

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR

A K63-kapcsolt poliubiquitin lehetséges szerepe a szekréciós granulum-lizoszóma fúzióban

36. OTDK Biológia Szekció

Készítette:

Dósa Anna

Biológus MSc, Molekuláris Genetika, Sejt- és Fejlődésbiológia szakirány, II. évfolyam

Témavezető:

Dr. Csizmadia Tamás

egyetemi adjunktus, Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék



2022.

TARTALOMJEGYZÉK

1. Összefoglaló	3
2. Rövidítésjegyzék	4
3. Bevezetés	7
4. Célkitűzések	12
5. Anyagok és módszerek	12
5.1. <i>Drosophila</i> törzsek	12
5.2. UAS-GAL4 rendszer	12
5.3. Fluoreszcens riporterrendszerek	13
5.4. Mintaelőkészítés	15
5.5. Képkötés	15
5.6. Számszerűsítés, statisztikai analízis	15
6. Eredmények	17
6.1. A Bendless K63-kapcsolt poliubiquitin specifikus E2 szükséges a krinofágiához	17
6.2. A Bendless eddig ismert interakciós partnereinek vizsgálata	18
6.3. A CYLD K63-kapcsolt poliubiquitin-specifikus deubiquitiniláz szükséges a krinofágiához	20
6.4. A TNF α útvonal komponenseinek vizsgálata	22
7. Diskusszió	25
8. Szerzői hozzájárulás	28
9. Nyilatkozat	28
10. Köszönetnyilvánítás	28
11. Irodalomjegyzék	29
12. Függelék	32

1. ÖSSZEFOGLALÓ

A krinofágia főként szekréciós sejtekre jellemző sejtes önemésztő folyamat. Ennek során az előregedett vagy felesleges szekréciós granulumok lizoszómákkal közvetlenül egyesülnek. Laborunkban 2018-ban már azonosították a szekréciós granulum-lizoszóma fúzióhoz közvetlenül szükséges Rab fehérjét, pányvázó- és SNARE-komplex alegységeket, azonban még nem ismert, hogy ezek a granulumok milyen módon jelölődnek ki a lebontásra. Az ubiquitin (Ub) általánosan degradatív szerepekkel asszociálható fehérje mely változatos mono- illetve poliubiquitin formákban képes befolyásolni szubsztrátfehérjéinek sorsát. A proteasomális degradáción túl, szerepét leírták már a szelektív makroautofágiában, de a fehérje számos szignalizációs útvonalban nem-degradatív szerepeket is betölt. Ezeket, illetve azon korábbi eredményeinket figyelembe véve, melyek szerint az ubiquitin kimutatható a váladékszemcsék membránjához lokalizálva pontosan a fejlődés során zajló krinofágia indukciójakor, elképzelhetőnek tartottuk, hogy a krinofágia szabályozásában is lehet jelentősége.

Egy E2 Ubiquitin-Konjugáló enzimeket érintő kisléptékű genetikai szűrés során felfedeztük, hogy a Bendless nevű, K63-kapcsolt poliubiquitinre specifikus enzim hiányában a krinofágia nem képes a fejlődési programnak megfelelően végbe menni az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) lárvális nyálmirigyében. Hasonló fenotípust fedeztünk fel a Cylindromatosis deubiquitiniláz fehérje esetében is. Ez a két eredmény együttesen arra mutat, hogy a krinofágiában fontos szerepet játszhat egy vagy több K63-kapcsolt poliubiquitinilációs esemény. A krinofágiához vezető útvonal feltérképezése érdekében megvizsgáltuk a Bendless eddig ismert, illetve feltételezett interakciós partnereit, ezek hiánya azonban nem okozott krinofágia-defektust, ami arra utal, hogy a K63 kapcsolt poliubiquitin nem jelátviteli komponensek modulálásán keresztül fejt ki hatását a krinofágia folyamatában, hanem a granulumok lebontási útra való terelésében.

2. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

Rövidítés	angol	magyar
Akt	Ak strain transforming	AK törzset transzformáló
ATP	adenosine triphosphate	adenozin-trifoszfát
ben	bendless	
cDNS	complementary DNA	komplementer DNS
CMA	Chaperone-mediated autophagy	Chaperone-mediált autofágia
Cnot4	CCR4-NOT transcription complex subunit 4	CCR4-NOT transzkripció komplex 4. alegysége
C-terminális	carboxyl terminal	karboxil-terminális
CYLD	Cylindromatosis	Cilindromatózis
DAPI	4',6-DiAmidino-2-Phenylindole	4',6-diamidino-2-fenilindol
DsRed	Discosoma sp. red fluorescent protein	Discosoma faj piros fluoreszcens fehérje
DUB	deubiquitylase	deubiquitiniláz
E1	E1 ubiquitin-activating enzyme	E1 ubiquitin-aktiváló enzim
E2	E2 ubiquitin-conjugating enzyme	E2 ubiquitin-konjugáló enzim
E3	E3 ubiquitin-ligase	E3 ubiquitin-ligáz enzim
fkf	fork head	
GAL4	Galactose 4 regulon	Galaktóz 4 regulon
GFP	Green Fluorescent Protein	Zölden fluoreszkáló fehérje
GTP	Guanosine Triphosphate	Guanozin-trifoszfát
GTP-áz	Guanosine Triphosphatase	Guanozin-trifoszfátáz
HOPS	Homotypic fusion and vacuole protein sorting	Homotipikus fúzió és vakuoláris fehérje válogatás
IL-1	Interleukine-1	Interleukin-1
Iru	Iruka	
JNK	C-Jun N-Terminal Kinase	c-Jun N-terminális kináz
Jra	Jun-related Antigen	Jun-szerű antigén
K48	lysine48	lizin48

K63	lysine63	lizin63
Lamp1	Lysosomal associated membrane protein 1	Lizoszómához kapcsolódó membránfehérje 1
Lck	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase	limfocita-specifikus fehérje tirozin-kináz
LR	Lamp-Ring	Lamp-gyűrű
M1	methionine1	metionin1
MMS2	Methyl Methanesulfonate Sensitive 2	metil-metánszulfonát-érzékeny 2
NF- κ B	nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells	az aktivált B sejtek κ -könnyűlánc-serkentő nukleáris faktora
nopo	no poles	
PBS	Phosphate Buffered Saline	Foszfát-pufferelt sóoldat
pH	pondus hidrogenii	
Plekhm1	Pleckstrin homology domain containing family M member 1	Pleckstrin homológ domént tartalmazó család M tagja 1
Rab	Ras-related proteins in brain	Ras-sal rokon fehérjék az agyban
RNAi	RNA interference	RNS-interferencia
RPF	Relative to Puparium Formation	a bebábozódáshoz képest
Sgs3	Salivary gland secretion 3	
SIFT	Scale-Invariant Feature Transform	Skálainvariáns Jellemző Transzformáció
sinah	seven in absentia homologue	
Snap	Soluble NSF Attachment Protein	szolubilis NSF-hez kötődő fehérje
SNARE	Soluble N-acetylmaleimid Sensitive Factor Receptor	Szolubilis N-acetilmaleimid-Érzékeny Faktor Receptor
Syx	Syntaxin	Szintaxin
Tab2	TAK1-Binding Protein 2	TAK1-kötő fehérje 2
Tak1	TGF-Beta Activated Kinase 1	TGFBéta-aktivált kináz 1
TLR	Toll-Like Receptor	Toll-szerű receptor
TNF α	Tumor Necrosis Factor α	Tumor nekrozis faktor
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor	Tumor nekrozis faktor receptor

Traf6	TNF Receptor Associated Factor 6	TNF Receptor Asszociált Faktor 6
UAS	Upstream Activating Sequence	Felfelé Aktiváló Szekvencia
Uba1	Ubiquitin-Like Modifier-Activating Enzyme 1	Ubiquitinszerű Módosító-aktiváló enzim 1
Ubc13	Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2 13	Ubiquitin-konjugáló enzim E2 13
Uev1A	Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2 Variant 1A	Ubiquitin-konjugáló enzim E2 Variáns A
UPR	Ubiquitin-Proteasome System	Ubiquitin-Proteaszóma rendszer
Vamp	Vesicle Associated Membrane Protein	Vezikulához kapcsolódó membránfehérje
wgn	wengen	

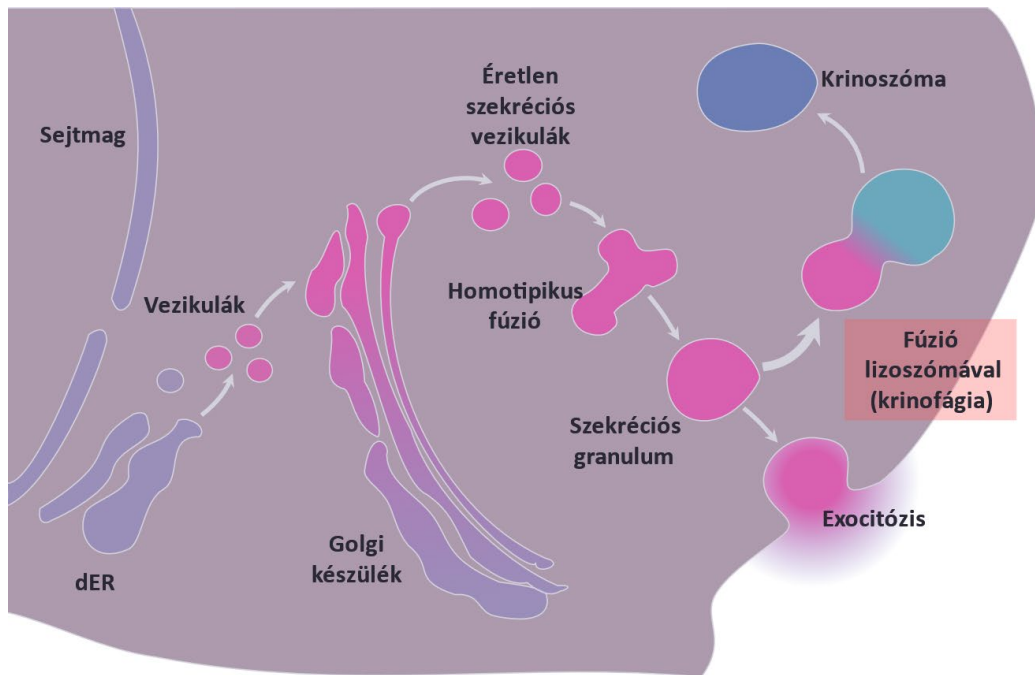
3. BEVEZETÉS

Az élő sejtek homeosztázisának fenntartása érdekében a sejten belüli anyagok folyamatos felépítése, újrahasznosítása és lebontása elengedhetetlen folyamat. Erre többféle stratégia is kialakult az evolúció során, a lebontandó anyag kémiai jellemzőitől, lokalizációjától és mennyiségétől, méretétől függően.

Az egyik jól ismert ilyen lebontó molekuláris apparátus a sejtekben az ubiquitin-proteasóma rendszer (UPR), mely elsősorban a citoplazmatikus fehérjék lebontásáért felelős. Az ubiquitin maga egy kis tömegű, evolúciósan konzervált fehérje [1, 2]. Elsődlegesen az UPR degradációs szignáljaként funkcionál, tehát ubiquitiniláció által elsősorban citoplazmatikus fehérjék küldhetők a proteasómába, ahol azok rövid peptidekre esnek szét. A peptidek tovább bonthatók aminosavakká, amik ezt követően új fehérjék szintéziséhez használhatók, vagy további degradáció által ATP nyerhető belőlük. Ezen kívül az ubiquitin betölthet nem-degradatív szignalizációs funkciót is, valamint a szerepét leírták már lizoszómán végződő útvonalakban is, mint például a szelektív makroautofágia és a receptor-mediált endocitózis [3, 4]. Az ubiquitin egy háromlépéses folyamat során kerül rá a szubsztrátfehérjére: az első lépésben az E1 ubiquitin-aktiváló enzim egy ATP molekula hidrolízisének szabadentalpia-változását felhasználva aktiválja az ubiquitin C-terminális végét. A második lépésben az aktivált ubiquitin átkerül az E2 ubiquitin konjugáló enzimre, amely képes E3 ubiquitin-ligázokhoz kapcsolódni. Az E3 enzim specializáltan ismeri fel a szubsztrátot. Az utolsó lépésben az aktivált ubiquitin az E2-ről (bizonyos esetekben az E3-on keresztül) a szubsztrát valamely lizin oldalláncához kötődik egy izopeptid-kötéssel [2].

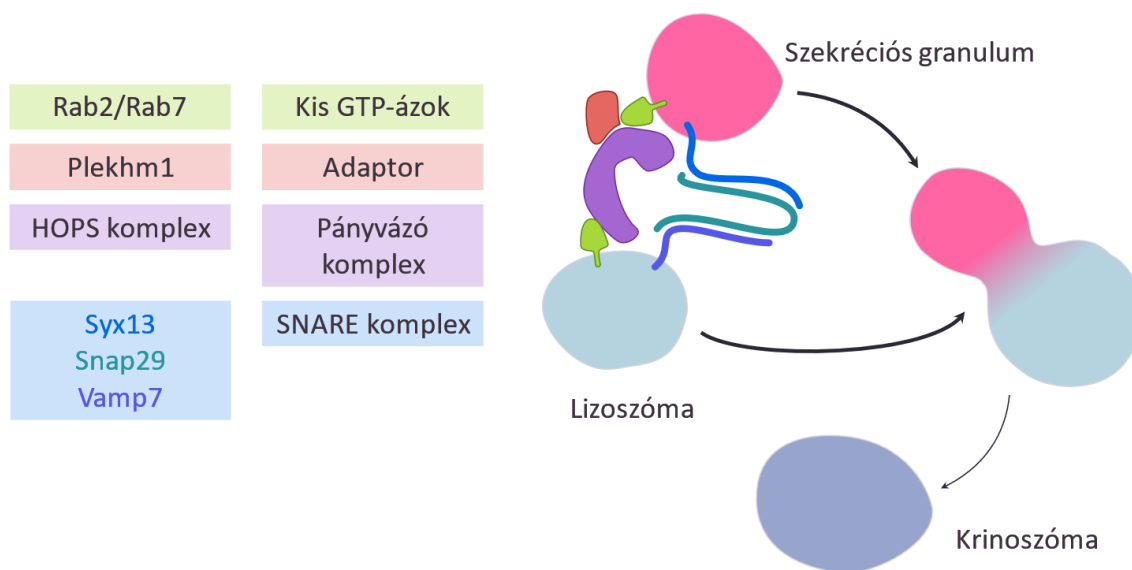
Nagyobb méretű lebontandó részecskék, például sejtszervecskék, fehérjeaggregátumok esetén a sejtek makroautofágiával (a sejtes önméztés legismertebb típusával) bontják le belső anyagaikat [5]. Az autofágia egy másik kevésbé ismert formája a krinofágia, amely szekréciós sejtekre jellemző degradatív folyamat, melynek során egy előregedett, sérült vagy felesleges szekréciós granulum membránja közvetlenül egyesül a lizoszóma membránjával (1. ábra). A folyamatot a hatvanas években fnyelték meg először, patkányok hipotalamuszának elektronmikroszkópos felvételein [6]. A szakma egy része a krinofágiát nem sorolja a szigorúan vett autofágia típusai közé, mert a granulumok belsejében lévő szekréciós anyag a funkcióját a sejten kívül tölti be, így elméleti szempontból nem a sejt saját anyaga, ergo nem tekinthető autofág folyamatnak [7]. Krinofágia elméletileg minden olyan sejtben megfigyelhető, amely valamilyen szekréciós tevékenységet végez, de legkönnyebben mirigysejtekben vizsgálható.

Ennek ellenére a folyamat szakirodalma kicsi, mert molekuláris mechanizmusáról és szabályzásáról keveset tudunk, és nem lehet egyszerűen indukálni, mint például az éhezési makroautofágiát.



1. ábra: A krinofágia sematikus folyamata Smith és Farquhar cikke alapján [6]. A homotipikus fúzió által létrejövő érett szekréciós granulumok egy része szekretálódik a sejtből, másik része viszont lizoszómákkal való fúzió által krinoszómává alakul, beltartalma lebomlik.

A krinofágia eddig ismert molekuláris résztvevőit az ELTE munkatársai írták le 2018-ban (2. ábra) [8]. Felfedezték, hogy a krinofágiához szükséges SNARE komplex a *Drosophilában* hasonló összetételű, mint a makroautofágiára jellemző komplex (Snap29, Vamp7, Syx17), azonban másik Syntaxin fehérje szükséges hozzá (Syx13). Ezen túl a fúzióhoz szükséges pályvázó komplex, a HOPS szerepét is bebizonyították, valamint az ezek toborzását megelőzően a granulumokra és a lizoszómákra lokalizálódó kis GTP-ázokat, a Rab2-t és a Rab7-et is azonosították. Arra sajnos még nem derült fény, hogy a krinofágia milyen jel hatására indukálódik, és milyen egyéb komponensek szükségesek ahhoz, hogy a fejlődésgenetikai programban meghatározott módon mehessen végre. Az én kutatásom ennek a problémának a kibontására fókuszál.



2. ábra: A krinofágia eddig ismert molekuláris komponensei ecetmuslicában, Csizmadia és munkatársai munkája alapján [8]. A granulumokra először a Rab2/7 kis GTP-áz molekulák lokalizálódnak, ezekhez toborzódik a Plekhh1 adaptor és a HOPS pányvázó komplex, melyek a lizoszómát és a granulumot megfelelő távolságban rögzítik egymáshoz képest. Ezek után a krinofágiára jellemző SNARE-komplex segítségével létrejön a membránfúzió a két kompartment között, kialakul a krinoszóma.

A krinofágia eddigi molekuláris komponenseit ecetmuslica lárvális és prepupális nyálmirigyéből írták le. Ez a szövet azért ideális a folyamat vizsgálatához, mert a sejtek nagy méretűek, és nagy mennyiségű szekréció keletkezik bennük, melyek szinkronizált módon szekretálódnak vagy bomlanak le. A krinofágia fejlődésgenetikailag meghatározott módon játszódik le a nyálmirigyben, ezért nincs szükség mesterséges indukcióra [8, 9]. Ezen felül az ecetmuslica széles körben ismert és alkalmazott genetikai modellorganizmus, így genetikai állományának manipulálására széleskörű eszköztár áll rendelkezésünkre (hiv).

A muscicalárvák a bebábozódást megelőzően kimásznak a tenyésztő üveg falára (L3 vándorló lárva stádium). Ebben az időszakban kezdődik meg a Glue (ragasztó) fehérjék szintézise, melynek funkciója, hogy az üveg falához rögzítse a bebábozódó állatot, majd ott tartsa a kikelésig. A granulumok 6 órával a bábozódás előtt (-6 h RPF) érettek, kitöltik a nyálmirigysejtek citoplazmáját; ilyenkor az állatok még intenzív mozgást végeznek. A szekréció mintegy 2 órával a bebábozódás előtt már megkezdődik, ilyenkor az állatok már kevésbé mozognak, összehúzódnak, a lárvabőr felszíne hullámos lesz, és a spirákulumok kiemelkednek az anterior végen. A szekréciót követően a sejtben maradó granulumok lizoszómákkal egyesülnek, elsavasodnak [10]. Az előbáb, vagy fehér báb bőre sima felszínű, spirákulumokkal rendelkezik, és már nem mozog (0 h RPF). Ezek nyálmirigyében az el nem

savasodott granulumok száma elenyésző és megkezdődik azok lebontása; később a lárvális sejtek programozott sejthalál által elpusztulnak.

Kísérleteim a krinofágia kutatásának területén jelenleg az ubiquitiniláció egy kevésbé ismert altípusára, a K63-kapcsolt poliubiquitinilációra fókuszálnak. Míg a proteasomális degradáció szignálja általában a 48-as lizinen keresztül kapcsolt poliubiquitin, addig a 63-as lizinen keresztül kapcsolódó poliubiquitin sokrétű, elsősorban nem-degradatív funkciókat lát el [11, 12]. Az ubiquitiniláció a végletekig specifikálható folyamat, így nagyon sok különböző E2, E3 és deubiquitiniláz (DUB) fehérje található egy-egy sejtben, ami a finomszabályozást lehetővé teszi [13]. Kiseb, de így is számottevő a diverzitás, ha csak a K63-kapcsolt poliubiquitinre fókuszálunk. Ezt a típusú ubiquitinilációt mégis az teszi vonzó vizsgálati területté, hogy az E2 enzimek közül csak egy olyan van, amely specifikusan K63-kapcsolt poliubiquitint hoz létre: ez az Ubc13, *Drosophilában* Bendless (*ben*). Ez alapján úgy gondolom, hogy ennek az E2-nek a vizsgálata önmagában reprezentálhatja az összes K63-kapcsolt poliubiquitiniláció szerepét a krinofágiában.

A K63-kapcsolt poliubiquitinilációnak fontos szerepe van az NF- κ B útvonalak szabályozásában, melyek a sejtek túlélését, növekedését és az immunválaszt serkentik [14]. Az NF- κ B-n végződő útvonalak (TLR, IL-1, TNF α) receptorai körül általában olyan szignalizációs komplex jön létre, melyben K63-kapcsolt poliubiquitin is megjelenik, és szükséges a jeltovábbításhoz [15]. Ezt leggyakrabban a Traf6 E3 ubiquitin-ligáz fehérje hozza létre, mely specifikusan az Ubc13/Uev1A E2 heterodimerrel van komplexben [16]. A Tumor Nekrózis Faktor α útvonal egy evolúciósan konzervált jelátviteli út, így a benne szereplő Traf6 (E3), Ubc13 (E2), Uev1A (E2 variáns) és Cylindromatosis (DUB) fehérjék ortológjai megtalálhatók ecetmuslicában is. A K63-specifikus E2 a Bendless, a Traf6, az Uev1A és a Cylindromatosis (CYLD) a humán ortológokkal azonos nevet viselik. Eltérés viszont, hogy más többsejtű szervezetekkel ellentétben a muslicákban csak egy (katalitikusan inaktív) E2 variáns van (Uev1A), míg például az emlősökben kettő (Uev1A és MMS2) [17].

A szignalizációs komplexben nem csak K63, hanem K48-kapcsolt poliubiquitin is megjelenhet, ami a proteasomális degradáció felé tereli a fehérjéket, így a jeltovábbítás leállhat. A CYLD az NF- κ B útvonalon a K63-kapcsolt poliubiquitint preferálja, ezáltal az útvonal negatívan szabályozódik általa [18]. Reiley és munkatársai kimutatták azonban, hogy egerek timocitáiban az Lck K48-kapcsolt poliubiquitinjét is eltávolítja, ami felerősíti az NF- κ B útvonalat, viszont lecsendesíti a JNK útvonalat [19]. A Tumor Nekrózis Faktor α szignalizációja NF- κ B-n és JNK-n is végződhet, itt tehát a CYLD-nek fontos eldöntő szerepe

lehet abban, hogy milyen választ adjon a sejt az adott kontextusban. Xue és munkatársai kimutatták, hogy ecetmuslicában a CYLD a JNK útvonalat pozitívan szabályozza [20]. Reiley eredményeire támaszkodva azt javasolják, hogy ez K48-kapcsolt deubiquitiniláció által valósulhat meg, azonban ezt biokémiai úton nem erősítették meg. David Komander humán CYLD-del végzett kutatásaiból kiderül, hogy bár az képes hasítani a K48-kapcsolt poliubiquitint is, a K63-ra sokkal nagyobb az affinitása [21]. Azt is bemutatták, hogy ez a specificitás főként a 12. és 13. béta-redő közötti hurok meghosszabbodásának köszönhető.

Az alábbiakban bemutatom, hogy kísérleteim alapján a *ben* és a *CYLD* géncsendesítése hasonló, fúziós defektus fenotípust okoz. A szakirodalmi adatok alapján mindkét fehérje pozitívan szabályozza a c-Jun N-terminal Kinase (JNK) útvonalat, ezért megvizsgáltam a Tumor Necrosis Factor α (TNF α) -JNK útvonal több komponensét is, mert lehetséges, hogy ugyanazon az útvonalon keresztül hatnak.

4. CÉLKITŰZÉSEK

Az elsődleges célom annak eldöntése, hogy a K63-kapcsolt poliubiquitinilációnak lehet-e bármilyen szerepe a krinofágia irányításában, azaz a szekréciós granulumok lebontási útra terelésében. Ehhez a legcélravezetőbb kísérlet a K63-kapcsolt poliubiquitint specifikusan konjugáló E2 enzim, a Bendless krinofágiára gyakorolt hatásának vizsgálata granulumsavasodást, granulum-lizoszóma fúziót és ubiquitinlokalizációt vizsgáló rendszerekkel. Abban az esetben, ha a *ben* szükséges a krinofágiához, érdemes kiindulópontként használni további fehérjék vizsgálatához. Véleményem szerint a leggyorsabb módon a Bendless szakirodalomban rögzített interakciós partnereinek vizsgálatával lehet felderíteni új krinofágia-szabályozó géneket. A szemfejlődésben is szerepet játszó TNF α -út vonal komponenseinek genetikai szűrését is a célkitűzéseim közé veszem, mert itt jól kimutatható a Bendless szignalizációban betöltött szerepe.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. *Drosophila* törzsek

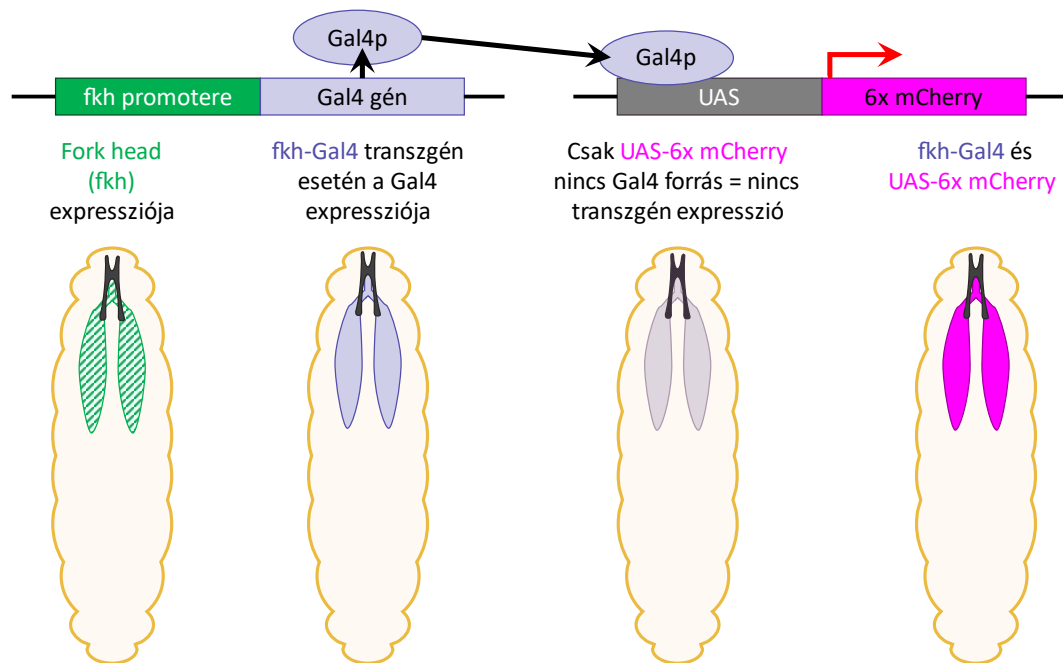
Sgs3-GFP (Glue-GFP) [9], *Sgs3-DsRed* [22] (Glue-Red), *UAS-GFP-Lamp1* [23], *fkh-GAL4* [24] (Berry, 2007), *Sgs3-GAL4* [25], *ben*^{KK109638} [26], *CYLD*^{GD4739} [27], *sinah*^{GD7906} [27], *Iru*^{11982R-3} a NIG-Fly törzsközpontból [28], *nopo*^{KK109198} [27], *Traf6*^{HMS00880} [29], *UAS-Traf6.S* [30], *Akt*^{HMS00007} [29], *Uev1A*^{HMS05413} [31], *wgn*^{GLC01716} [29], *Jra*^{JF01184} [32], *Tak1*^{HMJ02053} [29], *Tab2*^{JF03353} [31].

Az állatokat 25 °C-on neveltem, sztenderd kukoricaliszt-alapú táptalajon, lapos aljú, vattával ellátott tenyésztőcsövekben.

5.2. UAS-GAL4 rendszer

A vizsgálati konstrukcióink működése az UAS-GAL4 kétlépcsős génexpressziós rendszeren alapszik [33]. A riportertörzseinkben egytől-egyig található GAL4-forrásként szolgáló transzgén (*forkhead-GAL4*, az Akt RNAi vizsgálatánál *Sgs3-GAL4*). A transzgén egy általunk választott gén promoter régiójából és az élesztőgombából (*Saccharomyces cerevisiae*) származó GAL4 fehérje cDNS-éből áll. Így a *GAL4* időbeli és térbeli kifejezése szabályozhatóvá válik, ezzel elkerülve a nem kívánatos szisztematikus hatásokat. Ezeket az

állatokat olyanokkal keresztezzük, melyek egy *UAS*-transzgént tartalmaznak. Az Upstream Activating Sequence az élesztő genomjából származó promoter szekvencia, melyhez a GAL4 fehérje enhanszerként kötődik. A GAL4-kötődés hatására az *UAS*-t követő gén átírható, túltermeltethető. Ily módon expresszálnak riportergéneket (pl. *UAS-GFP-Lamp1*), vagy RNS-interferencia szekvenciákat is, mellyel géncsendesítést válthatunk ki. A rendszer működését a 3. ábra szemlélteti.



3. ábra: Az UAS-Gal4 rendszer működése az ecetmuslica nyálmirigyében. A *fkh* gén specifikusan a nyálmirigyben expresszálódik vándorló lárvákban. A *fkh* promotere után illesztett GAL4 kódoló szakaszból így csak a nyálmirigyben keletkezik GAL4 fehérje. Az UAS enhanszerrel rendelkező transzgének (pl. *6x mCherry*) indukció nélkül nem expresszálódnak, azonban, ha GAL4 is jelen van a sejtekben, az elindítja az UAS után álló génszakasz transzkripcióját. Ezzel a rendszerrel térben és időben szabályozható a transzgének expressziója.

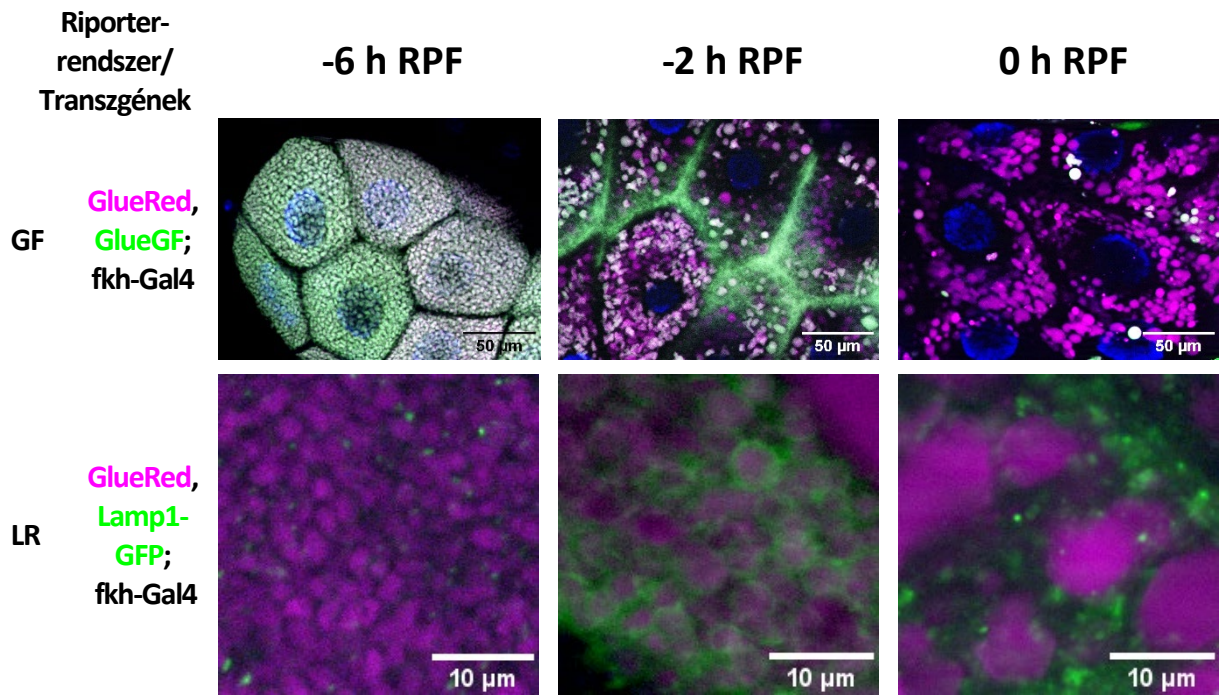
5.3. Fluoreszcens riportterendszerek

Egy-egy gén krinofágiában játszott szerepének megállapításához az adott génre RNS interferenciát hordozó *Drosophila melanogaster* hímekeket keresztezzük a riportertörzseink szűz állataival.

Először a Glue Flux (GF) törzzsel vizsgálunk, mellyel a granulumok savasodása követhető. A GF genotípusa: *Sgs3-GFP* (Glue-GFP), *Sgs3-DsRed* (Glue-Red); *fkh-GAL4*. Ebben a rendszerben a semleges pH-jú, sértetlen granulumok GFP-re és DsRed-re is pozitívak, mely a kompozit képeken fehéreként jelenik meg. A GFP az alacsony pH-ra erősen érzékeny, így az elsavasodó, lizoszómákkal egyesülő granulumokban reverzibilisen inaktíválódik. A létrejövő krinoszómák ezért csak a DsRedre pozitívak (magenta szín). A rendszer fluoreszcens

mikroszkópos képei a 4. ábra felső sorában láthatóak. Az Akt RNAi esetében egy későbbi promóterű GAL4 forrást, az *Sgs3-GAL4*-et alkalmaztam, mert a *fkh* promóter esetében a nyálmirigyek nem fejlődtek ki.

Ha a granulumok nem savasodnak el 0 h RPF állapotban, az RNS interferencia törzseket a Lamp-Ring (LR) rendszerrel is keresztezzük, mert a granulumok savasodásának defektusát nemcsak a szekréciós granulum-lizoszóma fúzió gátlódása, hanem a lizoszomális elsavasodás defektusa, például a protonpumpák defektusa is okozhatja. Az LR genotípusa *Sgs3-GFP*, *UAS-GFP-Lamp1*; *fkh-GAL4*. Ebben a rendszerben a granulumok és a lizoszómák fúziója esetén, mintegy 2 órával a bebábozódás előtt (-2 h RPF), a DsRed pozitív granulumok körül nagy mennyiségben jelennek meg GFP-gyűrűk. A Lamp1 primer lizoszóma-szerű struktúrákból érkezik, tehát a rendszerrel jól monitorozható a granulum-lizoszóma fúzió állapota. A GFP a Lamp1 C-terminálisán, a luminális oldalon található, így a gyűrűk rövidesen elhalványulnak a krinoszómák alacsony pH-ja miatt.



4. ábra: A Glue Flux (GF) és a Lamp Ring (LR) fluoreszcens riporterrendszerek idősorozata [8]. GF-ben 6 órával a bábozódás előtt (-6h RPF) a nyálmirigysejteket GFP-DsRed kettős pozitív granulumok töltik ki. -2 h RPF stádiumban a nyálmirigy lumenében megjelenik a kettős pozitív szekréta, a sejtekben pedig egyre több, csak DsRed-pozitív granulum jelenik meg. 0 h RPF stádiumban már főként csak DsRed-pozitív granulumokat látni, GFP-pozitívat alig. Az LR rendszerben a granulumokat DsRed jelöli, a lizoszomális membránt GFP-Lamp1. -2h RPF stádiumban, rövid időre GFP-gyűrű jelenik meg a DsRed-pozitív struktúrák körül, mely 0 h RPF időpontra el is halványul.

5.4. Mintaelőkészítés

A vizsgálathoz a nyálmirigyeket vándorló lárvastádiumú (bebábozódás előtt 6 órával lévő = -6 h RPF) illetve fehér báb állapotú (0 h RPF) *Drosophila melanogaster* állatokból boncoltam Zeiss Stemi DV4 sztereomikroszkóp alatt, 4% paraformaldehidet tartalmazó PBS-ben (Phosphate Buffered Saline). A mintákat 9:1 arányú PBS-glicerín elegyben fedtem le, ami 1:1000 hígításban Hoechst (1:1500) sejtmagfestéket tartalmazott.

5.5. Képalkotás

A fotókat két állomáson készítettem. A Carl Zeiss AxioImager Z1 ApoTome-mal felszerelt epifluoreszcens mikroszkópot 40x-es nagyítású EC Plan-NeoFluar objektívvel használtam, és a fotókat az AxioVision 4.8.2 szoftverrel rögzítettem. Az AxioImager M2-vel készült képeknél 40x-es Plan-Apochromat objektívet, valamint a Zeiss ZEN 2 (blue edition) mikroszkóp szoftvert használtam.

5.6. Számszerűsítés, statisztikai analízis

Minden releváns genotípusból legalább 6 különböző állat nyálmirigyét vizsgáltam meg a következtetések levonása előtt, ugyanakkor megbízható statisztikai analízishez elegendő fényképmennyiséget csak a *bendless* illetve a *cylindromatosis* gének vizsgálatából sikerült készíteni. Ennek oka, hogy a GF vizsgálórendszer 2022. októberétől kezdve nem a megszokott elsavasodási mintát mutatta, és a korábbi kontroll képekkel összehasonlítva is szignifikáns eltérést mutatott. Emiatt az ebben az időszakban vizsgált törzseknél (*bendless* interaktorok és TNF α útvonal komponenseinek géncsendesítései) a statisztikai analízist nem hajtottam végre. Ezeket a kísérleteket előbb meg kell ismételni, miután a GF vizsgálórendszert újrakeresztették, felfrissítettük.

A *ben* és a *CYLD* géncsendesítésének hatását a GF rendszerrel látható fenotípusok alapján számszerűsítettem. A felvételeken látható granulumokat (3-8 μ m átmérőjű DsRed foltok) GFP-pozitivitás alapján osztályoztam a „gfp-ring-detector” nevű, új fejlesztésű segédprogram segítségével, melyet Lezsák Domonkos harmadéves Informatika BSc szakos hallgató készített a laborunk számára [34]. Ez eredetileg a Lamp-Ring gyűrűk számszerűsítését célozta meg, azonban külön fejlesztési ágon rendelkezésre áll a GF rendszerünkhöz készült változat. A program első lépésben elválasztja a DsRed csatornán lévő granulumokat a háttértől a SIFT

(Skála-invariáns Jellemző Transzformáció) algoritmus segítségével. Ezután a paraméterként megadott granulumátmérőn belül összehasonlítja a GFP és a DsRed jel intenzitását. A GFP csatornán a háttértől való elválasztás érdekében egy küszöböt definiálunk, amely alapján GFP-pozitív (intakt) és GFP-negatív (elsavasodott) osztályokra bonthatók a granulumok. Ezt a küszöböt úgy igazítottuk, hogy az így létrehozott eredmények a laborunk korábbi publikációjához használt, kézi számolással végzett eredményeket tükrözzék [8]. A statisztikához a granulumok *pozitivitási arányát* használtam fel (**összes granulum száma/GFP-pozitív granulumok száma**).

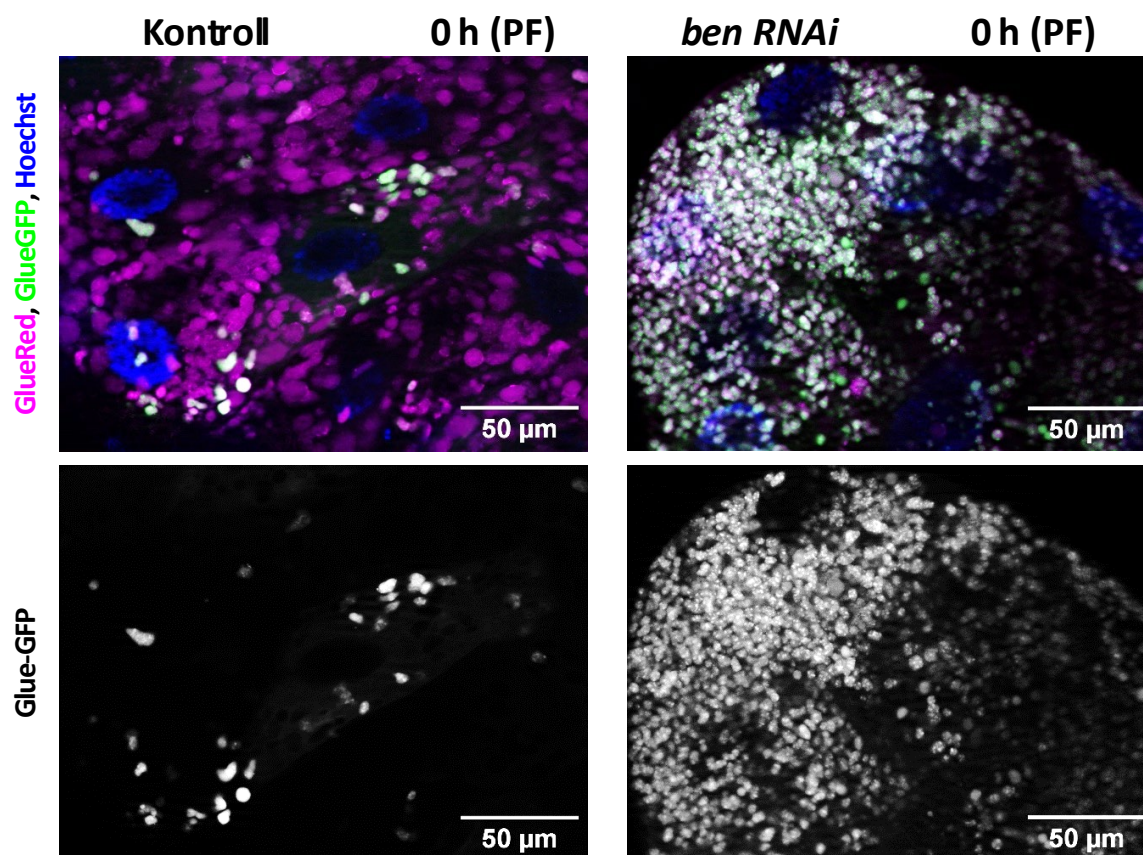
A számszerűsítéshez bebábozódó (0 órás) állatok nyálmirigyeiről készült képeket használtam. Ezekben kontroll esetben nagyfokú elsavasodás tapasztalható, a pozitivitási ráta a 0-t közelíti [8]. A nullhipotézisem minden kísérletben a következő: Ha a vizsgált géncsendesítés hordozó állat nyálmirigyéről készült fotókon a pozitivitási arány nem nagyobb, mint a kontrollban, akkor a vizsgált gén nem szükséges a granulumok elsavasodásához hatása. Amennyiben a pozitivitási arány átlagosan nagyobb a kontrollban mérténél, úgy a géncsendesítés gátolja a granulumok elsavasodását.

Ennek ellenőrzéséhez egyoldalú, kétmintás t-teszteket szerettem volna végrehajtani 5%-os szignifikanciaszinten, az R statisztikai szoftverrel [35-37]. A valószínűségi változóm normalitását Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztem, azonban a kontroll minta nem normális eloszlású ($p < 0,05$), így a nem-parametrikus Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztam [38, 39]. Ezt az R-ben a „`wilcox.test()`” függvény futtatásával lehet elvégezni. Mivel csak két kiértékelhető kísérleti csoportom volt, a Kruskal-Wallis teszt elvégzését nem éreztem szükségesnek. A tesztekben a kontroll fotókon mért pozitivitási ráták eloszlásának átlagát vettem össze a *ben* RNAi és külön a *CYLD* RNAi fotókon mértekkel. Ez a módszer mind a két esetben $p < 0.05$ eredményt adott (*ben*: $p = 2,2 \cdot 10^{-16}$; *CYLD*: $p = 1,5 \cdot 10^{-10}$), tehát az eredményeim szignifikánsnak tekinthetők. A tesztek eredményeit a dolgozatom függeléke tartalmazza (12. és 13. ábra).

Mindezek mellett azonban a jövőbeli publikálást megelőzően mindenképp szükséges lesz a jelen dolgozatban bemutatott géncsendesítések mindegyikének megfelelő kvantifikálása mind a GF, mind pedig az LR rendszerrel is. A program optimalizálása a granulumok köré szerveződő gyűrűk megbízható számszerűsítésére még folyamatban van.

6. EREDMÉNYEK

6.1. A Bendless K63-kapcsolt poliubiquitin specifikus E2 szükséges a krinofágiához

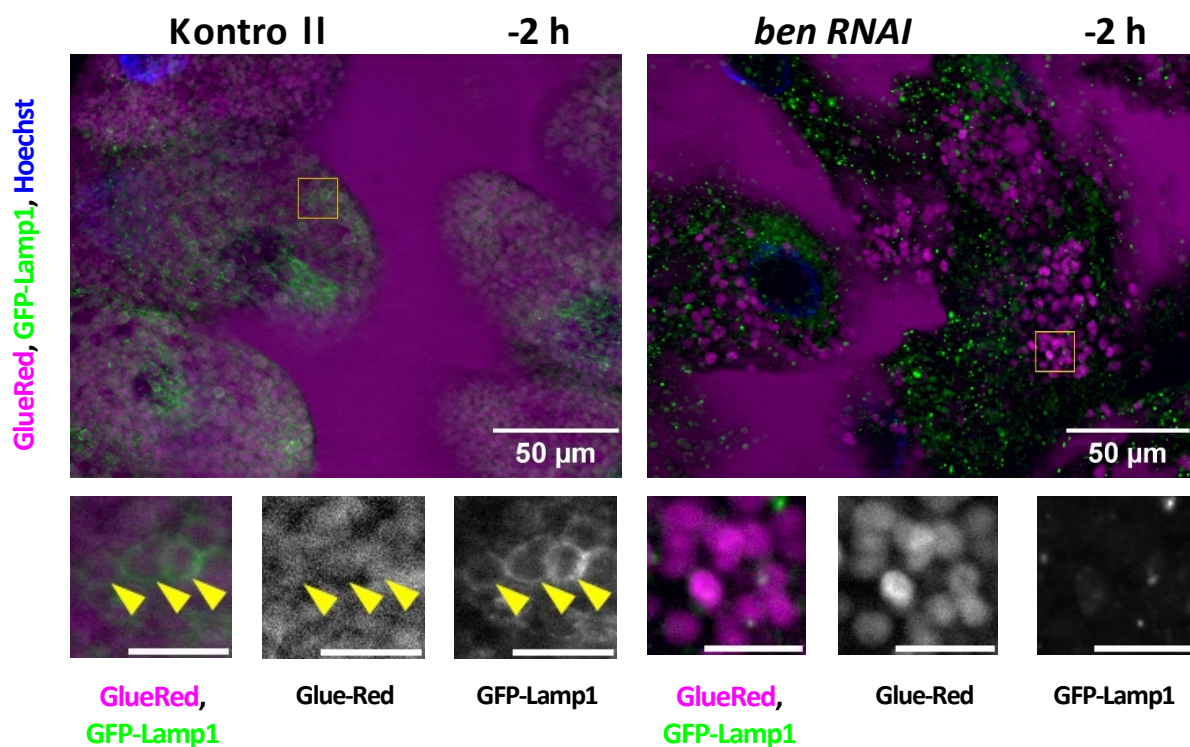


5. ábra: A *ben RNAi* degradációs defektust okoz a *Drosophila* lárvális nyálmirigyében. Bal oldalon kontroll fenotípus látható a bebábozódás időpontjában, jobb oldalon pedig a *ben* csendesítésének fenotípusa. A kontroll esetében GFP-pozitív granulumok csak elvétve találhatók, a *ben RNAi* esetében viszont a granulumok túlnyomó többsége GFP-re és DsRedre is pozitív.

A *ben* gén krinofágiára gyakorolt hatásának vizsgálatához *ben RNAi*-t hordozó muslicákat kereszteztünk sorrendben a GF, majd az LR rendszereket hordozó törzsekkel. A GF rendszer vad típusú háttéren, a bebábozódás időpontjában (0h, PF) főként elsavasodott, csak DsRed-pozitív granulumokat mutat a nyálmirigyben, GFP-pozitívakat csak elenyésző mértékben. Ezzel szemben *ben RNAi*-jal keresztezve, hasonló időpontban a granulumok túlnyomó része még GFP-pozitivitást mutat (5. ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy a Bendless fehérje hiányában a granulumok nem tudnak elsavasodni a fejlődésgenetikai programban meghatározott módon.

Ezt követően a *ben* RNAi állatokat az LR riportertörzzsel is kereszteztem (lásd 5.3 fejezet). LR-ben két órával a bábozódás előtt, GFP-Lamp1 gyűrűk tömegesen jelennek meg, viszont *ben* RNAi háttéren a gyűrűképződés a neki megfelelő időpontban csak elenyészően kevés esetben megfigyelhető (6. ábra). Ezek alapján tehát a Bendless hiányában maga a fúzió (a krinofágia) gátlódik.

A két vizsgálati rendszerrel tapasztalt eredmények alapján világosan látható, hogy a Bendless fehérje szükséges a krinofágia normális lezajlásához az ecetmuslicák nyálmirigyében.



6. ábra: A *ben* RNAi fúziós hibát okoz a *Drosophila* lárvális nyálmirigyében. -2 h RPF stádiumban vizsgálva az LR kontroll állatok nyálmirigysejtjeit Lamp1-GFP-gyűrűvel rendelkező DsRed-pozitív granulumok töltik ki, míg *ben* RNAi esetében a tömeges gyűrűképződés nem figyelhető meg ebben az időpontban. A Lamp1-pozitív lizozómaszerű struktúrák tehát feltehetőleg nem képesek fuzionálni a szekréciós granulumokkal. A képkivágásokon a méretvonal 10 µm-t jelöl.

6.2. A Bendless eddig ismert interakciós partnereinek vizsgálata

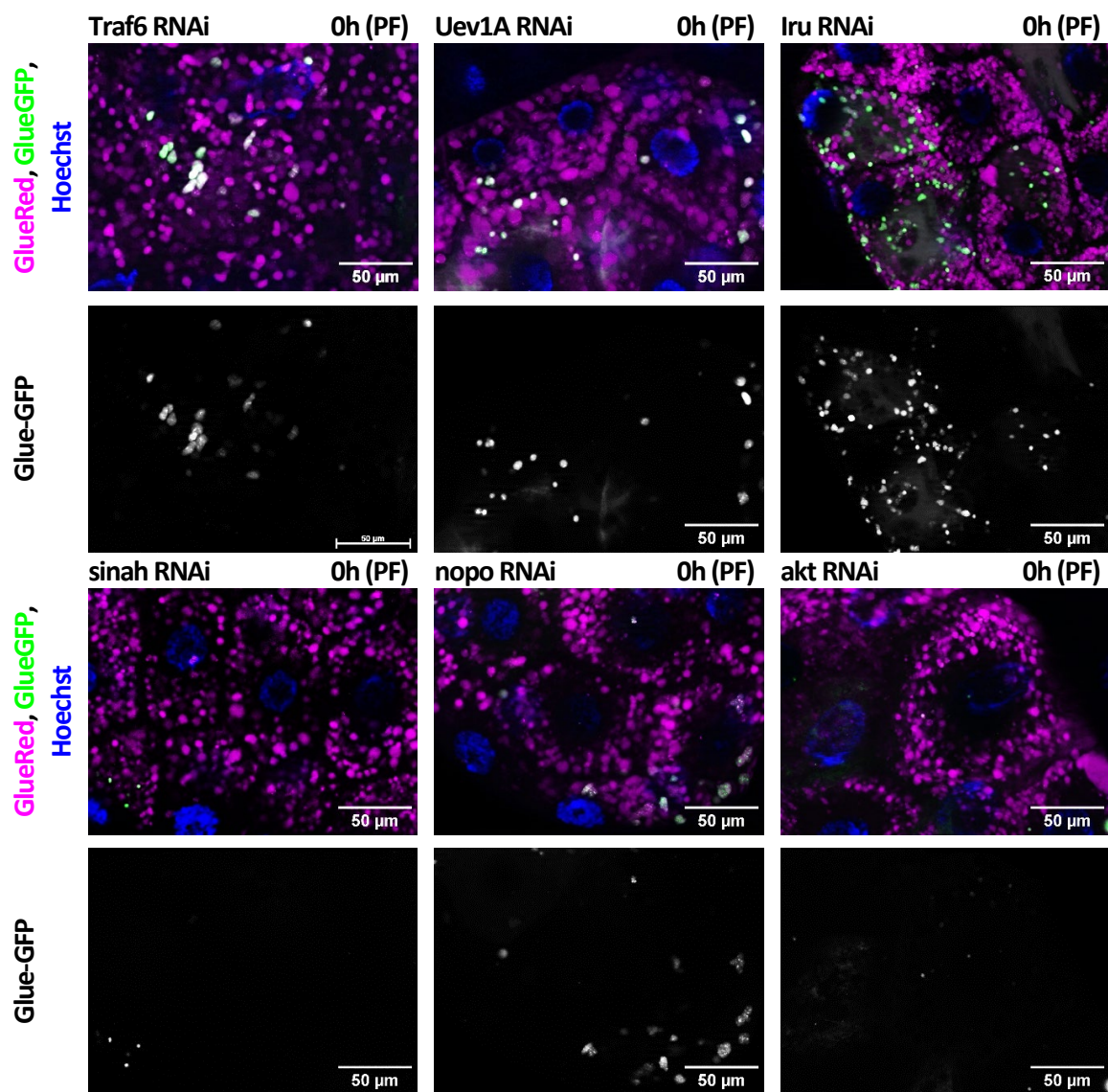
A Bendless hatásának kontextusba helyezésének érdekében megvizsgáltam a fent leírt módszerekkel a fehérje ismert interakciós partnereit is, azért, hogy megtaláljam köztük azt a komponenst, ami a Bendlesszel közreműködve szabályozza a krinofágiát. A FlyBase 2022 októberi állapota szerint a *Drosophila* Bendlessnek 7 interakciós partnere van: az Uba1 E1 ubiquitin-aktiváló enzim, az Uev1A nem katalitikus E2 ubiquitin-konjugáló enzim variáns, a Traf6, Iru, nopo és sinah E3 ubiquitin-ligázok, és az Akt inzulin-szignalizációban szereplő

kináz [40]. Ezek közül kísérletesen a Traf6-tal, az Uev1A-val és a nopoval való interakciót erősítették meg, a másik négy nagy áteresztőképességű kísérletekből, előzetes adatokból, illetve predikciókból származik [41-45]. Az összes felsorolt interakciós partner géncsendesítését is megvizsgáltam, az Uba1-et kivéve. Az Uba1 azért nem került még a tesztelendő gének közé, mert ecetmuslicában ez az egyetlen, amely E1 aktivitással rendelkezik, így csendesítése olyan következményekkel járna, aminek nem csak a krinofágia, hanem a nyálmirigy fejlődése, és talán még az állatok embrionális fejlődése is kárát látná, az ubiquitin-proteaszóma rendszer nélkülözhetetlensége miatt. Azt *Akt RNAi* esetében az 5.3. fejezetben leírtaknak megfelelően másik GAL4 promotert használtam.

Ezt leszámítva minden fentebb említett törzset a GF rendszerrel kereszteztem, és a bebábozódás idején szűrtem degradációs hiba fenotípusára (lásd 5.3). Az ily módon vizsgált törzsek közül sajnos egyik sem mutatott eltérést a kontrollcsoporttól (7. ábra). Ez a prediktált kölcsönható partnerek esetében kevésbé meglepő, illetve a nopo E3 ligáznak is főként DNS-javító mechanizmusokban van szerepe, ami nehezen hozható összefüggésbe a krinofágiával.

Az összes interaktor közül a Traf6-ot tartottam a legfontosabbnak, ugyanis a legtöbb szakirodalmi adat ehhez a fehérjéhez áll rendelkezésre. Nemcsak a *Drosophila* TNF α útvonallal fontos komponense, hanem emlősökben is kötődik a Bendless ortológjához, az Ubc13-hoz [46]. Ennek ellenére a modEncode Anatomy Atlas adatai szerint a *Drosophila* nyálmirigyben alacsony az expressziója [47, 48]. A várakozásom ellenére, de az expressziós adatoknak megfelelően a *Traf6 RNAi* nem okozott degradációs defektust a bebábozódás időpontjában megfigyelve. Ez arra enged következtetni, hogy a Bendless valószínűleg nem a Traf6 E3 enzimmel együttműködve hat a krinofágiára.

Váratlan eredmény az is, hogy az *Uev1A* csendesítése nem okozott a benhez hasonló fenotípust, ugyanis nem egy publikáció született a két fehérje komplexéről, ráadásul a humán Ubc13 nem is képes az enzimvariánsai (Uev1A és MMS2) nélkül funkcionálni. Elképzelhető, hogy a *Drosophila* Bendless eltér annyira ezektől, hogy az Uev1A nélkül is működőképes, azonban nem kizárható, hogy az előidézett RNS-interferencia nem megfelelően erős a fenotípus kiváltásához, így még a rövidtávú terveim között szerepel ezeket az eredményeket független RNAi vonalakkal, mutáns törzsekkel megvizsgálni.

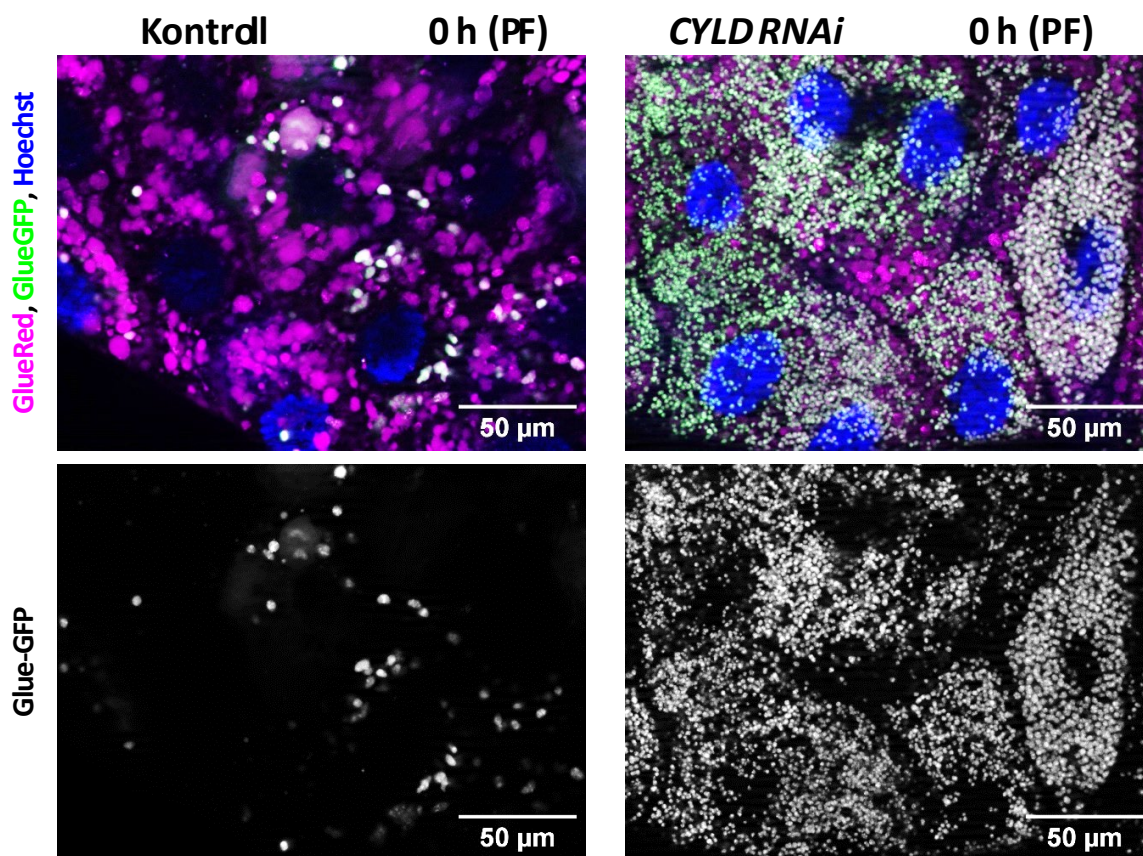


7. ábra: A Bendless fehérje-interakciós partnereinek genetikai szűrése. A fenti ábrán a Bendless eddig ismert kölcsönható partnereit érintő RNAi vonalak krinofágiára gyakorolt hatását láthatjuk a GF rendszerrel vizsgálva (lásd 5.3 fejezet). Észrevehető, hogy számottevő GFP-pozitivitás egyik gén esetében sem figyelhető meg, melyből arra következtethetünk, hogy a Bendless olyan fehérjékkel alkothat komplexet a krinofágia szabályzómechanizmusában, amelyeknek még nem ismert ilyen jellegű interakciója. Az *akt RNAi* esetében *fkh-GAL4* helyett *Sgs3-Gal4* promotert használtam.

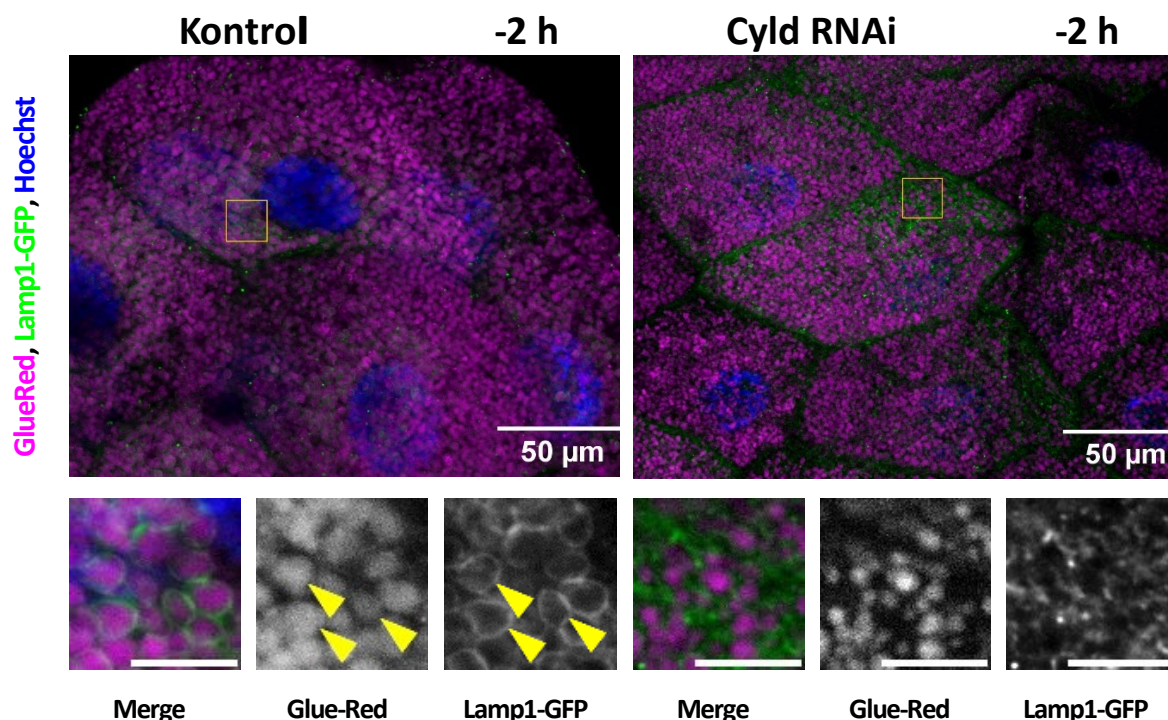
6.3. A CYLD K63-kapcsolt poliubiquitin-specifikus deubiquitiniláz szükséges a krinofágiához

A CYLD a DUB-ok egyik nevezetes, K63-kapcsolt poliubiquitinre specifikus tagja, mely ecetmuslicában és emlősökben is megtalálható. Konzervált módon a TNFR szupercsaládhoz tartozó jelátviteli útvonalakat szabályozza. Mivel a Bendless szerepét ecetmuslicában is a TNFR-hez kötődően írták le, ezért a Cylindromatosisra is különös figyelmet szenteltünk. A

savasodást vizsgáló GF rendszerünkkel keresztezve a *CYLD* RNAi a *benhez* hasonlóan degradációs defektus fenotípusát mutatta, illetve a granulumméret csökkenését is előidézte (8. ábra). LR rendszerrel vizsgálva, ugyancsak hasonlóan a *benhez*, fúziós hibát véltünk felfedezni a *CYLD* RNAi esetén (9. ábra). Mindez arra utal, hogy a CYLD DUB jelenléte ugyanúgy szükséges a krinofágia lezajlásához, mint a Bendless E2 enzim.



8. ábra: A CYLD deubiquitiniláz szükséges a szekréciós granulumok degradációjához a *Drosophila* lárvális nyálmirigyében. Bal oldalon GF kontroll állatok nyálmirigyei láthatók a 0h RPF stádiumban, melyek főként csak DsRed-pozitív krinoszómákat, illetve elvétve GFP-DsRed kettős pozitív granulumokat tartalmaznak. A *CYLD* gén csendesítésének esetén azonban ugyanebben a stádiumban a sejtekben nagy mennyiségű, GFP-re is pozitív struktúra marad, ami azt jelenti, hogy ezeknek az ürege nem képes elsavasodni.

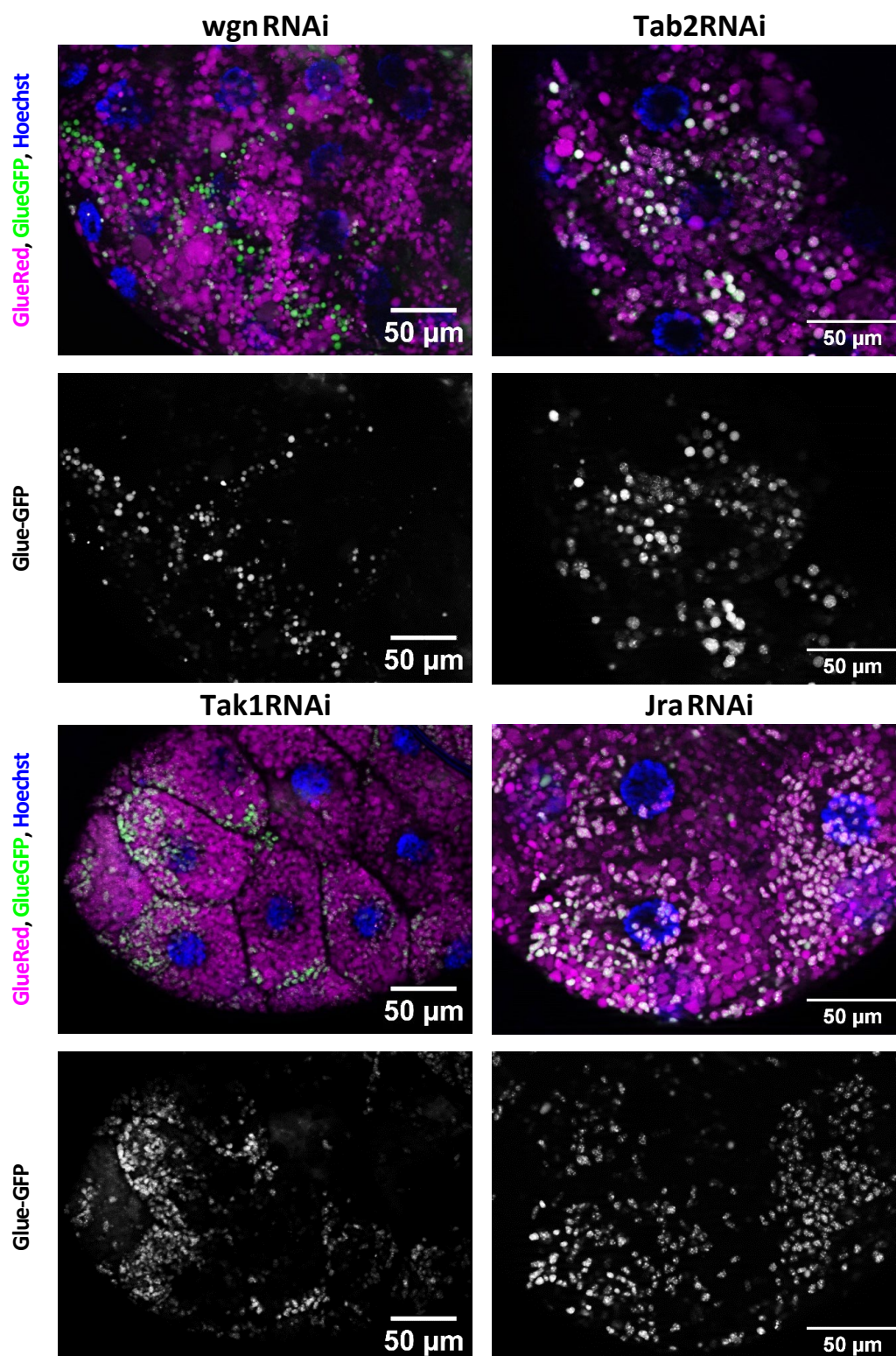


9. ábra: A CYLD deubiquitiniláz szükséges a szekréciós granulum-lizoszóma fúzióhoz. A bal oldali ábrákon megfigyelhető, hogy két órával a bebábozódás előtt (-2h RPF) a nyálmirigysejtekben a DsRed-pozitív granulumok körül szinte egyszerre jelennek meg GFP-gyűrűk, melyek a Lamp1-GFP-t tartalmazó lizoszómaszerű struktúrák és a GlueRedet tartalmazó granulumok fúziójából jönnek létre. Amennyiben *CYLD RNAi* áll fenn, a granulumok körül a GFP-gyűrűk csak elvétve figyelhetők meg, ami azt jelenti, hogy CYLD hiányában a krinofágia nem tud végbe menni. A képkivágásokon a méretvonalak 10 μm -t jelölnek.

6.4. A $\text{TNF}\alpha$ útvonal komponenseinek vizsgálata

A Bendless és a CYLD látszólagosan egymással ellentétes funkciójú, mivel a Bendless K63-kapcsolt poliubiquitinláncok létrejöttét, addig a CYLD ezeknek az eltávolítását katalizálja. Nekünk viszont minkét gén csendesítése ugyanazt a fenotípust okozta, így jogosan merülhet fel a kérdés, hogy ennek mi lehet a magyarázata. Szerencsére a CYLD és a Ben ezen tulajdonsága nem precedens nélküli a szakirodalomban, ugyanis Xue és munkatársai a $\text{TNF}\alpha$ -JNK útvonal feltérképezése során ugyanezt figyelték meg a *Drosophila* szemfejlődésében [20]. Ezen a vonalon elindulva megvizsgáltam a $\text{TNF}\alpha$ -útvonal rendelkezésemre álló komponenseit a krinofágia modellrendszerén. A gének közül a *wengen* TNFR, a *Tab2* ubiquitin-kötő, a *Tak1* kináz és a *Jra* transzkripciós faktor gének csendesítéseit tudtam eddig megvizsgálni. Ha a krinofágiát a Bendless és a CYLD valóban a $\text{TNF}\alpha$ útvonalon keresztül szabályozza, akkor az útvonal más komponenseinek kiütése esetén ugyanazt a fenotípust kellene látnom, mint a *ben* és *CYLD* csendesítése esetén. A tapasztalat viszont azt mutatja, hogy a vizsgáltak közül egyik gén csendesítése sem okozott jelentős granulum degradációs defektust (10. ábra). Ebből arra

következtetek, hogy az ecetmuslicák nyálmirigyében a krinofágia nem a $\text{TNF}\alpha$ -JNK útvonalon keresztül indukálódik, hanem más módon.



10. ábra: A $\text{TNF}\alpha$ -JNK útvonal néhány komponensének krinofágiára gyakorolt hatása. A vizsgálatokat a bebábozódás időpontjában lévő nyálmirigyekben vizsgáltam GF rendszerrel (4. ábra). Ebben az időpontban a granulumoknak legalább a 70%-a már csak DsRed-pozitív, elsavasodott. A fent látható géncsendesítések, leginkább a

Tak1 és a Jra RNAi esetében maradt vissza valamennyi GFP-pozitivitás, ez a granulumoknak csak viszonylag kis hányadát érinti, nem számottevő. A TNF α -JNK útvonalnak lehet némi késleltető hatása a szekréciós granulumok lebomlására, azonban valószínűleg nem ez a fő indukálója a sejtekben megfigyelhető krinofágiának.

7. DISZKUSSZIÓ

A krinofágia, vagyis a szekréciós granulum-lizoszóma fúzió jellemző lehet minden olyan sejtre, amely szekréciós tevékenységet végez, azonban a folyamat molekuláris hátteréről csak korlátozott szakirodalmi adat áll rendelkezésre. Ebben a dolgozatban bemutatom, hogy a K63-kapcsolt poliubiquitin-specifikus Bendless E2 ubiquitin-konjugáló és CYLD deubiquitiniláz fehérjék, a már általunk korábban azonosított Cnot4 E3 ubiquitin-ligáz mellett szükségesek az *ecetmuslica* lárvális nyálmirigyében lezajló, fejlődéstanilag szabályozott krinofágia lezajlásához. A két újonnan azonosított fehérjén kívül megvizsgáltam a Bendless eddig ismert interakciós partnereit, illetve a TNF α -JNK szignalizációs útvonal több komponensét is, melyben kimutatták már a Ben és a CYLD szerepét is. Az eredményeim alapján valószínűsíthető, hogy a két fehérje nem a TNF α -útvonalon keresztül szabályozza a granulum-lizoszóma fúziót, illetve a Bendless egy olyan E2-E3 komplexben lehet, ami egyelőre ismeretlen számunkra. Mindkét fehérje esetében szükséges még az eredmények független módszerrel való megerősítése is: ezt eltérő RNAi-vonalak, illetve mutáns gének vizsgálatával szeretném megtenni.

A Bendless egy E2 enzim, a CYLD pedig egy deubiquitiniláz, mindkettő K63-kapcsolt poliubiquitin-specifitására ismert. Ennek ellenére az általam vizsgált két rendszerben a rendszerben ugyanazt a fenotípust okozzák, tehát nem valószínű, hogy a CYLD a Ben, és a vele kölcsönható E3 által létrehozott K63-kapcsolt poliubiquitinláncot deubiquitinilálja. Egerekben kimutatták, hogy a CYLD képes K48-kapcsolt poliubiquitint is hasítani, így lehetséges, hogy stabilizálja a Bendlesst, vagy annak valamely kötőpartnerét [38]. A jövőben episztázisanálízissel szeretném megállapítani, hogy a két gén egy útvonalban hat-e. Ezt túltermelő konstrukciók beszerzésével, illetve generálásával tervezem végrehajtani.

Szeretnék közvetlen bizonyítékot is arra, hogy ténylegesen ezen fehérjék által végzett ubiquitiniláció szükséges a krinofágiához. A CYLD esetében ehhez rendelkezésre állnak olyan törzsek, melyekben a túltermelt fehérje egy-egy doménje hiányzik, ezeket még a közeljövőben megvizsgálom. A Bendless esetében jelenleg nincsenek ilyen konstrukciók a törzsközpontokban, így azokat magamnak kell létrehozni.

Korábban megfigyeltük, hogy a GFP-vel jelölt, UAS-Gal4 rendszerrel túltermelt ubiquitin a szekréciós granulumok membránjához lokalizálódik, a krinofágia indukálásával egy időben. A két újonnan felfedezett krinofágia-szabályozó gén hatását szeretném megvizsgálni egy olyan rendszerben is, amellyel az ubiquitin lokalizációja vizsgálható. Elképzelhető, hogy a folyamatot

Mivel a Bendless ismert kötőpartnerei közül egyik sem befolyásolta a krinofágiát specifikusan, az E2-vel kölcsönható E3 enzim kilétét továbbra is homály fedí. Azért, hogy megismerhessük az E3 enzimet, a Bendless szabályozóját, vagy esetleg az ubiquitiniláció targetjét, szeretném a Bendless interakciós partnereit a lárvális nyálmirigyből, koimmunoprecipitációval kifogni és tesztelni. Ehhez létre fogok hozni fluoreszcens fehérjével ellátott Bendlesst hordozó, transzgénikus muslicatörzseket. Így nemcsak a tényleges kötőpartnereket lehetne kifogni, de a Bendless lokalizációja is láthatóvá válna. Hasonlóan járnék el a Cyld esetén is. Ezen túl egy pulldown keretében érdemes lenne megvizsgálni azt is, hogy a korábban felfedezett Cnot4 enzimmel kölcsönhat-e a Bendless.

26

poliubiquitin a jeltovábbításban vesz részt. Lehetséges az is, hogy a fehérjék a granulumok membránfehérjéinek ubiquitiniláltságát befolyásolják.

8. SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Rész/feladat*	Felkészítés után önállóan végeztem a dolgozathoz szükséges mennyiségben (%-ban megadva)	Folyamatos segítséggel végeztem a dolgozathoz szükséges mennyiségben (%-ban megadva)
<i>A vizsgált állatok, állattörzsek fenntartása</i>	100	0
<i>A megfelelő állatok válogatása és keresztezése</i>	100	0
<i>A fénymikroszkópos minták előkészítése, fényképezése</i>	100	0
<i>Az adatok statisztikai feldolgozása</i>	100	0

9. NYILATKOZAT

Ezúton nyilatkozom, hogy “Az ubiquitin lehetséges szerepe a szekréciós granulumok lebontási útra való terelésében” című pályamunkámmal a 35. Országos Tudományos Diákköri Konferencián II. helyezést értem el. A helyezett pályamunkát a jelen BTDK jelentkezésem részeként eljuttattam a szervezőkhöz.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni a támogatást elsősorban témavezetőmnek, Dr. Csizmadia Tamásnak, illetve az Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék munkatársainak. Külön köszönetet érdemel Hargitai Dávid hallgatótársam, aki a *vis maior* helyzetekben is, idejét nem sajnálva segített nekem új protokollokat elsajátítani a vizsgálatokhoz. Köszönettel tartozom továbbá laborunk BSc-s hallgatóinak is, akik nemcsak a szorgalmukkal járultak hozzá a munkaterhek csökkentéséhez, de a produktivitásnak kedvező, motiváló munkahelyi légkör megteremtésében is nagyon fontos szerepet játszottak számomra. Végül szeretném hálámat kifejezni páromnak is, aki informatikai segítségnyújtásával nagyon sok stresszes órától kímélt meg engem a munkám során.

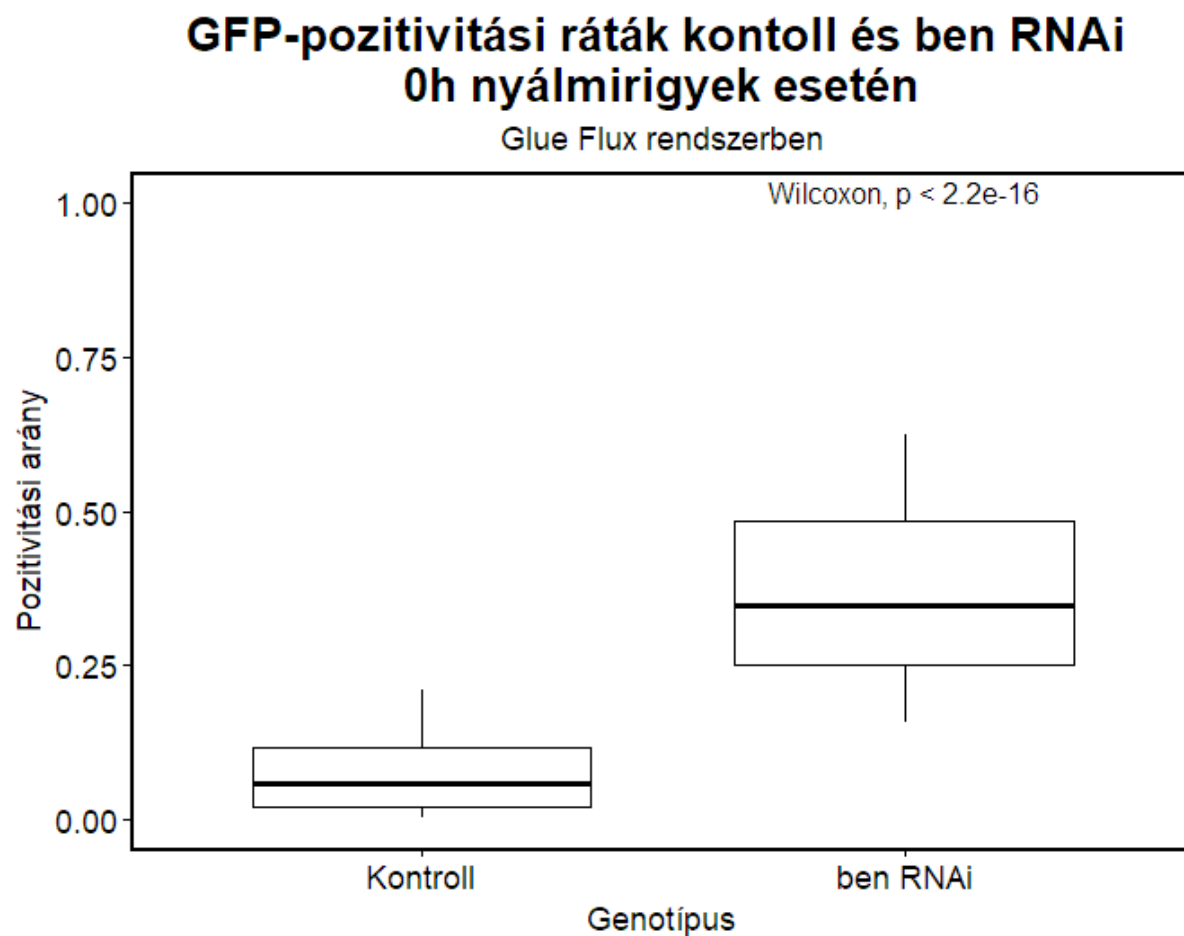
11. IRODALOMJEGYZÉK

1. Goldstein, G., et al., *Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells*. 1975.
2. Pickart, C., *Mechanisms underlying ubiquitination*. Annual review of biochemistry, 2001. **70**.
3. Acconcia, F., S. Sigismund, and S. Polo, *Ubiquitin in trafficking: the network at work*. Experimental cell research, 2009. **315**(9).
4. Lamark, T., S. Svenning, and T. Johansen, *Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm*. Essays in biochemistry, 2017. **61**(6).
5. Parzych, K. and D. Klionsky, *An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation*. Antioxidants & redox signaling, 2014. **20**(3).
6. Smith, R.E. and M.G. Farquhar, *Lysosome function in the regulation of the secretory process in cells of the anterior pituitary gland*. J Cell Biol, 1966. **31**(2): p. 319-47.
7. Galluzzi, L., et al., *Molecular definitions of autophagy and related processes*. EMBO J, 2017. **36**(13): p. 1811-1836.
8. Csizmadia, T., et al., *Molecular mechanisms of developmentally programmed crinophagy in Drosophila*. The Journal of cell biology, 2018. **217**(1).
9. Biyasheva, A., et al., *Glue secretion in the Drosophila salivary gland: a model for steroid-regulated exocytosis*. Developmental biology, 2001. **231**(1).
10. Harrod, M.J. and C.D. Kastriasis, *Developmental studies in Drosophila. II. Ultrastructural analysis of the salivary glands of Drosophila pseudoobscura during some stages of development*. J Ultrastruct Res, 1972. **38**(5): p. 482-99.
11. Madiraju, C., et al., *K63 ubiquitination in immune signaling*. Trends in immunology, 2022. **43**(2).
12. Bai, Z., Z. Li, and W. Xiao, *Drosophila bendless catalyzes K63-linked polyubiquitination and is involved in the response to DNA damage*. Mutation research, 2018. **808**.
13. Clague, M., C. Heride, and S. Urbé, *The demographics of the ubiquitin system*. Trends in cell biology, 2015. **25**(7).
14. Lork, M., K. Verhelst, and R. Beyaert, *CYLD, A20 and OTULIN deubiquitinases in NF- κ B signaling and cell death: so similar, yet so different*. Cell death and differentiation, 2017. **24**(7).
15. Skaug, B., X. Jiang, and Z. Chen, *The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways*. Annual review of biochemistry, 2009. **78**.
16. Deng, L., et al., *Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain*. Cell, 2000. **103**(2).
17. Bai, Z., et al., *Drosophila Uev1a is dually required for Ben-dependent DNA-damage response and fly mobility*. Cellular signalling, 2020. **74**.
18. Li, B., et al., *Indole-3-Carbinol Induces Apoptosis of Hepatic Stellate Cells through K63 De-Ubiquitination of RIP1 in Rats*. Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology, 2017. **41**(4).
19. Reiley, W.W., et al., *Regulation of T cell development by the deubiquitinating enzyme CYLD*. Nature Immunology, 2006. **7**(4): p. 411-417.
20. Xue, L., et al., *Tumor suppressor CYLD regulates JNK-induced cell death in Drosophila*. Developmental cell, 2007. **13**(3).

21. Komander, D., et al., *The structure of the CYLD USP domain explains its specificity for Lys63-linked polyubiquitin and reveals a B box module*. Molecular cell, 2008. **29**(4).
22. Costantino, B., et al., *A novel ecdysone receptor mediates steroid-regulated developmental events during the mid-third instar of Drosophila*. PLoS genetics, 2008. **4**(6).
23. Pulipparacharuvil, S., et al., *Drosophila Vps16A is required for trafficking to lysosomes and biogenesis of pigment granules*. Journal of cell science, 2005. **118**(Pt 16).
24. Berry, D.L. and E.H. Baehrecke, *Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in Drosophila*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1137-48.
25. Cherbas, L., et al., *EcR isoforms in Drosophila: testing tissue-specific requirements by targeted blockade and rescue*. Development (Cambridge, England), 2003. **130**(2).
26. Lee, K., et al., *Inflammation-Modulated Metabolic Reprogramming Is Required for DUOX-Dependent Gut Immunity in Drosophila*. Cell host & microbe, 2018. **23**(3).
27. Dietzl, G., et al., *A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in Drosophila*. Nature, 2007. **448**(7150).
28. Ueda, R. *NIG-Fly - Fly Stocks of National Institute of Genetics* -. 2008 [cited 2022 10.26.]; Available from: <https://shigen.nig.ac.jp/fly/nigfly/about/aboutRnai.jsp>.
29. Ni, J., et al., *A genome-scale shRNA resource for transgenic RNAi in Drosophila*. Nature methods, 2011. **8**(5).
30. Ketosugbo, K., H. Bushnell, and R. Johnson, *A screen for E3 ubiquitination ligases that genetically interact with the adaptor protein Cindr during Drosophila eye patterning*. PloS one, 2017. **12**(11).
31. Ni, J., et al., *A Drosophila resource of transgenic RNAi lines for neurogenetics*. Genetics, 2009. **182**(4).
32. Ni, J., et al., *Vector and parameters for targeted transgenic RNA interference in Drosophila melanogaster*. Nature methods, 2008. **5**(1).
33. Duffy, J.B., *GAL4 system in Drosophila: a fly geneticist's Swiss army knife*. Genesis, 2002. **34**(1-2): p. 1-15.
34. Lezsák, D., *Váladékszemsék szoftveres kvantifikációja fluoreszcens mikroszkópos felvételek alapján*, in *Algoritmusok és Alkalmazásaik Tanszék*. 2023, Eötvös Loránd Tudományegyetem. p. 25.
35. Team, R.C., *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. 2022, R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria.
36. Gosset, W.S., *The probable error of a mean*. Biometrika, 1908: p. 1-25.
37. Welch, B.L., *The generalization of 'Student's' problem when several different population variances are involved*. Biometrika, 1947. **34**(1-2): p. 28-35.
38. Shapiro, S.S. and M.B. Wilk, *An analysis of variance test for normality (complete samples)*. Biometrika, 1965. **52**(3-4): p. 591-611.
39. Mann, H.B. and D.R. Whitney, *On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other*. The Annals of Mathematical Statistics, 1947. **18**(1): p. 50-60.
40. *FlyBase Gene Report: Dmel\ben*. 2022 [cited 2022 10.30.]; Available from: https://flybase.org/reports/FBgn0000173#interactions_sub.
41. Ma, X., et al., *Bendless modulates JNK-mediated cell death and migration in Drosophila*. Cell Death and Differentiation, 2014. **21**(3).
42. Merkle, J.A., et al., *no poles encodes a predicted E3 ubiquitin ligase required for early embryonic development of Drosophila*. Development, 2009. **136**(3): p. 449-459.
43. Guruharsha, K.G., et al., *A Protein Complex Network of Drosophila melanogaster*. Cell, 2011. **147**(3): p. 690-703.

44. The FlyBi Project. *Towards a large-scale high-confidence binary protein interaction network for Drosophila*. 2022 [cited 2022 10.30.]; Available from: <https://flybi.hms.harvard.edu/results.php>.
45. Vinayagam, A., et al., *An Integrative Analysis of the InR/PI3K/Akt Network Identifies the Dynamic Response to Insulin Signaling*. Cell Reports, 2016. **16**(11): p. 3062-3074.
46. Lin, H., et al., *Oligomerization-primed coiled-coil domain interaction with Ubc13 confers processivity to TRAF6 ubiquitin ligase activity*. Nature Communications, 2017. **8**(1): p. 1-13.
47. Brown, J.B., et al., *Diversity and dynamics of the Drosophila transcriptome*. Nature, 2014. **512**(7515): p. 393-399.
48. *FlyBase Gene Report: Dmel\Traf6*. 2022 [cited 2022 10.28.]; FB2022_05:[Available from: <https://flybase.org/reports/FBgn0265464#expression>].

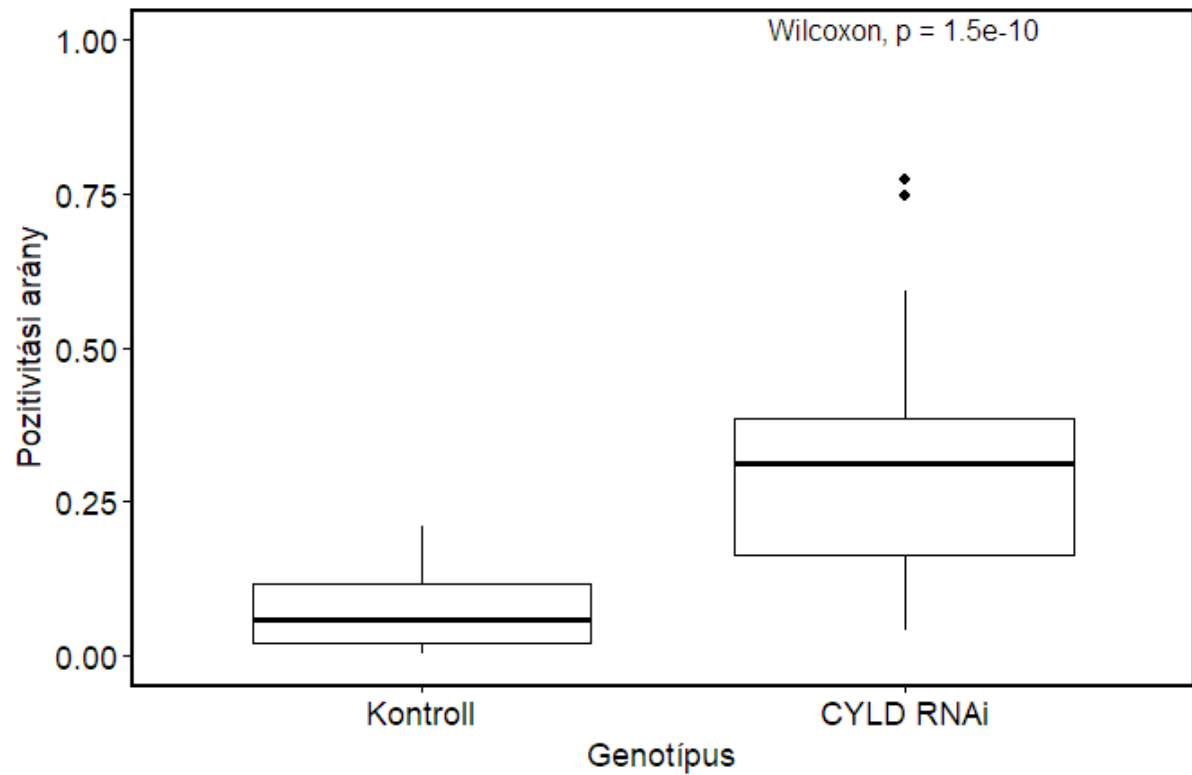
12. FÜGGELÉK



12. ábra: A 0 h-s állatok nyálmirigyeiben mérhető GFP-pozitivitási ráta összehasonlítása kontroll és bendless géncsendesítés esetén, GF rendszerben. Az ábrán megfigyelhető, hogy míg a kontrollban a pozitivitás átlaga alacsony (7%), addig a ben RNAi esetén ez jelentősen megnő (36,1%). A Mann-Whitney U teszt a Wilcoxon-féle nem-parametrikus teszt egyik változata, ezért szerepel ez a felirat az ábrán.

GFP-pozitivitási ráták kontroll és CYLD RNAi 0h nyálmirigyek esetén

Glue Flux rendszerben



13. ábra: A 0 h-s állatok nyálmirigyeiben mérhető GFP-pozitivitási ráta összehasonlítása kontroll és Cylindromatosis géncsendesítés esetén, GF rendszerben. Az ábrán megfigyelhető, hogy míg a kontrollban a pozitivitás átlaga alacsony (7%), addig a CYLD RNAi esetén ez jelentősen megnő (32,2%). A Mann-Whitney U teszt a Wilcoxon-féle nem-parametrikus teszt egyik változata, ezért szerepel ez a felirat az ábrán.