

Rab2 aktivációs célpont jelöltek vizsgálata *Drosophila melanogaster*ben

36. OTDK
Biológia Szekció

Készítette:

Falcsik Gergő

Biológia MSc 2. szemeszter

Témavezető:

Dr. Kovács Tibor



ELTE

EÖTVÖS LORÁND
TUDOMÁNYEGYETEM

Tartalomjegyzék

Összefoglaló.....	3
Rövidítésjegyzék.....	4
Szakirodalmi áttekintés	5
A sejtek önmegújító képessége: Az autofágia	5
Az autofágia jelentősége az öregedésben.....	7
A vezikuláris fúzió főszereplői	8
A kis-G fehérjék főkapcsolója: GAP-ok és GEF-ek.....	10
<i>Drosophila melanogaster</i> előnyei az öregedéssel kapcsolatos betegségek kutatásában.....	11
Célkitűzés.....	12
Anyagok és módszerek.....	14
Felhasznált törzsek, létrehozásuk és fenntartásuk.....	14
Kontroll törzsek	15
Mászás vizsgálat	16
Élethossz vizsgálat.....	16
Fluoreszcens mikroszkópia.....	16
Immunhisztokémia.....	17
Western-blot.....	17
PCR, Q-PCR.....	18
Statisztika és az adatok ábrázolása	20
Eredmények és diszkusszió.....	20
A Rab2 pozitív vezikulumok mennyisége szabályozható egyes GAP-ok csendesítésével felnőtt <i>Drosophila</i> agyakban.....	20
Az autofágia aktiválható a Rab2-t szabályozó GAP-ok idegrendszeri gátlásával	25
Élethossz növekedés érhető el GAP-ok idegrendszer specifikus csendesítésével	27
A GAP-ok tápláltsági kondíciótól függő módon szabályozhatják a Rab2 aktivációját	28
Konklúzió és jövőbeli tervek	30
Köszönetnyilvánítás	33
Irodalomjegyzék.....	33

Az autofágia sejtjeink egy nélkülözhetetlen homeosztázist fenntartó folyamata, mely azonban az öregedés során veszít hatékonyságából. E csökkent aktivitás különösen veszélyes lehet olyan pótolhatatlan sejtekre nézve, mint az idegrendszer sejtjei, ahol a káros anyagok felhalmozódása neurodegeneratív betegségek kialakulásával járhat.

Kutató csoportunk korábbi eredményei szerint a Rab2 kis-GTPáz (kis-G) fehérje – mely nélkülözhetetlen a savas lebontó útvonalak vezikuláinak fúziójához – konstitutívan aktív formája fokozza az autofágia hatékonyságát öreg állatokban, továbbá növeli azok élethosszát és mászási képességét. A kis-G fehérjét GAP-ok (*GTPase-activating proteins*) gátolják azok inaktiválásával, így közvetetten csökkenthetik az autofágia hatékonyságát, azonban Rab2 specifikus GAP-ok még nem ismertek az irodalomban. Kutatási célom volt olyan Rab2 fehérjét szabályozó GAP-okat találni, melyeknek gátlása képes fokozni a lizoszómális lebontási útvonalakat és ezáltal növelni az autofágia hatékonyságát az idegrendszerben. Ezen fehérjék jó célpontjai lehetnek a jövőben gátló hatású gyógyszer molekuláknak.

12 GAP gén RNS-interferencia (RNSi) csendesítését végeztem *Drosophilában*, melyek potenciálisan részt vehetnek a Rab2 szabályozásában. Ezek közül 5 lett kiválasztva részletesebb vizsgálatokra. Mind idegrendszerben, mind zsírtestben sikerült több olyan GAP gént találni, melyek csendesítése képes volt megnövelni az aktív Rab2-pozitív vezikulumok számát a sejtekben. Egyes csendesítések képesek voltak az autofág-lizoszómális lebontó útvonalak aktiválására (pl: *CG42795-RNSi*), ezzel csökkentve a lebontásra megjelölt anyagokat az állatok idegsejtjeiben. Bizonyos GAP-ok csendesítése szignifikáns növekedést okozott a *Drosophilák* élethosszában és a mászási képességre is több gén csendesítése volt pozitív hatással. Feltételezhetjük tehát, hogy egyes GAP fehérjék gátlása valóban alkalmas lehet a lizoszómális lebontási útvonalak aktiválásához, így ezeknek a fehérjéknek a további kutatása releváns új terápiás célpontokat nyújthat a neurodegeneratív betegségek elleni küzdelem során.

(Kutatásom során én végeztem az állatok fenntartását és keresztezését, a fluoreszcens mikroszkópiához a mintákat (előkészítés, boncolás, fixálás), a Western-blotot és a PCR eljárásokat és az azokhoz szükséges minták előállítását, az élethossz és mászás esszéket, valamint a kísérletek során kapott adatok kiértékelését, statisztikai elemzését és a hozzájuk tartozó ábrák és diagramok elkészítését.)

Rövidítésjegyzék

Arf	adenosine diphosphate-ribosylation factor
Arl8	ADP-ribosylation factor-like protein 8
Atg	autophagy-related gene
CA	konstitutívan aktív
cg (-Gal4)	collagen
Ddc (-Gal4)	dopa decarboxylase
Gal4	galactose-responsive transcription factor 4
GAP	GTPase-activating protein
GDP	guanozin-difoszfát
GEF	guanine exchange factor
GFP	green fluorescent protein
GTP	guanozin-trifoszfát
GTPáz	guanozin-trifoszfát hidroláz
HOPS	homotypic fusion and vacuole protein sorting
kis-G	kis-GTPáz fehérje
MTMR/EDTP	myotubularin-related/egg-derived tyrosine phosphatase
PBS	phosphate-buffered saline
PI3K	foszfoinozítid-3-kináz
PI3P	foszfatidil-inozitol-3-foszfát
Rab	Ras-associated binding
Rab2	Ras-related protein Rab-2A
Rab7	Ras-related Protein Rab-7a
Ref(2)P	refractory to sigma P
RNSi	RNS interferencia
SNARE	soluble NSF attachment protein receptor
TOR	target of rapamycin
Vps	Vacuolar protein sorting-associated protein
YFP	yellow fluoreszcens protein

A sejtek önmegújító képessége: Az autofágia

Az autofágia szerepét, mint a sejtek homeosztázisát fenntartó mechanizmust már számos kutatás bizonyította, valamint azt is, hogy hibás működése súlyos betegségekkel hozható összefüggésbe^{1,2}. Az autofág-lebontó útvonalakat több altípusra osztják fel, ám ezek közül a legjobban kutatott a makroautofágia, mely olyan nagyméretű, potenciálisan káros struktúrák és organellek eltávolítására is képes a sejtekből, amivel a többi lebontó útvonal már nem tud megbirkózni. E folyamat során a lebontandó anyagokat egy kettős membránnal rendelkező fagofór veszi körbe, ami aztán autofagoszómává záródva izolálja ezen struktúrákat a sejten belül. Az autofagoszómának, beltartalma lebontásához a savas lebontó útvonalakban főszerepet játszó lizoszómával kell egyesülnie, mely tartalmazza a degradációhoz szükséges enzimeket (1.ábra)³.

A fagofór – mely az autofagoszóma még be nem zárult, kezdetleges formája – képződésének helyét pontosan még nem tudták meghatározni, bár az endoplazmatikus retikulum (ER) kulcsfontosságúnak látszik e tekintetben, de mitokondriális, Golgi és plazmamembrán eredetét is leírtak már^{4,5}.

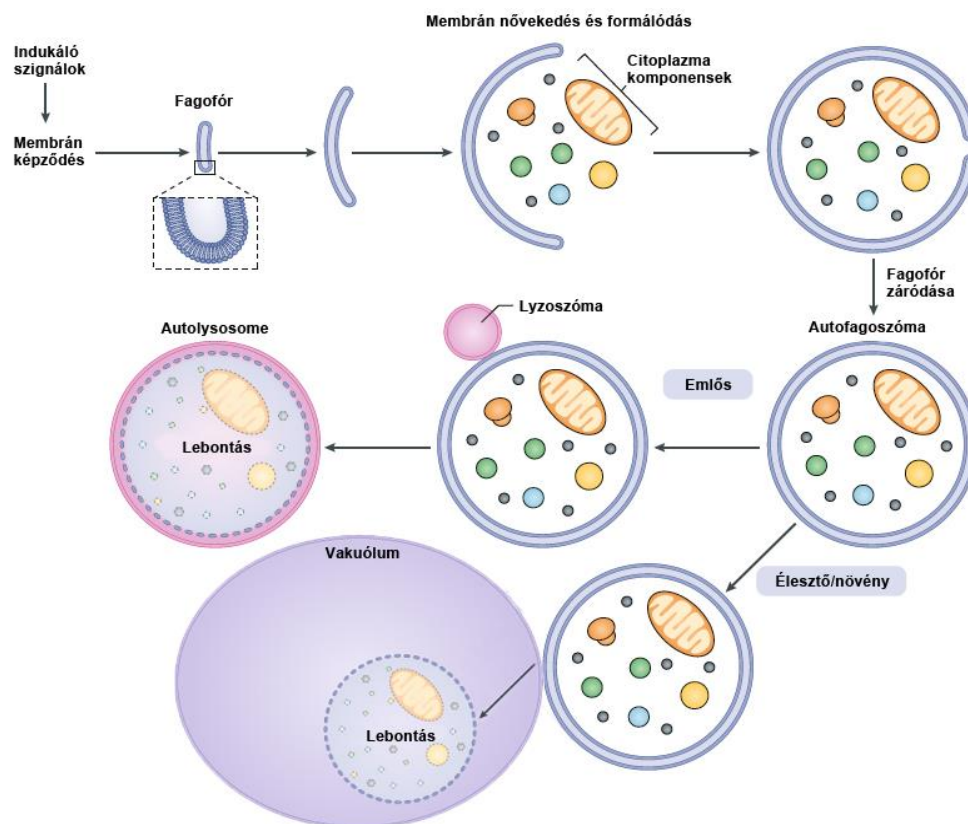
A fagofór képződést az Atg1 (emlősökben ULK) kináz komplex aktiválódása indítja be, mely más az autofagoszóma biogenezéséhez szükséges fehérjéket fog foszforilálni és ezzel aktiválni³. E komplex szabályozásáért a TOR (*target of rapamycin*) (emlősökben TORC1) útvonal felelős, mely az intracelluláris metabolizmus mesterszabályozója. Amennyiben az útvonal bizonyos aminosavak, vagy inzulin megemelkedett mennyiségét érzékeli, tehát a sejt úgy mond "jóllakott" állapotban van, akkor az Atg1 (*autophagy-related 1*) kináz komplex gátlásán keresztül lecsökkenti az autofágiát, hiszen a sejtnak van elég építőköve és energiája a fehérjeszintézishez. Ha azonban a sejt éhezik és a TOR szignalizációs útvonal így deaktiválódik, akkor beindulhat az Atg1 kináz komplex és új autofagoszómák képződhetnek, hogy a sejt a saját anyagainak lebontásából juthasson építőkövekhez, ugyanis a fehérjeszintézis egy sejtben sem állhat le, még tápanyaghiány esetén sem. Ez a szabályozási mechanizmus mutatja, hogy az alapvető homeosztatikus folyamatokban is elengedhetetlen az autofágia a sejtek túléléséhez, nem pusztán újrahasznosító szerepet tölt be^{6,7}.

Az autofagoszóma biogenezésének korai szakaszában szerepet játszik még a Vps34/PI3K komplex is, mely foszfatidil-inozitol-3-foszfáttá (PI3P) alakít foszfatidil-inozitokat (PI) a fagofór membránján. A PI3P egy autofagoszóma membrán specifikus PI, így ezt a mintázatot egyéb az autofágiához szükséges fehérjék fogják felismerni és ezáltal a formálódó membránhoz

toborzódni^{8,9}. Ilyen például az Atg2 mely az Atg18-cal alkot komplexet. Az Atg2-Atg18 komplex lipideket csatornázt át a fagofór membránjába, így növelve annak felületét. A membránba továbbá beépülnek Atg9 transzmembrán fehérjéket tartalmazó kis vezikulumok, melyeknek szintén szerepe van a membrán növekedésében^{3,10}.

A fagofór és később az autofagoszóma membránjára egy másik fontos identitást meghatározó elem is rákerül a PI3P-n kívül, ez pedig az ubikvitin-szerű Atg8 (emlőskben LC3B, ecetmuslicában Atg8a) fehérje. A szabad Atg8 fehérjékre az ubikvitin-ligáz-szerű konjugációs rendszer egy foszfatidil-etanolamin lipidhorgonyt helyez fel, majd ezek a lipidált Atg8 fehérjék a fagofór membránjához horgonyozódnak. Az Atg4 fehérje aminosav hasítása az Atg8 C-terminálisán szükséges a lipidhorgony felhelyezéséhez. Az Atg8 képes kapcsolatot létesíteni a p62 (Drosophila ortológ Ref(2)P) adaptor fehérjével. Sok szelektíven lebontandó anyag az Atg8-p62 (és más, szintén Atg8-hoz kapcsolt adaptor) fehérjék segítségével bomlik le^{3,10}. E két fehérje mutáns, fluoreszcens formáját gyakran használják a kutatók autofág markernek.

A vezikulák formálódása, szállítása, egyesülése finoman szabályozott, bonyolult lépéseken keresztül valósul meg, mely számtalan különböző funkciójú fehérjét igényel. Ilyenek többek között a kis-GTPáz, a burkoló, a motor, a dokkoló és a pányvázó fehérjék³.



1.ábra: A makroautofágia folyamatának főbb lépései. A fagofór biogenezeise után a lebontandó anyagok körül autofagoszómává záródik, mely állati sejtekben lizoszómával, növényekben és élesztőben a vakuólummal egyesülve degradálja ezen anyagokat³.

Az autofágia jelentősége az öregedésben

Az időskorral összefüggésbe hozható betegségek kapcsán rengeteg kutatás mutatott rá az autofágia szerepére. Kimutatható, hogy a kor előrehaladtával az autofágia hatékonysága csökken a sejtekben és ez számos problémához vezethet az egyes szövetekben, szervekben. A jelenség nem csak emlősökben, hanem olyan modellélőlényekben is kimutatható és vizsgálható, mint a *Drosophila melanogaster*, vagy *Caenorhabditis elegans*, melyek kedvelt modellszervezetei az autofágiával kapcsolatos kutatásoknak⁶. Az autofág gének (*atg*-k) funkcióvesztéses mutációi korai öregedést és élethossz csökkenést okoznak^{1,11}, ezzel szemben ezen gének (*atg8* vagy *atg5*) túlaktiválása *Drosophilában* és egérben élethossz növekedéssel járt^{2,12}.

Az autofágia időskori hanyatlására bizonyos szövetek különösen érzékenyek tekinthetők, például az idegsejtek nagy részének életünk végéig el kell látnia feladatát, helyettesítésük nem lehetséges. Ezért lehet az, hogy sok neurodegeneratív öregkori betegség kapcsolatba hozható az autofágia hibás működésével, vagy annak hiányával és újra-aktiválása potenciálisan javulást válthat ki az eddig gyógyíthatatlannak elkönyvelt betegségek lefolyásában. Parkinson-kór (PD) kialakulásához például két jelentősen eltérő autofág útvonal hibája is vezethet. A *shaperon* mediált autofágia (CMA) útvonal, mely normál esetben lebontaná az idegsejtekben az α -synucleint, csődöt mond annak mutáns oligomerizált formája esetében, mely erősen kötődik a lizoszómákon lévő LAMP2A transzporterekhez¹³. Szintén PD-t eredményezhet a mitofágia – az autofágia egy speciális mitokondriumokat lebontó formája – fehérjéinek (Parkin, PINK1 és DJ-1) hibái, melynek következtében nem megfelelően működő, káros mitokondriumok halmozódnak fel az idegsejtekben¹⁴.

PD és Huntington kóros *Drosophila* modellek esetében jó eredményeket értek el az autofágia farmakológiai aktiválásával. Az AUTEN-67 (*autophagy enhancer*) és AUTEN-99 gyógyszermolekulák alkalmazásával, melyek az MTMR14/EDTP fehérje inhibitorai. Az MTMR14 (*myotubularin-related protein 14*) egy autofágiát gátló fehérje, mely a Vps34-kináz komplex tevékenységének egy antagonistája. Ez a fehérje ugyanis képes defoszforilálni az autofagoszóma biogenezishez szükséges PI3P molekulákat. Az AUTEN molekulákkal kezelt neurodegeneratív modell állatok neuronjaiban szignifikánsan csökken a káros fehérje aggregátumok jelenléte, az állatok élethossza és mászási képessége is javul^{15,16}.

Kutatócsoportunk korábbi eredményei arra utalnak, hogy az öregedő állatokban nem csak a létrejövő autofagoszóma számának csökkenése miatt, hanem a lebontó folyamat későbbi lépéseiben bekövetkező hibák miatt is csökken az autofágia hatékonysága. Erre abból lehet következtetni, hogy az öreg állatokban megemelkedik az autofág-vezikulákhoz köthető

lipidált-Atg8a fehérjék mennyisége, tehát a lebontó kompartmentumok jelen vannak, azok felhalmozódnak, a savas-lebontás mégsem játszódik le, melyre egy másik autofág marker fehérje a Ref(2)P/p62 emelkedő szintje is utal. A Ref(2)P ugyanis normál esetben a lebontandó káros anyagokkal együtt szintén lebomlik a folyamat során. Ezen adatok alapján feltételezhetjük, hogy az autofág-degradációs útvonal megakadását részben olyan *downstream* lépések hibái okozhatják, mint például a vezikula fúzió, vagy a savas-lebontás nem megfelelő működése¹⁷.

A vezikuláris fúzió főszereplői

A lebontásra szánt sejtrészt körülhatároló autofagoszóma nem tartalmaz lebontó enzimeket, így azt máshonnan kell beszereznie, hogy véghez vihesse feladatát. Két lehetséges útvonal közül, vagy lizoszómával egyesülve autolizoszómává alakul, vagy endoszómával egyesülve amfiszómát képez, mely ugyancsak lizoszómával fuzionálva autolizoszómát hoz létre. A fúziós folyamatok hibája autofagoszómák felhalmozódásával járhat a sejtekben, ami a fehérje aggregátumok megjelenéséhez hasonlóan szintén káros a sejtekre nézve^{6,18}. Az egyes vezikulák fúziója magától szinte sohasem megy végbe, ahhoz mindkét vezikula részéről speciális, egymást felismerő és egymással interakcióba lépő fehérjékre van szükség. A különféle vezikulák identitását specifikus, a külső membránhoz kötődő fehérjék, mint például a kis-GTPázok és a pányvázó fehérjék határozzák meg, melyekhez egyéb azokat felismerő fehérjék is kapcsolódhatnak. Az identitással rendelkező vezikulumok a megfelelő célállomás felé szállíthatnak motorfehérjék segítségével és ott az adott felülettel egyesülhetnek, amennyiben az ehhez szükséges fehérjék aktiválódnak. A legszámasabb ilyen identitást meghatározó kis-G fehérjék a Rab és az Arf alcsoportokba sorolhatóak, továbbá a fúzióhoz elengedhetetlen a SNARE és HOPS komplexek közreműködése^{4,19,20}.

A **SNARE** fehérjék a membránok citoplazma felőli oldalán találhatók meg és szükségesek a lizoszomális lebontásban érintett vezikulumok (autofagoszóma, lizoszóma, Golgi eredetű vezikulum, kései endoszóma, amfiszóma, lizoszóma) fúziójához. Amikor az egyesülésre készülő vezikulum a célmembránhoz ér, a SNARE komplex fehérjéi mintegy összesodródó kötélen egymás köré tekerednek és egymás felé húzzák a két lipid kettősréteget, míg azok egybe nem olvadnak. Hiányukban, vagy az egyes elemek mutációjának következtében sérülnek a lebontó útvonalak. Ez történik bizonyos *lysosomal storage disorder* (LSD) betegségek esetében is, ahol a túlzott koleszterin jelenléte miatt, a membránokban nem tud megfelelő konformációt felvenni a SNARE egyes részei²¹. A Syntaxin17 (Stx17) egy

autofagoszóma membrán specifikus SNARE, ami azonban még nem található meg a fagofórok felszínén, így a lizoszómák nem fúzionálnak a még "nyitott" vezikulumokkal²².

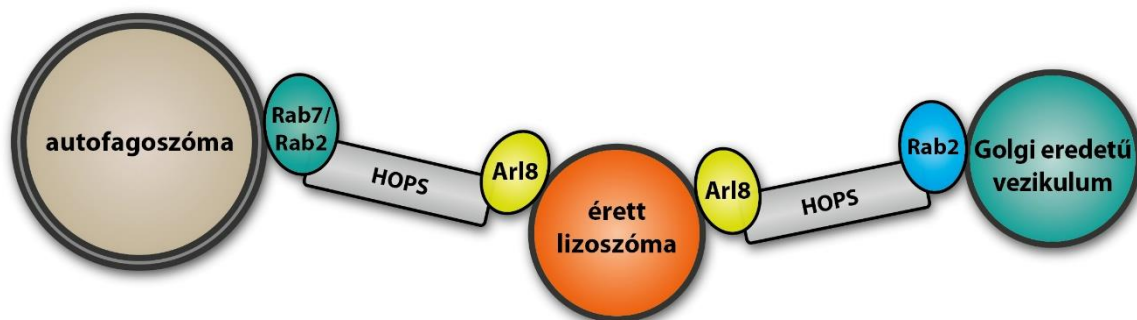
Homotypic fusion and protein sorting (HOPS) egy pányvázó fehérje, mely jól konzervált az evolúció során és a vezikulák közti kapcsolatot és azok fúzióját segíti elő. A komplex *vacuolar protein sorting (Vps)* alegységekből tevődik össze²³. A kis-G fehérjék, mint például a Rab-ok, melyek a vezikula membránok külső oldalán helyezkednek el, fontosak a különböző vezikulák e pányvázó fehérjével való összekapcsolásához annak alegységein keresztül^{24,25} (2. ábra). A HOPS hatásköre az élesztő esetében már kellően bizonyított, miszerint szükséges az autofagoszóma-lizoszóma fúzióhoz, az emlősök esetében azonban még ellentmondások az információk. Bizonyos alegységek esetében azt figyelték meg, hogy hiánya esetén sérül az autofágia^{23,26}. Jiang és munkatársai felderítették, hogy a HOPS két alegysége, a Vps33A és a Vps16 is képes az autofág-membrán specifikus Stx17-hez kötődni²³.

Az **Arl8** (*Arf like protein 8*) egy az Arf alcsaládba tartozó fehérje, mely állandóan jelen van az érett lizoszómák felszínén és elengedhetetlen azok megfelelő elosztásához az emberi sejtekben^{19,27}. Számos endoszómával kapcsolatos funkcióban és a szinaptikus vezikulák esetében is leírták már szerepét^{28,29}. Ezek mellett fontos a vezikula fúzióban is, mind az endoszóma-lizoszóma, mind az autofagoszóma-lizoszóma egyesülésben. A HOPS komplex egy alegységének, a Vps41-nek az interakciós partnereként hivatkoznak rá^{19,30}.

A **Rab7** (élesztőben **Ypt7p**) fehérje egy effektora a retromer komplex, mely segít bizonyos anyagok visszajuttatásában az endocitotikus útvonalból a plazma membránra, vagy a transz-Golgi ciszternákra³¹. Továbbá szerepe van az organellumok, többek közt az autofagoszómák pozicionálásában is, motor komplexek megkötésével^{32,33}. Szükséges még a vezikula fúzióhoz is, amit a HOPS komplex segítségével hajt végre. Élesztő esetében bizonyított a Rab7-HOPS interakció létrejöttét fúziókor³⁴, metazoákban erre azonban még kevés az adat. Emberi sejtekben kimutatták viszont, hogy a Rab7 fehérjék közvetlenül, a két membrán között homodimereket alkotva is ellátják ezt a funkciót³⁵.

A **Rab2** fehérjét legkorábban a Golgi készüléken találták meg és ezen organellum valamint az ER közötti vezikula forgalomhoz kötötték szerepét^{25,36}. A legtöbb régebben felfedezett interakciós partnere mind olyan fehérjék, melyek szintén a Golgihoz köthetőek, ezek funkciói azonban nem ismert. A Rab2 kiiktatása *C. elegans*-ban zavart okoz a szekréciós granólumok képződésében, valamint akadályozza a fagofórok érését. Mindez az endocitotikus útvonalakban betöltött szerepére utal³⁷. Sinka Rita és munkatársai egy biokémiai *screen* keretében Rab interakciós partnereket keresve azt találták, hogy a Rab2 a HOPS komplex két alegységével (Vps39 és Vps41) is kapcsolódik. Ez alapján vélhető volt, hogy szerepet tölt be

a vezikula fúzió, így az autolizoszómák létrejöttében is, valamint az amfiszómák lizoszómával való fúziójában²⁵. Ezt később *Drosophilán* végzett kísérletekkel is alátámasztották, ahol a Rab2 kiütése, vagy csendesítése az autofagoszómák felhalmozódását okozza lárvális zsírszövetben mutatta azt, hogy azok képtelenek végighaladni normális lebontó útvonalukon²⁴. Továbbá a konstitutívan aktív Rab2 fehérje csökkenti az autofág marker (p62 fehérje) jelenlétét a sejtekben, mely az autolizoszómális lebontás megemelkedésére utal, valamint képes volt a PD modell állatok élettartamát és mászási képességét is megnövelni⁶. *Muslica* lárvá idegsejtjeiben végzett Rab2 vizsgálatok rámutattak annak szerepére az axonális transzport folyamatokban. A Rab2 szükséges a fehérje típusú neurotranszmittereket tároló *dense core vesicles* (DCV) éréséhez, valamint azok anterográd és retrográd szállításához. Továbbá endoszómák és lizoszómák szállításában is kimutatták hatását az idegsejtekben, viszont az Arl8-al ellentétben a Rab2 nem volt szükséges a neurotranszmittereket tartalmazó vezikulák szinapszisba való juttatásához³⁸. A *Drosophilából* származó Rab2 adatok mind lárvális szöveteken lettek vizsgálva, a Rab2 lokalizációja és funkciója felnőtt idegrendszerben azonban még nem ismert.



2.ábra: Kis-GTPáz fehérjék vezikula fúzióban betöltött szerepe. Rab2 az autofagoszóma és Golgi eredetű vezikulumok fúziójában, Rab7 az autofagoszóma és endoszóma, Arl8 a lizoszómák fúziójában segít a HOPS komplexen keresztül (saját ábra).

A kis-G fehérjék főkapcsolója: GAP-ok és GEF-ek

A kis-G fehérjéket gyakran nevezik molekuláris kapcsoló fehérjéknek is, mert az alapján, hogy GTP-t, vagy GDP-t kötnek, van egy aktív, illetve egy inaktív állapotuk. A GTP kötött, aktivált kis-G fehérje képes más fehérjékhez kötődni és azokat aktiválni. Ebben a formájukban általában membrán kötöttek is, például egy lipid horgony segítségével. GDP-t tartalmazó formájuk deaktivált és sokszor szolubilisen található a citoplazmában. A kis-G fehérjék GTP kötött állapotát és így bekapcsolását a GEF (*guanine nucleotide exchange factors*) enzimek segítik elő. Ezzel ellentétesen a GAP (*GTPase-activating proteins*) enzimek a GTP- GDP-re történő hidrolízist és ezzel a kikapcsolást váltják ki. Ennek következtében ezen fehérjék jelenléte, vagy hiánya közvetetten befolyásolja a savas-lebontó útvonalak hatékonyságát a Rab

és más kis-GTPázok ki-be kapcsolásán keresztül⁶. A már fentebb leírt kísérletekben tapasztaltak szerint bizonyos Rab-ok gátlása az autofág-lebontó útvonal megakasztásához, így az autofagoszómák felhalmozódásához, vagy azok teljes hiányához vezethet²⁴. Tehát ezen Rab-okat inaktiváló GAP-ok gátlása potenciális terápiás célpont lehet, amennyiben az autofág aktivitást szeretnénk megnövelni, helyreállítani. A lizoszómális lebontásban szerepet játszó kis-G fehérjéknek azonban jelenleg nem ismertek GAP szabályozói az irodalomban.

***Drosophila melanogaster* előnyei az öregedéssel kapcsolatos betegségek kutatásában**

A *Drosophila melanogaster* – melyet a köznyelvben csak muslicaként ismerhetünk – a tudományban az egyik legelterjedtebb és legrégebb óta használt gerinctelen modellélőlény. Számítalan előnyös tulajdonsága miatt hatékonyan és gazdaságosan lehet vele dolgozni. A *Drosophila* rendkívül alkalmas screenek és egyéb nagy áteresztő-képességű kutatások elvégzésére, mivel ezen állatok életciklusa nagyon rövid, a kikelő egyedek száma viszont nagyon nagy. Annak ellenére, hogy a rovarok taxonómiai távoli csoportnak tekinthetők, az emberi betegségeket okozó gének hozzávetőleg 65%-ának van vélt funkcionális ortológja a *Drosophila* genomban^{39,40} és ezeknek az ortológoknak egy szignifikánsan nagy hányada expresszálódik is a *Drosophila* emberével megegyező funkciójú szöveiben⁴¹.

A kutatásokat nagyban megkönnyíti a *Drosophila*-ban kifejlesztett UAS-Gal4 rendszer. Ez a rendszer két elemből áll, melyek az élesztőből lettek átemelve a muslica genomba. A Gal4 fehérje egy olyan transzkripciós aktivátor, mely az UAS (*upstream activating sequence*) szakaszt ismeri fel és ehhez kötődve lehetővé teszi a *downstream* beépített transzgén átíródását. A Gal4 és az UAS elemek általában külön törzsekben vannak fenntartva és a két törzs összekeresztelésével aktiválhatók. További nagy előnye az UAS-Gal4 rendszernek, hogy lehetővé válik a transzgének szövet specifikus átíródása. Csupán annyit kell tenni, hogy az aktivátor Gal4 fehérje gén szekvenciáját egy az adott szövetre jellemző *enhancer* mögé építjük be, így az csak ott fog kifejeződni és aktiválni a transzgén átíródását. Így lehetőségünk van például csak az idegsejtekben kifejeztetni egy fluoreszcens jelölést, vagy csendesíteni egy gént RNS-interferenciával. Az UAS-Gal4 egy továbbfejlesztett változatában képesek lehetünk időben is szabályozni a transzgén kifejeződését. Itt egy harmadik elem (Gal80^{ts}) is megtalálható, egy fehérje mely a Gal4-gyel komplexet alkotva gátolja annak működését. A nekünk megfelelő időben hőmérséklet emelést alkalmazva azonban megszűnik ez az interakció és a transzgén átírásra kerülhet⁴².

Az RNS interferencia (RNSi) az eukarióták egy endogén védelmi mechanizmusa, amivel a sejtek képesek adott átíródott génszakaszok, vagy idegen szekvenciák poszt-transzkripciósgátlására, így megakadályozva azt, hogy azokból fehérje keletkezzen. A mechanizmust egy duplaszálú RNS (dsRNS) indítja be, mely lehet exogén eredetű, vagy akár egy hajtű szerűen összezáródó saját átírat is. *Drosophilában* a dsRNS-t a Dicer2 fehérjét tartalmazó komplex ismeri fel, mely 21bp (bázispár) hosszú darabokra vágja azt, majd ezeket az Ago2 (*argonauta*) fehérje egy-szálú RNS-sé tekeri ki. Az így processzált RNS molekula alapján a RISC (*RNA-induced silencer complex*) megkeresi az azzal homológ, párosodó mRNS (*messenger-RNS*) transzkriptumokat és ha talál ilyet akkor azt elhasítja, ami ennek következtében gyorsan degradálódni fog. Nem teljes bázispár egyezés esetén pedig transzlációs gátlás valósulhat meg. Ezt a folyamatot természetesen a kutatók is kihasználják a vizsgálni kívánt gének csendesítésére. A *muslica* esetében a legtöbb génre már létrehoztak RNSi törzset melyek a különféle törzsközpontokból viszonylag egyszerűen beszerezhetőek^{43,44}.

Célkitűzés

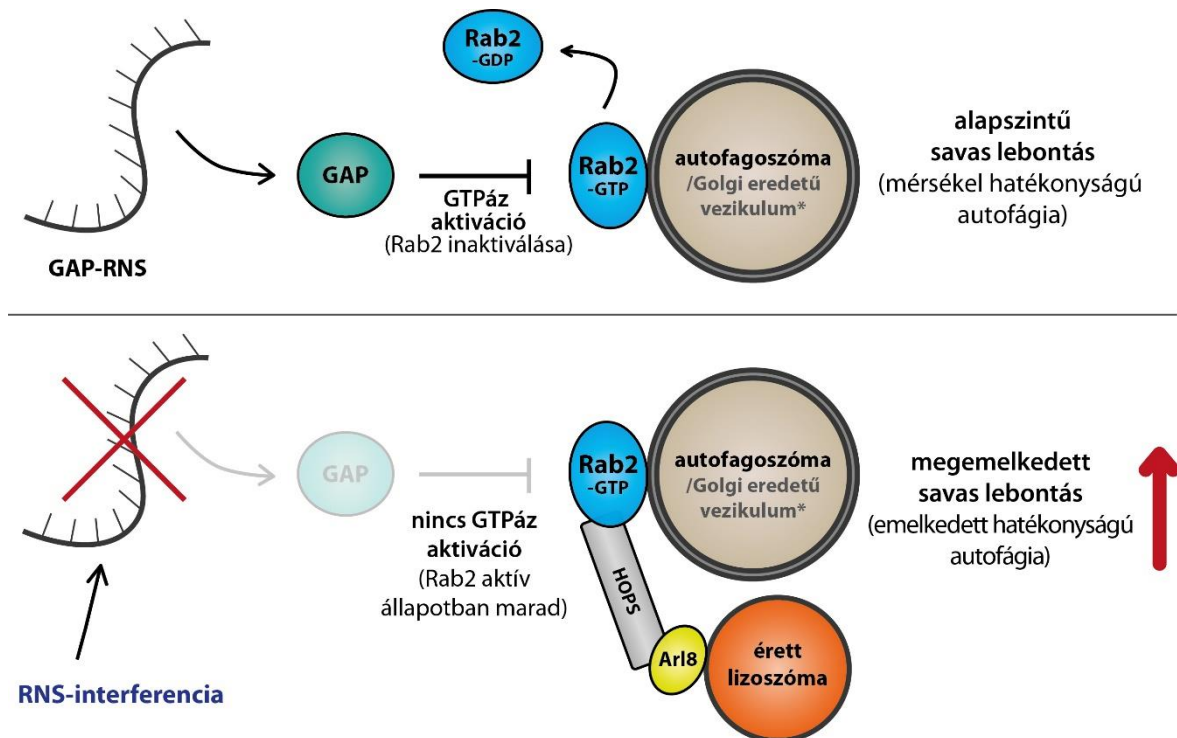
Az öregkori betegségek egy jelentős része kapcsolatba hozható az autofágia hatékonyságának csökkenésével. Az autofágia helyreállítása képes lehet az élethossz és életminőség növelésére, melyet már több modellszervezet esetében is igazoltak^{2,11}.

Egy lehetséges módja az autofág aktivitás növelésére a lizoszómális lebontási útvonalak hatékonyságának fokozása. Kutató csoportunk korábbi eredményei azt mutatták, hogy az idegrendszerben konstitutívan aktív formában kifejeztetett Rab2 (Rab2-CA) fehérje megnöveli az állatok élettartamát és azok kognitív funkcióit, valamint hozzájárul egy Parkinson-kóros modell (A53T) tüneteinek az enyhüléséhez is⁶.

Mivel a GAP-ok felelősek a kis-G fehérjék inaktiválásáért, ezért feltételezésem szerint a megfelelő GAP fehérjék gátlásával úgyszintén aktiválhatóak a lizoszómális lebontási útvonalak, hasonlóan mint a mutáns, folyamatosan aktív Rab2 fehérje esetében (3.ábra). Jelenleg az irodalomban azonban még nem ismertek e folyamatra specifikus GAP fehérjék. Céлом ezért olyan Rab2 specifikus GAP-ok keresése és jellemzése, elsősorban az idegrendszerben, melyek jó célpontjai lehetnek gátló hatású gyógyszer molekuláknak a jövőben.

Ennek érdekében a következő kísérleteket szerettem volna elvégezni:

- Megvizsgálni az egyes GAP-csendesítéseket követően az aktív-Rab2 fehérjék mennyiségét *Drosophila* idegrendszerben (agyakban), fluoreszcens mikroszkópia segítségével. Az eredmények alapján kiválasztani a potenciális Rab2-t szabályozó GAP fehérjéket további vizsgálatokra.
- Az különböző GAP-csendesített törzsekben vizsgálni az autofágia hatékonyságában bekövetkező változásokat, fluoreszcens mikroszkópia, Western-blot és immunhisztokémia segítségével.
- A GAP-géncsendesített muslica törzsek élethosszának és mászási képességének vizsgálata a megfelelő esszéket alkalmazva.
- Az egyes GAP-csendesítések hatását tanulmányozni *Drosophila* lárvális zsírszövetben, fluoreszcens mikroszkópia és Western-blot segítségével.



3.ábra: Rab2-t szabályozó GAP-ok csendesítésének várt hatása. A Rab2 fehérjét inaktíváló GAP jelenlétében a lizoszómális lebontási útvonalak alapszinten működnek (felső ábra), míg annak hiányában a Rab2 bekapcsolva marad és az autofágia hatékonysága megemelkedhet (alsó ábra).
 *Különböző szervekben a Rab2-höz kötik az autofagoszóma és a Golgi-eredetű, hidroláz-enzim tartalmú vezikulumok fúzióját is a lizoszómával. Mindkettő fúziós esemény serkentése növelheti a lebontás hatékonyságát (saját ábra).

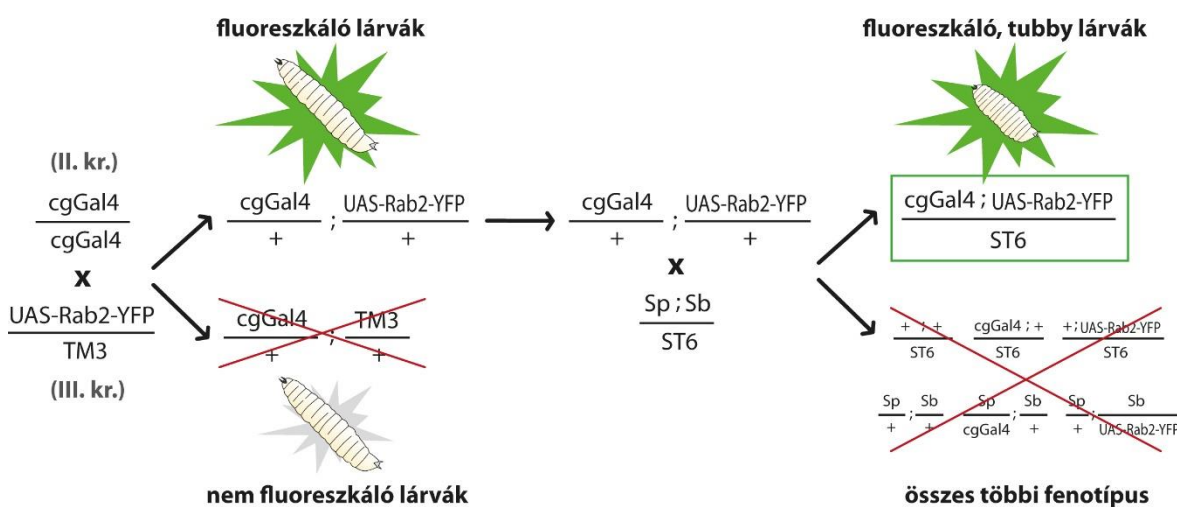
Felhasznált törzsek, létrehozásuk és fenntartásuk

A kísérletekhez *Drosophila melanogaster* modellszervezetet használtam. A felhasznált törzsek standard kukorica-cukor-agar alapú táptalajon voltak fenntartva. Minden kísérletemet 29°C-on tartott állatokon végeztem. A felhasznált törzsek a *Bloomington Drosophila Stock Center*-ből (BDSC) származnak, illetve az ELTE Genetika Tanszék törzsgyűjteményéből (EGTT) keresztezéssel lettek létrehozva. Az RNS-interferencia screen során **12** különböző **GAP** gén csendesítését végeztem (GAP-RNSi) (1.táblázat).

Megnevezés	Genotípus	Származás
kontroll / isowhite	w ¹¹¹⁸	BDSC
GFP-RNSi (RNSi-kontroll)	y[1] sc[*] v[1]; P{y[+7.7] v[+1.8] =VALIUM22-EGFP.shRNA.4}attP2	BDSC
CG8085 (GAP-RNSi)	y[1] v[1]; P{y[+7.7] v[+1.8] =TRiP.JF03085}attP2	BDSC
CG7324 (GAP-RNSi)	y[1] sc[*] v[1] sev[21]; P{y[+7.7] v[+1.8] =TRiP.HMS00722}attP2	BDSC
CG1695 (GAP-RNSi)	y[1] v[1]; P{y[+7.7] v[+1.8] =TRiP.HMJ24138}attP40	BDSC
CG31935 (GAP-RNSi)	y[1] sc[*] v[1] sev[21]; P{y[+7.7] v[+1.8] =TRiP.HMC05513}attP40	BDSC
CG42795 (GAP-RNSi)	y[1] v[1]; P{y[+7.7] v[+1.8] =TRiP.HMJ23781}attP40/CyO	BDSC
CG7112 (GAP-RNSi)	y[1] sc[*] v[1] sev[21]; P{y[+7.7] v[+1.8] =TRiP.HMS01132}attP2/TM3, Sb[1]	BDSC
CG4041 (GAP-RNSi)	y[1] sc[*] v[1] sev[21]; P{y[+7.7] v[+1.8] =TRiP.GL00239}attP2/TM3, Sb[1]	BDSC
CG42612 (GAP-RNSi)	y[1] sc[*] v[1] sev[21]; P{y[+7.7] v[+1.8] =TRiP.HMC06174}attP40	BDSC
CG6182 (GAP-RNSi)	y[1] sc[*] v[1] sev[21]; P{y[+7.7] v[+1.8] =TRiP.HMC06532}attP40	BDSC
CG5344 (GAP-RNSi)	y[1] sc[*] v[1] sev[21]; P{y[+7.7] v[+1.8] =TRiP.HMC06579}attP40	BDSC
CG12241 (GAP-RNSi)	y[1] sc[*] v[1] sev[21]; P{y[+7.7] v[+1.8] =TRiP.HMS00612}attP2/TM3, Sb[1]	BDSC
CG11727 (GAP-RNSi)	y[1] v[1]; P{y[+7.7] v[+1.8] =TRiP.HMS01818}attP40	BDSC
DdcGal4	w[1118]; P{Ddc-GAL4.L}4.36	BDSC
cgGal4	w[1118]; P{Cg-GAL4.A}2	BDSC
DdcGal4-Rab2-YFP	w[1118]; DdcGal4; Rab2-YFP/ST6	EGTT
cgGal4-Rab2-YFP	w[1118]; cgGal4; Rab2-YFP/ST6	általam létrehozva
cgGal4 (II.)	w[1118]; P{Cg-GAL4.A}2	EGTT
Rab2-YFP	y[1] w[*]; P{w[+mC]=UAST-YFP.Rab2} (3)neo38[02]/TM3, Sb[1]	BDSC
ST6	w*; Sp; Sb / ST6	EGTT
3x mCh-Atg8a, DdcGal4	w[1118]; DdcGal4; 3x mCh-Atg8a	EGTT

1.táblázat: A felhasznált törzsek megnevezése, genotípusa és származási helye.

Az általam létrehozott *cgGal4; Rab2-YFP/ST6* törzs szükséges volt a lárvális zsírszövetek fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatához. A *DdcGal4*-es törzshöz hasonlóan, mely elsősorban a dopaminerg és szerotonerg neuronokban fejezi ki a Gal4 fehérjét⁴⁵, a *cgGal4* zsírszövet specifikusan fejezi ki azt⁴⁶, így az RNS interferencia és a fluoreszcens marker fehérjék csak itt fognak átíródni (szövet specifikus UAS-Gal4 rendszer). Az ST6 multikromoszómális (kapcsolt) balancer kromoszómára azért van szükség, mert így a törzs stabilabban fenntartható, lehetővé teszi a vele homológ 2. és 3. kromoszómák egyidejű öröklődését, valamint az ST6-ban jelenlévő *tubby* (rövid és tömzsi) mutáció fenotípusára könnyen lehet szelektálni a lárvák esetében is. A keresztezés során fluoreszcens mikroszkóp alatt szelektáltam a fluoreszkáló *tubby* fenotípusú lárvákra (4.ábra).



4.ábra: A *cgGal4-Rab2-YFP* elnevezésű törzs létrehozásának lépései. *TM3* és *ST6* balancer kromoszómák, *Sp* (*sternopleural*) és *Sb* (*stubble*) marker mutációk (saját ábra).

Kontroll törzsek

A kísérleteim során RNS-interferencia (RNSi) törzseket használtam, melyekhez kontrollként a vad típusnak megfelelő izogenikus *w¹¹¹⁸* (*isowhite*) törzset alkalmaztam, illetve bizonyos kísérletekhez egy további RNSi-kontroll törzset (GFP-RNSi) (1.táblázat). Erre azért volt szükség, mivel a termelődő duplaszálú RNS önmagában is kiválthat nem-specifikus hatásokat a RISC komplex aktiválásán keresztül. Az RNSi-kontroll egy target-nélküli duplaszálú RNS-t termeltet pluszban a normál kontrollhoz képest, így ennek a nem-specifikus hatásait hivatott szimulálni⁴⁷. Ez a GFP-RNSi kontroll törzs azonban nem alkalmazható azoknál a kísérleteknél, ahol a GFP fehérje kifejeztetése szükséges (például több fluoreszcens mikroszkópos kísérletem esetében is).

Mászás vizsgálat

E kísérlet során összehasonlíthatjuk a vizsgált állatok fittségét és idegrendszerének állapotát öregedésük folyamán. Leütést követően a *Drosophilák* egy kis átmérőjű, magas (25cm) üvegcsőben kezdenek el felfele mászni (negatív geotaxis). Az inger felfogásának sebessége és annak megtartása arányos a muslicák idegrendszerének állapotával. A rövidtávú mászás-teszt az állatok ingerfelfogó képességéről, míg a hosszútávú-mászás az állatok inger megtartó képességéről, azaz a memóriájukról ad információt⁴⁸. Az állatok mászását 7, 14, 21 és 28 napos korukban mértem. A méréseket két párhuzamos csővel végeztem. Az egyes genotípusokat CO₂-vel elaltattam, majd a nemeket elkülönítve, 10-10 állat került egy-egy csőbe. Ezt követően az állatok 1 órát pihentek 29°C-on. Pihenés után a mászás esszéjét háromszor ismételtam, 30 perces szünetekkel az egyes mérések között. A mászásokról videó felvétel készült, ami alapján ki lehet értékelni az egyes genotípusok nemenkénti teljesítményét. A rövidtávú mászás az első határvonalig tart (6 cm) és méri, hogy a 10 állatból hány éri azt el 10, illetve 20mp alatt. A hosszútávú mászás a felső határvonalig tart (21cm) és méri, hogy hány állat éri azt el 20, 40, illetve 60mp alatt. Az eredmények hasonlósága miatt a dolgozatban csak a legnagyobb különbségeket mutató mérések lettek bemutatva, ami rövidtáv esetén a 20-, hosszútáv esetén a 60-másodperces értékek.

Élethossz vizsgálat

A kísérlet célja, hogy összehasonlítsuk az egyes genotípusok átlagos élettartamát. A mérést 5 párhuzamos csővel végeztem, minden csőbe 15 nőstény és 15 hím állat került. A *Drosophilákat* két naponta ráztam át friss tápcsőbe. Naponta feljegyeztem, hogy melyik csőben mennyi és milyen nemű állat halt meg, míg az összes muslica el nem pusztult. Az élethossz-mérés Kaplan-Meier görbéit és az adatok kiértékelését az SPSS22.0 szoftverrel végeztem.

Fluoreszcens mikroszkópia

A GAP-RNS-interferencia hatásait kétféle szervben vizsgáltam, felnőtt *Drosophila* agyakban és lárvális zsírtestekben. A felnőtt nőstény muslicákat éteres altatást követően lefejeztem és a fejeket előboncoltam, majd 4%-os PBS-ben (foszfáttal puffertolt sóoldat) hígított formaldehiddel fixáltam 20 percig szobahőn, aztán 3x 5 perig mostam a mintákat PBS-ben. Ezt követően kiboncoltam az agyakat, szintén PBS-ben. A zsírszövet

vizsgálatához L3 táplálkozó stádiumú (L3F), lárvák zsírtest lebenyeit boncoltam ki, fixálás nélkül PBS-ben. A savas kompartmentumok jelölésére zsírtestekben LysoTracker Red (L7528) festést használtam. A festéshez a LysoTrackert PBS-ben 1:1000 arányban hígítottam. 2 perces festést követően 2x mostam a mintákat PBS-ben, fedése előtt 2-2 perccel. A mintákat Hoechst tartalmú PBS:glicerín (1:4 arány) oldattal fedtem. A mikroszkópos képek ApoTome2-vel felszerelt Zeiss Axioimager Z1 mikroszkóppal készültek. Az agyak fotózása 200x, míg a zsírtesteké 400x nagyításon történt. A képek készítésekor a teljes szerv vastagsága végig lett fényképezve, szeletenként 1µm távolságra készültek egymástól képek. Az elkészült képek ezt követően össze lettek montázsolva, így a kiértékeléskor a szerv valamennyi jelölése számolható volt. A képek kiértékeléséhez a ZEN 3.5 (Blue edition v3.5.093) és az ImageJ szoftvereket használtam.

Immunhisztokémia

A muslica agyakban jelenlévő ubikvitinált struktúrák mennyiségi változását immunhisztokémia segítségével tanulmányoztam. A kísérlethez 7 napos nőstény *Drosophilák* agyát használtam fel, Kovács és munkatársai által leírtak szerint⁴⁹. A mintákat a mikroszkópiánál leírtak szerint készítettem elő és 40 percig szobahőmérsékleten fixáltam. Fixálás után a mosást itt PBT-vel (3x 10perc, PBS + 0.1% Tween20) végeztem. Ezt követően az agyakat kiboncoltam és 1 órát blokkoltam 1ml PBT + 50µl FBS (*fetal bovine serum*) oldatban. Ezután inkubáltam a mintákat az elsődleges ellenanyagban: anti-ubikvitin (mouse, 1:500, Merck, ST1200), 5°C-on 2 napig. A felesleges elsődleges ellenanyagot kimostam PBT-vel (3x 20perc), majd egy újabb blokkolás következett 20 percig, mely után már a másodlagos ellenanyaggal: Alexa Fluor 488 anti-mouse (1:500, Life Technologies, A11001) inkubáltam az agyakat szobahőmérsékleten, 2 órán keresztül. A másodlagos ellenanyag feleslegét is több lépésben kimostam, az elsődlegesnél leírtak szerint, majd az "utóboncolás" során eltávolítottam a maradék rajtamaradt más szervből származó szövetet és tracheákat az agyak felszínéről a mikroszkópia előtt. A magok jelölése Hoechst tartalmú PBS:glicerín (1:4) magfestéssel történt.

Western-blot

Bizonyos fehérjék mennyiségi változásának mérésére Western-blotot alkalmaztam. A méréshez 7 napos, nőstény állatok fejéből izoláltam fehérjét. Az állatokat éteres altatás után lefejeztem, így az egyes törzsekből 15-15 fejet gyűjtöttem eppendorf csövekbe. A fejekből

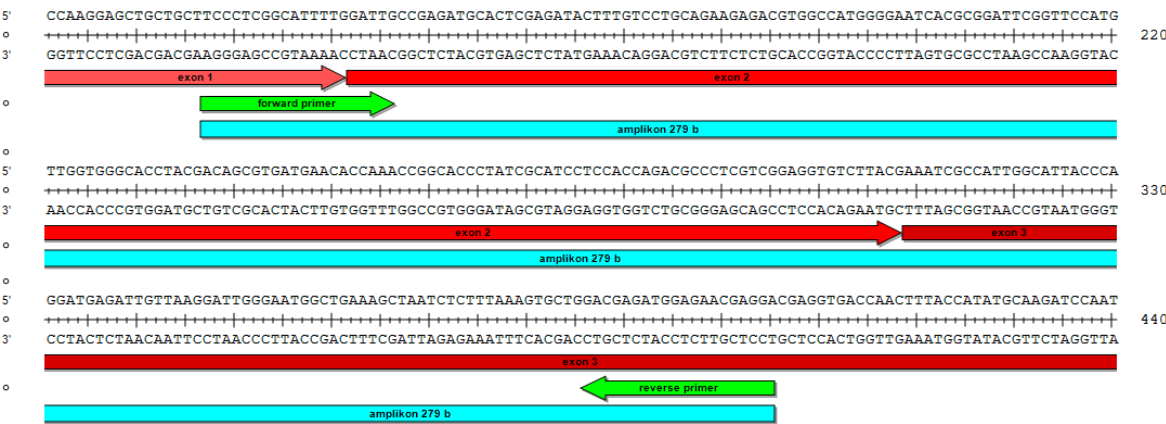
a fehérjét 96µl Fly Lysis buffer és 2xLaemmli (BioRad, 1610737) buffer 1:1 arányos keverékében homogenizáló pálca segítségével nyertem ki, majd -20°C-on tároltam. A Western-blotot Billes és munkatársai által leírt metodika szerint folytattam⁵⁰. Az egyes mintákból 15µl-t vittem fel, majd futtattam 4-20%-os Mini-PROTEAN® TGX™ gradiens gélen, majd blottoltam nitrocellulóz membránra (Kisker Biotech, 40520100). Ezt követően 3%-os tejpor oldatban (BioRad 170–6404 Blotting-Grade Blocker) blokkoltam a mintákat 1 órán keresztül, majd felvittem az elsődleges ellenanyagokat: anti-Ref(2)P/p62 (nyúl, 1:2000⁵¹), α-Tub84B (belső kontroll) (egér, 1:1000, Sigma, T6199), anti-Atg8a (nyúl, 1:2000^{52,53}) és ezekben inkubáltam a mintát 5°C-on egy éjszakán keresztül. Másnap lemostam a felesleges (nem kötődött) elsődleges ellenanyagot a nitrocellulózzal TBST-vel, 3x 10 perc mosás. Ezután a másodlagos ellenanyagokban: anti-nyúl IgG alkalikus foszfatáz (1:1000, Sigma, A3687), anti-egér IgG alkalikus foszfatáz (1:1000, Sigma, A5153) egy órát hagytam a nitrocellulózt. Az előhívás NBT-BCIP oldattal (1:50, Sigma, 72091) történt. Az eredmények kiértékeléséhez ImageJ programot használtam. A p62 és Atg8a szintjeit az α-Tub84B-nél mért változással korrigáltam. A Western-blot egy szemi-kvantitatív technika, így csak a változások irányát jegyeztem fel, azok mértékét nem jelöltem.

PCR, Q-PCR

Az RNS-interferencia hatékonyságának vizsgálatára PCR eljárásokat alkalmaztam, melyek megmutatják, hogy a kontrollhoz képest hogyan változik a vizsgált génekről átíródó mRNS-ek mennyisége. A kísérlethez 7 napos nőstény *Drosophilák* fejéből izoláltam RNS-t. A muslicákat éteres altatás után lefejeztem, így 10-10 fejet gyűjtöttem össze az egyes genotípusú állatokból. Trizol és 96%-os etanol 1:1 arányos keverékében, homogenizáló pálca segítségével degradáltam a szöveteket, hogy kinyerhessem a nukleinsavakat, majd RNS izoláló kit (Direct-zol™ RNA MiniPrep kit (Zymo Research, R2050)) segítségével izoláltam azokat az extraktumból. DNáz enzim emésztéssel tovább tisztítottam a mintákat, hogy abban ne maradjon genomiális DNS, ami befolyásolhatja a PCR eljárás végeredményét. A tisztított mintát eltettem -80°C-ra 1 napra. Először standard PCR technikával vizsgáltam a mintákat. Az RNS-eket reverz-transzkriptáz (RevertAid RT Reverse Transcription Kit (Thermo Scientific, K1691)) enzimmel cDNS-re írtam át, majd amplifikáltam. Az így keletkezett ampliconokat 0,8%-os agaróz gélen futtattam, melyhez 4µl etídium-bromidot adtam hozzá. Ugyanezeket az RNS mintákat kvantitatív PCR (Q-PCR) eszközzel is megvizsgáltam (Roche LightCycler 96 (Roche Molecular Systems)), az alábbi

kit alkalmazásával: (FastStat Essential DNS Green Master kit (Roche, 06924204011)). Minden mintáról 3 párhuzamos mérést végeztem. Háztartási génként az *actin5c* mRNS mennyiségét mértem.

Primer tervezéskor úgy próbáltam kiküszöbölni a genomiális DNS szennyezést, hogy a *forward* és *reverse* primereket két külön exonra, továbbá a *forward* primert két egymást követő exon határára terveztem, így csökkentve annak az esélyét, hogy az intronokat is tartalmazó nukleinsav szekvenciákkal ez a primer párba álljon (5.ábra). Ha ez mégis megtörténne úgy az amplikon eltérő hosszából következtethetünk a valós mRNS mennyiségre. Az intronokat tartalmazó amplikonok mindig hosszabbak lesznek, mint a processzált mRNS amplikonja (2.táblázat). A PCR eljárásokhoz a primereket Lasergene SeqBuilder (v7.0, Build: 43) szoftver és a Primer3web (primer3.ut.ee) webes program segítségével terveztem (2.táblázat).



5.ábra: CG7324 gén szekvenciájára tervezett primerek SeqBuilder programban. A gén szekvenciája a FlyBase adatbázisból származik, majd abból az intronokat a program segítségével kivágtam.

	Forward	Reverse	cDNS (b)	gDNS (b)
<i>actin5c</i>	5-GGATACTCCTCCCACACAA-3'	5-GAGCAGCAACTTCTTCG-3'	265	1826
<i>CG8085</i>	5-AGCGAAACGTACCACACAAAT-3'	5-TGAATGTTGTTGTCTCCAGC-3'	151	481
<i>CG7324</i>	5-TCCCTCGGCATTTTGGATTG-3'	5-TCCTCGTTCCTCATCTCGTC-3'	279	1235
<i>CG1695</i>	5-ACGAGGAGTTCTTGGCCAG-3'	5-CCACTTTCACGGGTCAGA-3'	347	525
<i>CG31935</i>	5-GATAAGTTTCGACCCCATGCG-3'	5-TGGGGAGGATGGGGATCA-3'	323	2241
<i>CG42795</i>	5-TTGCCAGGGATTCAACATGC-3'	5-TCCCATCTTGCCATAGAACTCA-3'	448	1044

2.táblázat: A PCR eljárásokhoz tervezett primerek. Forward (/left-primer), reverse (/right-primer). cDNS (komplementer DNS) az RNS mintából reverz transzkripció során átíródott szekvencia hossza bázisokban (b) megadva. gDNS (genomiális DNS) az esetleges DNS szennyezésből kapott amplikonok hossza.

Statisztika és az adatok ábrázolása

Az adatok statisztikai elemzését RStudio (2021.09.0 Build 351) programmal végeztem. Első lépésként az adatok eloszlását teszteltem. Normál eloszlás esetén t-tesztet, nem normál eloszlás esetén Mann-Whitney U-tesztet használtam. A diagrammokon megjelenő csillagok a szignifikancia megbízhatósági fokát jelzik: $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***. A fekete * a "vad" (isowhite) típusú kontrollhoz képesti szignifikanciát, a barna * az RNSi-kontrollhoz (GFP-RNAi) képesti szignifikanciát jelöli.

A kiértékelt adatok ábrázolására boxplotokat (dobozdiagramokat) készítettem szintén az RStudio program segítségével. A boxplot diagramon a doboz az interkvartilisbe tartozó értékeket (adatok 50%-át), a dobozban lévő vonal pedig a mediánt jelöli. Az alsó vízszintes vonal a minimum, a felső a maximum értéket mutatja. Az üres körök az adatsor kiugró értékeit tüntetik fel. A fekete pontok a diagramon egy-egy mintához tartozó értéket jelölnek, például egy mikroszkópos kép kiértékelését, kivéve a mászás esszé esetében, ahol egy pont egy darab mérést, azaz 10 állat mászását jelöli. Az élethossz vizsgálat és a Q-PCR adattípusa nem jeleníthető meg boxplot segítségével, így itt oszlopdiagramot használtam. Az oszlopdiagramon feltüntetett sávok a standard szórást mutatják.

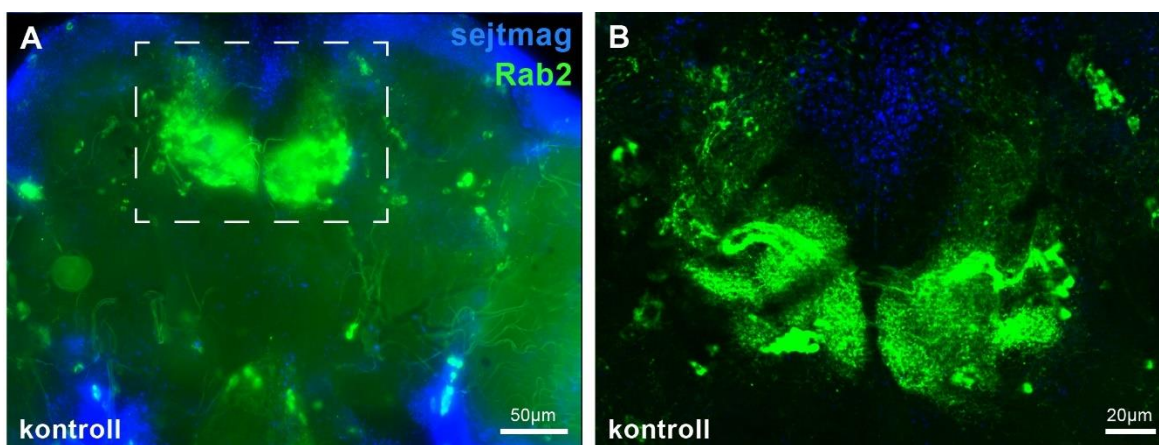
Eredmények és diszkusszió

A Rab2 pozitív vezikulumok mennyisége szabályozható egyes GAP-ok csendesítésével felnőtt *Drosophila* agyakban

Mivel a célom Rab2 aktiváció és ezzel a lizoszómális lebontási útvonalak hatékonyságának növelése az idegrendszerben, így először megvizsgáltam fluoreszcens mikroszkópia segítségével, hogy az egyes GAP-ok csendesítése esetén hogyan változik az aktív Rab2 fehérjét tartalmazó vezikulumok mennyisége muslica agyakban. Amennyiben sikerül Rab2-t inaktiváló GAP-ot csendesíteni, úgy több Rab2-pozitív vezikulumot kell, hogy lássunk az idegsejtekben. Az aktív (lipidált és vezikula membrán kötött) Rab2 fehérjék jól elkülöníthető fluoreszcens pöttyökként, míg az inaktív szolubilis forma halvány háttérzajként jelenik meg a fluoreszcens mikroszkópos képeken (7.ábra).

A kísérletben a BDSC gyűjteményből megrendelhető 12 GAP-RNSi törzset vizsgáltam. Az egyes interferencia törzseket *DdcGal4*; *Rab2-YFP* genotípusú állatokkal kereszteztem be, ami csak az agy dopaminerg és szerotonerg neuronjaiban fejeződik ki. A mérés során a

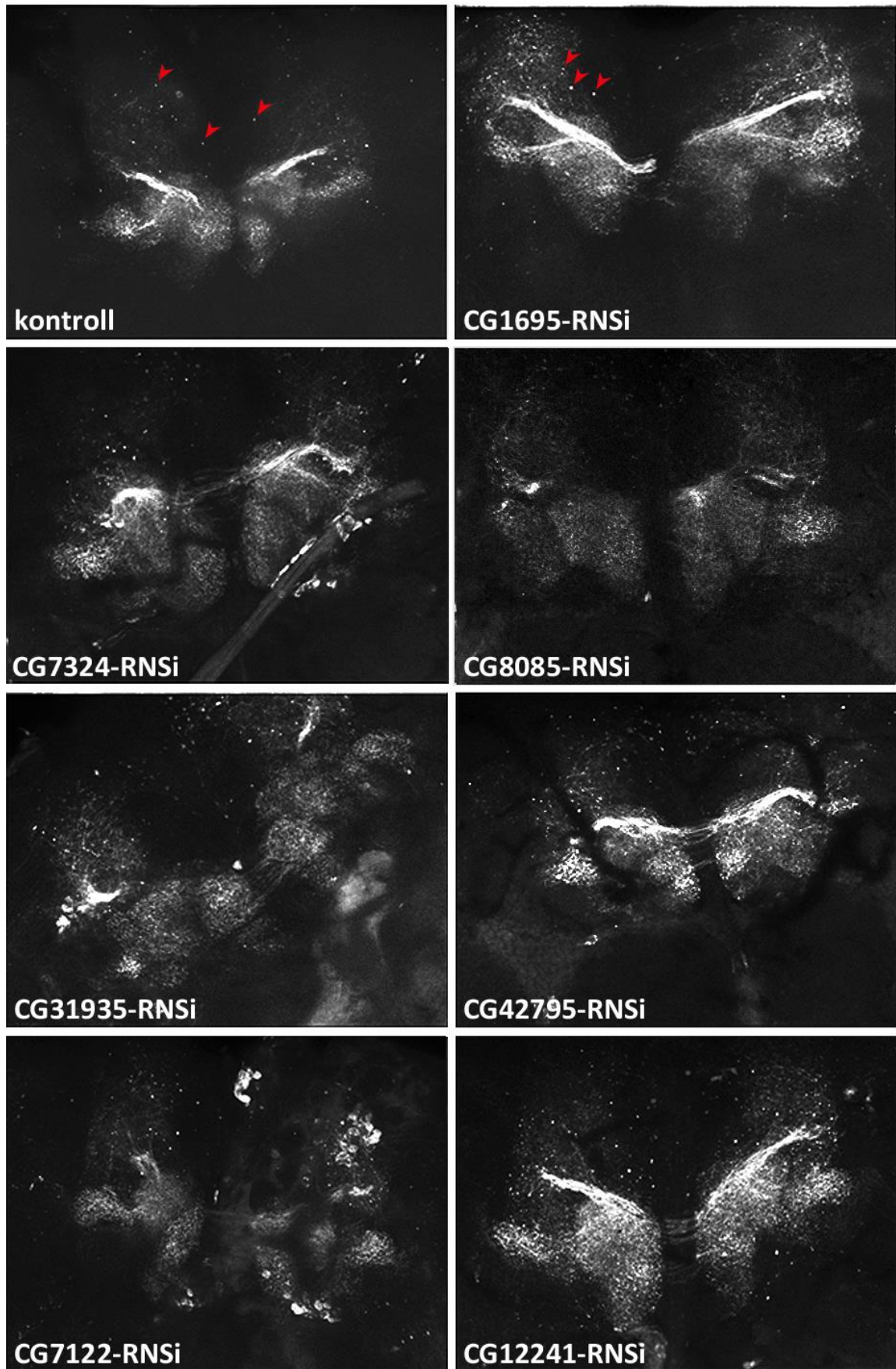
gombatestnek (*mushroom body* (MB)) nevezett agyterületre koncentráltam, mely nagy számban tartalmaz dopaminerg és szerotonerg neuronokat, valamint alkalmas öregkori neurodegeneratív betegségek modellezésére⁵⁴⁻⁵⁶ (6.ábra: A-B).



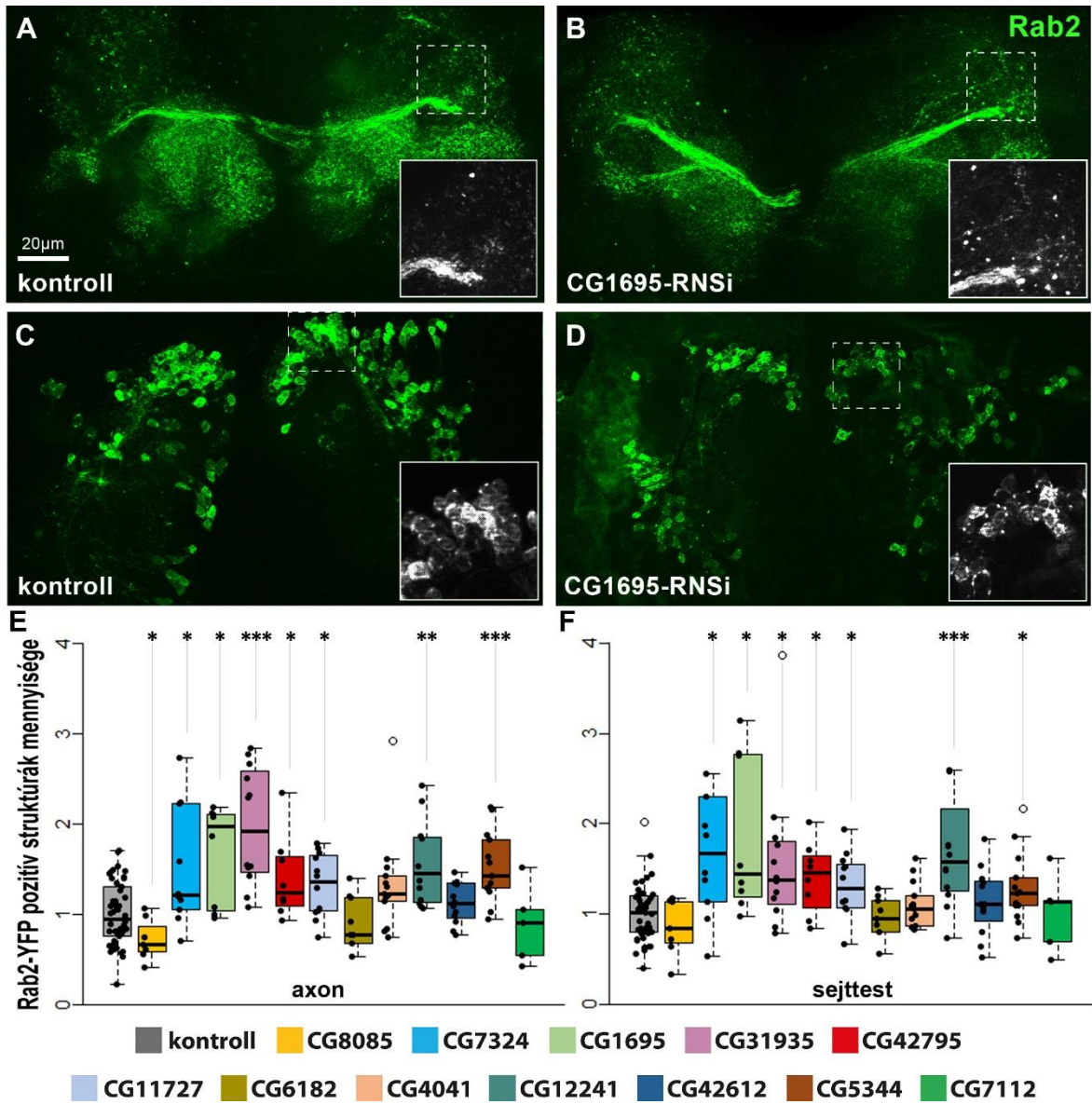
6.ábra: Rab2-YFP jelölés *Drosophila* agyban, dopaminerg és szerotonerg neuronokban. A: konvencionális mikroszkópos felvétel *Drosophila* agyról. Fehérrel bekeretezett terület az MB. **B:** *Drosophila* gombatest szemi-konfokális felvétele.

Külön vizsgáltam a neuronok sejttesti és axonális területeit, ugyanis a neuronok nagymértékben polarizált sejtek, így nagy különbségek lehetnek a két sejtt területen (8.ábra: A-D). Több GAP gén csendesítését követően is megfigyelhető szignifikáns változás a Rab2-YFP pöttyök mennyiségében (7., 8.ábra: E-F). Az axonális sejtt területen 7 esetben növekedés és 1 esetben csökkenés következik be, míg a sejtt test területén 7 gén csendesítése okoz szignifikáns növekedést. Az aktív Rab2 fehérje növekedést okozó géncsengesítések (CG7324-, CG1695-, CG31935-, CG42795-, CG11727-, CG12241-, CG5344-RNSi) mindkét sejtt területen szignifikáns változást okoztak. A legtöbb csendesített génnel ellentétben, csökkenést okozó géncsengesítés (CG8085-RNSi) azonban csak az axonális területen mutat szignifikáns eltérést.

Az itt kapott eredmények és egy korábban elvégzett előzetes mászás vizsgálat alapján, végül 5 GAP-RNSi törzset választottam ki, amiket részletesebben is meg szerettem volna vizsgálni (3.táblázat). Ezek az alábbiak: CG7324, CG1695, CG31935, CG42795 és CG8085, melyek közül az első négy mind a Rab2 pozitív struktúrák mennyiségében, mind az előzetes mászás esszében javulást eredményezett, míg CG8085 mindkét kísérletben rontott, így ellenpéldának lett kiválasztva.



7.ábra: Példák az egyes *GAP-RNSi* törzseknél vizsgált Rab2 jelölésről *Drosophila* idegrendszerben (gombatestben), a sejtek axonális területén. A piros nyilak a kiértékelésnél mért, jól elkülöníthető, aktív Rab2-pozitív fluoreszcens pöttyöket jelzik.

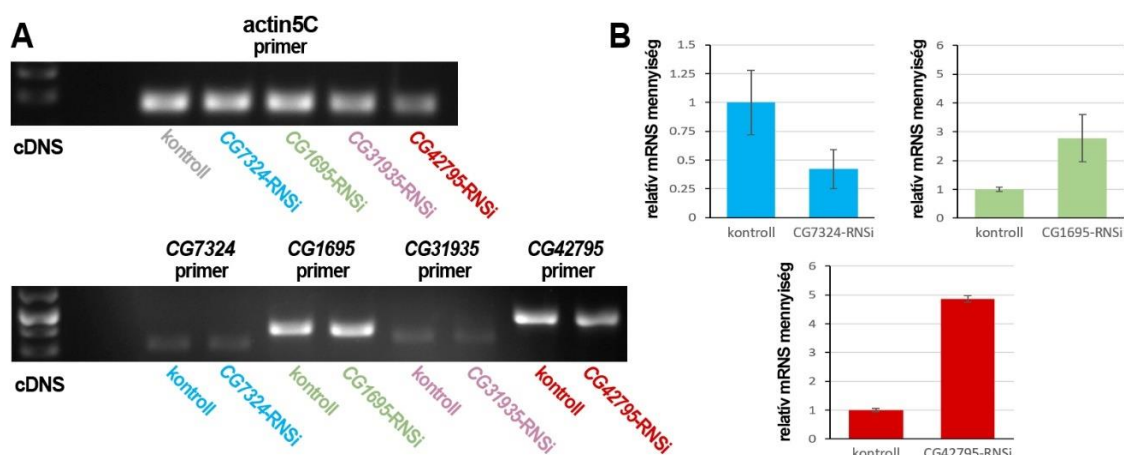


8.ábra: Rab2-pozitív struktúrák mennyiségének változása, különböző GAP csendesítések esetében a neuronok axonális és sejtestest területén. **A-B:** Kontroll és CG1695-RNSi Rab2 pöttyözöttsége a gombatest (MB) axonális területén. **C-D:** Pöttyözöttség az MB neuronok sejtestest területén. **E-F:** A két vizsgált sejtesterületen lévő változásokat szemléltető boxplot diagramok. Az egyes genotípusok színekódolása az összes ábrán egységes.

GAP gén:	vélt funkció:
CG8085	Másnéven <i>RN-tre</i> (<i>Related to the N terminus of tre oncogene</i>). Ez a <i>Drosophila</i> gén több humán génnel is összefüggésbe hozható, de a legközelebb a humán RNTRE fehérjéhez áll, mely képes az EGF (<i>epidermal growth factor</i>) receptor egy doménjéhez kötni, emellett GTPáz funkcióval is rendelkezik ⁵⁷ .
CG7324	Másnéven <i>Tbc1d8-9</i> (<i>TBC1 domain family member 8/9</i>). Több humán ortológja is van, például a <i>TBC1D8</i> (<i>TBC1 domain family member 8</i>), vagy a <i>VRP</i> (<i>vascular RabGAP/TBC domain containing protein</i>). GTPáz funkcióval rendelkezik, valamint szerepet játszhat a <i>nephrotic syndrome type 20</i> betegség kialakulásában ^{57,58} .
CG1695	Humán ortológjai az <i>SGSM1</i> (<i>small G protein signaling modulator 1</i>) és <i>SGSM2</i> (<i>small G protein signaling modulator 2</i>). Vélt funkciója GTPáz aktiváció ⁵⁹ . Az <i>SGSM1</i> és <i>SGSM2</i> fehérjéknek <i>TBC-8</i> a <i>C. elegans</i> ortológja, amelyről leírták, hogy rendelkezhet <i>Rab2</i> -t szabályozó GAP funkcióval (egyetlen ilyen jellegű kísérletes publikáció) ⁶⁰ .
CG31935	Vélhetőleg egy <i>Rab3</i> fehérjét inaktíváló GAP katalitikus alegysége, de lehet máshol is GTPáz funkciója. A <i>Rab3</i> szerepet játszik neurotranszmitterek és hormonok exocitózisában. (UniProt)
CG42795	Humán ortológja a <i>TBC1D30</i> (<i>TBC1 domain family member 30</i>) Vélt funkciója GTPáz aktiváció (UniProt)

3.táblázat: További elemzésre kiválasztott 5 GAP gén(/fehérje) rövid leírása.

Szemi-quantitatív PCR segítségével vizsgáltam ezen gének csendesítésének hatékonyságát, melyhez a muslicák fejéből izoláltam mRNS-t. 2 gén esetén tudtam mRNS szint változást kimutatni a gélek kiértékelését követően, amelyek transzlációs gátlásra (*CG42795*), illetve mRNS degradációra (*CG31935*) utalnak (9.ábra: A). A szemi-quantitatív PCR nem bizonyult elég érzékenynek arra, hogy minden gén esetében kimutasson változást. Ez valószínűleg azért van így, mert az általam használt RNS-interferenciák csak a dopaminerg és szerotonerg neuronokban fejeződnek ki, az RNS izolálását azonban csak egész fejből tudtam kivitelezni, melynek következtében elenyészővé válik a befolyásolt sejtek aránya a mintákban. E probléma kiküszöbölésére kvantitatív PCR (Q-PCR) segítségével is megvizsgáltam a mintákat, mivel ez az eljárás képes kimutatni a nagyon kis mennyiségi eltéréseket is. A Q-PCR kimutatta, hogy *CG1695*- és *CG42795*-RNSi esetében megemelkedik a transzkriptum mennyisége, tehát ezen géneknél transzlációs gátlás következik be. *CG7324*-RNSi esetében pedig lecsökken, ami az mRNS-ek degradációjára utal (9.ábra: B). *CG31935*-RNSi mérése ismétlést igényel. Elmondható tehát, hogy 3 esetben (*CG7324*-, *CG1695*-, *CG42795*-RNSi) működik az RNS-interferencia és *CG31935*-RNSi-nél is erre utal a szemi-quantitatív PCR eljárás eredménye. A *CG8085*-re tervezett primer nem működött megfelelően, így ez újratervezésre szorul.



9.ábra: Az RNS-interferenciák hatékonyságának tesztelésére elvégzett szemi-kvantitatív PCR és Q-PCR eljárások eredményei. **A:** Kontrollként használt háztartási gén (*actin5C*) mRNA mennyisége az egyes mintákban (felső gélkép). A csendesített target gének mRNA mennyisége (alsó gélkép). **B:** A kvantitatív PCR eljárás eredményeit ábrázoló diagramok.

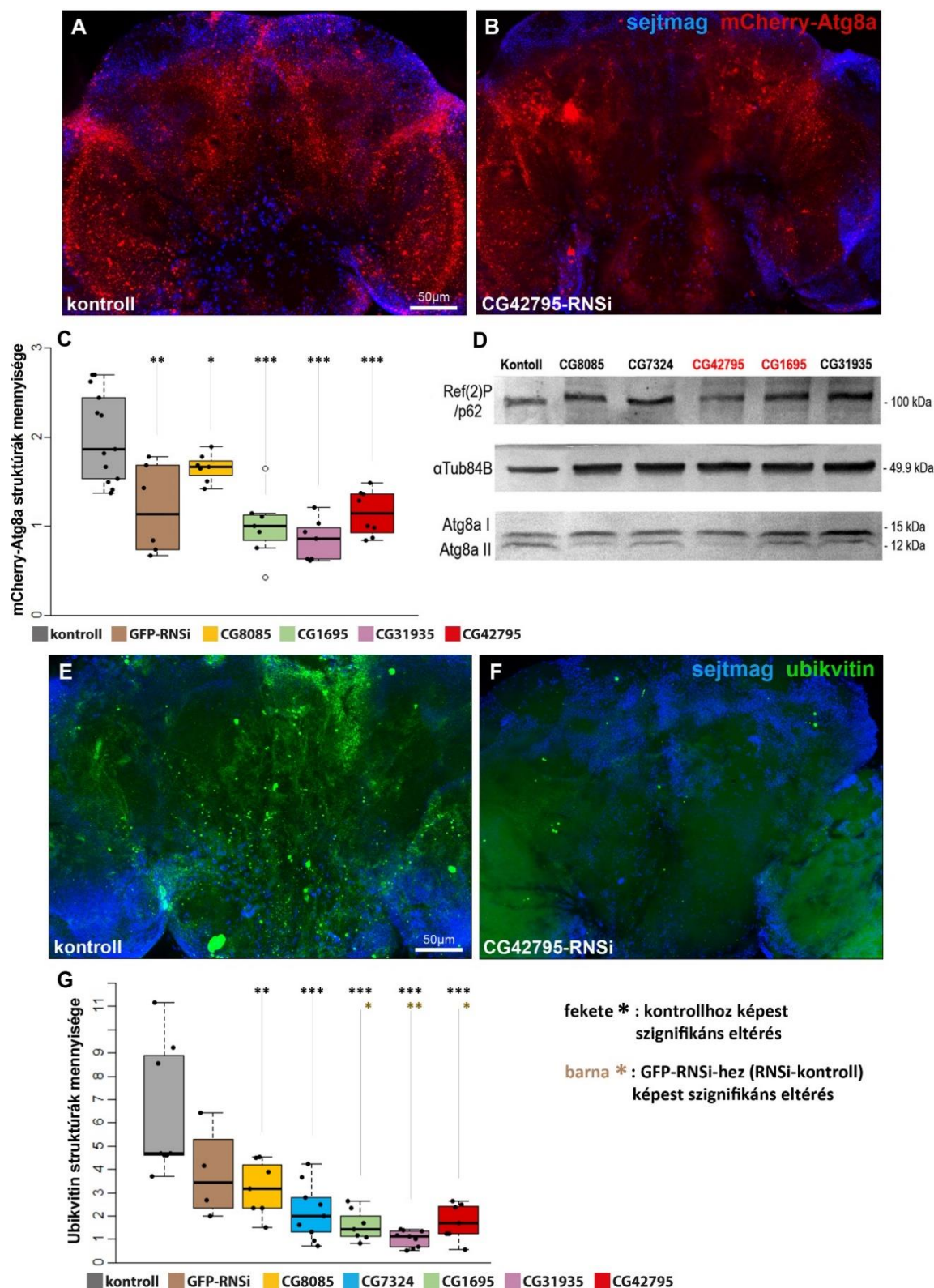
Az autofágia aktiválható a Rab2-t szabályozó GAP-ok idegrendszeri gátlásával

Az 5 kiválasztott GAP-csendesítésnél az autofágia aktivitását is meg szerettem volna vizsgálni. Ehhez 3xmCherry-Atg8a markert használtam, mely a formálódó fagofórtól az autolizoszómáig valamennyi kompartmentumot kijelöli⁶¹ (10.ábra: A-B). Mind az 5 törzs esetében szignifikánsan csökken az Atg8a-pozitív pöttyök mennyisége a vad típusú állatokhoz képest, az RNSi-kontrollhoz képest azonban a csökkenés nem volt minden esetben sikeres (10.ábra: C). CG7324-RNSi esetében a mérés sikertelen volt, így ezt majd meg kell ismételni. A lipidált Atg8a pöttyök csökkenése azon genotípusoknál, ahol növekedett a Rab2 pöttyök száma, jelentheti azt, hogy az autofág vezikulák fúziója hatékonyabb és a hosszan fennálló aktivált autofágia hatására elbomlott az mCherry jelölés.

Western-blot segítségével megvizsgáltam az egyes genotípusú állatok fejéből izolált Atg8a és p62 fehérjék mennyiségét, valamint kontrollként α -Tub84B szintet is mértem (10.ábra: D). A gélképen az Atg8a-II (lipidált forma) szintek egybevágnak a mikroszkópos eredményekkel, az RNSi törzseknél a fehérje mennyisége csökken. Ha az autofág-lizoszómális lebontási útvonal hatékonysága növekedik, akkor a Ref(2)P/p62 fehérje lebomlik (szubsztrátja a folyamatnak) a folyamat során, így e fehérje jó indikátora az autofágiának⁶¹. A p62 szint is valamennyi RNSi törzsnél csökken (α -Tub84B mennyiségével korrigált számítás alapján), ami a kiértékelés alapján CG1695 és CG42795 esetében jelentős, így ezeknél az autofágia aktiválódása feltételezhető.

További vizsgálatként immunhisztokémiát (IHC) végeztem muslica agyakon, lebontásra megjelölt, ubikvitinált fehérje aggregátumokat keresve (10.ábra: E-F). A vad típusú állatokhoz képest mind az 5 kiválasztott GAP-csendesítésnél jelentősen csökkent az aggregátumok mennyisége, továbbá 3 törzs esetén az RNSi-kontrollhoz képest is szignifikáns csökkenést

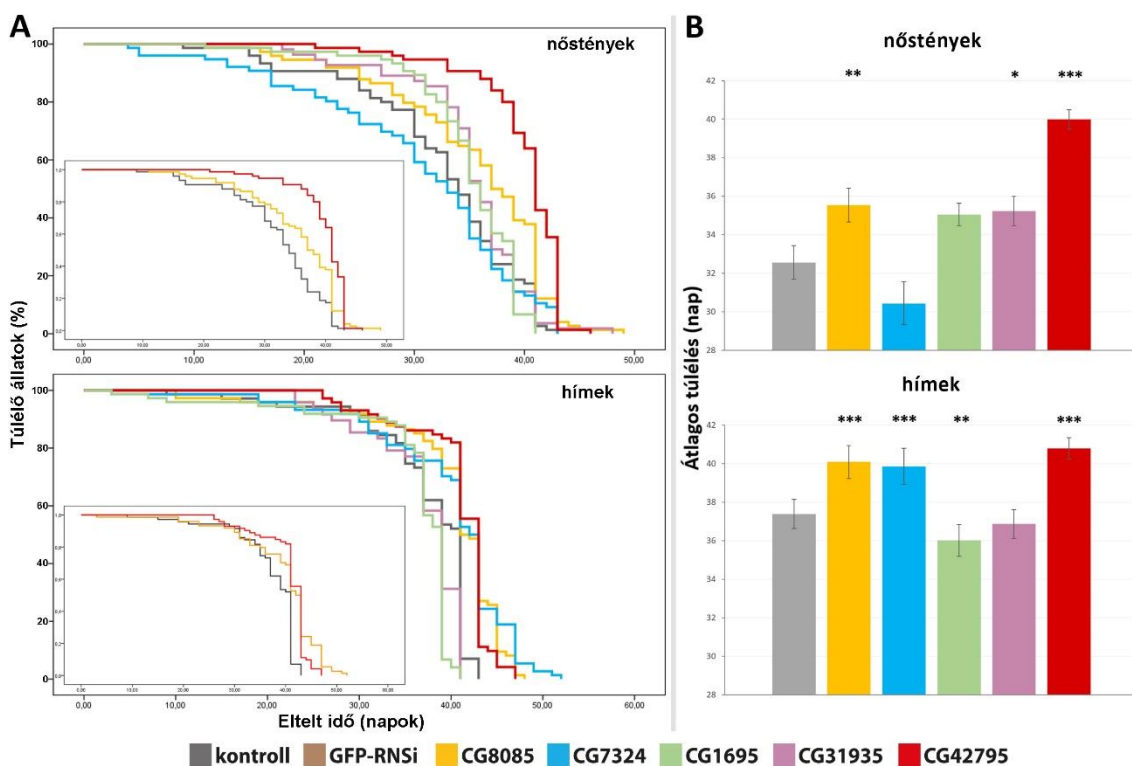
kaptam (10.ábra: G). Ezek az eredmények szintén magyarázhatóak az autofágia emelkedett aktivitásával, melynek hatására lebomlanak a degradációra megjelölt ubikvitinált struktúrák.



10.ábra: GAP csendesítések hatása az autofág-aktivitásra felnőtt *Drosophila* agyban. A-B: mCherry-Atg8a tartalmú struktúrák mennyisége a kontroll és egy GAP csendesítés esetében. **C:** Az mCherry-Atg8a fluoreszcens képek kiértékelése. **D:** Western-blot eredmények. **E-F:** Az ubikvitin tartalmú struktúrák jelenléte a kontroll és egy GAP-RNSi törzs esetében. **G:** Az ubikvitin ellenanyag jelölések kiértékelése.

Élethossz növekedés érhető el GAP-ok idegrendszer specifikus csendesítésével

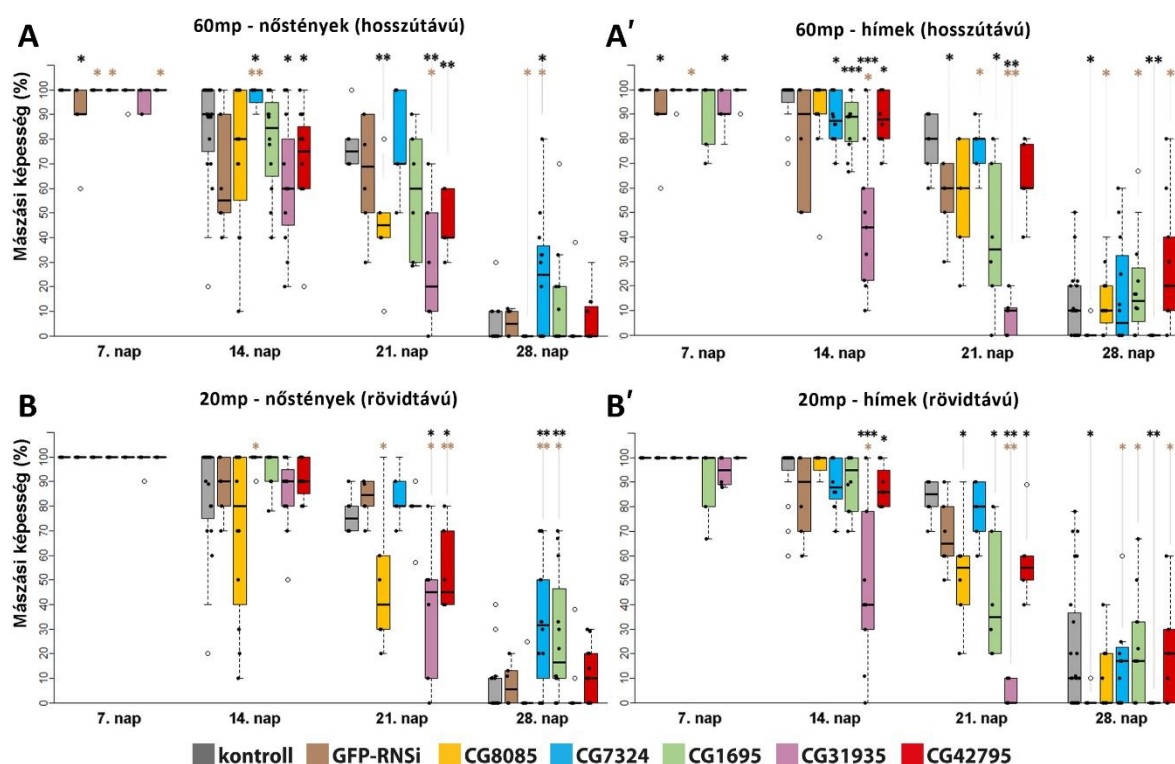
A Rab2 fehérje mutáns konstitutívan aktív formája képes volt élethossz növekedést okozni *Drosophilában*⁶, tehát ha sikerül Rab2-t inaktíváló GAP-ot csendesítenem, akkor hasonlóan élethossz növekedést várhatok. Ennek tesztelésére élethossz vizsgálatot végeztem az 5 RNSi törzsen (11.ábra: A-B). A csendesítéseket szintén csak dopaminerg és szerotonerg neuron specifikusan végeztem, így más szövetek, vagy neuron típusok hatásai nem befolyásolják a kísérletet. *CG8085*- és *CG42795*-RNSi mindkét nemnél szignifikánsan növelte az átlagos élettartamot, a *CG42795*-RNSi nőstény muslicáknál kiemelkedő növekedést okozott. A másik három GAP gén csendesítése csak az egyik nemben mutat változást. *CG7324*- a hímekben növeli az átlagos élettartamot, nőstényekben azonban nincs szignifikáns változás. *CG1695* csendesítése hímek esetében szignifikáns csökkenést, míg nőstényekben növekvő trendet mutat. *CG31935*-RNSi a nőstényekben szignifikánsan növeli az élethosszt, hímekben viszont nem okoz változást.



11.ábra: Átlagos élettartam változása az egyes géncsenedesítések hatására. A: Az egyes géncsenedesített törzsek Kaplan-Meier élethossz görbéi. A bal alsó sarokban található kisebb grafikonok a mindkét nemben szignifikáns növekedést mutató görbéket emelik ki. **B:** Átlagos élethossz az egyes törzsek esetében.

A mászás vizsgálatot is megismételtem több mérési ponttal, mint a korábban alkalmazott, előzetes mérés esetében. A mostani adatok alapján mind a hosszútávú, mind a rövidtávú mászásképeséget kiértékeltem (12.ábra). Bizonyos GAP-csenedesítések

javították, míg egy esetben jelentősen romlott az állatok mászásképpessége idős korukra. CG8085-RNSi a hím állatok a hosszútávú mászását javítja, míg nőstényeknél ront. CG7324-RNSi mind a hosszútávú, mind a rövidtávú mászást javította az idős nőstény muslicák esetében. CG1695- rövid távon mindkét nemnél javulást eredményez, míg hosszútávon csak a hímeknél szignifikáns a javulás (bár tendenciózus javulás minden mérésnél látható). A leg szembetűnőbb változást a CG31935 csendesítése esetében láthatjuk, ami jelentősen lerontja az állatok mászását mindkét nemben. Ebben az esetben a *Drosophilák* már 21 napos korukra szinte alig képesek mászni. CG42795-RNSi mindkét nemben javít, ez azonban csak a hímekben mutat szignifikáns változást.



12.ábra: Mászási képesség változása az egyes géncsökkentések hatására öregedő muslicáknál. A-A': Hosszútávú mászási képesség öregedő nőstény (baloldalt) és öregedő hím (jobbaldalt) állatok esetében. B-B': Rövidtávú mászási képesség változása.

A GAP-ok tápláltsági kondíciótól függő módon szabályozhatják a Rab2 aktivációját

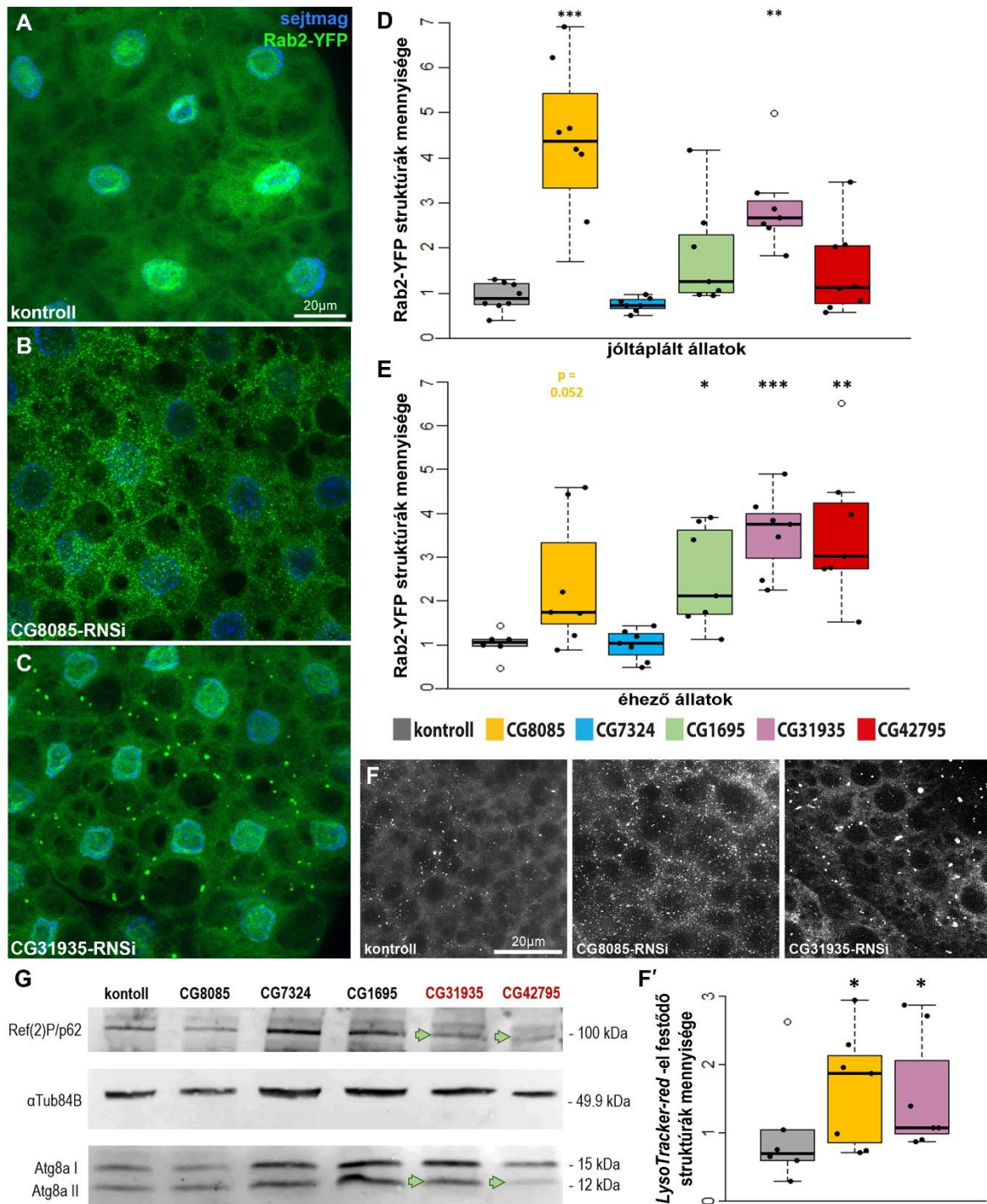
Az autofágia és lizoszómális lebontás vizsgálatának kedvelt szövete a *Drosophila* lárvális zsírszövet. Szerettem volna itt is megvizsgálni, az egyes GAP-ok hatását. Először a Rab2 pozitív struktúrák változását tanulmányoztam. Az RNSi törzseket cgGal4; Rab2-YFP törzzsel kereszteztem be, mely lárvális zsírtest specifikusan fejeződik ki. A vizsgálatot két kondícióban, jóláplált és éhező állatok esetében is elvégeztem. Éheztetés következtében az

autofágia aktiválódik az állatokban, míg jóltáplált körülmények között kevés autofág vezikulum észlelhető⁶².

A jóltáplált lárvák esetében a kontroll szövet alig tartalmaz Rab2-pozitív vezikulát, míg CG8085-RNSi esetében rengeteg apróbb elszórt pöttyöt figyeltem meg. CG31935-nél pedig kevesebb, de nagy méretű Rab2-pozitív struktúrák jelennek meg többnyire a sejtek periferiáján (13. ábra A-C). A vezikulumok periferián való elhelyezkedése utalhat az adott GAP vezikula transzportban betöltött szerepére, egy a szállításhoz szükséges kis-G fehérjén keresztül. Ezt a hipotézist másfajta, a vezikuláris transzport folyamatok vizsgálatára alkalmas markerekkel lehetne tesztelni. Egy ilyen kísérlet rávilágíthat arra, hogy melyik kis-G fehérjét szabályozza az adott GAP. Éhező állatoknál már CG1695 és CG42795 esetében is szignifikáns növekedést figyelhetünk meg, azonban CG8085 hatása itt kevésbé jelentős (13. ábra D-E). CG7324 nem mutat változást a kontrollhoz képest egyik esetben sem. Ezek az eredmények az aktív Rab2 fehérje mennyiségének jelentős emelkedésére utalnak bizonyos GAP-ok csendesítésének következtében zsírszövetben.

A két jelentős változást mutató GAP-RNSi (CG8085, CG31935) esetében egy további kísérletben LysoTracker Red festést alkalmaztam lárvális zsírtesten, mely a lebontásban fontos savas vezikulákat festi⁶¹. Ilyenek a lizoszómák és a késői endoszómák. Ennél a kísérletnél is az előzőekéhez hasonló mintázatot figyeltem meg, valamint a két genotípusban szignifikánsan több volt a lebontó útvonalak vezikuláiból (13. ábra: F-G).

Zsírtestben az egyes GAP-csendesítések autofág-aktivitásra gyakorolt hatását az idegrendszerrel leírt protokoll szerint Western-blottal vizsgáltam. Az Atg8a és p62/Ref(2)P autofág marker fehérjék, valamint kontrollként az α -Tub84B fehérje mennyiségét mértem (13. ábra: G). Ebben a kísérletben ehhez jóltáplált *Drosophila* L3F stádiumú lárvák zsírtesteiből izoláltam fehérjét, 10 állatból/minta. A szemi-kvantitatív adatok kiértékelését követően két géncsengesítés (CG31935-, CG42795-RNSi) esetében tapasztaltam jelentősebb csökkenést a Ref(2)P fehérje mennyiségében, mely az autofág-lebontás aktiválódására utal, valamint ezen géneknél a lipidált-Atg8a fehérje mennyisége (lipidált forma (Atg8a II) a szabad formához (Atg8a I) képest) is lecsökkent. Ezen adatok hasonlítanak az idegrendszerben tapasztaltakhoz azon géneknél, ahol aktiválódott a savas lebontás.



13.ábra: GAP csendesítések hatásának vizsgálata lárvális zsírszövetben: **A-C:** Rab2-pozitív organellumok kontroll és két RNSi törzs esetében. **D-E:** A Rab2-YFP pöttyök mennyiségi változását ábrázoló grafikonok jól táplált (**D**) és éhező (**E**) állatok esetében. **F-F':** LysoTracker Red-el festődő organellumok a különböző mintákban, valamint ezek mennyiségi változását ábrázoló boxplot. **G:** Zsírtestekből izolált fehérjék Western-blot eredményei.

Konklúzió és jövőbeli tervek

Az eredményekből az alábbi következtetéseket vonhatjuk le (14.ábra). CG8085-RNSi idegsejtekben csökkentette, zsírtestben növelte az aktív Rab2 fehérjék számát, mégis megnövelte az élethosszt, így elképzelhető, hogy ez a GAP nem Rab2-n, hanem más kis-G

fehérjén keresztül hat az idegrendszerben. Ezzel szemben *CG7324-RNSi* csak idegsejtekben (zsírtestben nem) növelte az aktív Rab2 mennyiségét, tehát ez a GAP szövetspecifikus lehet. Ezen felül javította az állatok mászási képességét és a hím állatok élethosszát. *CG1695*, *CG31935* és *CG42795* csendesítése mind idegsejtekben, mind zsírszövetben képes növelni az aktív Rab2 mennyiségét, valamint emelni az autofágia mértékét. E három géncsökkentés közül *CG1695*- negatívan befolyásolja a hím állatok élethosszát, viszont javítja az állatok mászás képességét. *CG31935*- javítja a nőstény muslicák átlagos élethosszát és mindkét nemből jelentős negatív hatással van a mászás képességre. *CG42795*- mindkét nemből az élethossz is jelentősen megnövelte, valamint a mászás képességre is pozitív hatással volt idős *Drosophiláknál*.

Bizonyos GAP-ok eltérő hatással bírhatnak a Rab2 aktivációjára zsírszövetben: *CG80085-RNSi* esetében megfigyelhető kisméretű, a sejtekben szórtan elhelyezkedő vezikulumok a lizoszómális lebontás hibájára utalhatnak, míg *CG31935* csendesítésekor nagyméretű Rab2-pozitív, savas vezikulumok képződnek, amelyek a sejtmembrán felé szállítódnak. Ez utalhat hatékonyabb vezikula fúzióra.

A kapott eredményekből elmondható tehát, hogy GAP-ok csendesítésével lehetséges lehet az aktív-Rab2 fehérjék mennyiségének a növelése. Sok esetben sikeresen növelhető a savas lebontó útvonalak hatékonysága, ezáltal az ubiquitinált lebontásra megjelölt anyagok csökkentése a *Drosophilák* agyában, valamint elérhető az állatok élethosszának és mászási képességének növelése is. Néhány esetben viszont élettartam vagy mászás képesség csökkenés történt, tehát a GAP-ok csengesítésének negatív hatásai is lehetnek. Mindent összevetve a GAP fehérjék gátlása egy jó irányba lehet a savas lebontó útvonalak hatékonyságának növelésére és gyógyszer jelölt molekulák fejlesztésére (pl.: neurodegeneratív betegségek gyógyítására).

A jövőben szükségesnek tartom a fenti kísérleteimet más RNSi törzsekkel és mutáns allélekkel is megismételni. Továbbá fehérje-fehérje interakciós (GAP-Rab2) vizsgálatokat, például élesztő kéthibrid módszert is tervezek végezni, melyek segíthetnek eldönteni, hogy a GAP fehérjék közvetlenül a Rab2-höz kötődve, vagy más közvetett úton szabályoznak. Ezeken kívül érdemes lehet és tervezem is részletesebben megvizsgálni a *CG12241* és *CG5344* gének csengesítéseinek hatásait, mivel ezek szintén szignifikánsan növelték az aktív Rab2 mennyiségét *Drosophila* idegrendszerben. Továbbá az élethossz és mászás esszéiben több esetben eltérés volt tapasztalható az eredményekben a nemek között, idegrendszeri Rab2 és autofágia aktivációt azonban csak nőstény állatokban vizsgáltam. Érdemes lehet a hímekben is tanulmányozni ezeket. Szeretném a jövőben humán vonatkozásban is kutatni ezeket a géneket, azok Rab2-re és autofágiára gyakorolt konzervált hatásait.

	CG8085	CG7324	CG1695	CG31935	CG42795
agy: aktív Rab2 pozitív struktúrák mennyisége	↓	↑	↑	↑	↑
agy: p62/Ref(2)P fehérje mennyisége	↓	↓	↓	↓	↓
agy: lipidált Atg8a struktúrák mennyisége	↓	↓	↓	↓	↓
agy: ubikvitinált aggregátumok mennyisége	↓	↓	↓	↓	↓
átlagos élethossz	↑	♀ ↑ ♂	♀ ↓ ♂	↑ ♀ ♂	↑
mászás képesség rövidtávon	⊘	↑	↑	↓	♀ ↑ ♂
mászás képesség hosszútávon	♀ ↓ ♂	↑ ♀ ♂	♀ ↑ ♂	↓	♀ ↑ ♂
zsírtest: aktív Rab2 pozitív struktúrák mennyisége jóltáplált állatokban	↑	⊘	↑	↑	↑
zsírtest: aktív Rab2 pozitív struktúrák mennyisége éhező állatokban	↑	⊘	↑	↑	↑
zsírtest: LysoTracker-Red pozitív vezikulák mennyisége	↑	×	×	↑	×
zsírtest: p62/Ref(2)P fehérje mennyisége	↓	⊘	⊘	↓	↓
zsírtest: lipidált Atg8a struktúrák mennyisége	⊘	⊘	⊘	↓	↓

= szignifikáns növekedés
 = szignifikáns csökkenés
 = nincs változás

= növekvő trend (nem szignifikáns)
 = csökkenő trend (nem szignifikáns)
 = nincs adat

14.ábra: Az eredményeket összegző táblázat.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek dr. Kovács Tibornak, a rengeteg segítségért, szakmai tudásért és hogy lehetőséget biztosított kutatásomhoz, valamint az ELTE Genetika tanszéken dolgozó munkatársaimnak/szaktársaimnak, akikhez szintén bizalommal fordulhattam, ha kérdéseim voltak.

Irodalomjegyzék

1. Tóth, M. L. *et al.* Longevity pathways converge on autophagy genes to regulate life span in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy* **4**, 330–8 (2008).
2. Simonsen, A. *et al.* Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila*. *Autophagy* **4**, 176–84 (2008).
3. Nakatogawa, H. Mechanisms governing autophagosome biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 439–458 (2020).
4. Graef, M., Friedman, J. R., Graham, C., Babu, M. & Nunnari, J. ER exit sites are physical and functional core autophagosome biogenesis components. *Mol. Biol. Cell* **24**, 2918–31 (2013).
5. Hamasaki, M. *et al.* Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* **495**, 389–93 (2013).
6. Szinyákovics, J., Kiss, E., Keresztes, F., Vellai, T. & Kovács, T. Rab2 is a potent new target for enhancing autophagy in the treatment of Parkinson’s disease. *bioRxiv* (2020).
7. Laplante, M. & Sabatini, D. M. mTOR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* **122**, 3589–3594 (2009).
8. Axe, E. L. *et al.* Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **182**, 685–701 (2008).
9. Cheng, J. *et al.* Yeast and mammalian autophagosomes exhibit distinct phosphatidylinositol 3-phosphate asymmetries. *Nat. Commun.* **5**, 3207 (2014).
10. Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y. & Ohsumi, Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 458–67 (2009).
11. Vellai, T., Takács-Vellai, K., Sass, M. & Klionsky, D. J. The regulation of aging: does autophagy underlie longevity? *Trends Cell Biol.* **19**, 487–94 (2009).
12. Pyo, J.-O. *et al.* Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan. *Nat. Commun.* **4**, 2300 (2013).
13. Cuervo, A. M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P. T. & Sulzer, D. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* **305**, 1292–5 (2004).
14. Jin, S. M. & Youle, R. J. PINK1- and Parkin-mediated mitophagy at a glance. *J. Cell Sci.* **125**, 795–9 (2012).
15. Papp, D. *et al.* AUTEN-67, an autophagy-enhancing drug candidate with potent antiaging and neuroprotective effects. *Autophagy* **12**, 273–86 (2016).
16. Kovács, T. *et al.* The small molecule AUTEN-99 (autophagy enhancer-99) prevents the progression of neurodegenerative symptoms. *Sci. Rep.* **7**, 42014 (2017).

17. Kovács, T. *et al.* A conserved MTMR lipid phosphatase increasingly suppresses autophagy in brain neurons during aging. *Sci. Rep.* **12**, 21817 (2022).
18. Klionsky, D. J. & Codogno, P. The mechanism and physiological function of macroautophagy. *J. Innate Immun.* **5**, 427–33 (2013).
19. Boda, A. *et al.* Drosophila Arl8 is a general positive regulator of lysosomal fusion events. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. cell Res.* **1866**, 533–544 (2019).
20. Stenmark, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 513–25 (2009).
21. Fraldi, A. *et al.* Lysosomal fusion and SNARE function are impaired by cholesterol accumulation in lysosomal storage disorders. *EMBO J.* **29**, 3607–20 (2010).
22. Itakura, E., Kishi-Itakura, C. & Mizushima, N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* **151**, 1256–69 (2012).
23. Jiang, P. *et al.* The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Mol. Biol. Cell* **25**, 1327–37 (2014).
24. Lőrincz, P. *et al.* Rab2 promotes autophagic and endocytic lysosomal degradation. *J. Cell Biol.* **216**, 1937–1947 (2017).
25. Gillingham, A. K., Sinka, R., Torres, I. L., Lilley, K. S. & Munro, S. Toward a comprehensive map of the effectors of rab GTPases. *Dev. Cell* **31**, 358–373 (2014).
26. Rieder, S. E. & Emr, S. D. A novel RING finger protein complex essential for a late step in protein transport to the yeast vacuole. *Mol. Biol. Cell* **8**, 2307–27 (1997).
27. Bagshaw, R. D., Callahan, J. W. & Mahuran, D. J. The Arf-family protein, Arl8b, is involved in the spatial distribution of lysosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **344**, 1186–91 (2006).
28. Nakae, I. *et al.* The arf-like GTPase Arl8 mediates delivery of endocytosed macromolecules to lysosomes in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* **21**, 2434–42 (2010).
29. Niwa, S. *et al.* BORC Regulates the Axonal Transport of Synaptic Vesicle Precursors by Activating ARL-8. *Curr. Biol.* **27**, 2569-2578.e4 (2017).
30. Garg, S. *et al.* Lysosomal trafficking, antigen presentation, and microbial killing are controlled by the Arf-like GTPase Arl8b. *Immunity* **35**, 182–93 (2011).
31. Rojas, R. *et al.* Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *J. Cell Biol.* **183**, 513–26 (2008).
32. Jordens, I. *et al.* The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr. Biol.* **11**, 1680–5 (2001).
33. Pankiv, S. *et al.* FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport. *J. Cell Biol.* **188**, 253–69 (2010).
34. Seals, D. F., Eitzen, G., Margolis, N., Wickner, W. T. & Price, A. A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 9402–7 (2000).
35. Tamura, N. & Mima, J. Membrane-anchored human Rab GTPases directly mediate membrane tethering in vitro. *Biol. Open* **3**, 1108–1115 (2014).
36. Edwards, S. L. *et al.* Impaired dense core vesicle maturation in *Caenorhabditis elegans* mutants lacking Rab2. *J. Cell Biol.* **186**, 881–95 (2009).
37. Guo, P., Hu, T., Zhang, J., Jiang, S. & Wang, X. Sequential action of *Caenorhabditis elegans* Rab GTPases regulates phagolysosome formation during apoptotic cell degradation.

- Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 18016–21 (2010).
38. Lund, V. K. *et al.* Rab2 drives axonal transport of dense core vesicles and lysosomal organelles. *Cell Rep.* **35**, 108973 (2021).
 39. Bellen, H. J. & Yamamoto, S. Morgan’s legacy: fruit flies and the functional annotation of conserved genes. *Cell* **163**, 12–4 (2015).
 40. Chien, S., Reiter, L. T., Bier, E. & Gribskov, M. Homophila: human disease gene cognates in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* **30**, 149–51 (2002).
 41. Chintapalli, V. R., Wang, J. & Dow, J. A. T. Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nat. Genet.* **39**, 715–20 (2007).
 42. Brand, a H. & Perrimon, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401–15 (1993).
 43. Heigwer, F., Port, F. & Boutros, M. RNA Interference (RNAi) Screening in *Drosophila*. *Genetics* **208**, 853–874 (2018).
 44. Humphreys, D. T., Westman, B. J., Martin, D. I. K. & Preiss, T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 16961–6 (2005).
 45. Riemensperger, T. *et al.* A single dopamine pathway underlies progressive locomotor deficits in a *Drosophila* model of Parkinson disease. *Cell Rep.* **5**, 952–60 (2013).
 46. Weaver, L. N., Ma, T. & Drummond-Barbosa, D. Analysis of Gal4 Expression Patterns in Adult *Drosophila* Females. *G3 (Bethesda)*. **10**, 4147–4158 (2020).
 47. Alic, N. *et al.* Detrimental effects of RNAi: a cautionary note on its use in *Drosophila* ageing studies. *PLoS One* **7**, e45367 (2012).
 48. Gargano, J. W., Martin, I., Bhandari, P. & Grotewiel, M. S. Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. *Exp. Gerontol.* **40**, 386–95 (2005).
 49. Kovács, T. *et al.* A Conserved MTMR Lipid Phosphatase Increasingly Suppresses Autophagy in Brain Neurons During Aging. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* (2021).
 50. Billes, V. *et al.* AUTEN-67 (Autophagy Enhancer-67) Hampers the Progression of Neurodegenerative Symptoms in a *Drosophila* model of Huntington’s Disease. *J. Huntingtons. Dis.* **5**, 133–47 (2016).
 51. Piracs, K. *et al.* Advantages and Limitations of Different p62-Based Assays for Estimating Autophagic Activity in *Drosophila*. *PLoS One* **7**, (2012).
 52. Takáts, S. *et al.* Autophagosomal Syntaxin17-dependent lysosomal degradation maintains neuronal function in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **201**, 531–539 (2013).
 53. Nagy, P. *et al.* Atg17/FIP200 localizes to perilyosomal Ref(2)P aggregates and promotes autophagy by activation of Atg1 in *Drosophila*. *Autophagy* **10**, 453–467 (2014).
 54. Bolus, H., Crocker, K., Boekhoff-Falk, G. & Chtarbanova, S. Modeling Neurodegenerative Disorders in *Drosophila melanogaster*. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
 55. Mershin, A. *et al.* Learning and memory deficits upon TAU accumulation in *Drosophila* mushroom body neurons. *Learn. Mem.* **11**, 277–87 (2004).
 56. Aso, Y. *et al.* The neuronal architecture of the mushroom body provides a logic for associative learning. *Elife* **3**, e04577 (2014).
 57. Bernards, A. GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and *Drosophila*. *Biochim. Biophys. Acta* **1603**, 47–82 (2003).

58. Kampf, L. L. *et al.* TBC1D8B Mutations Implicate RAB11-Dependent Vesicular Trafficking in the Pathogenesis of Nephrotic Syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* **30**, 2338–2353 (2019).
59. Callebaut, I., de Gunzburg, J., Goud, B. & Mornon, J. P. RUN domains: a new family of domains involved in Ras-like GTPase signaling. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 79–83 (2001).
60. Hannemann, M. *et al.* TBC-8, a putative RAB-2 GAP, regulates dense core vesicle maturation in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* **8**, e1002722 (2012).
61. Lőrincz, P., Mauvezin, C. & Juhász, G. Exploring autophagy in *Drosophila*. *Cells* **6**, 1–14 (2017).
62. Varga, V. B., Keresztes, F., Sigmond, T., Vellai, T. & Kovács, T. The evolutionary and functional divergence of the Atg8 autophagy protein superfamily. *Biol. Futur.* (2022) doi:10.1007/s42977-022-00123-6.