

36. OTDK Biológia Szekció

SZEGEDI

TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és

Informatikai Kar

Genetikai Tanszék

SZEGEDI

BIOLÓGIAI

KUTATÓKÖZPONT

Genetikai Intézet

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

**Az axonsérülésre aktiválódó Stat92E
transzkripció faktor kapcsolata az autofágiával
és a veleszületett immunitással *Drosophila*
gliasejtekben**

Vincze Virág

Biológus MSc, II. évfolyam

Témavezető:

Dr. Szabó Áron

tudományos főmunkatárs

Belső konzulens:

Dr. Kozma-Bognár László

egyetemi docens

Szeged

2022. november 14.

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETŐ	3
1.1 Waller-féle degeneráció és az axonsérülés hatására indukálódó folyamatok <i>Drosophila</i> gliasejtekben.....	3
1.2 A Stat92E szignalizációhoz és a Draper upregulációjához vezető aktivációs kaszkádok.....	5
1.3 Autofágia és LC3-asszociált fagocitózis	9
1.4 Szelektív autofágia és immunfolyamatok.....	11
2. CÉLKITŰZÉS	13
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	14
3.1 <i>Drosophila</i> törzsek eredete, fenntartása és keresztezése	14
3.2 Steril <i>Drosophila</i> törzs elkészítése és fenntartása.....	16
3.3 Traumás agysérülés modell (TBI) <i>Drosophila melanogaster</i> ben	16
3.4 SDS-PAGE és Western blot	17
3.5 Statisztikai analízis	18
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	19
4.1 Stat92E kapcsolata a LAP-pal és az autofágiával	19
4.2 Az Imd útvonal kapcsolata a Stat92E-vel és az autofágiával.....	23
4.3 Su(var)2-10 kapcsolata a Stat92E-vel és az autofágiával.....	28
5. DISZKUSSZIÓ.....	33
6. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS	36
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	37
8. IRODALOMJEGYZÉK	37

1. BEVEZETŐ

1.1 Waller-féle degeneráció és az axonsérülés hatására indukálódó folyamatok *Drosophila* gliasejtekben

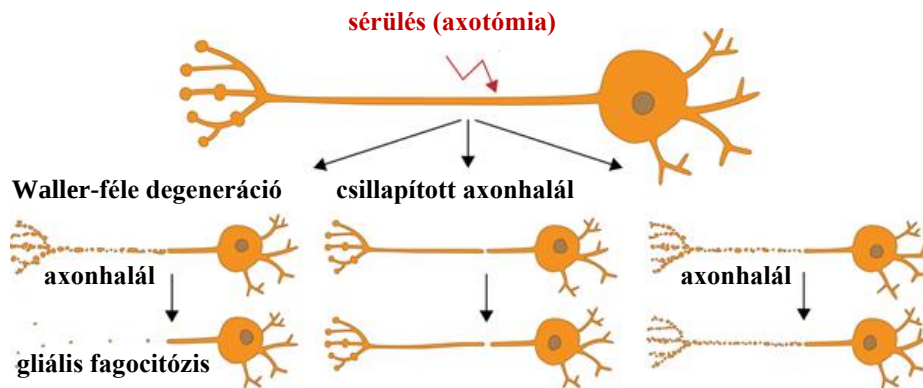
Az idegrendszert két fő sejtípus alkotja, a neuronok és a gliasejtek. A gliasejtek ügyelnek az idegrendszer épségére, táplálják a neuronokat, és a fejlődés során kontroll alatt tartják az idegsejtek számát és a neuronális kapcsolatok hálózatát a központban, valamint a periférián. Fontos szerepet töltenek be továbbá az idegrendszert érő stressz kezelésében, illetve az öregedésben is. Ha a gliális funkciók sérülnek, akkor csökken az idegrendszer plaszticitása, és könnyen felborulhat a homeosztatikus egyensúly.

A neurodegeneratív betegségek – mint például az Alzheimer-kór, a Parkinson-kór vagy a demencia - komoly kihívás elé állítják az orvostudományt, hiszen az egyes betegségek kialakulásában résztvevő genetikai és környezeti tényezők jelentős része még nem ismert, ahogy a molekuláris mechanizmusok többsége is felderítésre vár. A kor előrehaladtával rohamosan nő ezen betegségek kialakulásának esélye, de egy erősebb vagy többszöri gyenge traumás agysérülés (TBI) is bármikor kiválthat hosszú távon neurodegeneratív elváltozásokat, mint például a krónikus traumatikus encefalopátia.¹ Ezek a betegségek a neuronális sejtestek és nyúlványaik, illetve szinapszisaik pusztulásával járnak. A már ismert strukturális, szabályozás-, mozgás- és viselkedésszerű defektusok mellett fontos lenne a korai, betegségekhez vezető jelek felismerése, hogy hatékonyabb kezelési módok is elérhetővé váljanak.

Megfigyelték, hogy számos neurodegeneratív rendellenesség kialakulásának a kezdetén axondegeneráció következik be.² Az axonok hirtelen pusztulása, felszakadozása valamilyen axonokat érintő sérülés után jelentkezik, ami egy irreverzibilis folyamat. A törmelékképződés azonban nemcsak a sérülés helyén megy végbe, hanem az axon teljes, sérüléstől disztálisan eső részén is. Ezt a jelenséget nevezik Waller-féle degenerációnak (1. ábra).^{3,2}

Waller-féle degeneráció esetén sérülés után 1-2 nappal az axon sok apró törmelék formájában lesz jelen a sejtközi térben.⁴ Ez szintén stresszként hat a környező sejtekre, és további károkhoz vezethet, ha nem képes ezeket a szervezet megfelelő módon eltávolítani, például akadályozza az újránövő axonok áthaladását. A sérült terület körül található gliasejtekben jelentős morfológiai és génexpressziós változások mennek végbe, hogy megfelelően tudjanak reagálni a stresszhelyzetre, illetve hogy időben el tudják távolítani az elpusztult sejtek tartalmát. Ezt a folyamatot nevezik reaktív gliózisnak.⁵ A felszabadult törmelék így a fagocitikus gliákba

kerül.⁶ Egy egészséges szervezetben a törmelék mennyisége megfelelő körülmények között pár nap alatt szinte teljesen eltűnik. A gliózis során ugyan mikroglia is aktiválódna, és fokozza a gyulladásos folyamatokat, krónikus gyulladást általában nem eredményeznek.⁷ A törmelékeltakarítás hiánya azonban legtöbbször krónikus neuroinflammációhoz vezet.⁸



1. ábra: Waller-féle degeneráció. A sérült axon disztális része teljes egészében fragmentálódik. A sejtörmelégeket a környező gliasejtek fagocitálják, és azok normál esetben pár napon belül eltűnnek az extracelluláris térből. Ha a Waller-féle degenerációt kiváltó szignalizációs kaskádöt a megfelelő módon gátoljuk, akkor megakadályozható a fragmentáció. Amennyiben a törmelékeltávolítás nem tud végbemenni, abban az esetben a fragmentek hosszú ideig a sejtközi térben maradnak.

(Forrás: Rosell et al., 2019 - módosított)

A fagocitikus gliák és az axontörmelék közötti közvetlen kapcsolatot a Draper receptor teremti meg, ami a *Caenorhabditis elegans*-ban felfedezett *ced-1* gén, illetve az emlős *MEGF10* ortológja *Drosophilában*.⁹ A Draper megtalálható makrofágokban/hemocitákban, gliasejtekben, illetve epithelialis sejtekben, tehát nem-hivatásos fagocitasejtekben is.^{5,10,11} Az első törmelékdarabok fagocitózisa után rövidesen megnő a *draper* expressziós szintje, és a sejtmembrán filopódiumokat növeszt, amelyek a sértett axonok irányába mozdulnak.^{5,12} A Draper iniciálja a fagocitózist, megtörténik a citoszkeletális aktin-újrarendeződés - ami lehetővé teszi az befűződést -, majd végül létrejön a fagoszóma. A sejt belső lebontó folyamata, az autofágia során keletkező kanonikus autofagoszóma dupla membránstruktúrájával szemben az itt kialakult fagoszómát csak egy membrán határolja.¹³

Drosophila melanogaster-ben az első axonsértési modellt agyban dolgozták ki.⁵ Megfigyelték, hogy például a maxilláris tapogató (és egyben a benne található neuronális sejttestek) eltávolítása, amivel axonsérülést idéztek elő, a központi agyban Waller-féle degenerációhoz

vezetett. Hasonló eredményt adott a csáp eltávolítása is. Ezen beavatkozások közben az állatok még nem pusztulnak el, így az élő szervezetben lehet vizsgálni a különböző markerekkel jelölt neuronok, gliák vagy ezeken belül bizonyos fehérjék helyzetbeli, mennyiségi és minőségi változását.⁵ Sérülés után a Draper-t ellenanyaggal jelölve észrevették, hogy az alapállapothoz képest a *draper* expressziós szintje jelentősen megnőtt a sérülés után egy nappal. A maxilláris tapogató eltávolítása után már 4 órával szignifikáns kolokalizáció volt megfigyelhető az axontörmelékek és a Draper receptorok között, bizonyítva, hogy valóban a Draperrel borított gliasejtekbe kerülnek a felszabadult sejtmaradványok.

Miután a felszabaduló axontörmelék a Draper közvetítésével és membránba csomagolva bejut a gliasejtekbe, a sejt igyekszik minél előbb megszabadulni tőle. Sokáig nem volt világos, hogy ez melyik lebontó útvonalon keresztül valósul meg, de korábbi eredményeink végül az LC3-asszociált fagocitózishoz vezettek.⁶ Az LC3-asszociált fagocitózis (LAP) folyamatát először emlőseknél fedezték fel, majd *C. elegans*-ban is kimutatták^{14,15}, így valószínűleg ez egy meglehetősen konzervált folyamat. A patogének eltávolítása mellett fontos szerepe van az elhalt sejtek és sejtörmelékek eliminációjában is, ezzel megakadályozva egy elhúzódó gyulladást, illetve a környező sejtek és szövetek károsodását. A lebontó folyamat a lizoszómában végződik, és az autofágiához (vagyis a sejtek önmegsejtő folyamatához) szükséges gének egy része a LAP esetében is fontos szerepet tölt be. Ezért emlegetik ezt gyakran nem-kanonikus autofágiaként is.

1.2 A Stat92E szignalizációhoz és a Draper upregulációjához vezető aktivációs kaszkádok

A törmelék felvétele során a Draper receptorok számának nagyfokú növekedése ecetmuslicában a Stat92E transzkripciós faktornak köszönhető azáltal, hogy fokozza a *draper* gén átírását.¹⁶ A Stat92E-függő aktivációhoz vezet egy aktivációs kaszkád a Draper receptorból (ami egy pozitív visszacsatolási hurok), és az inzulinszerű jelátviteli út is a *draper* upregulációját idézi elő a Stat92E-n keresztül.¹⁷

A STAT-nak (jelátalakító és transzkripciós aktivátornak) egy ortológja ismert *Drosophila melanogaster*-ben, a Stat92E. A génről szintetizálódó fehérje számos különböző feladatot lát el az ecetmuslica szöveiben. Részt vesz például a fejlődésben, a sejtosztódásban, az őssejtek megújulásában, valamint az immunfolyamatokban.¹⁸ Transzkripciós faktorként elsősorban a gének megfelelő expressziós mintázatának kialakításáért felelős, de számos más genetikai

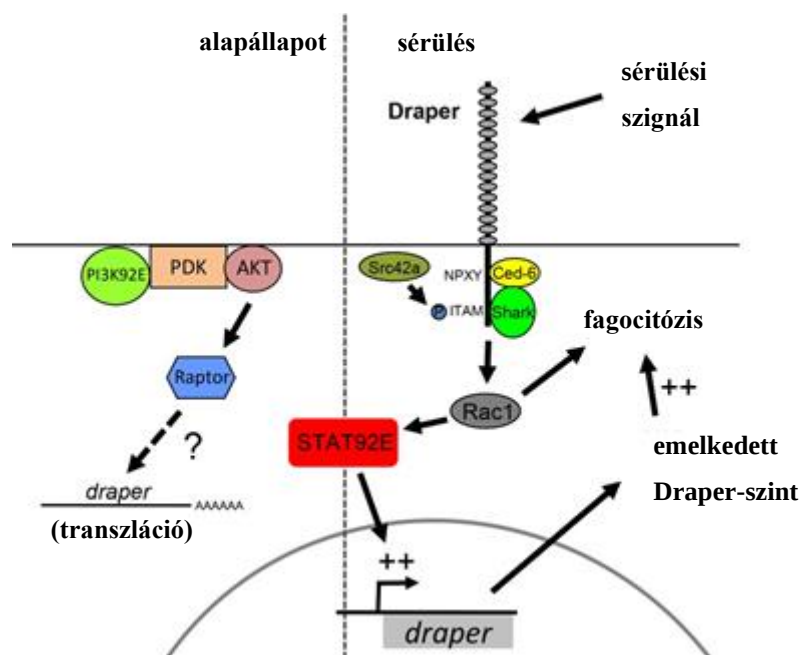
kölcsönhatásban is jelen van. Működését általában a JAK/STAT jelátviteli útvonalhoz kapcsolják; az upstream folyamatok a Stat92E-n végződnek, és transzkripció regulátorként ez képes bejutni a sejtmagba, közvetlenül szabályozva a gének kifejeződésének mértékét.¹⁹ Negatív regulátorai közé tartozik a Socs36E és a Su(var)2-10.¹⁸

Axonsérülés hatására az axont körülölelő gliákban megnő a Stat92E transzkripció faktor aktivitása, és ezzel hozzájárul a felszabaduló törmelék megfelelő mértékű és ütemű eltakarításához.¹⁶ A Stat92E serkenti a *mátrix metalloproteáz-1* (*Mmp1*) és a *draper* expresszióját. Az *Mmp1*-nek az extracelluláris mátrix átrendezésében van szerepe. A Draper receptor a sértetlen szövetben is megtalálható, hiszen a káros és veszélyes halott szövet gyors detektálásához, valamint a megfelelő elimináló folyamatok beindításához szükség van egy olyan jelérzékelő molekulára, aminek aktiválódására downstream folyamatok indulnak be.^{10,5} Ezek közvetlenül és közvetve is részt vesznek az eltakarítás hatékonyságának fokozásában. A Draper egyrészt fagocitálja az elhalt sejteket, sejttörmelékét^{10,5}, és ezáltal feltehetőleg aktiválja a LAP-ot⁶, másrészt pedig saját expressziójának serkentésével megnöveli a fagocitózis mértékét.¹⁶ A megfelelő helyeken történő foszforiláció következtében a Stat92E a sejtmagon belül a *draper* promóter régiójához kötődik, és serkenti a génexpressziót (2. ábra).

A Drapertól a Stat92E-ig vezető aktivációs útban több fehérje vesz részt, amelyek hiányában vagy csendesítésekor elmarad a Stat92E aktivációja. A Drapert az Src42A kináz foszforilálja, ami után a receptor képes lesz megkötni a Shark nem-receptor tirozin kinázt.²⁰ A kinázok működése és megfelelő helyekre történő kötése aktiválja a Rac1 kis GTPáz fehérjét.²¹ A Rac1 valamilyen úton végül a Stat92E aktiválódását eredményezi, ugyanis egy gliákban konstitutívan aktív Rac1-konstrukton keresztül jelentősen meg tudták növelni a Stat92E transzkripció faktor aktivitását. A kaszkád ezen tagjait először a Draper aktivációjával, illetve annak expressziós szintjének változásával kapcsolták össze, és csak később derült fény a Stat92E közvetlen aktiváló szerepére. (2. ábra)

Miután kiderült, hogy a Rac1-től downstream hat a Stat92E transzkripció faktor, megvizsgálták, hogy a JAK/STAT útvonal többi tagja is részt vesz-e a folyamatban.¹⁶ Meglepő módon a JAK *Drosophila* megfelelőjének, a Hopscotch-nak a csendesítése, valamint a Domeless receptor funkcióvesztéses mutációja sem eredményezett jelentős változást a Draper receptorok mennyiségében a kontrollhoz képest, illetve a sejttörmelék is eltűnt 5 nap után, csakúgy, mint a vad típusú állatokban. A Stat92E aktiválása a Y117-es pozícióban megvalósuló foszforilációval történik, és ennek hiányában nem is következett be a Stat92E-riporter upregulációja. A Stat92E fehérjének tehát mindenképpen szüksége van egy kinázra, ami

foszforilálja a megfelelő helyen, de ebben nem a kanonikus JAK-STAT útvonal vesz részt, hanem más folyamatok, amit kísérleteink során próbáltunk mi is kideríteni.



2. ábra: A draper transzkripciójának aktivációja. Alapállapotban mindkét aktivációs kaszkád (PI3K-út és Stat92E-út) részt vesz a bazális Draper-szint kialakításában, sérülés hatására viszont a Stat92E által közvetített útvonal felelős a draper nagyszintű upregulációjáért, ami a Draper receptortól indul, és az Src42a, a Shark és a Rac1-en keresztül jut el a Stat92E-ig, ami végül bemegy a sejtmagba.

(Forrás: Doherty et al., 2014 - módosított)

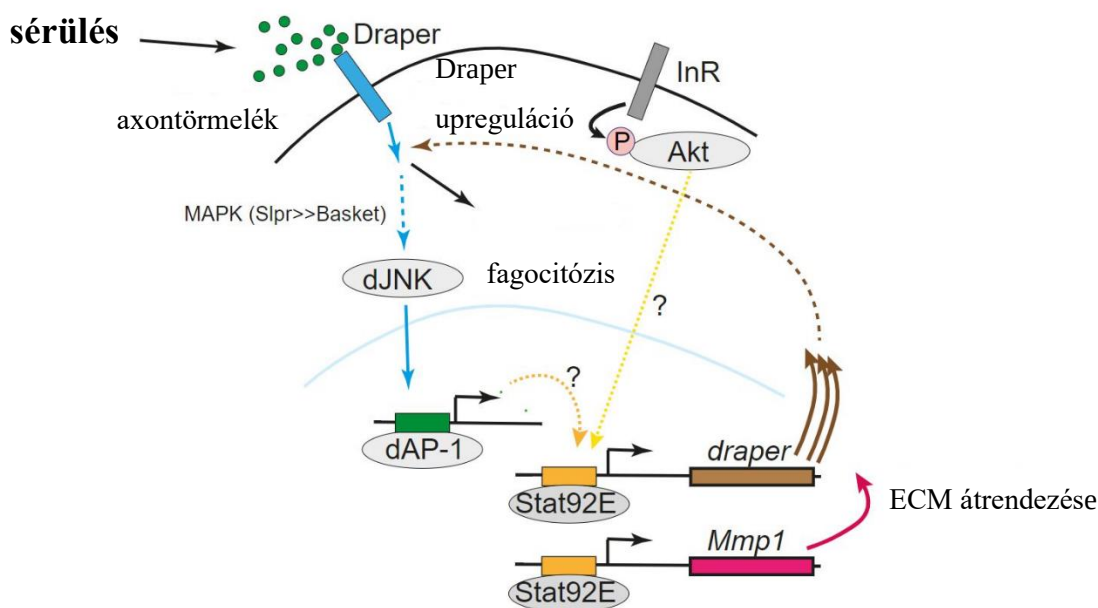
A Stat92E mellett egy másik transzkripciós faktorra, a dAP-1-re is szükség van a megfelelő gliális génexpressziós változásokhoz.²² A dAP-1 egy transzkripciós faktor komplex, a JNK útvonal végrehajtó fehérjekomplexe. A dAP-1 közvetve képes hatni a Stat92E-függő génaktivációra, de ennek folyamata nem ismert. A TRAF4 a Drapertől downstream hat, és aktiválja a JNK útvonalat. A TRAF4 képes a Draper-hez kötődni, és hiányában vagy csökkent működésében nem is történik meg megfelelően a feldarabolódott axon fagocitózisa. A Stat92E tehát a JNK útvonal effektor komplexével együtt transzkripcionálisan képes fokozni a fagocitózis mértékét az axonfragmentáció után.

A megfelelő Stat92E-közvetített draper-válasz kialakításában az InR (inzulinszerű receptor) fehérjéből kiinduló szignalizációs útra is szükség van Drosophilában az axonok megsértése után.¹⁷ Az ILS (inzulinszerű szignalizáció) folyamata szabályozza az energiaháztartást, a sejtnövekedést, valamint a sejtek túlélését az embrionális és a posztnatális fejlődés során, a

transzkripció, transzláció és az autofágia szabályozása által.²³ Kimutatták, hogy az InR-nek és downstream regulátorának, az Akt1-nek fontos szerepe van a *draper* aktivációjában.¹⁷ Az InR funkcióvesztéses mutánsaiban és a gliákban RNS-szinten csendesített muslicákban nem nőtt meg a Draper szintje, szemben a vad típusú állatokéval, és a sérült axonok eltakarítása sem történt meg megfelelően. A Stat92E upregulációja sem következett be, tehát valóban a Stat92E-n keresztül megvalósuló *draper*-aktiváció sérült. Az Akt csendesítése ugyanezt eredményezte. Láthatjuk tehát, hogy a Stat92E expressziós szintjét több útvonal is befolyásolja gliákban egy axonsérülés után.^{16,17,22} (3. ábra)

A gyulladásos útvonalakkal való kapcsolata még felderítésre vár, noha emlősökben a STAT-ok mind pro-, mind antiinflammatorikus citokinek fő aktivátorai.²⁴ A *Drosophila* (veleszületett) humorális immunitás két útvonala a Toll és az Imd útvonal, ezek megfeleltethetők az emlős gyulladásokeltető TLR és TNFR szignalizációnak.²⁵ A Relish az Imd (immunodeficiencia) útvonal transzkripciós faktora. Korábban már kimutattak olyan célgéneket, amik átfedő Stat92E- és Relish-kötőhellyel rendelkeznek (pl. Attacin-A)²⁶, és antagonistá módon képesek aktiválni vagy gátolni a gén átírását. Más esetben viszont mindkettőre szükség van ahhoz, hogy a gén aktiválódjon (pl. totA).²⁷ Még nem tudják, hogy egy axonfragmentáció után fellép-e gliákban ezen transzkripciós faktorok között valamilyen kölcsönhatás. Gyulladásos molekuláris folyamatokra jellemző molekulák expressziójának növekedését viszont gliákban is kimutatták már TBI hatására *Drosophilában*, például bizonyos antimikrobiális peptidét.²⁸

Gliális aktiváció a sérülés után



3. ábra: A Stat92E hatására aktiválódó draper és Mmp1, valamint ezek kapcsolata a Draper-aktivációs útvonallal, a JNK útvonallal és az inzulinszerű jelátviteli úttal axonsérülés során Drosophila gliákban.

1.3 Autofágia és LC3-asszociált fagocitózis

Az autofágia során a funkcióvesztett vagy feleslegessé vált komponensek különülnek el a sejten belül egy határoló membrán által, majd a lizoszómában kerülnek lebontásra. Ezzel lehetővé válik a már előregedett vagy rosszul működő sejtalkotók újrahasznosítása, és energiát biztosít a sejt számára egy éhező periódusban. Kimutatták, hogy az autofágia bizonyos defektusai neurodegeneratív betegségeket is előidézhetnek, tehát az idegrendszer neuronjaiban is fontos szerepet tölt be²⁹, a gliákban ellátott feladatairól viszont még keveset tudunk.

Az autofágia három fő típusa közé a makroautofágia, a mikroautofágia és a chaperon-mediált autofágia tartozik. Ezek közül a makrofágia irodalma a legkiterjedtebb, és az autofágia kifejezés alatt is legtöbbször csak a makroautofágiát értik. Azonban az utóbbi időben és az ismeretek bővülésével egyre szélesebbé vált ez a kör, és az autofágia más típusai, valamint a nem-kanonikus autofágia egyes ágai is le lettek írva. Nem-kanonikus autofágiának nevezzük azokat a folyamatokat, amelyekben részt vesznek olyan molekulák, amik az autofágiához is szükségesek, viszont annak nem minden komponensét igénylik. Ide tartozik az LC3-asszociált fagocitózis is^{30,31}, ami részt vesz számos káros és veszélyes, sejtközötti állományban jelen lévő anyag és patogén eltávolításában, köztük a sérülés hatására fragmentálódott axonok fagocitózisát követő lebontásában is.⁶

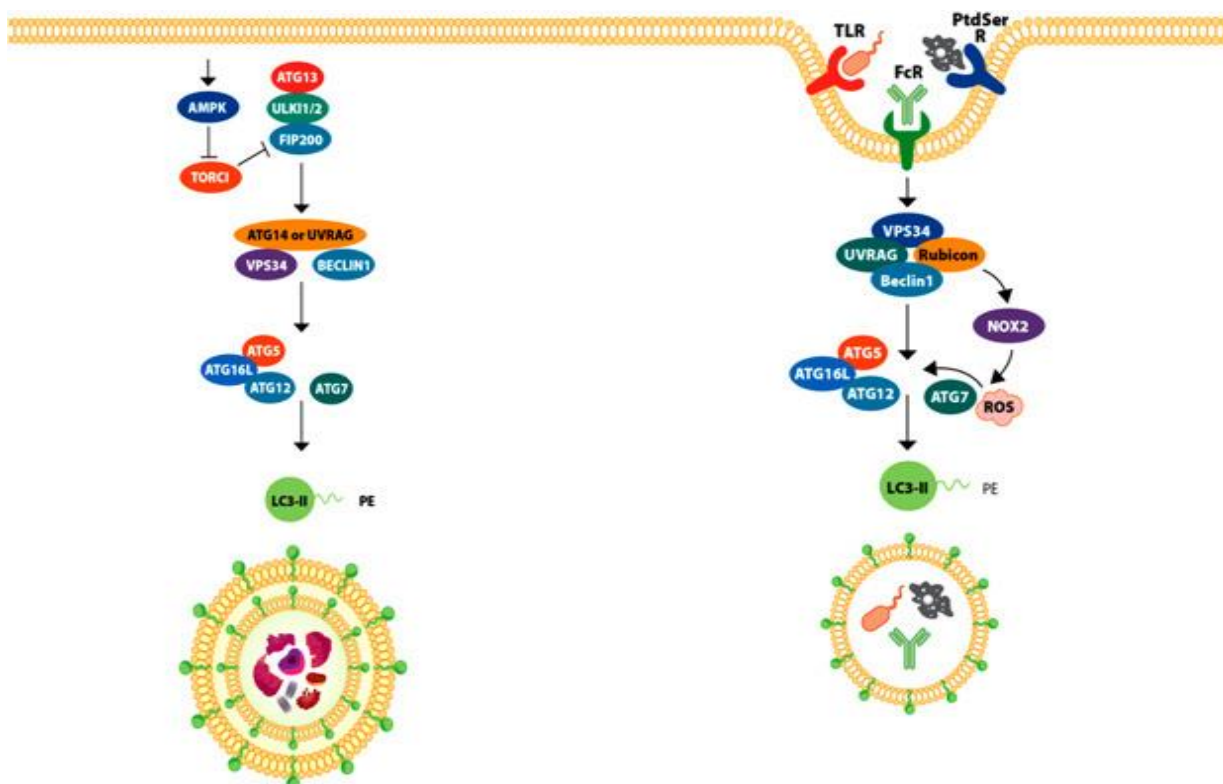
A LAP az autofág rendszer elemei közül a Vps34 komplex néhány tagját, valamint az Atg5-12-16L és az LC3-foszfátidil-etanolamin konjugációs rendszert használja fel.^{15,30} A Vps34 lipid kináz komplex molekulái közül a Beclin-1 (Atg6), a Vps15 és a Vps34 kerül a korai fagoszomális membránra emlősökben. Az így létrejött III-as típusú foszfátidil-inozitol-3-kináz (PI3K) komplexbe tartozik még az UVRAG is, ami más szerepben elősegíti az autofagoszóma érését, valamint annak lizoszómával való egyesülését, itt pedig a fagoszóma membrán foszforilációját irányítja. A Rubicon fehérje funkció sokszínűsége is nagyon jól megmutatkozik a két folyamatban, ugyanis az autofágiában inhibitor szerepet tölt be, a LAP-nak viszont nélkülözhetetlen eleme. Részt vesz a PI3K komplex aktiválásában, és stabilizálja a NOX2 komplexet, elősegítve a reaktív oxigéngyökök képzését, melyek jelenléte szintén nélkülözhetetlen a downstream konjugációs rendszer összeszerelődéséhez és az LC3

fagoszóma membránba való konjugálódásához.³¹ A folyamat a lizoszómában végződik; ebben a sejtorganellumban kerül lebontásra a fagocitált axontörmelék (4. ábra).³²

Az autofágia azonban nemcsak általános lebontó, hanem specifikus szabályozó szerepet is ellát, más sejten belüli folyamatokra kihatva. Egyes molekulák célzott degradációjával ugyanis képes befolyásolni egy-egy útvonal komponenseinek sejten belüli koncentrációját, ami egy kaszkád mérséklését, gátlását vagy fokozott aktivitását eredményezi. Ezt hívják szelektív autofágiának.³³

Az autofág membránok és vezikulák érése során különböző Atg fehérjék aktiválódnak és kötődnek a membránhoz.^{34,35} Konzervált folyamat lévén *Drosophilában* és emlősben is nagyrészt ugyanazon funkciókat ellátó molekulák vesznek részt, tehát az ehhez tartozó gének egymás ortológjai. A folyamat kezdetén kialakul egy dupla membránnal rendelkező struktúra, a fagofórmembrán. Ez valószínűleg az endoplazmatikus membránból vagy a Golgi-apparátusból fűződik le, de ezt még nem tudták egyértelműen bizonyítani. Az iniciációs (Atg1) komplex tagjaihoz tartozik az Atg1 (emlős ULK1), az Atg17/FIP200, az Atg13 és az Atg101. Az Atg1 egy kináz funkcióval rendelkező komplex, amelynek először az Atg1 nevű fehérjéje aktiválódik. Ezt a komplexet erősen szabályozzák a különböző stresszfaktorok és a tápanyagellátás. Az autofágia indukciójának a legegyszerűbb módja a sejtek éheztetése. A fagofór nukleációjának majd elongációjának kulcskomplexe a foszfatidilinozitol-3-foszfátáz (PI3P) komplex. Ennek kialakulásáért és aktiválódásáért a 3-as típusú PI3-kinázkomplex felelős, amit Atg- és Vps-fehérjék alkotnak: Atg14, Atg6, Vps15 és Vps34.

Miközben a fagofór egyre nő a lebontásra szánt komponens(ek) körül, az Atg8 (LC3) a membránba konjugálódik két konjugációs rendszer közreműködésével.³⁵ Az Atg4 proteáz, az Atg7 és az Atg3 katalizálja az Atg8a foszfatidil-etanolaminnal történő összekapcsolódását, vagyis aktiválódását, ami ezután már lipidált formában képes lesz az autofagoszómaéhoz kötődni. A másik konjugációs rendszer az E3 ligáz-szerű Atg5/12/16 komplexet hozza létre, ami az Atg8a membránba épülésén kívül még a fagofór expanszióját is segíti, mielőtt kialakulna az autofagoszóma. A komplex az Atg7 és az Atg10 segítségével jön létre. Ezek ubikvitinszerű konjugációs rendszerek, amelyekben az Atg7 felel meg az E1 enzimnek, az Atg3 és az Atg10 pedig az E2-nek. Az Atg8a még egy proteolitikus hasításon is átesik az Atg4 által, mielőtt az E1-hez kapcsolódna. A kész autofagoszóma a lizoszómával egyesülve autolizoszómává válik, amiben a vezikula tartalma lebontásra kerül a lizoszóma enzimei segítségével. (4. ábra)



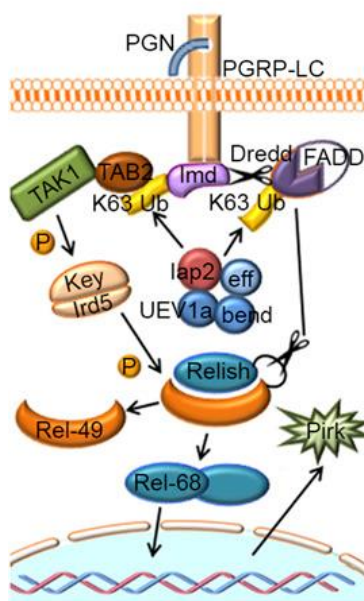
4. ábra: Az autofágia és az LC3-asszociált fagocitózis (LAP) összehasonlítása. Láthatjuk, hogy a LAP-ból teljesen hiányzik az iniciációs komplex, viszont a Vps34, a Beclin-1, az Atg8 és a két konjugációs rendszer jelen van. Emellett emlősökben a LAP-hoz elengedhetetlen a NOX2 jelenléte, mert a reaktív oxigéngyökök segítik az Atg8/LC3 konjugációját. A Rubicon aktiválja a PI3K-komplexet, és stabilizálja a NOX2 komplexet.

(Forrás: Cunha et al., 2017 - módosított)

1.4 Szelektív autofágia és immunfolyamatok

A molekulák szelektív lebontásának egyik módja az autofágián keresztül történik. A lebontásra szánt anyagokhoz receptorok kapcsolódnak, amiket azok specifikusan kötnek.³⁵ Ezen receptorok mindegyike tartalmaz egy LIR (LC3-mal kölcsönhatásba lépő régió) motívumot, amin keresztül az Atg8-hoz tudnak kötődni a receptorok. A legismertebb és legtöbbet tanulmányozott szelektív autofágia receptor emlősben és Drosophilában is a p62/Ref(2)P. Ecetmuslicában ide tartozik még például az Atg1, a Blue cheese, a Kenny (IKK-gamma), a CKA és az SH3PX1. Néhány esetben a receptorok és adaptorok Atg8-cal kialakított kapcsolatához pontos funkciót is sikerült kapcsolni, de számos olyan molekula van még, amiknél eddig csak a fizikai interakciót bizonyították a LIR-motívumon keresztül.

Néhány éve fedezték fel, hogy a *Drosophila* belső immunitási folyamatokban résztvevő Imd útvonalának egyik fehérjéje, a Kenny is tartalmaz egy LIR-motívumot.^{35,36} Az Imd útvonal bizonyos fertőzések hatására bekövetkező immunválasz kialakításáért felelős, ami az emlős TNF útvonal megfelelője.³⁷ Ez a Toll útvonal mellett a másik gyulladásos szignalizációs út, ami antimikrobiális peptidek (AMP-k) termelődését eredményezi *Drosophilában*. Az Imd útvonalban a Relish nevű transzkripciós faktor aktiválja az AMP-k termelődését. A Relish aktiválásáért az IKK-komplex felelős, melynek egyik tagja a Kenny, a másik pedig az Ird5 (IKK β). A Relish egy aktivációs és egy gátló doménnel rendelkezik. Az IKK-komplex foszforilálja az aktivációs részt, egy proteáz (valószínűleg a Dredd kaszpáz) levágja az inhibitor domént (ami a C-terminuson helyezkedik el), és az aktív fehérjerész a sejtmagba vándorol (5. ábra). Nemrég arra is fény derült, hogy az Imd útvonalban a Kenny mellett más fehérjék is rendelkeznek LIR-motívummal (Tak1, Tab2).³³ Az útvonalban résztvevő fehérjék degradációja megakadályozza annak folyamatos aktivitását, például a muslica kommenzalista mikroflórájával szemben.³⁶



5. ábra: Imd (immundeficiencia) útvonal. A baktérium sejtfal peptidoglükánja a PGRP-LC receptorhoz kötődik, aminek hatására downstream szignalizációs molekulák gyűlnek össze. Ezek között szerepel az Imd, a Dredd és a FADD. Miután a Dredd aktiválódik, hasítja az Imd-t, ennek hatására az Iap2 hozzá tud kötődni, és ubikvitinálja az Imd-t. Ez aktiválja a Tab2/Tak1 komplexet, ami foszforilálja az IKK-komplexet. A kináz foszforilálja a Relish aktivációs doménjét, majd a Dredd le is hasítja. Az aktív rész tartalmaz egy NLS-t (nukleáris lokalizációs szignált), és be tud jutni a sejtmagba transzkripciós faktorként.

(Forrás: Myllymäki et al., 2014)

2. CÉLKITŰZÉS

Az axontörmelék felvétele az LC3-asszociált fagocitózison keresztül valósul meg⁶, melynek fő célja a környező sejtek védelme, és a krónikus gyulladás megelőzése. A más folyamatokra való hatását, szabályozó szerepét azonban még nem ismerjük. Ugyan az axontörmelék eltakarításában a kanonikus autofágia közvetlenül nem vesz részt, közvetett szerepe még lehet. Kísérleteink során olyan szabályozó molekulákat, enzimeket vagy útvonalakat szerettünk volna találni, amik a Draper-Src42a-Shark-Rac1 tengely és a Stat92E között helyezkednek el (2. ábra). A Stat92E aktiválja a *draper* gént, viszont a Stat92E transzkripciós faktor aktiválásáról, szabályozásáról még nem sokat tudunk az Waller-féle degeneráció által indukált folyamatban a gliasejteken belül. Célul tűztük ki annak meghatározását, hogy a LAP vagy az autofágia szabályozza-e a Stat92E aktivitását, és az eredmény függvényében további kapcsolatokat kerestünk a *Drosophila melanogaster* axotómiás szárnymodelljének felhasználásával.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 *Drosophila* törzsek eredete, fenntartása és keresztezése

A muslicákat 25 °C-on tartottuk a keresztezések során, kivéve a *10xStat92E-dEGFP/CyO; repo-Gal4, tubulin-Gal80^{ts}/Tm6 Hu* törzs felhasználásával készült keresztezéseket. Ezek 18 °C-on fejlődtek bábból való kikelésig, a kísérletekhez használt (4-9 napos) felnőtt utódokat pedig a kísérlet alatt 29 °C-on tartottuk. A táptalaj kukoricadarát, élesztőt, agart és dextrózt tartalmazott, valamint nipagint, egy antifungális tartósítószerrel.

A következő használt törzseket már korábban leírták: *10xStat92E-dEGFP*³⁹, *Atg5*^{5cc5,40}. Az *Atg101*^{Δ^{6h}} mutánszt a Zhejiang University School of Medicine Genetikai Intézetétől, az UAS-Su(var)2-10-et (*Sm6b/Sp; UASp-EGFP-Su(var)2-10*) pedig a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Genetikai Intézetéből, a *Drosophila* Ivarsejt Fejlődési Csoporttól kaptuk ajándékba. A *repo-Gal4* (7415), *TRE-EGFP: w**; *P{TRE-EGFP}attP16* (59010), *w sgRNA TKO.GS02468* (79543), *luciferáz RNSi: P{TRiP.JF01355}* (31603), *mCherry RNSi* (35785), *Atg5 RNSi: y1 v1; P{TRiP.JF02703}attP2* (27551), *Atg1 RNSi: P{TRiP.GL00047}attP2* (35177), *UAS-EGFP-Kenny: w**; *P{UASp-EGFP-key}3* (90309), *UAS-EGFP-KennyLIR: w**; *P{UASp-EGFP-key.F7A.L10A}2/CyO* (90310), *UAS-BFP: P{lexAop-UAS-TagBFP.CAAX.K}77B/TM6B* (55090), *UAS-Relish^N: P{UAS-FLAG-Rel.68}1, w**; *TM2/TM6C, Sb* (55777) és a *Su(var)2-10 RNSi: y¹ v¹; P{TRiP.JF03384}attP2* (29448) a Bloomington *Drosophila* Stock Center-ből (Bloomington *Drosophila* Törzsközpont) származik. Az *Atg16 RNSi: P{KK102326}VIE-260B* (105993) és a *Rubicon RNSi: v109424: P{KK108247}VIE-260B* (109424) a Vienna *Drosophila* Resource Center- ből (Bécsi *Drosophila* Eszköz-Központ) származik.

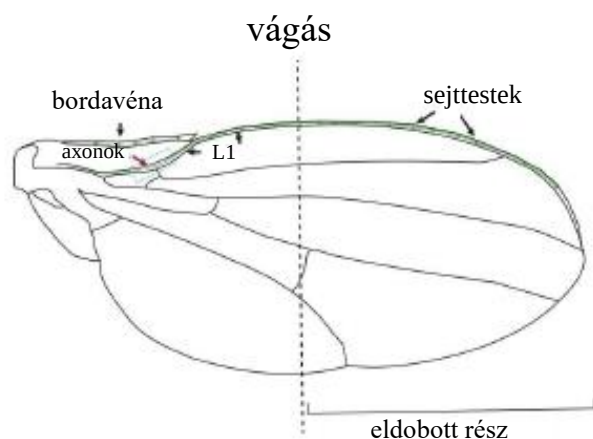
A több genetikai elemet tartalmazó törzsek létrehozásához klasszikus mendeli genetikát használtunk. Az *UAS-EGFP-Kenny*, *repo-Gal4/TM3,Sb* és a *10xStat92E-dEGFP/CyO; repo-Gal4, tubulin-Gal80^{ts}/Tm6. Hu* törzset meiotikus rekombinációval készítettük el.

Axondegenerációs modell *Drosophila* szárnyban és a gliasejtekben expresszáldó fehérjék vizsgálata sérülés után

A *Drosophila melanogaster*ben végrehajtott kísérletek többségéhez a Neukomm és mtsai (2014)⁴¹ által kidolgozott axondegenerációs modellt használtam fel. (6. ábra) A kísérletek mindegyikében hímek szerepeltek, kivéve azokban a keresztezésekben, amikben a *tubulin-Gal80^{ts}* is jelen volt; azokban nőstényeket használtam a hímek túlélési problémái miatt. Ezen modell szerint a szárny hosszanti oldalával merőlegesen egy egyenes vágással eltávolítottam a

szárny egyharmadát a disztális végen. A vágást egy mikrosebészeti ollóval hajtottam végre. Minden egyednél csak az egyik szárnyat vágtam meg, a másik sértetlen maradt, és kontrollként szolgált. A megcsonkított szárnyú állatokat ezután 3 napig 25 °C-on tartottam fiolákban. A sérülés után 3 nappal (3 dpi) már erős 10xStat92E-dEGFP jel volt megfigyelhető, így a megvágott szárnyakat is a vágástól számítva 3 nap elteltével helyeztem a tárgylemezre.

Az muslicák sértett és sértetlen szárnyát fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltam. A szárnyban az L1 vénán belüli régiót vettem figyelembe, ami valójában egy epitélium által burkolt cső. Az L1 véna egy ponton a szárnyélről a szárny belső területe felé kanyarodik, amin belül axonok és gliasejtek helyezkednek el. A mintákat az Axio Imager.M2 mikroszkóppal és az ORCA-Flash4.0LT CMOS kamerával (Hamamatsu) vizsgáltam szobahőmérsékleten. A mikroszkóphoz egy ApoTome.2 (Zeiss) készülék volt csatlakoztatva, amely optikai szeleteket volt képes készíteni a mintákról. A megvilágítást a CoolLED pE-4000 rendszer biztosította. A képeket a Zeiss Zen programja segítségével készítettem el. A képek több síkból álltak, mert különböző mélységekből származtak. 470 nm hullámhosszú megvilágítást és 100 ms expozíciós időt használtam. A szárnyak L1 vénáján belül készült képekhez a Zeiss Plan-Apochromat 63x/1.40 NA, immerziós olajjal együtt alkalmazható objektívet használtam. Az egyes rétegek között 0,25 µm volt a távolság. Később végignéztem az elkészített képek rétegeit, és mindegyiknél kiválasztottam azt a réteget, amin a riporter a legintenzívebben látszódott. A kvantifikálás során a Fiji (Imagej) programot használtam, ezzel történt meg a fluoreszcens jel intenzitásának számszerűsítése. A 10xStat92E-dEGFP jel intenzitásának méréséhez 174 x 54 px méretű, az UAS-EGFP-Kenny és UAS-EGFP-Kenny^{LIR} jel méréséhez pedig 205 x 63 px méretű téglalapot jelöltem ki mérendő területként az L1 vénán belül. A Stat92E-jel esetében csak a terület összintenzitását néztem, a Kenny-jelek esetén viszont az EGFP-pontok számát is. A kapott értéket a háttér autofluoreszcenciájára normalizáltam.



6. ábra: Az axotómia vázlatosan. A vágás során a legtöbb axon megsérül, és Waller-féle degeneráció megy végbe. Kísérleteink során az L1 véna szárny belsejébe lépő (a mediális rész felé kanyarodó) régióját vizsgáltuk, amiben axonok és gliasejtek helyezkednek el.

3.2 Steril *Drosophila* törzs elkészítése és fenntartása

Petéztetés, mosás és dekorionálás. Az eredeti UAS-EGFP-Kenny/Tm3, Sb törzsből kb. 100 állatot fekete petéztető agart tartalmazó hengerbe helyeztem egy éjszakára. Az agarra vízzel felkevert élesztőt is tettem. Másnap a muslicák eltávolítása után enyhén folyó desztillált vízzel átmostam az agart, amire a nőstények a petéket rakták, majd egy ecsettel homogénre kevertem az élesztőt. Az élesztős, vizes peteszuszpenziót ezután egy gyűjtő szűrőre öntöttem, amin a peték akadtak csak fenn. A szűrő egy apró réseket tartalmazó szövetből állt, amit egy gyűrűalakú keretbe helyeztünk. A szűrőt egy papírtörlővel leitattam, majd Petri-csészébe helyeztem. A szűrő alá és tetejére is öntöttem 4-5%-os hipót (hipoklórossavat) az embriók dekorionálásához, és 1 percig így hagytam a szűrőt a petékkel. Mikroszkóp alatt ellenőriztem, hogy a peték fényesen csillognak-e, ugyanis ez jellemzi a dekorionálódott embriókat. Ezután a petékről folyó desztillált víz alatt mostam le a hipót. Végül a szűrő szövetét kiszedtem, egy papírtörlőre helyeztem, és ecsettel átraktam a petéket új, antibiotikum-koktéllal összekevert táptalajt tartalmazó fiolákba.

Steril, antibiotikum-koktélt tartalmazó *Drosophila* táptalaj elkészítése. Olyan táptalajt szerettünk volna készíteni a muslicák számára, amivel az állatok baktériummentesek lesznek. Ehhez a Tusco és mtsai (2017) cikkben leírt receptet használtam fel.³⁶ Először az általánosan használt agaros *Drosophila*-táptalajt autoklávban sterilizáltattam, majd a még folyékony, de már nem túlságosan forró táptalajanyagba 0.25 mg/ml ampicillint, tetraciklint, streptomocint (vagy streptomycin-penicillin keveréket) és 1 mg/ml kanamicint kevertem. A koktél elkészítése steril fülke alatt, autoklávban sterilizett eszközökkel történt.

Sterilitás ellenőrzése. A sterilitás ellenőrzéséhez antibiotikum nélküli Luria Broth (LB) táptalajt használtam. Egy-egy LB-t tartalmazó Petri-csészén 2-2 homogenizált muslicát kentem el, és kiszélesztettem a bennük potenciálisan megbúvó baktériumsejteket.

3.3 Traumás agysérülés modell (TBI) *Drosophila melanogaster*ben

Intaktan bekövetkező agysérüléshez (closed-head injury) traumás agysérülést (TBI-t) idéztünk elő, melyek kontrolljai sértetlen fejek voltak. A TBI-t Precellys® Evolution homogenizátorral hajtottuk végre (7. ábra). Ennek metodikája részletesen leírt és tesztelt.⁴² 2 ml-es csöveket

használtunk, és mindegyikbe 20 állatot raktunk. 3 x 10 másodpercig folyt a rázás 10 °C-on és 4 500 rpm-en. A rázások között 30 mp szünet volt. A Western blothoz azoknak az állatoknak a fejét használtuk csak fel, amelyek a mintagyűjtés időpontjáig életben maradtak.



7. ábra: A Precellys® Evolution homogenizátor. Ezzel hajtottuk végre a TBI-t a muslicákon a Western blothoz.

3.4 SDS-PAGE és Western blot

Mintaelőkészítés. Az autofágia Su(var)2-10-re (a Stat92E egyik negatív regulátorára) gyakorolt hatását Western blottal szerettük volna megvizsgálni. A Western blothoz hím *Drosophila* fejeket gyűjtöttünk. A TBI által sértett és sértetlen muslicáknak a fejét használtuk fel a kísérlethez. A mintagyűjtés során folyamatosan szárazjégen dolgoztunk, és a fejjelöláshoz használt eszközöket előzetesen lehűtöttük szárazjégen. A sértett állatokat TBI-ztük, és 1 nappal a TBI után választottuk le a fejeket a sértetlen állatokéval együtt. Minden muslicát legalább 10 percig szárazjégen tartottunk egy Falcon-csőben, majd a csöveket 20-30 mp-ig vortexeltük, hogy a testhez csatlakozott fejeket leszakítsuk. A vortexelést követően a muslicákat két egymásra rakott szitára öntöttük. Az alsó szita kis lyukakat tartalmazott, a felső pedig nagyobbakat, amin a fejek még átfértek, de a testek nagy része nem ment át. A szitán egy ecsettel óvatosan kevergettük a muslicákat, hogy a fejek leváljanak a testről, és átkerüljenek az alsó szitára. Az alsó szitán összegyűlt fejeket egy tölcseren keresztül átraktuk Eppendorf-csővekbe, 20-asával. Amelyikbe kevesebb jutott, azt jelöltük. A mintákat felhasználásig -80 °C-on tartottuk. Később 1x Laemmli-pufferből és 100 mM koncentrációjú DTT-ből mintakészítő oldatot mértünk össze desztillált vízben, és fejenként 4 ul-t pipettáztunk az Eppendorf-csővekbe, majd kézi homogenizátorral feltártuk benne a fejeket. A csöveket ezután 5 percig 100 °C-on inkubáltuk, majd 14 000 rcf-en néhány percig centrifugáltuk. A felülúszót átmértük új mikrocentrifuga-csővekbe, és -80 °C-on tároltuk a fehérjét.

SDS-PAGE és Western blot. Az elektroforézishez egy 3%-os tömörítő (stacking) és egy 8%-os szeparáló (resolving) gélt használtunk a következő összetevőkkel: Tömörítő (10 ml-re): 1.25 ml 4x puffer (pH = 6.8), 0.5 ml 30% akrilamid-bisakrilamid. 50 μ l 10% APS, 5 μ l TEMED és 3.2 ml víz. Szeparáló (10 ml-re): 2.5 ml 4x puffer (pH = 8.8), 2.66 ml 30% akrilamid-bisakrilamid, 100 μ l 10% APS, 10 μ l TEMED és 4,73 ml desztillált víz. 3 μ l PageRuler Plus molekulaszúly markert vittünk fel, az üres zsebeket pedig a mintával megegyező térfogatú, 1x mintapufferrel töltöttük fel. 10x Tris-glicin puffert 1x-esre hígítottunk. 20 percig 70 V-on, majd egy óráig 150 V-on futtattunk. A blottoláshoz 1x transzfer puffert (10% 10x transzfer puffer, 10% metanol, víz) készítettünk. PVDF – Immobilion Fluorescent (FL) membránokat vágtunk méretre. Metanolban előáztattuk ezeket, majd a blottoláshoz használt membránokat, szivacsokat, filterpapírokat és blottoló kereteket 1x transzfer pufferben ekvilibráltuk. A BioRad filterpapírjait használtuk. A blottoló tankokat transzfer pufferrel töltöttük meg. A blottolás kb. 15-17 óráig tartott. Másnap a membránokat 2x TBST-vel (1xTBS + 0.1% Tween-20) mostuk 2 percig. A Su(var)2-10 ellenanyagot (mouse)⁴³ 1:500-as hígításban alkalmaztuk, a β -aktint (rabbit) pedig 1:2500 hígításban. A hígításhoz a LI-COR Intercept Blocking Buffer-t használtuk. A membránokat ellenanyagban inkubáltuk 1.5 óráig, majd 3x mostuk TBST-vel 10 percig egyenként. A fluoreszcens másodlagos ellenanyagokat 1:15000-re hígítottuk, és 1 óráig inkubáltuk benne a membránokat lefedve. Utána mostuk TBST-vel 3x, majd 2x TBS-sel (Tween-20 nélkül), végül pedig 5-10 percig metanollal. Szárítás után a LI-COR Odyssey készülékkel készítettük el a képeket.

3.5 Statisztikai analízis

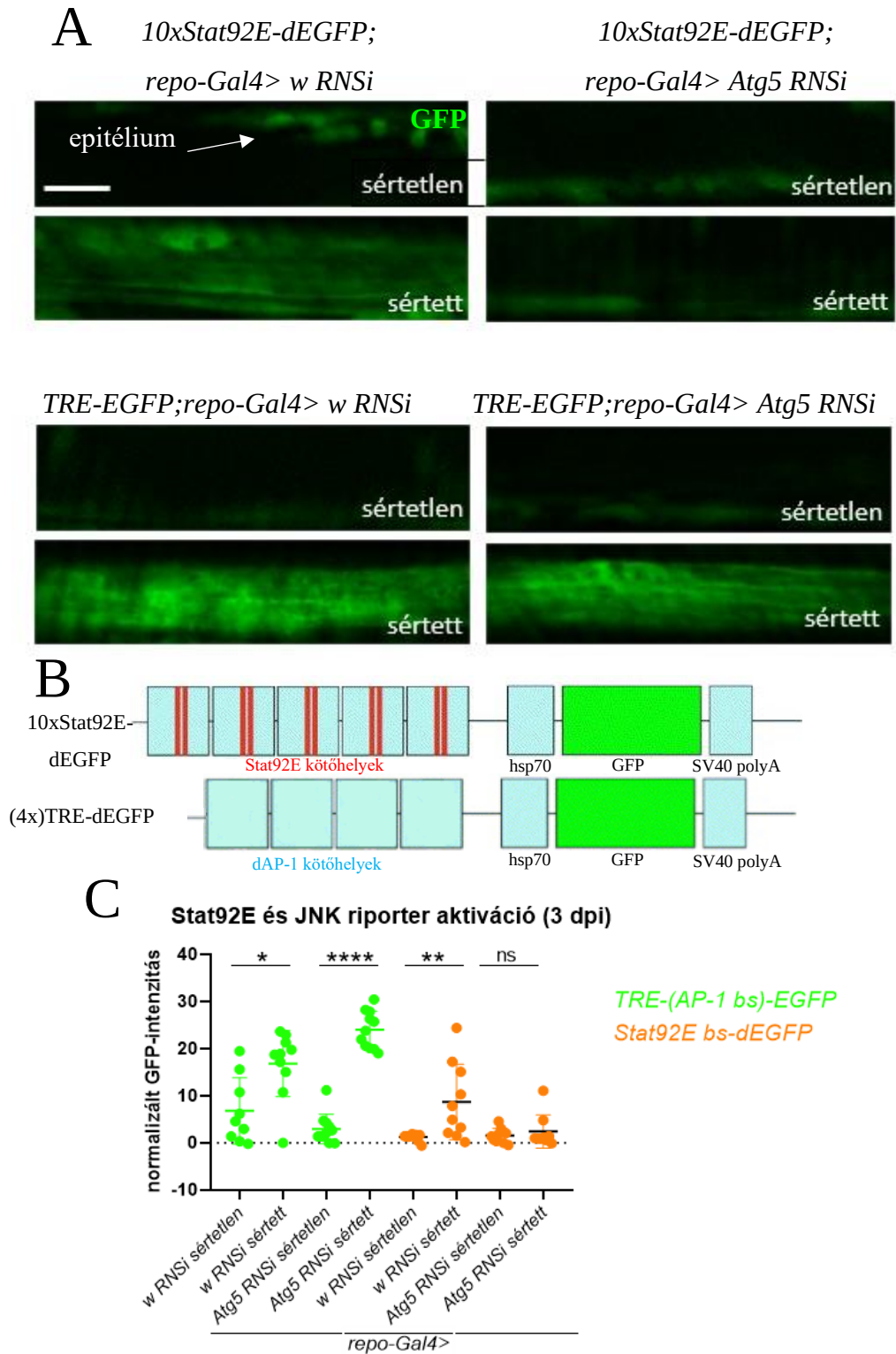
Az adatok kiértékelése a GraphPad Prism 8.0.1 programmal történt. Először ellenőriztem az adatcsoportokon belül az adatok normál eloszlását, és annak függvényében használtam egy olyan próbát, amellyel meghatároztam 2-2 adatcsoport között az eltérés mértékét. A normál eloszlás vizsgálata Shapiro-Wilk teszttel valósult meg, ami ideális alacsony mintaszámú adatsorok elemzéséhez. Egy adatcsoport nem tartalmazott 20-nál több adatot. Normál eloszlású adatsorok esetében páratlan, kétoldali t-próbát futtattam le, nem-normál eloszlásnál pedig kétoldali Mann-Whitney tesztet.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKEELÉSÜK

4.1 Stat92E kapcsolata a LAP-pal és az autofágiával

Ismert, hogy a Draper-ből kiinduló aktivációs kaszkádban résztvevő Stat92E transzkripció aktivitása szignifikánsan megnő mind az agy gliáiban, mind a szárnygliákban axonsérülés után. A Stat92E aktív működését a *10xSTAT92E-dEGFP*-n vizsgáltuk, ami 10 Stat92E kötőhelyet tartalmaz a *Socs36E* gén régiójából. A *Socs36E* a Stat92E egy természetes inhibitora. A *10xStat92E-dEGFP* riporter aktiválásához a szárnyideg megsértése végett ollóval levágtuk a szárny egy részét. Előzetes optimalizáló kísérletek során már megfigyeltük, hogy a Stat92E riporter jel szárnyban 2 nappal a sérülés után már látható, és még az 5. napnál is mérhető. Az 1. napnál még nincsen látható jel. Mivel az axontörmelék eltakarítása a 3. naptól mutat látványos változást a törmelékszámokban egy vad típusú ecetmuslicaszárnyban⁶, mi is a 3. napnál (3 dpi) vizsgáltuk a *10xStat92E-dEGFP* által adott jelet a lejjebb leírt kísérletekben. A Stat92E aktivációt korábban csak *Drosophila* agyban vizsgálták, és ott már 1 nap után erős intenzitást mutatott a neuronális jel és a gliákban jelölt *10xStat92E-dEGFP* is.¹⁶ Mivel azonban a törmelékeltakarítás is lassabban megy végbe szárnyban, nem olyan meglepő, hogy 1 nap után a Stat92E-dEGFP jelből sem látunk még ekkor semmit.

Az agyban mind a JNK, mind a Stat útvonal bekapcsol gliákban axonsérülés érzékelését követően.^{22,16} Megvizsgáltuk a szárnyidegben a Stat92E és a dAP-1 EGFP-vel kapcsolt riportereinek segítségével, hogy az autofágia vagy az LC3-asszociált fagocitózis játszik-e valamilyen szerepet a Stat92E vagy a dAP-1 aktiválásában vagy működésében. Az Atg5 az autofágia és a LAP folyamatában is nélkülözhetetlen az Atg8 megfelelő konjugációjához, így egy *Atg5* RNS-interferenciával a *repo-Gal4*-gyel gliaspecifikusan egyszerre mindkét folyamatot meg tudtuk vizsgálni. Az TRAF4-től downstream ható JNK-útvonal dAP-1 transzkripció faktorának működését a TRE(AP-1 kötőhely (bs))-EGFP riporterkonstrukción keresztül néztük meg 3 nappal a sérülés után (8. ábra). A sérült szárnyakat a sértetlen szárnyakhoz, a kettő közötti statisztikai változást pedig a kontrollban létrejövő változáshoz hasonlítottuk.



8. ábra: A) A Stat92E riportere (*10xStat92E-dEGFP;repo-Gal4*) és a JNK útvonal AP-1 riportere (*TRE-EGFP;repo-Gal4*) által adott fluoreszcens jel Atg5 RNSi háttéren 3 nappal a sérülés után. A repo gliaspecifikus expressziót tesz lehetővé. Méretarányegység: 10 μ m. A kontrollt egy white (w) RNSi képezte. Az AP-1 riporterben erős emelkedés látszik vágás hatására, a 10xStat92E-dEGFP jelben viszont nem figyelhető meg változás a sértett szárnyakban a sértetlenekhez képest Atg5 RNSi esetén. B) A riporterkonstrukciók sémás rajza. (Forrás: Bach et al., 2007 – módosított.³⁹) C) A számszerűsített intenzitásértékek statisztikai

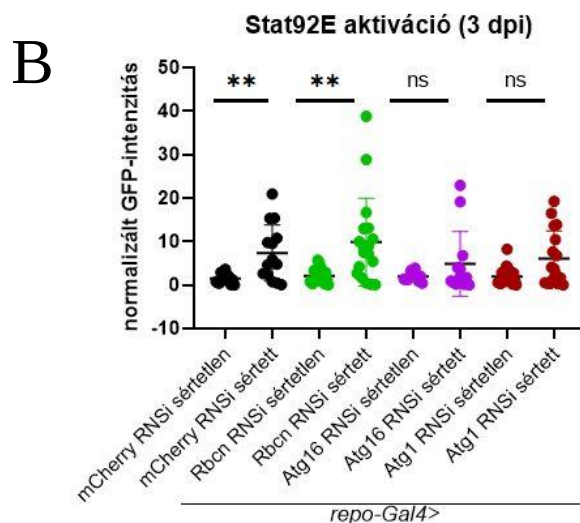
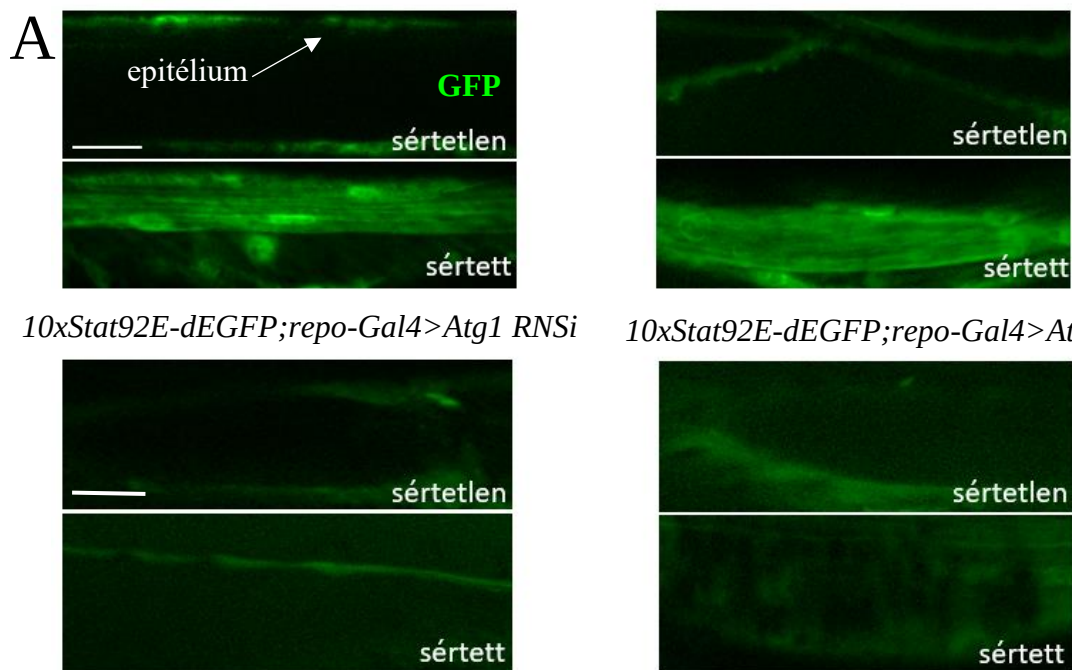
elemzése Mann-Whitney teszttel. A hibasávok a szórást jelölik, a középvérték az átlag. $*p = 0.0172$, $**p = 0.0039$, $****p < 0.0001$. $n = 9, 10, 11$.

Ha a Stat92E aktiválódása vagy a riportergénhez való kötése sérül, akkor a fluoreszcens jel is kisebb intenzitású lesz. Láthatjuk, hogy *Atg5* csendesítés hatására a d-AP-1 aktivitás nem csökkent sérülés után a kontrollhoz képest, amiben *white* RNS-interferenciát használtunk. A Stat92E aktivitása ezzel szemben jelentősen lecsökkent az *Atg5* csendesítés után. Kvantifikálás után kiderült, hogy a Stat92E-aktivitás olyan kis mértékű volt, hogy nem eredményezett szignifikáns változást a sértetlen állapothoz képest. A dAP-1 viszont nagyon hatékony tudott maradni az *Atg5* RNS-interferencia után is (8. ábra).

Az *Atg5* csendesítés után az *Atg16* (az *Atg5* partnere) csendesítésének a hatását is megnéztük a szárny gliasejtjeiben. Az *Atg16* csendesítése szintén a 10xStat92E-dEGFP-jel csökkenését idézte elő sérült szárnyakban a kontrollhoz képest (9. ábra). Az *Atg5* és *Atg16* jelenléte tehát befolyásolja a Stat92E aktivitását. Ezután azt kellett felderítenünk, hogy a LAP vagy az autofágia okozza-e ezt a fenotípust, mivel nemcsak az *Atg5*-ön, hanem az *Atg16*-on is osztozik a két vezikuláris folyamat. Ehhez első körben egy-egy olyan fehérjét helyeztünk előtérbe, ami a két folyamat közül csak az egyikhez szükséges. Jól ismert, hogy a Rubicon gátló hatást fejt ki az autofágiára, míg a LAP-hoz elengedhetetlen. Az autofágia *Atg1* kináz komplexe ezzel szemben csak az autofágia iniciációjában vesz részt, a LAP viszont nélküle is ugyanúgy végbemegy.

Megvizsgáltam, hogy a fent említett komponensek közül melyiknek a hiánya eredményezi azt a fenotípust, amit az *Atg5* csendesítésénél tapasztaltunk. A kísérlethez egy *Rubicon* RNSi-t, *Atg1* RNSi-t és kontrollként *luciferáz* RNSi-t, illetve *mCherry* RNSi-t használtam (9. ábra). A kontroll RNSi-ket teszteltem, és mindkettő egyformán jól működött.

10xStat92E-dEGFP;repo-Gal4>mCherry RNSi 10xStat92E-dEGFP;repo-Gal4>Rubicon RNSi



9. ábra: A) A Stat92E riportere (10xStat92E-dEGFP;repo-Gal4) által adott fluoreszcens jel Rubicon RNSi, Atg1 RNSi és Atg16 RNSi háttéren 3 nappal a sérülés után.

Méretarányegység: 5 μ m. A kontrollt egy mCherry RNSi képezte. A Rubicon az autofágiához nem szükséges, míg a LAP-nak elengedhetetlen eleme. Az Atg1 az autofágia iniciációjában játszik kulcsfontosságú szerepet, de a LAP-hoz nincs rá szükség. Az Atg1 és Atg16 RNSi-nél eltűnt az Stat92E-függő expresszió növekedés sérülés után, míg a Rubicon RNSi mellett megmaradt. B) Látható, hogy a kontrollhoz (** $p = 0.0032$) hasonlóan a Rubicon RNSi háttérű sérített és séríttelen szárnyakban szignifikáns a különbség (** $p = 0.0021$), az Atg16 RNSi háttéren ($p = 0.9547$) és Atg1 RNSi háttéren ($p = 0.1434$) viszont nem. Mindegyik statisztikai elemzés Mann-Whitney teszt, kivéve a kontrollé, ami páratlan t -próbával lett elkészítve. A hibasávok a szórást jelölik, középen az átlaggal. $n = 13, 14, 18, 17, 11, 13$.

A *Rubicon RNSi* hatására nem láttunk különösebb változást a kontrollhoz képest, míg az *Atg1 RNSi* a legtöbb esetben gyengítette a kontrollban látott erős EGFP expressziós választ. Az ismétlések után is hasonló eredményeket kaptunk. Ezzel azt a következtetést vontuk le, hogy a Stat92E megfelelő működéséhez gliákban sérülés után szükség van az autofágiára, de a LAP szerepe elhanyagolható ebben az esetben. A *Rubicon RNSi*-t tartalmazó *10xStat92E-dEGFP* muslicák szárnyaiban az intenzitás sérülés után eléggé szórt, ami azzal magyarázható, hogy ez valószínűleg mindkét folyamatban érintett, csak ellentétes funkciót lát el, mert az autofágiánál általános inhibitorként működik.

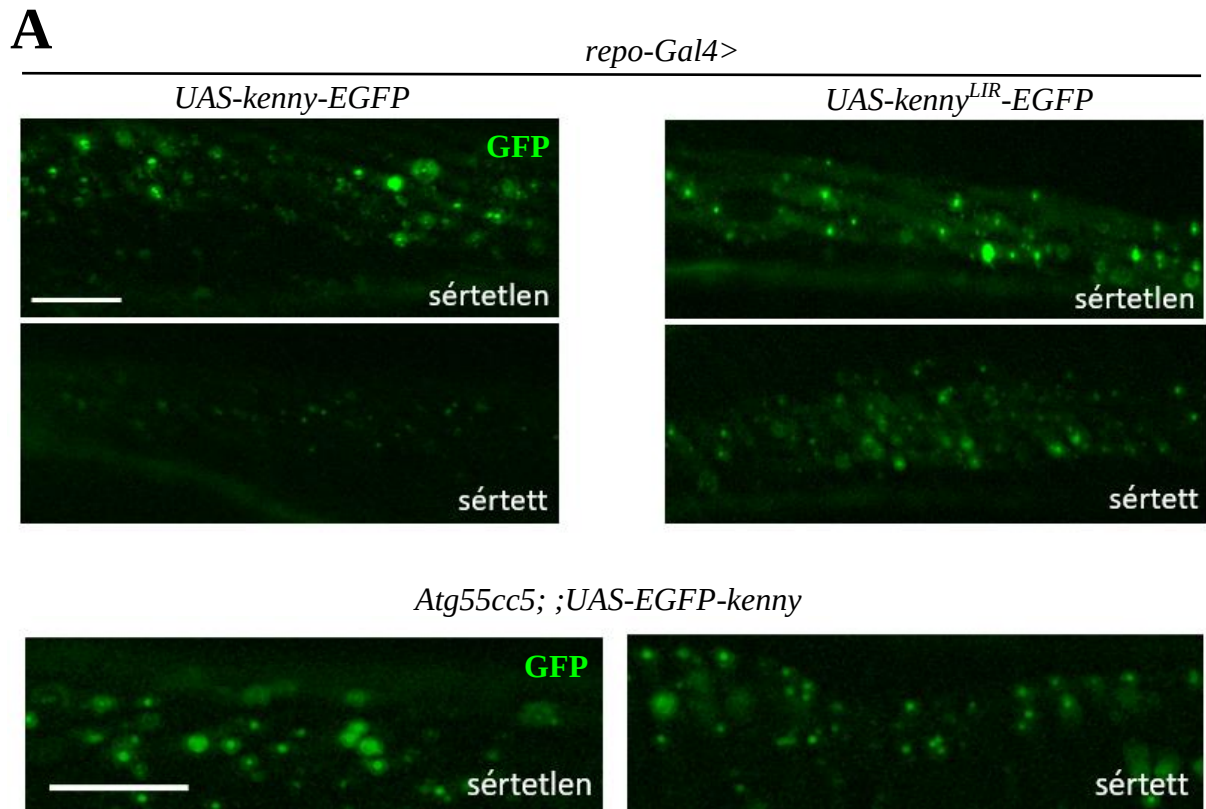
Az autofágia tehát valamilyen módon befolyásolja a Stat92E aktivitását. Úgy sejtettük, hogy ennek a hátterében valószínűleg a szelektív autofágia áll, ugyanis az képes olyan fehérjéket eltávolítani, amik LIR-motívummal rendelkező receptorokhoz vagy adaptorokhoz kapcsolódnak (maga a Stat92E nem rendelkezik ilyen motívummal). Potenciális jelöltjeink között éppen ezért olyan fehérjék jöhetnek szóba, amik valamilyen módon kapcsolatban állhatnak a Stat92E-vel. A Stat92E aktivitását befolyásolhatják más kaszkádokkal, illetve közvetlen gátlómolekulái is ismertek. Ennek fényében több olyan fehérjét is megvizsgáltunk, amiket már kapcsolatba hoztak az axonsérülés, ill. traumás agysérülés utáni gliális jelátvitellel vagy egyszerűen csak magával a Stat92E szabályozásával. A jelöltek közül a veleszületett immunitás Imd-útvonala és a Stat92E-nek egy negatív szabályozója, a Su(var)2-10 mutatott valamilyen összefüggést a Stat92E-aktivációval.

4.2 Az Imd útvonal kapcsolata a Stat92E-vel és az autofágiával

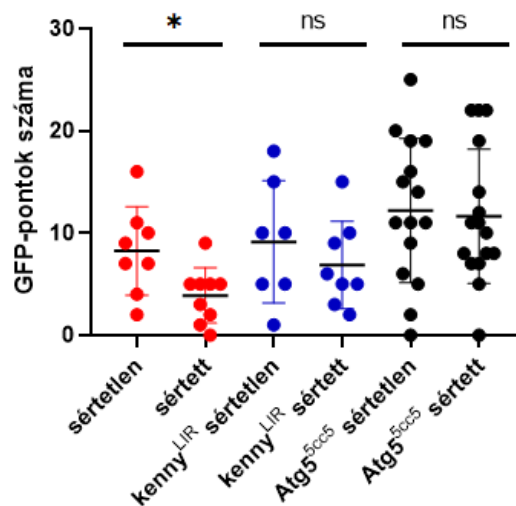
A *Drosophila* veleszületett immunitása két, antimikrobiális peptidek termelését eredményező szignalizációs útvonalon keresztül valósul meg, amik gátolják a baktériumok vagy gombák növekedését.²⁵ Az Imd út transzkripciós faktorának, a Relish-nek az aktiválásáért az IKK-komplex felelős, amelynek két tagja van: a Kenny (IKK γ) és az Ird5 (IKK β). A Kenny egy állványfehérje⁴⁴, amelyről már kimutatták, hogy rendelkezik LIR-motívummal, és a szelektív autofágia révén hozzájárul az IKK-komplex lebontásához, vagyis a Kenny-n keresztül az Ird5 is lebomlik.³⁶ Ezáltal elkerülhető az Imd útvonal túlzott aktivációja, valamint a kommenzalista baktériumok miatt létrejövő folyamatos gyulladás.

Mi arra voltunk kíváncsiak, hogy a Kenny-nek van-e valamilyen szerepe a gliákban sérülés után, illetve kapcsolatba hozható-e a Stat92E-vel. Először megvizsgáltam, hogy a gliákban

kifejeztetett UAS-EGFP-Kenny jelben megfigyelhető-e valamilyen változás sérülés után. Az EGFP jel pontok formájában volt jelen a gliasejtekben, amelyek száma az axotómia hatására szignifikánsan csökkent 3 nappal a sérülés után. Ugyanezt a kísérletet megismételtem EGFP-vel jelölt *Kenny^{LIR}* mutánsokban, illetve *UAS-EGFP-Kenny*-t tartalmazó *Atg5^{5cc5}* mutánsokban is. A szelektív autofágia bármelyik irányból történő gátlása megszüntette ezt a változást, tehát a sérülés hatására bekövetkező csökkenés előidézésben fontos szerepet játszik az autofágia. (10. ábra) A pontok, ill. a kijelölt terület összintenzitása nem mutatott konzisztens összefüggést a sérüléssel.

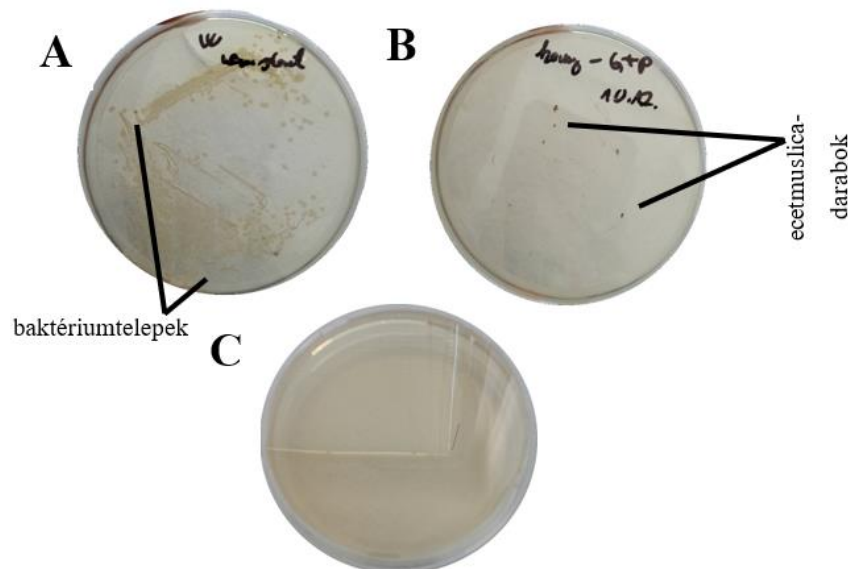


B EGFP-Kenny és EGFP-Kenny^{LIR} pontok számának változása (3 dpi)



10. ábra: A) *UAS-EGFP-Kenny* és *UAS-EGFP-Kenny^{LIR}* jel *Kenny-túltermelő* törzsek, valamint *UAS-EGFP-Kenny* jel *Atg5* mutánsok szárnyaiban (*Atg5^{5cc5}*) 3 nappal a sérülés után. Méretarányegység: 5 μ m. Az EGFP-Kenny jelben jelentős különbség látszik a sértett szárnyban a pontok számában, míg a pontok mennyiségében mutatkozó különbség az *Atg5^{5cc5}* muslicákban sokkal kisebb, hasonlóan az *UAS-EGFP-Kenny^{LIR}* pontok számbeli változásához. Az *Atg5^{5cc5}* állatokban még a *Kenny^{LIR}* mutánsoknál is több pont halmozódik fel. B) Egységnyi területen található pontok száma. A hibasávok a szórást jelölik, középen az átlaggal. Az elemzések Mann-Whitney teszttel és páratlan t-próbával lettek végrehajtva. * - szignifikáns különbség, $p < 0,05$. ns - nem szignifikáns különbség. n = 8, 9, 7, 15.

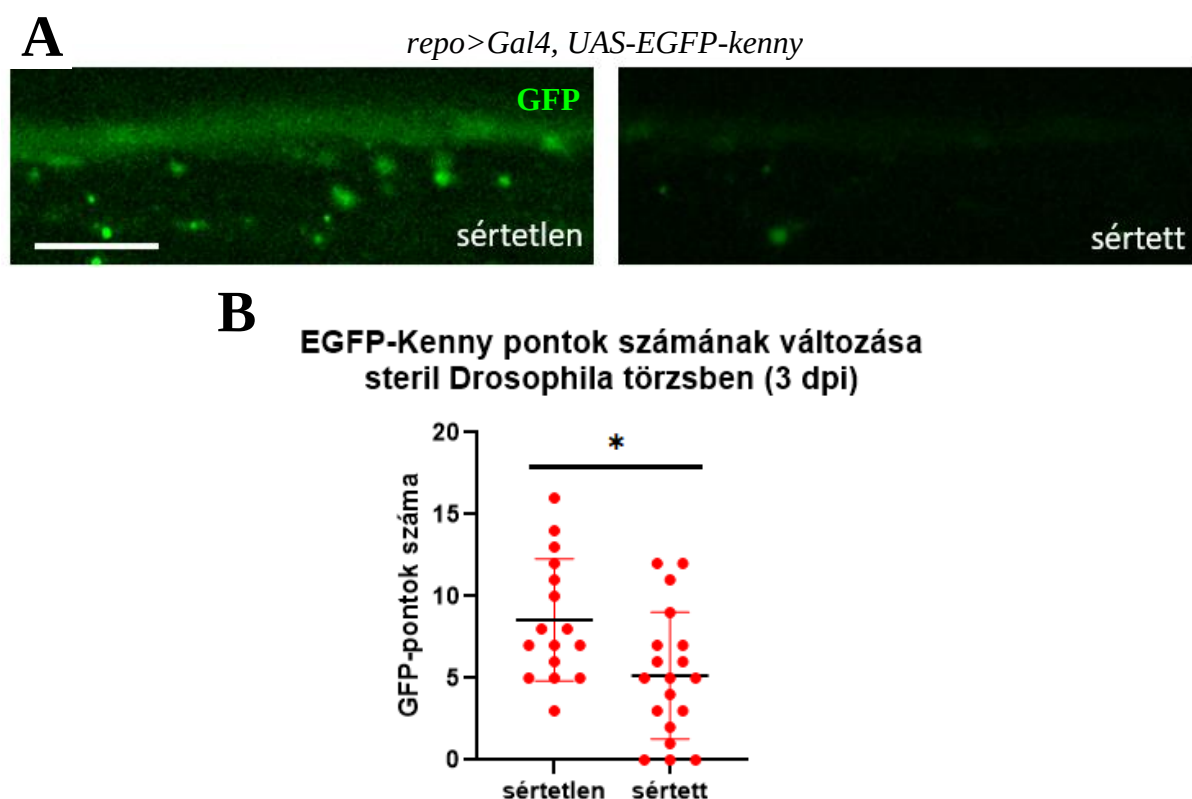
Mivel kísérleteim során invazív beavatkozás történt a szárny egy részének eltávolítása által, meg kellett győződnöm arról, hogy az eredményekben nem egy vágás hatására kialakuló fertőzés nyomát látom a gliasejtekben, hanem az axonsérülés és -degeneráció hatását. Ennek érdekében a sterilizált munkaeszközök mellett steril *UAS-EGFP-Kenny/Tm3,Sb* törzset is készítettem és a kísérletet ebben a steril, baktériummentes muslicatörzsből is elvégeztem. Ezzel ki szerettem volna zárni annak a lehetőségét, hogy a sérült szárnyba valamilyen *Drosophilában* élő vagy külső Gram-negatív baktérium jusson be, és ez váltsa ki az Imd út aktiválódását. Az antibiotikum-koktéllal etetett törzsek baktériummentességét LB táptalajon teszteltem. A sterilen tartott törzsön 1 nap múlva nem nőtt ki semmilyen baktériumtelep (11. ábra).



11. ábra: LB táptalajra kiszélesztett, *Drosophilában* élő baktériumok. Mindegyik Petri-csészén 2-2 állatot kentem szét, és egy éjszakán keresztül 37°-on tartottam a táptalajokat. A) Negatív kontroll: hagyományos, nem-steril körülmények között tartott muslicák. B) Steril

UAS-EGFP-Kenny törzs. C) Pozitív kontroll: LB, muslica nélkül. A negatív kontrollon sok telep látszódik, míg az UAS-EGFP-Kenny-n a szétkent mintán kívül semmi.

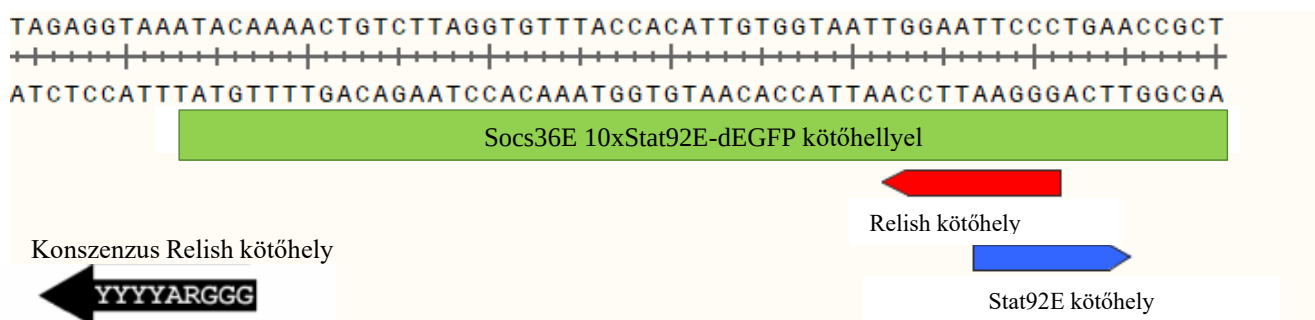
Végül ebben a steril környezetben végrehajtott kísérlet során is ugyanazt az eredményt kaptam, mint hagyományosan nevelt állatok esetében, ami igazolja, hogy valóban az axonsérülés hatását látjuk a gliális EGFP-Kenny jel csökkenésében (12. ábra).



12. ábra: A) Steril körülmények között tartott és vágott steril törzs UAS-EGFP-Kenny jele gliákban sértetlen és sértett állapotban. Méretarányegység: 5 μ m. B) Egységyi területen található EGFP-Kenny-pontok száma 3 nappal a steril muslicatörzs sértése után szárnyban. A hibasávok a szórást jelölik, középen az átlaggal. Láthatjuk, hogy a sértetlen és sértett pontok számában szignifikáns különbség van; egy csökkenő tendencia figyelhető meg. A hibasávok a szórást jelölik, középen az átlaggal. A statisztikai elemzés Mann-Whitney teszttel készült. A számolt $*p = 0.0125$. $n = 16, 19$.

Mivel az autofágia gén-, valamint LIR-mutánsokban nem látható ez a csökkenés, valószínűleg az autofágia intenzívebbé válása okozza az UAS-EGFP-Kenny jel csökkenést. Szerettük volna kideríteni, hogy ennek a változásnak az Imd útvonalon keresztül van-e valamilyen hatása a Stat92E-re. Felvetődött bennünk, hogy a Kenny-n keresztül esetleg az Imd útvonal

aktivitásának csökkenésére is szükség van ahhoz, hogy a Stat92E aktiválódjon, és el tudja látni a feladatát. A hipotézist tovább erősítette, hogy *Drosophila* S2-sejtekben már korábban mutattak ki olyan célgéneket (pl. antimikrobiális peptideket), amelyek szabályozó régiójában átfedő Relish és Stat92E-kötőhelyek vannak, amelyek antagonisztikusan hatnak: a Stat92E túltermelése csökkenti bizonyos antimikrobiális peptidek termelődését (pl. az Attacin A-ét), amit vad típusú állatokban a Relish aktivál.²⁶ Miután megvizsgáltuk a Stat92E riportergénjét, amely a *Socs36E* regulátor régióján alapul, mi is találtunk a *Socs36E* Stat92E-kötőhelyein több olyan átfedő régiót, ami potenciális Relish kötőhely, mivel a konszenzus NF- κ B motívumnak felel meg (13. ábra).



13. ábra: A 10xStat92E-dGFP riportergénjének (a *SOCS36E*-nek) Stat92E kötőhelyén egy potenciális Relish kötőhely látható, amik átfednek egymással. A bal alsó sarokban lévő fekete nyíl a Relish konszenzus szekvenciáját tartalmazza.²⁶

Ennek érdekében megfigyeltem a Stat92E-jelet olyan ecetmulicákban is, amelyekben túl volt termelve a Relish aktív, N-terminális része a Gal4-UAS rendszerrel. A konstitutívan aktív Relish által okozott letalitás elkerülése végett a kísérleteket *repo-Gal4*, *tubulin-Gal80^{ts}* háttéren végeztem el az expresszió adult-specifikus kondicionális aktiválásával. Várakozásaink ellenére azonban a UAS-Relish^N nem csökkentette, hanem inkább növelte a 10xStat92E-dEGFP jel intenzitását, ami szignifikánsan nagyobb volt a kontrolléhoz képest. (14. ábra)

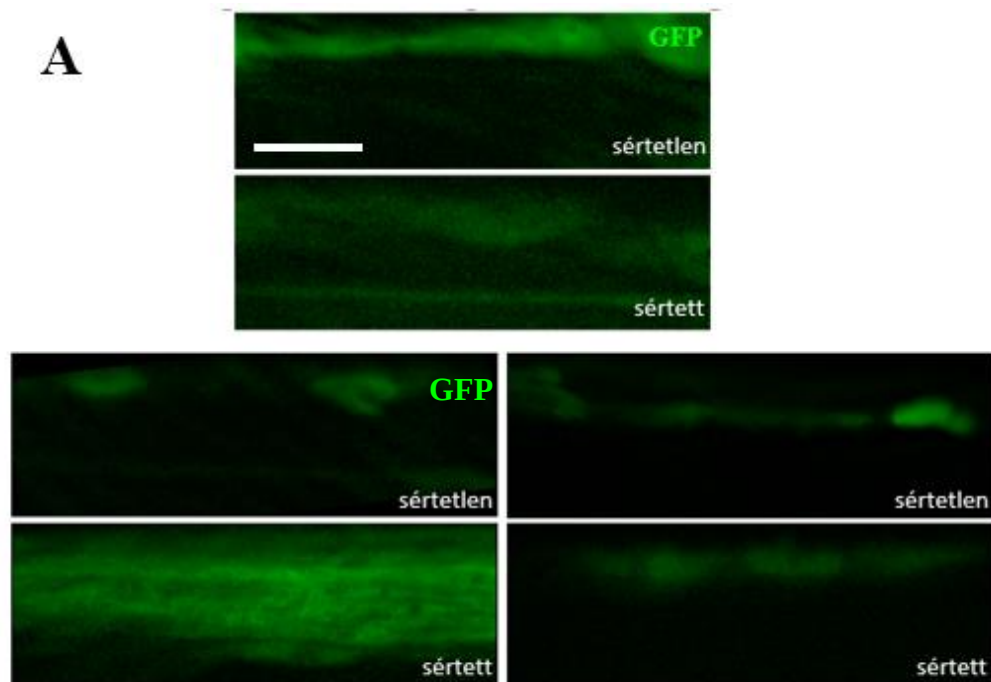
Megállapíthatjuk, hogy a Relish valóban hatással van a Stat92E aktivitására, de ez nem egy negatív, hanem egy pozitív kölcsönhatás, így a Kenny autofágia által történő lebontása nem magyarázza a megfigyelt Stat92E inaktivitást autofágia defektus esetén. A Kenny jelben megfigyelhető csökkenés valószínűleg az autofágia általános serkenésének tudható be.

4.3 Su(var)2-10 kapcsolata a Stat92E-vel és az autofágiával

A következőkben a Stat92E negatív szabályozófehérjéit vettük inkább górcső alá, mivel ha ezen fehérjék közül valamelyik sérülés során is szabályozza gliákban a Stat92E aktivitását, akkor az valószínűleg a szabályozó elem szintjének csökkenésén keresztül valósul meg. Így megvizsgáltuk, hogy jelöltjeink közül melyiknek a csendesítése vagy túltermelése okoz különbséget a Stat92E aktivitásában.

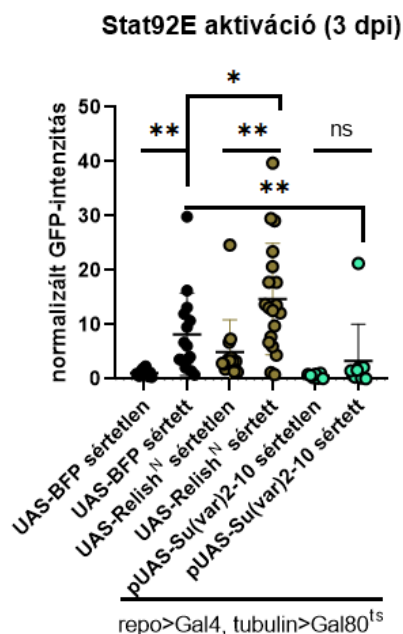
A megvizsgált fehérjék közül a *Ptp61F* (a Stat92E egy negatív regulátora) csendesítésének és túltermelésének, az *Ack* RNSi-nek, az *Src64b* RNSi-nek, a *FER* túltermelésének, illetve a *kenny* RNSi-nek és túltermelésének nem volt szignifikáns hatása a Stat92E aktivitására. Az *imd* RNSi hatása alacsonyabb Stat92E jelet eredményezett, de az ismételések során már nem okozott szignifikáns különbséget a kontrollhoz képest. A Su(var)2-10 SUMO ligáznak, a Stat92E negatív regulátorának⁴⁵ a szintje erősen befolyásolta a *10xStat92E-dEGFP* jel intenzitását sérülés után. A Su(var)2-10 túltermelés általi letalítás elkerülése végett a kísérleteket itt is *repo-Gal4*, *tubulin-Gal80^{ts}* háttéren végeztem. Túltermelés hatására csökkent a Stat92E-aktivitás (14. ábra), a *Su(var)2-10^{RNSi}* pedig növelte a jelintenzitást fokozódását a szárny gliasejtjeiben sérülést követően (15. ábra). Ugyan a Su(var)2-10 túltermelő konstrukt nőstény csíravonalban expresszáldó UAS-t (UASp-t) tartalmazott, bizonyos esetekben szomatikus szövetben is működhet.

10xStat92E-dEGFP;repo-Gal4,tubulin-Gal80^{ts}>UAS-BFP



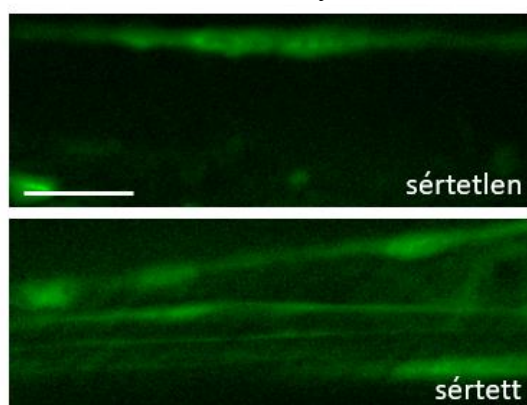
10xStat92E-dEGFP;repo-Gal4,tubulin-Gal80^{ts}> UAS-Relish^N *10xStat92E-dEGFP;repo-Gal4,tubulin-Gal80^{ts}> UASp-Su(var)2-10*

B

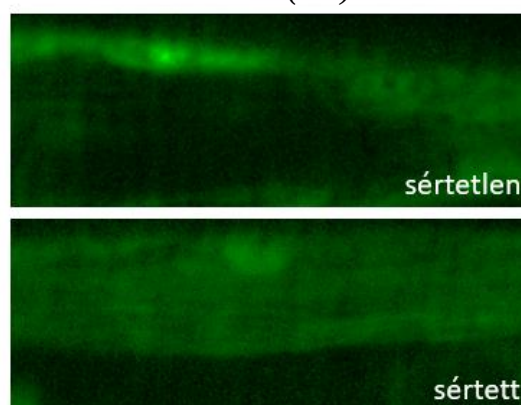


14. ábra: A) *Relish^N* és *Su(var)2-10* túltermelés hatása a *Stat92E* aktivitására. Méretarányegység: 5 μ m. Kontrollként UAS-BFP-t fejeztettünk ki gliákban. A tubulin-Gal80^{ts}-et tartalmazó, gliában túltermelő állatok *Stat92E* jel intenzitása sérülés után gyengébb a korábbi kontrollokhoz képest, feltehetőleg a tubulin-Gal80^{ts} konstruktt miatt, de a sértetlen szárnyakhoz képest még mindig szignifikánsan nagyobb. Az adult állatokat 29 °C-on inkubáltuk. A *Relish^N* túltermelés serkentette, a *Su(var)* túltermelés gyengítette a jelet. B) Az adatok páratlan *t*-próbával és Mann-Whitney teszttel végzett statisztikai elemzése. ***p*(kontroll) = 0.0051, ***p*(*Relish^N*) = 0.0014, ***p* (BFP és *Su(var)2-10* sértett) = 0.0083. **p* = 0.0488. *n* = 11, 15, 14, 19, 7, 9. A hibasávok a szórást jelölik, középen az átlaggal.

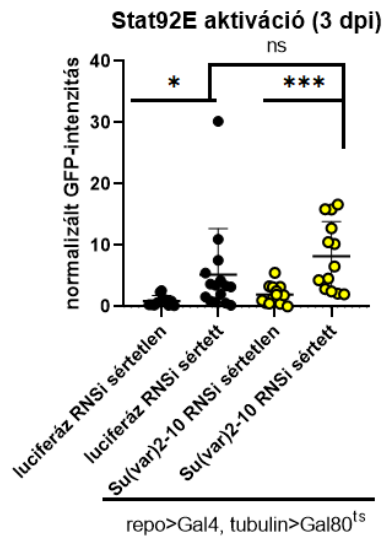
A 10xStat92E-dEGFP;repo-Gal4,
tubulin-Gal80^{ts}> luciferáz RNSi



10xStat92E-dEGFP;repo-Gal4,
tubulin-Gal80^{ts}> *Su(var)2-10* RNSi



B



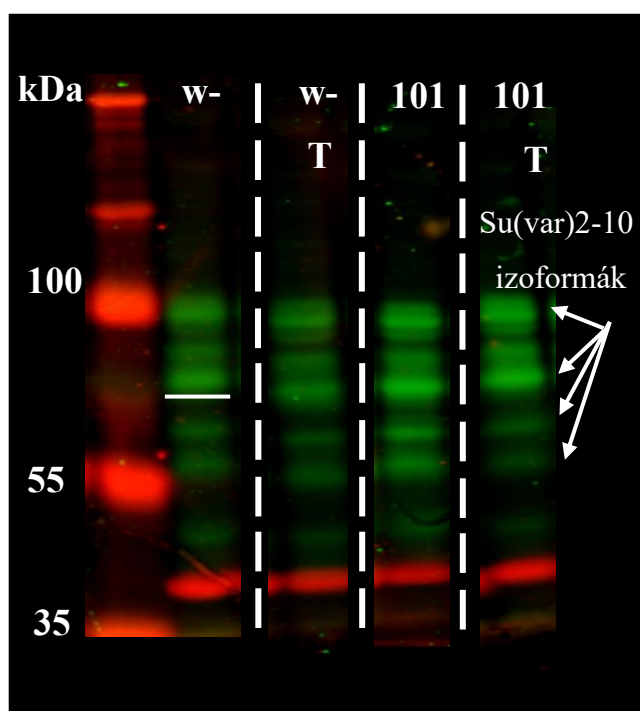
15. ábra: A) Stat92E aktiváció három nappal a sérülés után 29 °C-on nőstény egyedekben luciferáz RNSi és Su(var)2-10 RNSi háttéren. Méretarányegység: 5 μ m. B) Az Su(var)2-10 RNSi-ben az intenzitás sérülés után nagyobb volt, mint a kontrollban, de a luciferáz RNSi outlier értéke miatt nem lett szignifikáns. p (luciferáz RNSi sértett – Su(var)2-10 RNSi sértett) = 0.0581. Viszont a sértetlen és sértett szárnyak között a Su(var)2-10 RNSi háttéren sokkal kisebb a p -érték ($***p = 0.0008$), mint a kontrollnál ($*p = 0.0045$) és jóval nagyobb a változás mértéke is. $n = 11, 15, 13$.

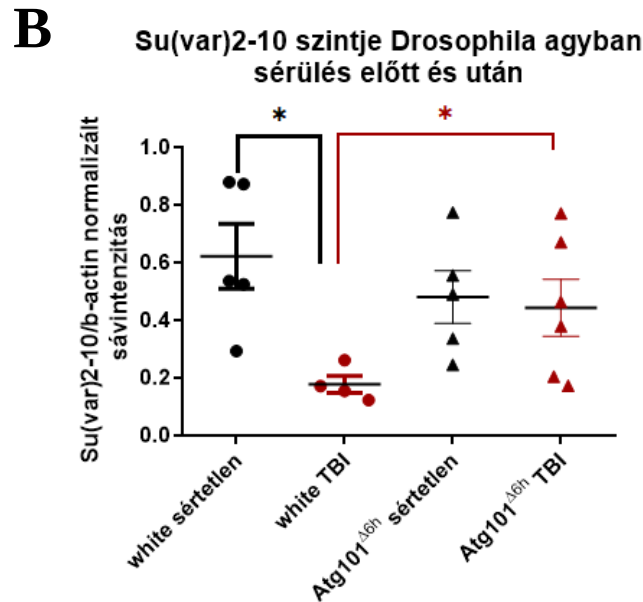
Mivel a Su(var)2-10 szintjének a változása az autofágia aktivitásával ellentétes módon befolyásolta a Stat92E riporter intenzitást, kíváncsiak voltunk, hogy a Su(var)2-10 szintjének esetleges csökkenése sérülés után autofágia általi lebontással valósul-e meg. Ehhez Western blot analízist végeztünk a Su(var)2-10 fehérjén. A sérülés hatását ezúttal nem *Drosophila*-szárnyban vizsgáltuk, hanem fejen. Az agy axonjainak szakadása ugyanis egy traumás agysérülés (TBI) modellben könnyen előidézhető és az agy több sejtet is tartalmaz, mint a szárny, tehát kevesebb mintával megbízhatóan elvégezhető a Western blot. A sértetlen és TBI-n átesett muslicáknak csak a fejét használtuk fel, hogy elsősorban az agyban bekövetkező változásokat tudjuk megvizsgálni a fehérjék szintjén. Ez szövet- vagy sejtspecifikus (pl. gliaspecifikus) vizsgálatra nem alkalmas, de jó kiindulási pontja lehet ennél precízebb, alaposabb vizsgálatoknak (pl. immunohisztokémiai kísérleteknek), illetve izoformák vizsgálatára is alkalmas. A kontrollt egy *white (w)* törzs képezte, az autofágia-deficienciát pedig

Atg101 null mutánsok alkalmazásával értük el, amely az iniciációs komplex nélkülözhetetlen tagja.

A Su(var)2-10 ellenanyag 7-8 sávot ismert fel fejextrakton, amelyek megfeleltethetők a prediktált vagy már leírt Su(var)2-10 izoformáknak.⁴⁶ A legszembetűnőbb volt az a tendencia, ami sérülés után volt látható *w* muslicák agyában, vagyis a Su(var)2-10 mennyiségének szignifikáns csökkenése a TBI hatására. Ez különösen igaz volt a domináns, 80 kDa-nál futó Su(var)2-10 izoformára. Ugyanakkor az *Atg101* autofág mutánsban ez a csökkenés nagyon kis mértékű, és szinte teljesen elveszik. Sértett *Atg101* mutánsokban szignifikánsan nagyobb volt a Su(var)2-10 szintje, mint a sértett *w*-ban, vagyis az autofágia hiányában sokkal több lesz a Su(var)2-10 sérülés után (16. ábra). Ez a Stat92E aktivitásának csökkenését okozhatja, mivel a Su(var)2-10 a Stat92E represszora és a fenotípus szintjén is azt láttuk, hogy a Su(var)2-10 túltermelése kisebb 10xStat92E-dEGFP jelet eredményezett. (14. ábra). A sértetlen állatoknál nem volt Su(var)2-10 fehérjeszint-növekedés az *Atg101* mutánsban. A kísérletet többször is elvégeztük, és mindegyik esetben látszódott ez a tendencia. Idegi sérülések után a Su(var)2-10 megfelelő szintre hangolásában tehát fontos szerepe lehet az autofágiának, valószínűleg annak közvetett vagy közvetlen lebontásán keresztül.

A





16. ábra: Western blot sértetlen és TBI-zett állatokon. A) w^- = kontroll, 101 = $Atg101^{\Delta 6h}$, T = TBI. Zöld: Su(var)2-10. Piros: β -aktin. A Su(var)2-10 több izoformája is megjelent a membránon, amiből a legtöbb 55 kDa és 100 kDa között helyezkedett el. Mi a legvastagabb sávot választottuk ki (fehér aláhúzás) kb. 80 kDa-nál, mert abban látszódtott különbség. B) A β -aktin szintjére normalizált Su(var)2-10 szintje sérülés után látványos szignifikáns csökkenést mutatott TBI után ($*p = 0.0114$), míg az $Atg101$ mutánsokban ez nem történt meg. A sértett kontroll és sértett $Atg101$ mutáns között szignifikáns különbség mutatkozott ($*p = 0.0338$). A white TBI és az $Atg101$ TBI között csak egyoldalas (one-tailed) páratlan t -tesztet alkalmaztam, mivel a változás elfogadható irányát előre meghatároztuk. A hibasávok a szórást jelölik, középen az átlaggal. $n = 6, 4, 5$.

5. DISZKUSSZIÓ

Axonsérülés hatására Waller-féle degeneráció megy végbe, ami az érintett neuronális sejtek sérüléstől disztális részének teljes pusztulását jelenti.² A fragmentálódott axon eltakarítását a gliasejtek végzik *Drosophilában* és részben emlősökben is. A felszabaduló törmelék felvételében a Draper fagocitikus receptor vesz részt *Drosophilában*. Előzetes eredményeink az sugallják, hogy a Draper aktiválja a LAP-ot, amin keresztül az axonfragmentumok a lizoszómába jutnak, majd ott degradálódnak.⁶ Ennek köszönhetően a sérülés közelebbi és távolabbi pontjain elhelyezkedő sértetlen sejtek megmenekülhetnek, mert nem pusztulnak el egy kiterjedő és sokáig fennmaradó gyulladás során, valamint a regenerációs folyamatok is könnyebben végbe tudnak menni.

A *draper* gén nagyfokú átírása axonsérülés során a Draper-Src42a-Shark-Rac1-Stat92E-*draper* aktivációs kaszkádon keresztül valósul meg, ami tulajdonképpen egy pozitív feedback hurok. A gliasejtek felszínén sérülés előtti állapotban is található Draper fehérjék, és a korai axontörmelék fagocitózisa ezeken keresztül valósul meg. Ezután a Draper-Src42a-Shark-Rac1-Stat92E szignalizációs út aktiválásával felkészül a gliasejt a többi axontörmelék nagymértékű és gyors eltávolítására a *draper* expressziós szintjének hirtelen növelésével.¹⁶ A *draper* gén átírását a Stat92E közvetlenül fokozza, annak promóterrégiójához kötődve. A gliákban az axondegenerációs folyamat során a *draper* mellett még számos gén aktivációja megtörténik. *Drosophila* gliasejtekben az MMP-k szintje is megnő, miközben a Stat92E és a JNK útvonal is aktiválódik, ugyanis a Stat92E és a dAP-1 transzkripció faktor együttes jelenlétére van szükség ezen gének nagyfokú átírásához.^{11,16,38} Ezt a folyamatot a Rac1 által szabályozott morfológiai változásokkal együtt gliális aktivációnak hívjuk, amely emlős mikrogliákban is jelen van és funkcionálisan kevésbé megértett. A gliális aktiváció túlműködése hosszútávú neuroinflammációhoz és neurodegenerációhoz vezethet.

Kísérleteink során először azt a kérdést szeretnénk volna körbejárni, hogy a LAP vagy a kanonikus autofágia hozzájárul-e a Draper-Src42a-Shark-Rac1-Stat92E szignalizációs út vagy a JNK útvonal aktiválásához. Kíváncsiak voltunk, hogy a kezdeti Draper-szint által beinduló LC3-asszociált fagocitózis segíti-e a Stat92E aktiválását, és ezáltal a *draper* átírását vagy a JNK útvonalat. Ehhez az *Atg5* gliákban történő csendesítése mellett megvizsgáltuk a dAP-1 és a Stat92E aktivitását a *TRE-EGFP;repo-Gal4* és a *10xStat92E-dEGFP;repo-Gal4* riporterkonstrukción keresztül szárnyban bekövetkező sérülés után 3 nappal. Az axotómia után normál esetben mindkettő riporternek megnő a szintje a gliákban. Az *Atg5* RNSi hatására nem csökkent a TRE-EGFP fluoreszcens jel szintje vágás után, sőt inkább nagyobb lett a kontrollhoz képest. A Stat92E aktivitása ezzel szemben lecsökkent, és már nem volt megfigyelhető

szignifikáns változás a sértetlen és sértett szárnyakban mérhető jelintenzitás között. Ugyanezt a kísérletet elvégeztük *Atg16 RNSi* háttéren is a Stat92E riporterével, ami ugyanazt az eredményt adta, mint az *Atg5* csendesítés.

Az *Atg5* és az *Atg16* a kanonikus autofágiához és a LAP-hoz is nélkülözhetetlen az *Atg8a* membránba történő konjugációját végezve³¹, ezért azt szerettük volna először kideríteni, hogy melyik folyamat érintett a Stat92E aktivációjában. Ehhez külön-külön kísérletekben leütöttük a *Rubicon*-t és az *Atg1*-et. A *Rubicon*ra csak a LAP-ban van szükség, az *Atg1* pedig egy olyan autofág fehérjének a génje, ami csak az autofágia iniciációjában vesz részt, de a LAP-ban nem. Az eredmények azt mutatták, hogy a *Rubicon* csendesítésének nincsen jelentős hatása a Stat92E aktivációjában. Az *Atg1* csendesítés ezzel szemben többszöri ismétlés után is jelentős csökkenést mutatott a *10xStat92E-dEGFP* jelben sérülés után, vagyis a sértetlen és sértett szárnyak között nem volt szignifikáns intenzitásnövekedés 3 nappal a sérülés után gliákban. Az axontörmelék eltakarítását a LAP végzi, azonban előző kísérleteink arra utalnak, hogy a Stat szignalizáció esetében a kanonikus autofágiának egy közvetett hatását figyelhetjük meg, ami más regulátorokon vagy szignalizációs utakon keresztül hathat.

Melyek lehetnek az autofágia által szabályozott, a Stat92E-re ható fehérjék? Az autofágia szabályozott módon képes egyes molekulák célzott lebontására a szelektív autofágián keresztül. Egyre több fehérjéről derül ki, hogy rendelkeznek olyan motívummal vagy jól szabályozható poszttranszlációs módosítással, amik ezt segítik elő.³⁵ Kitüntetett figyelmet fordítottunk a Kenny fehérjének, ami az Imd útvonal IKK kinázkomplexének az egyik tagja, és a veleszületett immunfolyamatok része. Kiderült, hogy a Kenny rendelkezik egy LIR-motívummal, és azon keresztül részt vesz az IKK komplex degradációjában.³⁶ Ez megakadályozza a túl erős és folyamatos immunválaszt a zsírtestben, a kommenzális baktériumok jelenlétében. Mivel agyban előidézett TBI esetében már megfigyelték, hogy az Imd útvonal egyes célfehérjéi is aktiválódnak gliákban⁴⁷, kíváncsiak voltunk arra, hogy a szárnyban bekövetkező sérülés során van-e valamilyen szerepe az autofágiának a Kenny-n keresztül a gliasejteknél. Az UAS-EGFP-Kenny pontok formájában volt jelen a szárny gliáiban, ezért a pontok számában vizsgáltam a változást. Érdekes módon 1 és 2 nap után még nem, de 3 nappal a sérülés után már szignifikáns csökkenés mutatkozott az UAS-EGFP-Kenny jelben. A kísérletet steril körülmények között, mikrobiálisan steril muslicatörzzsel is elvégeztem, ami ugyanezt az eredményt adta. A Kenny-jel csökkenését tehát nem külső vagy belső fertőzés okozta, hanem az axonsérülés. A LIR-mutáns UAS-EGFP-Kenny^{LIR} esetében, illetve az UAS-EGFP-Kenny-nél *Atg5* mutáns háttéren nem láttunk szignifikáns csökkenést a pontok számában, tehát a csökkenés egy része az autofágiának köszönhető. Ezután megvizsgáltuk, hogy ezen útvonal negatív manipulálása

okoz-e valamilyen változást a Stat92E jelben. A *kenny* és *ird5* (az IKK komplex másik tagjának) külön-külön történő csendesítése nem változtatta meg jelentősen a Stat92E aktivitását. Mivel mindkét fehérje egy komplex része, a sztöchiometriai viszonyok miatt nem is biztos, hogy jelentős gátlás alá került az Imd útvonala. Ennek kiküszöbölésére az IKK által aktivált Relish transzkripciós faktor aktív fragmentjének a túltermelése mellett is megvizsgáltam a Stat92E aktivitását. Mivel az autofágia sérülés hatására csökkentette a *Kenny* szintjét, és azt már tudtuk, hogy az autofágia szükséges a Stat92E megfelelő szintű aktiválódásához, azt vártuk, hogy a Relish túltermelése a Stat92E jelben csökkenést fog eredményezni a sértett szárny gliáiban. Ezt a hipotézist támogatták azok az eredmények is, amelyek a Stat92E és a Relish antagonista szerepét bizonyították fertőzés során *Drosophila* S2 sejtekben. Emellett a *10xStat92E-dEGFP* riporterkonstrukció Stat92E kötőhelyei (amik a *Socs36E* célgénből származnak) potenciális Relish kötőhelyekkel is átfednek, hasonlóan ahogyan azt az S2 sejteken látták bakteriális fertőzés során.²⁶ Ez a hipotézis viszont megdőlt, a Relish túltermelése ugyanis szignifikáns emelkedést mutatott a *10xStat92E-dEGFP* intenzitásában sérülés után 3 nappal. A *Kenny* egy részének autofágia által történő lebontása tehát nem azt a célt szolgálja, hogy a Stat92E felszabaduljon egy gátlás alól, és ezáltal aktívabb lehessen, hiszen úgy tűnik, hogy az útvonala inkább együttműködik a Stat92E-vel. Ez sem egy teljesen új jelenség az irodalomban, ugyanis vannak olyan gének, amelyeknek az expressziós szintje csak akkor nő meg jelentősen, ha a Stat92E és a Relish transzkripciós faktor is jelen van. Ilyen például a *totA*, aminek expresszióját a hemocitákban szeptikus sérülés hatására a Stat92E és a Relish is serkenti.²⁷ A *Kenny* szelektív autofágia által történő lebontása valószínűleg inkább az autofágia általános serkenésének tudható be sérülés után. Mivel a LIR- és autofág mutánsokban is van kis mértékű csökkenés a *Kenny*-pontok számában, előfordulhat, hogy a csökkenés másik része a *Kenny* mobilizációjának köszönhető, amely során a Relish-t is aktiválja. Az is lehetséges, hogy a *Kenny* nem a Relish-en, hanem más faktorokon keresztül hat a Stat92E működésére. A további megvizsgált, a Draper alatt, az autofágiában, illetve a Stat92E felett ható fehérjék közül a Ref(2)P, az Ack, a Ptp61F, az Src64b és a FER fehérjék RNS-szinten történő manipulálása nem eredményezett szignifikáns változást a Stat92E aktivitásában. A *Su(var)2-10* SUMO ligáz túltermelése mellett viszont már szignifikánsan alacsonyabb aktivitást kaptunk a sértett szárnyban gliákban a kontrollhoz képest, míg a *Su(var)2-10* RNSi háttérén vizsgált aktivitás erősebb lett. Kíváncsiak voltunk arra, hogy az autofágia vajon hatással lehet-e a *Su(var)2-10* szintjére sérülés után, mivel a *10xStat92E-dEGFP* jel intenzitásának a változása ellentétesen alakult a sérülés során autofág gének RNS-interferenciája és a *Su(var)2-10* csendesítése mellett. Mivel a *Su(var)2-10* a Stat92E negatív regulátora, elképzelhető, hogy

gliális sejtekben is hatással van a fehérjére. Emellett nemrég kimutatták, hogy a Relish is képes SUMOilálódni a Su(var)2-10 által, ami a Stat92E-hez hasonlóan itt is negatívan hat a transzkripciós faktor aktivitására.⁴⁸ *Drosophila* fejekben vizsgáltuk meg a Su(var)2-10 szintjének változását Western blottal. A sértett állatokban TBI-vel idéztünk elő axonsérülést. A kvantifikáció során kiderült, hogy a Su(var)2-10 szintje a sértett állatok fejében szignifikánsan alacsonyabb, vagyis a sérülés hatására lecsökken. Ez a csökkenés viszont már nem volt szignifikáns az *Atg101* autofág mutánsban. Ez alapján feltételezhetjük, hogy a Su(var)2-10 csökkenése az autofágián keresztül valósul meg.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a Stat92E aktiválásában kulcsfontosságú szerepet tölt be a kanonikus autofágia. Az eredmények alapján feltételezzük, hogy az autofágia a Su(var)2-10 negatív Stat92E regulátor lebontásán vagy represszióján keresztül fejt ki pozitív hatását. A Stat92E aktivitásának növelésében az autofágia mellett az Imd útvonal Relish transzkripciós faktora is részt vesz. A Su(var)2-10 autoSUMOilációs aktivitása és lehetséges SUMO-függő poliubiquitilációja felveti a szelektív autofágia szerepét a Su(var)2-10 lebontásában.

A jövőben ezen eredményeket szeretnénk megerősíteni többféle megközelítésből. A Su(var)2-10 gliaspecifikus mennyiségbeli változását immunfestéssel fogjuk megvizsgálni. A Su(var)2-10 túltermelését az UASp csíravonalban is aktív enhancer-promóter alkalmazása helyett szomatikus sejtekben megfelelően expresszálandó konstrukttal fogjuk elérni transzgén bejuttatásával. Mindemellett a *kenny*, valamint az *Ack* túltermeléséhez és mRFP1-gyel való jelöléséhez is készítünk jelenleg egy-egy túltermelő törzset. Az *Ack* az emlős Stat-ok egyik kináza.⁴⁹ A Relish hiányának hatását domináns negatív mutánsok alkalmazásával transzheterozigótákban fogjuk vizsgálni. A Stat92E-nek és a Relish-nek egy már bizonyított és leírt közös célgénjéről átíródó fehérjét, a Listericin-t is EGFP-vel fogjuk jelölni egy transzgenikus muslicatörzsben. A *draper* gén transzkripcióját sérülés után egy általunk gyártott *drpr-Gal4* által hajtott destabilizált GFP-vel fogjuk mérni. Végül a gliákban sérülésre aktiválódó Stat92E, Draper, autofágia és Imd útvonal közötti kapcsolatok további megismerését szárny RNS-szekvenálással fogjuk támogatni.

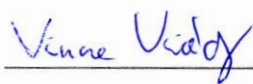
6. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott **Vincze Virág** nyilatkozom, hogy a 36. OTDK-ra benyújtott „**Az axonsérülésre aktiválódó Stat92E transzkripciós faktor kapcsolata az autofágiával és a veleszületett immunitással *Drosophila* gliasejtekben**” című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Részfeladat	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán jellemezve)
Rekombináns törzsek létrehozása	3
Szüzek gyűjtése	4
Keresztezések összeállítása a kísérletekhez	5
Steril <i>Drosophila</i> törzs elkészítése	5
Antibiotikum-koktél elkészítése a steril <i>Drosophila</i> táptalajhoz	5
Szárnyak vágása (axotómia)	5
Mikroszkópos vizsgálatok	5
Adatok kiértékelése és statisztikai feldolgozása	4
Mintagyűjtés és mintaelőkészítés a Western blothoz	4
Western blot	4

Kelt: Szeged, 2022. november 14.

A nyilatkozatban foglaltak helyességét
megerősítem:



Pályamunkát benyújtó hallgató (Vincze Virág)
aláírása



Témavezető (Dr. Szabó Áron, Szegedi Biológiai
Kutatóközpont) aláírása

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Szabó Áronnak a folyamatos segítségért, visszajelzésekért és szakmai támogatásért. Köszönettel tartozom még Dr. Juhász Gábor csoportvezetőnek szakmai utam támogatásért, Esküdt Zsombornak a kísérletek lebonyolításában és az eredmények kiértékelésében való segédkezésért; Bozsó Szilviának a technikai segítségért; és a Lizoszómális Degradáció Kutatócsoport többi tagjának, hogy bármikor számíthattam rájuk. Köszönöm a lelki támogatást a családomnak és páromnak, Dr. Bakacsy Lászlónak. Jelen TDK dolgozat elkészítését az Emberi Erőforrások Minisztérium NTP-NFTÖ-22-B-0055 számú pályázata támogatta.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Inserra, C. J. & DeVrieze, B. W. *Chronic Traumatic Encephalopathy*.
2. Conforti, L., Gilley, J. & Coleman, M. P. Wallerian degeneration: An emerging axon death pathway linking injury and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**, 394–409 (2014).
3. Koeppen, A. H. Wallerian degeneration: History and clinical significance. *J. Neurol. Sci.* **220**, 115–117 (2004).
4. Neukomm, L. J. & Freeman, M. R. Diverse cellular and molecular modes of axon

- degeneration. *Bone* **23**, 237–337 (2014).
5. MacDonald, J. M. *et al.* The Drosophila Cell Corpse Engulfment Receptor Draper Mediates Glial Clearance of Severed Axons. *Neuron* **50**, 869–881 (2006).
 6. Szabo, A. *et al.* LC3-associated phagocytosis promotes glial degradation of axon debris after injury (preprint). *Res. Sq.* (2022).
 7. Wyss-Coray, T. & Mucke, L. Inflammation in neurodegenerative disease - A double-edged sword. *Neuron* **35**, 419–432 (2002).
 8. Grajchen, E. *et al.* CD36-mediated uptake of myelin debris by macrophages and microglia reduces neuroinflammation. *J. Neuroinflammation* **17**, 1–14 (2020).
 9. Zhou, Z., Hartweg, E. & Horvitz, H. R. CED-1 is a transmembrane receptor that mediates cell corpse engulfment in *C. elegans*. *Cell* **104**, 43–56 (2001).
 10. Manaka, J. *et al.* Draper-mediated and phosphatidylserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by Drosophila hemocytes/macrophages. *J. Biol. Chem.* **279**, 48466–48476 (2004).
 11. Etchegaray, J. I. *et al.* Draper acts through the JNK pathway to control synchronous engulfment of dying germline cells by follicular epithelial cells. *Dev.* **139**, 4029–4039 (2012).
 12. Logan, M. A. *et al.* Negative regulation of glial engulfment activity by Draper terminates glial responses to axon injury. *Nat. Neurosci.* **15**, 722–730 (2012).
 13. Sanjuan, M. A. *et al.* Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* **450**, 1253–1257 (2007).
 14. Martinez, J. *et al.* Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)-associated phagocytosis is required for the efficient clearance of dead cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 17396–17401 (2011).
 15. Boada-Romero, E., Martinez, J., Heckmann, B. L. & Green, D. R. The clearance of dead cells by efferocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 398–414 (2020).
 16. Doherty, J. *et al.* PI3K Signaling and Stat92E Converge to Modulate Glial Responsiveness to Axonal Injury. *PLoS Biol.* **12**, (2014).
 17. Musashe, D. T., Purice, M. D., Speese, S. D., Doherty, J. & Logan, M. A. Insulin-like Signaling Promotes Glial Phagocytic Clearance of Degenerating Axons through Regulation of Draper. *Cell Rep.* **16**, 1838–1850 (2016).
 18. Flybase. Stat92E. <http://flybase.org/reports/FBgn0016917>.
 19. Zeidler, M. P., Bach, E. A. & Perrimon, N. The roles of the Drosophila JAK/STAT pathway. *Oncogene* **19**, 2598–2606 (2000).

20. Ziegenfuss, J. S. *et al.* Draper-dependent glial phagocytic activity is mediated by Src and Syk family kinase signalling. *Nature* **453**, 935–939 (2008).
21. Lu, T. Y., Doherty, J. & Freeman, M. R. DRK/DOS/SOS converge with Crk/Mbc/dCed-12 to activate Rac1 during glial engulfment of axonal debris. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 12544–12549 (2014).
22. Lu, T. Y. *et al.* Axon degeneration induces glial responses through Draper-TRAF4-JNK signalling. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
23. Flybase. InR. <http://flybase.org/reports/FBgn0283499>.
24. Bolívar, S. *et al.* IFN- β plays both pro- and anti-inflammatory roles in the rat cardiac fibroblast through differential STAT protein activation. *Front. Pharmacol.* **9** (2018).
25. Govind, S. Innate immunity in Drosophila: Pathogens and pathways. *Insect Sci.* **15**, 29–43 (2008).
26. Lark, K. K. *et al.* Down-regulation of NF- κ B target genes by the AP-1 and STAT complex during the innate immune response in Drosophila. *PLoS Biol.* **5** (2007).
27. Agaisse, H., Petersen, U. M., Boutros, M., Mathey-Prevot, B. & Perrimon, N. Signaling role of hemocytes in Drosophila JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Dev. Cell* **5**, 441–450 (2003).
28. Herzog, C. *et al.* Rapid clearance of cellular debris by microglia limits secondary neuronal cell death after brain injury in vivo. *Dev.* **146**, (2019).
29. Nixon, R. A. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat. Med.* **19**, 983–997 (2013).
30. Heckmann, B. L., Boada-Romero, E., Cunha, L. D., Magne, J. & Green, D. R. LC3-Associated Phagocytosis and Inflammation. *J. Mol. Biol.* **429**, 3561–3576 (2017).
31. Martinez, J. *et al.* Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. *Nat. Cell Biol.* **17**, 893–906 (2015).
32. Ziegenfuss, J. S., Doherty, J. & Freeman, M. R. Distinct molecular pathways mediate glial activation and engulfment of axonal debris after axotomy. *Nat. Neurosci.* **15**, 979–987 (2012).
33. Tsapras, P. *et al.* Selective autophagy controls innate immune response through a TAK1 / TAB2 / SH3PX1 axis || Selective autophagy controls innate immune response through a TAK1 / TAB2 / SH3PX1 axis. *CellReports* **38**, 110286 (2022).
34. Galluzzi, L. *et al.* Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* **36**, 1811–1836 (2017).

35. Gohel, R., Kournoutis, A. & Petridi, S. *Molecular mechanisms of selective autophagy in Drosophila*. *International Review of Cell and Molecular Biology* vol. 354 (Elsevier Inc., 2020).
36. Tusco, R. *et al.* Kenny mediates selective autophagic degradation of the IKK complex to control innate immune responses. *Nat. Commun.* 1–15 doi:10.1038/s41467-017-01287-9.
37. Myllymäki, H., Valanne, S. & Rämet, M. The Drosophila Imd Signaling Pathway . *J. Immunol.* **192**, 3455–3462 (2014).
38. Purice, M. D. *et al.* A novel Drosophila injury model reveals severed axons are cleared through a draper/MMP-1 signaling cascade. *Elife* **6**, 1–30 (2017).
39. Bach, E. A. *et al.* GFP reporters detect the activation of the Drosophila JAK/STAT pathway in vivo. *Gene Expr. Patterns* **7**, 323–331 (2007).
40. Kim, M. *et al.* Mutation in ATG5 reduces autophagy and leads to ataxia with developmental delay. *Elife* **5**, 1–18 (2016).
41. Neukomm, L. J., Burdett, T. C., Gonzalez, M. A., Züchner, S. & Freeman, M. R. Rapid in vivo forward genetic approach for identifying axon death genes in Drosophila. **111**, 9965–9970 (2014).
42. Barekat, A. *et al.* Using Drosophila as an integrated model to study mild repetitive traumatic brain injury. *Sci. Rep.* **6**, 1–14 (2016).
43. Andreev, V. I. *et al.* Panoramix SUMOylation on chromatin connects the piRNA pathway to the cellular heterochromatin machinery. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **29**, 130–142 (2022).
44. Flybase. Kenny. <https://flybase.org/reports/FBgn0041205.html>.
45. Betz *et al.* A Drosophila PIAS homologue negatively regulates stat92E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 9563–9568 (2001).
46. Flybase. Su(var)2-10. <http://flybase.org/reports/FBgn0003612>.
47. Katzenberger, R. J. *et al.* A Drosophila model of closed head traumatic brain injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, (2013).
48. Tang, R. *et al.* Drosophila H2Av negatively regulates the activity of the IMD pathway via facilitating Relish SUMOylation. *PLoS Genet.* **17**, 2–10 (2021).
49. Corry, J. *et al.* The Cdc42 effector and non-receptor tyrosine kinase, ACK defines a distinct STAT5 transcription signature in a chronic myeloid leukaemia cell model. (2022)