

3.5.1 Az élesztő autofágia-gének működésének igazolása *Drosophila melanogaster*ben

Ezidáig 20 Agt gént azonosítottak élesztőben. Közülük 9-nek van ortológia *Drosophilában*. Az Atg7 gén fehérjeterméke egy E1 konjugáló enzim, amely az élesztőben az Agt8 és Atg12 aktivációján keresztül a képződő autofág vakuolum membránjának bezáródásához és lefűződéséhez szükséges. Előállítottuk az Atg7 mutánsát *Drosophilában*, aminek következtében a lárva-báb átalakulás előtt természetes körülmények között beinduló ún. fejlődési autofágia gyakorlatilag teljesen gátlódott a lárvális szervekben. A kifejlett legyekben az Atg7 működésének gátlása a stressz hatásokra való túlérzékenységhez vezetett, csökkentette az élethosszukat és az idegrendszerükben ubiquitinálódott fehérjék felhalmozódását okozta. Feltehetően ez a közvetlen oka annak, hogy az ilyen mutánsok központi idegrendszerében a pusztuló idegsejtek száma megnövekedett. E vizsgálataink arra utalnak, hogy az autofágia a neuronok túléléséhez szükséges, mivel alaphelyzetben a káros fehérjéket eliminálja a idegsejtekből (Juhász és mtsa-i 2007).

3.5.2 Azon gének funkciójának vizsgálata az autofagocitózis során, amelyek működéséről korábban még nem születtek leírások

P-elem inzerciók törzsekből azonosított autofágia-gének

Korábbi munkáinkban több mint 300, késő lárvakorban letális, P-elem indukált, funkcióvesztéses *Drosophila* mutáns törzset teszteltünk. Összesen 52 olyan mutánst találtunk, amelyek lárvális szerveiből, a fénymikroszkópos vizsgálatok eredményei szerint, teljesen hiányoznak az acridin orange/neutrálvörös/LysoTracker Red pozitív granulomok, vagy a granulomok mérete, megoszlása, száma jelentősen eltér a vad típustól. Ezen törzsek zsírtest sejtjeit elektronmikroszkópban is megvizsgáltuk és csak azokat vizsgáltuk tovább, amelyek esetében az autofág struktúrák hiánya ezen a szinten is igazolható volt. Valamennyi funkcióvesztéses törzsből kezeltünk állatokat 20-hidroxiekdizonnal (amely a fejlődési autofágiát serkenti) és végeztünk éheztetéses kísérleteket (a stressz indukált autofágia vizsgálatára). A P-elem által okozott funkcióvesztést deléciós mutánsokkal való keresztezésekkel is igazoltuk. Végül e tesztrendszer segítségével 21 törzset azonosítottunk.

A **jelen pályázat keretében** először e 21 törzsből megpróbáltuk az eredeti fenotípust visszaállítani a P-elem remobilizálásával. Más szóval revertánsokat állítottunk elő. Ez 10 törzs esetében bizonyult sikeresnek:

Közülük kiválasztottunk négy törzset, amelyeket részletesebben tanulmányoztunk az elmúlt évek során (CG5269 vib, CG6784, CG8532 lqf és CG17299 SNF4).

A következő kísérleteket végeztük el:

1. Megszekvenáltuk a Flybase-ből azonosított genomiális DNS szakaszt, azért, hogy a P-elem pontos helyét megállapítsuk és közölni tudjuk. A szekvenálás mind a négy esetben sikeres volt, de sajnos a CG6784 törzsből két P-elem inzertálódott. Így e törzs

esetében további genetikai munkára volt szükség, aminek a segítségével a két P-elemet szét tudtuk választani és meg tudtuk állapítani, hogy melyik inzerció az, amely az autofágia szabályozásában szerepet játszó gén működését akadályozza.

2. Mindegyik törzs esetében felsokszoroztuk a génterméket, vagy annak egy jellemző exonját PCR segítségével, majd expressziós vektorba klónoztuk a megfelelő fragmentet. Kifejeztettük a fehérjét, vagy az exon által kódolt részt és poliklonális ellenanyagot termeltettünk ellenük. Az ellenanyagok segítségével Western blotokon meghatároztuk a fehérje kifejeződésének idejét az egyedfejlődés során, és megállapítottuk, hogy mely szervekben expresszálódnak. Fénymikroszkópos immuncitokémiai módszerekkel megállapítottuk a sejtekben a fehérje lokalizációját.

3. Ugyancsak a fent említett négy gén esetében ún. palindrómás konstrukciókat hoztunk létre. Ezeket hősokk- és szövetspecifikus promoterek mögé építettük, majd a megfelelő vektorba való bevitel után petesejtekbe injektáltuk. A transzgén törzsekben a hősokk hatására a palindrómás konstrukcióról hajtúalakú, kettős szálú RNS másolódik, amely az RNS interferencia jelensége miatt az adott gént „elcsendesíti”, azaz a róla másolódó egyes szálú RNS molekulák is lebomlanak a sejtekben. Ennek az a következménye, hogy az autofágia gátlódik az ilyen törzsekben.

4. Menekítő konstrukciókat készítettünk és ezzel a módszerrel is igazoltuk az adott gén funkcióját az autofágia kiváltásában, mechanizmusában.

5. Igazoltuk RT-PCR segítségével, hogy a mutánsokban az adott gén mRNS terméke gyakorlatilag hiányzik és nem lehet sem hormonkezeléssel, sem éheztetéssel a génről másolódó mRNS szintézisét fokozni.

6. Mind a négy törzs esetében megpróbálkoztunk klonális expresszióval is. Ezek a kísérletek egyenőre csak esetenként sikerültek.

A **CG17299SNF4Ay** törzs az egyike azoknak, amelyek esetében valamilyen kísérletünk pozitív eredményt hozott. A mutáció gátolja a fejlődési és a stressz indukálta autofágiát, a zsírtest sejtek sem 20-OHE kezelés, sem éheztetés hatására nem képesek autofág vakuolumok képzésére. Ugyanez a hatás figyelhető meg a hemizigótákban és RNS interferencia alkalmazása után. A P-elem remobilizálása és a menekítés visszallítja az eredeti, vad fenotípust. A mutánsokban nem mutatható ki a géntermék sem RNS, sem fehérje szinten. A fénymikroszkópos immuncitokémiai vizsgálataink azt igazolják, hogy a génről másolódó fehérje az autofágia indukációjakor a sejtmagba transzlokálódik. A gén csökkentett expressziója a felnőttkorban (legyekben) az élethossz jelentős rövidüléséhez vezet. Az SNF4Ay az emlősökben azonosított AMPK Drosophila orthológja. Működése a fejlődési és stressz indukált autofágiához egyaránt szükséges és minden bizonnyal a TSC1/TSC2-Rheb-TOR jelátviteli útvonalon keresztül szabályozza a folyamatot (Lippai és mtsa-i 2008).

A **CG8532lqf** a másik törzs, amely a négy vizsgált közül minden eddigi vizsgálatban pozitív eredményeket hozott. A mutánsok sem az autofágiát indukáló hormonális (20-OHE) hatásra, sem az éheztetésre nem tudnak autofágiával válaszolni. Az autofágiát RNAi módszerrel gátolni lehet bennük. A P-elem remobilizálása és a menekítés e mutáns esetében is visszallítja az eredeti, vad fenotípust. A gén csendesítése jelentősen lecsökkenti a legyek élethosszát. E gén fehérjetermékével szemben is termeltettünk ellenanyagot. Konfokális mikroszkópos vizsgálatokban igazoltuk, hogy az lqf kolokalizál a LAMP1 lizoszómális membrán markerrel, amelyet egy transzgén

törzsünk hordoz. Eredményeink tudományos cikk formájában való publikációja előtt szeretnénk a génterméket elektronmikroszkópos szinten is lokalizálni. Sajnos, az általunk kifejlesztett poliklonális ellenanyag ebben a rendszerben nem működik. Ezért GFP-lqf fuziók fehérjét expresszáló transzgen törzset készítettünk. E legyekben a génterméket anti-GFP segítségével tervezzük lokalizálni. Ez fontos eredmény lehet, mivel az lqf ENTH doménje szerepet játszhat az autofág vakuolum izoláló membránjának kialakulásában (Sass és mtsa-i 2006).

A **CG6784** törzs esetében is elvégeztük valamennyi fent említett kísérletet és ezek pozitív eredményeket hoztak. Egyértelműen bizonyítottuk a gén funkcióját az autofágia szabályozásában. Mivel a konfokális mikroszkópos vizsgálatokban CG6784 fehérjeterméke is kolokalizál a LAMP1 lizoszómális membrán markerrel, ebben az esetben is szeretnénk elektronmikroszkópos vizsgálatokat végezni az eredmények leírása előtt. E törzs esetében hiányoznak még az RT-PCR kísérletek is. (Sass és mtsai, 2005, Lippai és mtsai 2005, Csikós és mtsai 2005).

A **CG5269vib** esetében szintén elvégeztük a fenti kísérletsorokat. Valamennyi vizsgálat pozitív eredményt hozott. Egyelőre nem sikerült azonban olyan ellenanyagot termeltetni, amely felismeri a vad törzsekben a fehérjét, noha a rekombináns fehérjével kitűnően reagálnak.

Autofágia gének azonosítása microarray módszerrel

Autofágia géneket kerestünk mikroarray módszerrel is. Azt találtunk, hogy több chaperon fehérjét kódoló gén gátlódik a fejlődési autofágia megindulásának idején, közöttük a peptidil-cisz-transz izomeráz FK506-kötő fehérje génje is (FKBP39). Genetikai molekuláris biológiai és sejtbiológiai módszerekkel igazoltuk, hogy e fehérjének fontos szerepe van az autofágia szabályozásában, és valószínűleg a Foxo transzkripciós faktor működését modulálja. A Foxo mutánsok nem képesek éheztetés hatására autofág struktúrákat képezni, viszont a Foxo túltermeltetése autofágiát indukál a sejtekben (Juhász és mtsa-i 2007).

Autofágia gének azonosítása differential display technikával

A *Manduca sexta* interegmentális izmainak lebomlását tanulmányozva ezzel a módszerrel, egy új, eddig nem azonosított autofágia gént sikerült azonosítanunk, amelynek a funkcióját *Drosophilában* is vizsgálni tervezzük a továbbiakban (Lőw és mtsa-i 2005).

3.5.3 Az előzetes munkáink során azonosított autofágia gének egymáshoz való kapcsolatainak tisztázása

A munkatervi pontra vonatkozóan jelenleg azt mondhatjuk, az általunk azonosított valamennyi autofágia gén a molekuláris hatásmechanizmusa alapján kapcsolható az eddig ismert autofágia gének egy, vagy több tagjához. Ugyanakkor még nem ismerünk elég adatot e gének működésnek mechanizmusairól ahhoz, hogy egy a

soksejtű szervezetekben is érvényes szabályozási hálózatba tudjuk rendezni őket. E cél eléréséhez minden bizonnyal még sok munkára és szerencsére van szükség.

3.5.4 A neuronpusztulás szabályozásában és mechanizmusában részt vevő gének/géntermékek azonosítása

Ezen a téren az első vizsgálataink célja az volt, hogy a neuronpusztulást okozó *Drosophila* mutánsokban, ill. transzgén törzsekben megfigyelhető sejtpusztulás típusát (apoptosis, autophagia, vesicularis degradatio) meghatároztuk.

A Flybase adatbázisból a következő mutánsokat választottuk ki a korábbi rendelkezésre álló irodalmi adatok ismeretében: Loechrig (SNF4Ay, 12 allél) Blue cheese (Beached1, 2 allél), Bubblegum (4 allél), Drop-dead (6 allél), Swiss cheese (10 allél), Spongecake (2 allél), Eggroll (2 allél), Appl (16 allél), Vap (1 allél). Ezekon kívül megszereztük a Huntington-modellként szolgáló UAS-Zzzz, a Parkinson modellként ismert UAS-Hsap/SNCA és az Alzheimer-kórt modellező UAS-SWE transzgén törzseket is.

A törzseket bekeresztettük a megfelelő genetikai markereket és balancereket hordozó legyekkel. Sajnos, e keresztezések során valamennyi neuronpusztulós transzgén törzset elvesztettük, mivel életképtelennek bizonyultak.

A többi törzs esetében először fénymikroszkópos felmérést végeztünk. A Blue cheese, a Bubblegum, a Swissscheese és a Vap mutánsokban találtunk olyan területeket az agydúcban, ahol valószínűsíthető volt tömeges sejtpusztulás.

Ezeket a mintákat elektronmikroszkópban is megvizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a sejtpusztulás a Blue cheese és a Swissscheese mutánsokban a neuronok pusztulása a bábból való kikelés utáni 10.-12. napon volt először megfigyelhető. A sejttetek nagy részében fiatal autofagoszómák és idősebb autofág vakuolumok is láthatók. Az axontömegben is megfigyelhető az előrehaladott autofágia, noha sokkal kevesebb számban, mint ahogy azt a sejttetek állapota alapján várni lehetne.

A Bubblegum és a Vap mutánsokban a bábból való kikelés után 18-24 nappal találtuk meg azokat az idegsejteket, amelyek a mutáció következtében elpusztulnak. Ezen törzsek esetében elsősorban apoptotikus sejteket tudtunk azonosítani. Ezen a téren további feladat az autofágia esetleges szerepének tisztázása, pontos meghatározása (Takács és mtsai 2005). Az elsődleges adatgyűjtés alapján minden bizonnyal morfometriai felméréseket kell végeznünk elektronmikroszkópos szinten ahhoz, hogy igazolni tudjuk az autofágia részvételét a neuronpusztulásban, vagy a neuronpusztulást megelőző fiziológiai folyamatok során (Takács és mtsai 2006).

4.2.3 Az autofágia és apoptózis (genetikai) kapcsolatának vizsgálata

A pályázat keretében több vizsgálatot végeztünk az apoptózis és az autofágia kapcsolatára vonatkozóan is a *Drosophila* lárvális szöveteinek pusztulása során. Megállapítottuk, hogy a proapoptotikus gének közül a **hid** erőteljesen serkenti az autofágiát a lárvális szövetekben, míg a *repear*, a *grim* és a *sickle* nincs hatással e folyamatra, noha mind a négy gén egyidejűleg apoptózist indukál az imaginális szövetekben. Igazoltuk, hogy a *hid* autofágiát serkentő hatása a kaszpáz-kaszád

rendszerétől független. További kísérletek alapján bebizonyosodott, hogy a hid ugyan erősen serkenti a stressz indukálta autofágiát, de a fiziológiásan beinduló, fejlődési autofágiához nem szükséges, mert a hid mutánsokban ugyanúgy zajlik a folyamat, mint a kontrol, vad típusú lárvákban (Juhász és mtsai 2005).

Az autofágia és az apoptózis szabályozásának kapcsolataira vonatkozóan amerikai kutatókkal kooperációban végeztünk kísérleteket a *Drosophila* nyálmirigyen. Megállapítottuk, hogy a nyálmirigy pusztulása során az autofágia megelőzi az apoptózis első lépéseit, szükséges a proapoptotikus gének aktiválódásához, az apoptózis beindulásához. (Akdemir és mtsai 2006)

Egy másik kísérletsorozatban, szlovák kutatókkal közösen azt találtuk, hogy a nyálmirigy sejtek pusztulása során az autofágiának fontos szerepe van, de valószínűleg nem az autofágia maga a sejtpusztulás „kivitelező” mechanizmusa, mert a sejtek elsősorban apoptózissal pusztulnak. Úgy tűnik, hogy az autofágiát egy ER stressz indítja be a nyálmirigy sejtekben. Az autofág gének működésének gátlása, vagy mutációja a nyálmirigyben azt eredményezi, hogy a mirigy pusztuló sejtjeit nem támadják meg és nem kebelezik be a vérsejtek. E folyamat molekuláris hátterére vonatkozóan vannak már adataink, amelyeket a közeljövőben tervezünk leírni.

4.2.4 Az autofágia potenciális szerepének vizsgálata a neurondegenerációban

Mint arról fentebb szó esett, az *Atg7* élesztő autofágia gén funkcióját vizsgálva *Drosophilában* azt tapasztaltuk, hogy a gén mutációja az élethosszot jelentősen megrövidítette a kifejlett legyekben. Ez egyébként valamennyi eddig általunk tanulmányozott autofágia gén esetében igaz (Tóth és mtsai 2008). A jelenséget részletesebben tanulmányozva azt tapasztaltuk, hogy a mutáns legyek stressz hatásokra adott válasza sokkal gyengébb, mint a kontroloké. Mozgási aktivitásuk is jelentősen gyengült. A mutáns legyek agydúcában levő neuronokban jelentős mennyiségben jelennek meg a fehérje aggregátumok (inclusion bodies). Ezek a fehérje aggregátumok ubiquitinált molekulákat tartalmaznak. Mindebből arra következtettünk, hogy az autofágia normális esetben a hibás, vagy káros fehérjéket folyamatosan eliminálja a neuronokból. Ha az autofágia gátolt a mutáció következtében, akkor ezek felszaporodnak és minden bizonnyal az idegsejtek pusztulásához vezetnek, ami alapja lehet az élethossz rövidülésének is (Juhász és mtsai 2007). Később a mi eredményeinkhez nagyon hasonló adatokat közöltek az *Atg8* esetében is.

A *C. elegans* esetében elért eredmények

4.2.1 *C. elegans* autofág gének mutáns és RNAi analízise

4.2.2 Az autofágiát szabályozó genetikai útvonalak feltárása és jellemzése

A kutatási periódus első szakaszában zöld fluorescens fehérjével (GFP) jelölt riporter konstrukciókat hoztunk létre a *C. elegans*ban zajló autofágia vizsgálatára; a *bec-1/Atg1*, *lgg-8/Atg8* és *atg-18/Atg18* gének transzlációs fúziós (funkcionális) rendszerét injektáltuk vad típusú genetikai háttérbe. A BEC-1::GFP transzgén menekítette a *bec-1* „null” mutánsok embrió életképtelen fenotípusát. Ezt az extrakromoszómális (instabil)

rendszerrel használtuk a *bec-1* gén mozaik analíziséhez. Az *lgg-1* és *atg-18* transzgéneket sikerült integrálni, majd a kapott törzseket izogenizálni. Az *lgg-1::gfp* transzgént expresszáló törzs elemzésével megállapítottuk, hogy az autofágia legfőbb markereként használt LGG-1 (LC3/GABARAP/GATE16) fehérje jelen van a fonalféreg egyedfejlődés minden szakaszában és az állat minden sejtjében. A normális körülmények között tartott fonalféreg esetében az LGG-1 alapvetően „bazális” szintű expressziót mutatott, de a citoplazmában jellemző pontszerű struktúrákat is megfigyeltünk. Ez a bazális szint különböző sejthalált okozó inzultusok hatására drasztikusan megnövekedett az embriókban. Hasonló mintázatot kaptunk a *bec-1* és *atg-18* gének esetében is, amely felveti az autofágiát szabályozó gének koordinált transzkripciós szabályozását. Kimutattuk, hogy az LGG-1 a lárvális „seam” sejtekben a Golgi struktúrákkal is kollokálódik.

A genetikai vizsgálatokhoz izoláltunk két *bec-1* mutációt, beszereztünk két *unc-51/Atg1* mutáns törzset, valamint az *lgg-1*, *atg-7* és *lgg-3/Atg12* génekre specifikus RNS interferencia (RNSi) konstrukciókat állítottunk elő. Ugyancsak létrehoztuk a *Drosophila* „blue cheese” és „snf4” gének nematoda ortológjainak RNSi konstrukcióit. A genetikai vizsgálatok az alábbi eredményekkel szolgáltak.

1. Kimutattuk, hogy az autofág gének hozzájárulnak a különböző ion-csatorna alegységeket kódoló gének funkcionyeréses mutációi által okozott idegsejt pusztuláshoz; az autofág gének inaktiválása gátolta a *mec-1*, *mec-4* és *deg-1* funkcionyeréses mutánsokban az érintés-érzékelő neuronok pusztulását. Ezzel összhangban, csökkent TOR jelátvitel vagy éhezési stressz serkentette ezen neuronok pusztulását. Az autofág gének csökkent aktivitása ugyancsak szuppresszálta a 6-OHDA neurotoxin-indukált dopaminerg neuronok nekrozisát. Eredményeink rámutatnak az autofág gének excitotoxikus hatásokra bekövetkező neurodegenerációt közvetítő hatására.

2. *bec-1* és *unc-51* mutáns nematoda törzsek vizsgálatával kimutattuk, hogy ezek az autofág gének szükségesek a normális testméret kialakításához. A *bec-1* és *unc-51* mutánsok kisebbek voltak a vad típusnál. Mivel a *bec-1* és *unc-51* mutációk nem befolyásolták a sejtszámot (a *C. elegans* sejtvonala invariáns, mennyiségileg jól jellemezhető), hatásuk kisebb sejtméretben nyilvánult meg. Ezt igazolták a sejtmarkereken alapuló vizsgálatok is. A sejtek méretét alapvetően az insulin/IGF-1 és TGF- β jelátviteli útvonalak szabályozzák. Kimutattuk, hogy az insulin/IGF-1 és TGF- β mutáns állatok hosszú testméretét az autofág mutációk szuppresszálták. Az autofág génkaskád tehát „downstream” hat e két jelátviteli rendszertől a sejtméret szabályozásában.

4.2.5 „Trans-species” analízis

Az autofág gének funkcióját vizsgálva azt találtuk, hogy az autofág gének mutációja, vagy csendesítése (*BEC-1*, *UNC-51/Atg1*, *LGG-1/Atg8*, *Atg9*, *Atg18*) *C. elegans*-ban és *Drosophilában* is jeletősen csökkenti az állatok élethosszát. Az ilyen mutánsok sejtjeiben a lipofuszcín mennyisége sokkal gyorsabban növekszik, mint a vad típusban, valamint hamarabb mutatják a „sarcopenia” jelenségét. Episztázis vizsgálatokkal igazoltuk, hogy az autofágia gének lecsökkent aktivitása az insulin/IGF-1-TOR jelátviteli útvonalon keresztül befolyásolja az élettartamot. Az éheztetésnek és a mitokondriumok csökkentett működésének hasonló hatása van. Úgy gondoljuk, hogy az

autofágia normális esetben fenn tudja tartani a sejtek energiaszintjét, legalább annyira, hogy az ne eshessen egy kritikus szint alá. Ráadásul, az autofágia eliminálni tudja a sejtekből a sérült makromolekulákat és organelleket. E munkánk fő üzenete az, hogy az autofágia centrális szerepet tölthet be az élethossz meghatározásában, és az életkor meghatározása sokkal specifikusabban szabályozott, mint ahogy azt korábban gondolták (Tóth és mtsa-i 2008).

4.2.5 Az eredményeink érvényességének kiterjesztése emlős-humán rendszerekre

Ezt a munkát már 2008-ban végeztük. A munkáink és a költségünk úgy alakult, hogy 2007 végén még jelentős összeg maradt további kísérletes munkákra. Ezért engedélyt kértem és kaptam arra, hogy a pályázatot 2008 végén zárjuk le.

A kérelemben három célkitűzést jelöltem meg:

1. a neuronpusztulás patkány modelljében egyes autofág gének expressziójának a vizsgálata

Beállítottunk (neurológus Kollégáink segítségével) egy ismert neuronvesztéses patkány modellt. Ez azon alapszik, hogy a négycsatornás elzárás (az aa.vertebralis elektrokoagulációja, majd az ezt követő aa. carotis elszorítás) által okozott hypoxia jelentős neuronvesztéshez vezet a kísérleti patkányok agyában. Ismert az is, hogy a prekondicionálás, vagyis az aa. carotis rövid idejű elszorítása megakadályozza a később alkalmazott hosszú idejű hypoxia által okozott sejtpusztulást. E rendszerben vizsgáltuk immuncitokémiai módszerekkel a Bec-1, az Atg5 és Atg8 autofágia gének kifejeződését a kezelt patkányok agyszövetében. Vizsgáltuk azt, hogy a kontrol állatok idegsejtjeiben kimutathatók-e ezen gének termékei, mennyiségük a hypoxia, vagy inkább a prekondicionálás után emelkedik-e és azt is, hogy az egyes funkcionálisan elkülöníthető agyterületekben az autofágia géneket kifejező sejtek megoszlása milyen a különböző kísérleti csoportokban? Megállapítottuk, hogy ha alacsony szinten is, de kimutathatók a kezeletlen állatok egyes idegsejtjeiben az autofágia gének. Ezek kifejezetten struktúrához kötötten, apró granulomok formájában jelennek meg a neuronok sejtmag körüli zónájában. Hypoxia után emelkedik az autofág géneket kifejező neuronok száma. Ez elsősorban a neocortex szenzoros részeiben és a hipocampális kéregben figyelhető meg. Prekondicionálás után az autofágia géneket kifejező idegsejtek száma lényegesen magasabb, amiből arra lehet következtetni, hogy a neuronvesztés során az autofágiának inkább a neuronprotekciónak van szerepe, mint a neuronpusztulásban. E vizsgálatainkból publikáció még nem született, de egy V. éves hallgatóm két diákköri konferencián nyert második díjat az e témakörben tartott előadásával.

2. Az lqf-re vonatkozó eredmények kiegészítése és leírása

2008-ban kiegészítettük és publikálható formába rendeztük a fentebb már említett, a Drosophila lqf génre vonatkozó eredményeinket. A kéziratot elküldtük, amit kisebb módosítások és néhány kiegészítő kísérlet elvégzése után javasoltak elfogadásra. Ezeket a

hiányosságokat, a bírálók javaslatai alapján, pótoltuk és visszaküldtük a szerkesztőségbe. A kéziratot közlésre elfogadták, de még nem jelent meg (György Csikós, Mónika Lippai, Tamás Lukácsovich, Gábor Juhász, László Henn, Miklós Erdélyi, Péter Maróy and Miklós Sass (2008) A novel role for the Drosophila epsin (lqf): involvement in autophagy. Autophagy, accepted).

3. Az autofágia szerepének vizsgálata a nyálmirigy sejteinek lebontásában, a vérsejtek szerepe a lárvális sejtek maradványainak eltüntetésében

A kísérleti terv alapja Beth Levine (Qu és mtsai Cell 2007) azon megfigyelése volt, miszerint a szövettényezetben tartott emlős sejtekben az autofág gének (elsősorban a Bec-1) kifejeződése az „eat me szignál” (phosphatidylserine, PS) sejtmembránon való expozícióját serkenti, így a Bec-1-et kifejező sejtekhez vonzza a professzionális fagocita sejteket. A Drosophila nyálmirigy esetében a metamorfotikus változások egyike az erőteljes autofág reakció, amelyet a vérsejtek infiltrációja követ. Végeredményben az elpusztuló nyálmirigy sejtek maradványait az odavándorló vérsejtek veszik fel és emésztik el. Előzetes megfigyeléseink ráadásul azt igazolták, hogy az „eat me szignál” expozíciója a nyálmirigy sejtek membránján itt is kimutatható a vérsejtek beszűrődése előtt. Sajnos várakozásaink nem bizonyultak helyesnek. Mindezen jelenségek megfigyelhetők a nyálmirigy metamorfotikus változássora alatt, de kapcsolat az autofágia és a vérsejtek nyálmirigyre tapadása, odavándorlása között nem volt bizonyítható. Egyelőre ez irányú munkánkat felfüggesztettük.

2008 során, a fentiekén kívül, amerikai kollégáinkkal kooperációban, befejeztünk egy korábban elkezdett kísérletsort. Ebben azzal foglalkoztunk, hogy a Vps34 (a Drosophila Class III, phosphatidylinositol(3)phosphate molekulát kódoló génje) esszenciális szerepet tölt be az autofágia szempontjából. Előállítottuk a gén mutánsát és igazoltuk, hogy a mutáció következtében a sejtekben nem alakulnak ki autofág vakuolumok, sőt az endocitózis is nagyrészt gátlódik. Az eredményeink arra utalnak, hogy ez annak a következménye, hogy az Atg1 autofágia gén hatására a Vps34 a primer endoszómákból az autofagoszómák membránjába transzlokálódik. Ez a hatás független a TOR kináztól, amiről korábban azt gondoltuk, hogy a Vps34 jelátviteli útvonalának egyik „downstream” tagja (Juhász és mtsai 2008).

Úgy gondolom, hogy a pályázatban felvázolt eredeti célokat elértük. A legtöbb eltervezett kísérletsorozat meghozta a várt eredményeket. Ezek nagy részét sikerült leírni, általában jó, néhány esetben pedig jelentős nemzetközi folyóiratokban közzétenni.

Nem változott az az eredeti elképzelésünk, miszerint az autofág gének nagyon fontos biológiai működéseket irányítanak és termékeik (a nem távoli jövőben) a gyógyszertervezés jelöltjei lehetnek.