyan neurodegeneratív betegségek kezelésében hozhat áttörést, ahol a betegség kiváltó oka egy toxikus citoplazmatikus fehérje felhalmozódása és ezek hatékonyabb lebontásával lehet javulást elérni. Ilyen betegség az Alzheimer-kór (felhalmozódott β -amiloid és tau fehérje), Parkinson kór (α -szinuklein) és egyéb taupátiák. Gyógyszerfejlesztés szempontjából a kis GTPáz fehérjék aktivációja például úgy érhető el, ha gátoljuk a GAP enzimeket, amik a GTP hidrolíziséért felelősek, tehát inaktíválják a kis G fehérjéket. Az jelenleg még nem ismert, hogy melyik GAP enzimek lehetnek specifikusak az általam vizsgált kis GTPáz fehérjékre. Ha találunk olyan GAP enzimeket, ami képes célzottan a Rab2 vagy az Arl8 fehérjéket inaktíválni, akkor ez ideális célfehérje lenne, amit gyógyszerjelölt molekulákkal gátolhatunk. Összegezve, a cél a negatív szabályozók gátlásán keresztüli aktiváció. A Rab7-tel kapcsolatos eredmények alapján elmondható, hogy a Rab7-re specifikus GAP-ok gátlása kerülendő a lehetséges negatív hatásai miatt.

A dolgozatban a kis GTPáz-okat mint autofágia szabályozó fehérjéket vizsgáltam, azonban fontos megemlíteni, hogy ezen fehérjék rendelkeznek a savas lebontástól független funkcióval is. Az Arl8 szerepet játszik a mikrotubulus és vezikula szállítás irányításában. Emellett elősegíti a preszinaptikus cargo fehérjék axonális transzportját és ezzel megelőzi az idő előtti aggregálódásukat (Donaldson és Jackson, [2011](#)). A Rab2 egy Golgi rezidens fehérje, melynek szerepe van az ER és Golgi közötti szállító folyamatokban mindkét irányban. A preszinaptikus prekurzorok, melyek a neuronok szómájában képződnek a transz-Golgi hálózattól a Rab2 közreműködésével jutnak a szinapszisokhoz. Ez a folyamat nélkülözhetetlen a szinapszisok képzéséhez és neurotranszmisszióhoz. Azt is kimutatták, hogy a preszinaptikus prekurzorok biogenezisében a Rab2 upstream hat az Arl8-hoz képest (Götz és mtsai., [2021](#)). A Rab7 részt vesz tumor progresszióban: ez lehet egyaránt onkogén vagy tumor szuppresszor szerep, ezt a környezeti faktorok határozzák meg. Fontos szerepet játszik a ciszplastin kemoterápiás szer elleni kemorezisztenciában, mivel befolyásolja a késői endoszómális útvonalat és lizoszóma biogenezist. Ezen fontos szerepei miatt rákos terápiák kidolgozásához jó célpont lehet (Guerra és Bucci, [2019](#)).

Összefoglaló

Az autofágia egy lizoszomális degradációs útvonal az eukarióta sejtekben, ami sérült organellek, toxikus fehérjék lebontásáért és a sejtes homeosztázis fenntartásáért felelős. Szerepe létfontosságú a posztmitotikus szövetekben, mint az idegrendszerben, ahol az elpusztult neuronok pótlása nem lehetséges, így autofágia által kell megakadályozni a toxikus fehérjeformák képződését. Az autofágia hatékonysága a kor előrehaladtával csökken, ami előidézheti neurodegeneratív betegségek megjelenését. Ezek kezelésére ígéretes módszer lehet az autofágia aktiválása.

Makroautofágia során létrejön egy citoplazma komponenseket tartalmazó, kettős membránnal rendelkező autofagoszóma, ami fuzionálhat késői endoszómával vagy lizoszómával. A fúziós lépések szabályozásában számos kis G fehérje vesz részt, mint a Rab2, Rab7 és Arl8, de ezek eltérnek egymástól lokalizációban és funkcióban, illetve különböző fúziós eseményeket irányítanak.

Korábbi eredményeink szerint a Rab2 konstitutívan aktív, GTP-kötött (Rab2-CA) formájának idegrendszeri kifejeződése növeli az élettartamot és javítja a mászásképpességet. Jelen kutatás kimutatta, hogy a *Rab7* és az *Arl8* gátlása negatív hatással van az állatok mozgási és túlélési képességére és gátolja az autofágiát. Az Arl8 folytonosan GTP kötött formája (Arl8-CA) pozitívan, viszont a Rab7 aktiválás (Rab7-CA) negatívan befolyásolja az élettartamot és a kognitív képességet. A Rab7 aktiválása hatására az axonális transzport sérülését feltételezem. A kis G fehérjék kettős aktiválása javítja a mászást és serkenti az autofágiát.

Megállapíthatjuk, hogy mindhárom kis G fehérje szükséges a normál élettartamhoz, fittséghez és a megfelelő autofágiához, de aktiválásuk hatása eltérő. Autofágiát aktiváló gyógyszermolekulák tervezésekor a kis G fehérjék ígéretes új célpontok lehetnek, de a hatóanyagok specifikusságának ismerete kiemelt jelentőségű a lehetséges negatív hatások elkerülése érdekében.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek dr. Kovács Tibornak a szakmai segítséget, útmutatást és hogy mellette elsajátíthattam a kutatásomhoz szükséges kísérleti technikákat. Köszönöm a ELTE Genetikai Tanárszéknek a lehetőséget, hogy itt végezhettem kutatásomat.

Hivatkozások

Alic Nazif és mtsai (2012): **Detrimental Effects of RNAi: A Cautionary Note on Its Use in Drosophila Ageing Studies.** *PLoS ONE*. 7, 9.: 1–5. ISSN: 19326203

Aso Yoshinori és mtsai (2014): **The neuronal architecture of the mushroom body provides a logic for associative learning.** *ELife*. 3. e04577. ISSN: 2050084X

Bernards Andre és Settleman Jeffrey (2004): **GAP control: Regulating the regulators of small GTPases.** *Trends in Cell Biology*. 14, 7.: 377–385. ISSN: 09628924

Billes Viktor és mtsai (2016): **AUTEN-67 (Autophagy Enhancer-67) Hampers the Progression of Neurodegenerative Symptoms in a Drosophila model of Huntington's Disease.** *Journal of Huntington's Disease*. 5, 2.: 133–147. ISSN: 18796400

Boda Attila és mtsai (2019): **Drosophila Arl8 is a general positive regulator of lysosomal fusion events.** *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 1866, 4.: 533–544. ISSN: 18792596

Damme Markus és mtsai (2015): **Autophagy in neuronal cells: general principles and physiological and pathological functions.** *Acta Neuropathologica*. 129, 3.: 337–362. ISSN: 14320533

Dinter Elisabeth és mtsai (2016): **Rab7 induces clearance of α -synuclein aggregates.** *Journal of Neurochemistry*. 758–774. ISSN: 14714159

Donaldson Julie G. és Jackson Catherine L. (2011): **ARF family G proteins and their regulators: Roles in membrane transport, development and disease.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 12, 6.: 362–375. ISSN: 14710072

Feng Yuchen és mtsai (2014): **The machinery of macroautophagy.** *Cell Research*. 24, 1.: 24–41. ISSN: 10010602

Florence H. és mtsai (2017): **Drosophila melanogaster : Deciphering Alzheimer's Disease.**

The Malaysian Journal of Medical Sciences. 23, 6:.. 6–20

Frentzel Julie és mtsai (2017): **Targeting autophagy in ALK-associated cancers.** *Cancers.* 9, 12:.. 7–9. ISSN: 20726694

Fujita Naonobu és mtsai (2017): **Genetic screen in drosophila muscle identifies autophagy-mediated T-tubule remodeling and a Rab2 role in autophagy.** *ELife.* 6. 1–30. ISSN: 2050084X

Gillingham Alison K. és mtsai (2014): **Toward a Comprehensive Map of the Effectors of Rab GTPases.** *Developmental Cell.* 31, 3:.. 358. ISSN: 18781551

Götz Torsten W. B. és mtsai (2021): **Rab2 regulates presynaptic precursor vesicle biogenesis at the trans-golgi.** *Journal of Cell Biology.* 220, 5:.. ISSN: 15408140

Guerra Flora és Bucci Cecilia (2016): **Multiple Roles of the Small GTPase Rab7.** *Cells.* 5, 3:.. 34. ISSN: 2073-4409

Guerra Flora és Bucci Cecilia (2019): **Role of the RAB7 protein in tumor progression and cisplatin chemoresistance.** *Cancers.* 11, 8:.. ISSN: 20726694

Hindle Samantha J. és Bainton Roland J. (2014): **Barrier mechanisms in the Drosophila blood-brain barrier.** *Frontiers in Neuroscience.* 8, DEC: 1–12. ISSN: 1662453X

Khatter Divya és mtsai (2015): **Arf-like GTPase Arl8: Moving from the periphery to the center of lysosomal biology.** *Cellular Logistics.* 5, 3:.. ISSN: 21592799

Kovács Tibor és mtsai (2017): **The small molecule AUTEN-99 (autophagy enhancer-99) prevents the progression of neurodegenerative symptoms.** *Scientific Reports.* 7, February: 1–17. ISSN: 20452322

Kovács Tibor és mtsai (2021): **A Conserved MTMR Lipid Phosphatase Increasingly Suppresses Autophagy in Brain Neurons During Aging.** *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS.* 1–33. ISBN: 0692420401

Kulkarni Aditi és mtsai (2018): **Neuronal autophagy and intercellular regulation of homeostasis in the brain.** *Current Opinion in Neurobiology.* 51. 29–36. ISSN: 18736882

Li H. és mtsai (2000): **Ectopic g-protein expression in dopamine and serotonin neurons blocks cocaine sensitization in Drosophila melanogaster.** *Current Biology.* 10, 4:.. 211–214. ISSN: 09609822

- Lőrincz Péter és Juhász Gábor (2020): **Autophagosome-Lysosome Fusion**. *Journal of Molecular Biology*. 432, 8.: 2462–2482. ISSN: 10898638
- Lőrincz Péter, Mauvezin Caroline és Juhász Gábor (2017): **Exploring Autophagy in Drosophila**. *Cells*. 6, 3.: 22. ISSN: 2073-4409
- Lőrincz Péter és mtsai (2017): **Rab2 promotes autophagic and endocytic lysosomal degradation**. *Journal of Cell Biology*. 216, 7.: 1937–1947. ISSN: 15408140
- Lund Viktor Karlovich és mtsai (2018): **Drosophila Rab2 controls endosome-lysosome fusion and LAMP delivery to late endosomes**. *Autophagy*. 14, 9.: 1520–1542. ISSN: 15548635
- Maruzs Tamás és mtsai (2019): **On the fly: Recent progress on autophagy and aging in Drosophila**. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 7, JULY: 1–15. ISSN: 2296634X
- McPhee Christina K. és Baehrecke Eric H. (2009): **Autophagy in Drosophila melanogaster**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1793, 9.: 1452–1460. ISBN: 6176321972. ISSN: 15378276
- Mizushima Noboru és Yoshimori Tamotsu (2007): **How to interpret LC3 immunoblotting**. *Autophagy*. 3, 6.: 542–545. ISSN: 15548635
- Moloney Aileen és mtsai (2010): **Alzheimer's disease: Insights from Drosophila melanogaster models**. *Trends in Biochemical Sciences*. 35, 4.: 228–235. ISSN: 09680004
- Nagy Péter és mtsai (2014): **Atg17/FIP200 localizes to perilyosomal Ref(2)P aggregates and promotes autophagy by activation of Atg1 in Drosophila**. *Autophagy*. 10, 3.: 453–467. ISSN: 15548635
- Nagy Péter és mtsai (2015): **How and why to study autophagy in Drosophila: It's more than just a garbage chute**. *Methods*. 75, 2015.: 151–161. ISSN: 10959130
- Nakamura Shuhei és Yoshimori Tamotsu (2017): **New insights into autophagosome-lysosome fusion**. *Journal of Cell Science*. 130, 7.: 1209–1216. ISSN: 14779137
- Nezis Ioannis P. és mtsai (2008): **Ref(2)P, the Drosophila melanogaster homologue of mammalian p62, is required for the formation of protein aggregates in adult brain**. *Journal of Cell Biology*. 180, 6.: 1065–1071. ISSN: 00219525
- Park Hyungsun és mtsai (2020): **Autophagy in neurodegenerative diseases: A hunter for**

aggregates. *International Journal of Molecular Sciences*. 21, 9:. 1–24. ISSN: 14220067

Parzych Katherine R. és Klionsky Daniel J. (2014): **An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation.** *Antioxidants and Redox Signaling*. 20, 3:. 460–473. ISSN: 15230864

Pircs Karolina és mtsai (2012): **Advantages and Limitations of Different p62-Based Assays for Estimating Autophagic Activity in Drosophila.** *PLoS ONE*. 7, 8:. ISSN: 19326203

Prübing Katja és mtsai (2013): **Drosophila melanogaster as a model organism for Alzheimer’s disease.** *Molecular Neurodegeneration*. 8, 1:. ISSN: 17501326

Pyo Jong Ok és mtsai (2012): **Molecules and their functions in autophagy.** *Experimental and Molecular Medicine*. 44, 2:. 73–80. ISSN: 20926413

Rosa-Ferreira Cláudia és mtsai (2018): **The small G protein Arl8 contributes to lysosomal function and long-range axonal transport in Drosophila.** *Biology Open*. 7, 9:. ISSN: 20466390

Simonsen Anne és mtsai (2008): **Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult Drosophila.** *Autophagy*. 4, 2:. 176–184. ISSN: 15548635

Sinka Rita és mtsai (2008): **Golgi coiled-coil proteins contain multiple binding sites for rab family G proteins.** *Journal of Cell Biology*. 183, 4:. 607–615. ISSN: 00219525

Szinyákovics Janka, Kiss Eszter, Keresztes Fanni, Vellai Tibor és Kovács Tibor (2020): **Rab2 is a potent new target for enhancing autophagy in the treatment of Parkinson’s disease.** *BioRxiv*. ISSN: 26928205

Takáts Szabolcs és mtsai (2018): **Small GTPases controlling autophagy-related membrane traffic in yeast and metazoans.** *Small GTPases*. 9, 6:. 465–471. ISSN: 21541256

Takáts Szabolcs és mtsai (2013): **Autophagosomal Syntaxin17-dependent lysosomal degradation maintains neuronal function in Drosophila.** *Journal of Cell Biology*. 201, 4:. 531–539. ISSN: 00219525

Tammineni Prasad és Cai Qian (2017): **Defective retrograde transport impairs autophagic clearance in Alzheimer disease neurons.** *Autophagy*. 13, 5:. 982–984. ISSN: 15548635

Tan Chen Chen és mtsai (2014): **Autophagy in aging and neurodegenerative diseases:**

Implications for pathogenesis and therapy. *Neurobiology of Aging*. 35, 5:. 941–957. ISSN: 01974580

Wong Esther és Cuervo Ana Maria (2010): **Integration of clearance mechanisms: the proteasome and autophagy.** *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2, 12:. 1–19. ISSN: 19430264

Wyers F. és mtsai (1993): **Immunological cross-reactions and interactions between the Drosophila melanogaster ref(2)P protein and sigma rhabdovirus proteins.** *Journal of Virology*. 67, 6:. 3208–3216. ISSN: 0022-538X

Yao Tso-Pang (2010): **The role of ubiquitin in autophagy-dependent protein aggregate processing.** *Genes and Cancer*. 1, 7:. 779–786. ISSN: 19476019

Yu Zhong-Qui és mtsai (2012): **Dual roles of Atg8-PE deconjugation by Atg4 in autophagy.** *Autophagy*. 8, 6:. 883–892

Zhang Jun és mtsai (2007): **Thirty-one flavors of Drosophila Rab proteins.** *Genetics*. 176, 2:. 1307–1322. ISSN: 00166731