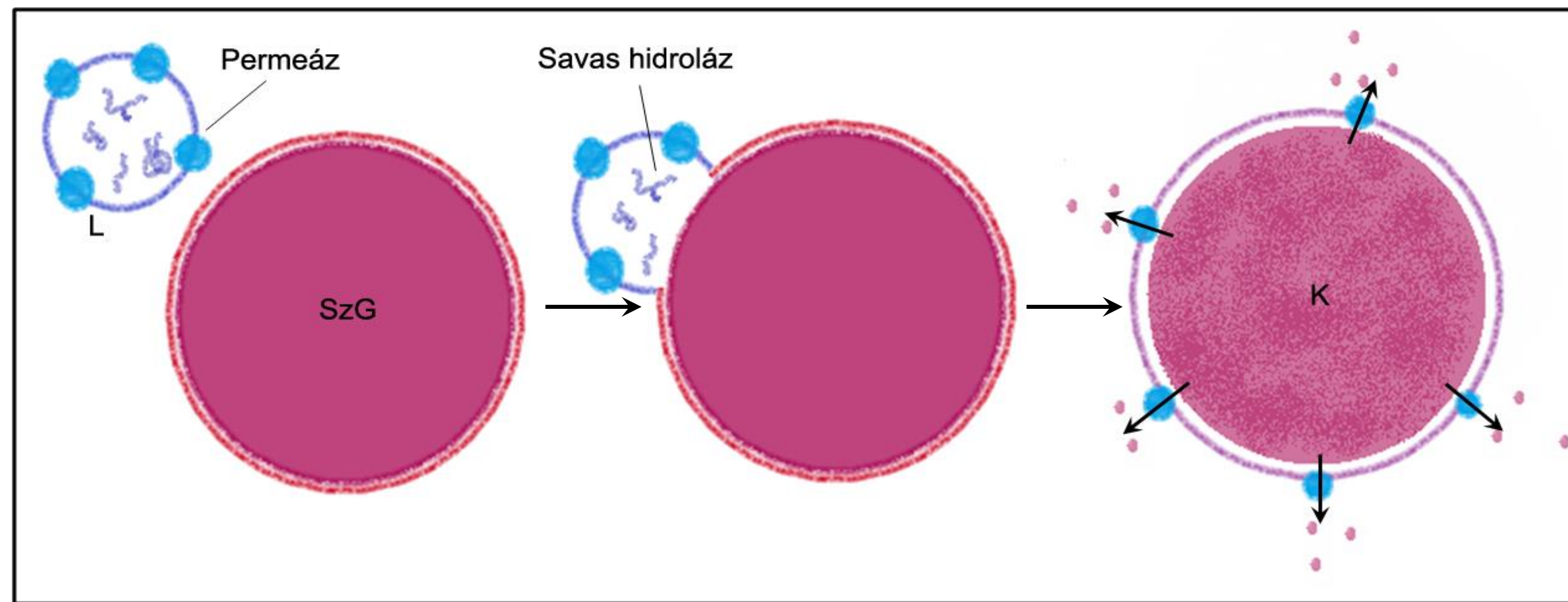




Bevezetés

Krinofágia során a szekréciós sejtek előregedett és feleslegessé vált szekréciós granulumjaik lebontását végzik lizoszómákkal történő fúzió révén [1]. A folyamatban részt vevő faktorok többek között a Rab2 és Rab7 kis GTPázok, a HOPS pályvázó komplex, továbbá a Syx13, Vamp7 és SNAP29 SNARE fehérjék [2]. Ezek a SNARE fehérjék – a Syx13 kivételével – részt vesznek a makroautofág SNARE komplex kialakításában is. Egyre több bizonyíték áll rendelkezésre az Ykt6 SNARE fehérje autofagoszómalizozóma fúzióban betöltött szerepéről, és csoportunk javasolt egy modellt, amelyben az Ykt6 tagja egy fúzió előtti SNARE komplexnek, de a végső komplexből kiszorul [3]. A Vamp7-hez hasonlóan az Ykt6 egy longin doménnel rendelkező R-SNARE, transzmembrán doménnel azonban nem rendelkezik. Ellenben a C terminálisán található CCAIM motívum lehetővé teszi a fehérje reverzibilis palmitoilációját, ezzel segítve a membránok-hoz való kötődést[4]. Jelen projektben megvizsgáljuk, hogy az Ykt6 részt vesz-e, és ha igen milyen szerepet tölt be a krinofág folyamatban *Drosophila melanogaster* modell alkalmazva.



1. ábra A krinofágia sematikus ábrázolása. A savas hidrolázokat tartalmazó lizozóma (L) és szekréciós granulum (SzG) fúziójával létrejön a krinoszóma (K), amelynek beltartalma megemésztődik és permeázokon keresztül a citoszolba kerül.

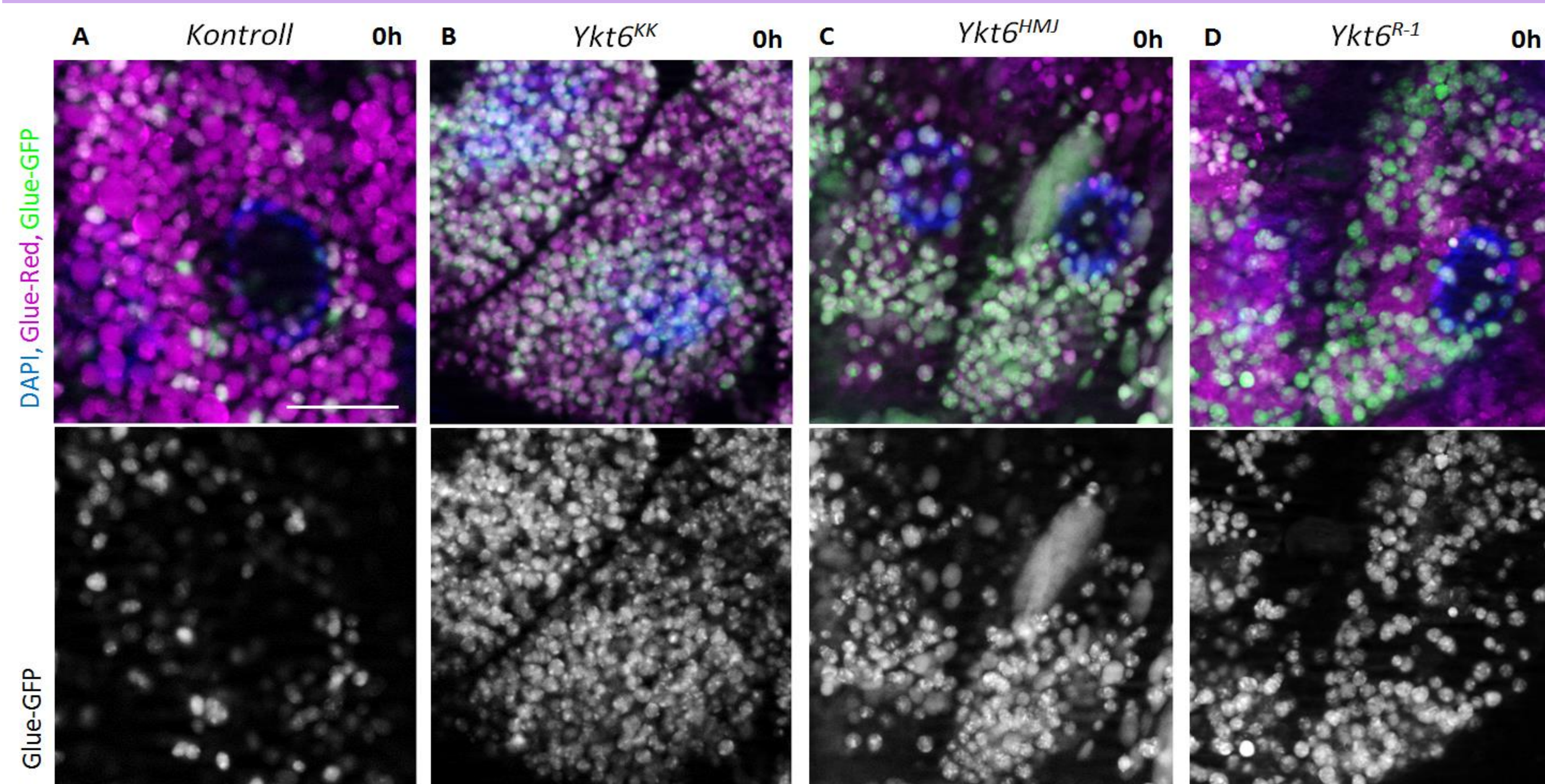
Módszerek

Transzgenikus *ecetmuslica* törzsek lárvális nyálmirigyeinek sejtjeit vizsgáltuk fluoreszcens mikroszkópiával. A Glue-flux rendszerben az Sgs3 (Glue) fehérjére GFP vagy DsRed címkét helyeztünk. Alacsony pH-n a GFP jel kiltódik, így a szekréciós granulum lizozómával történő egyesülését követően kialakuló savas közegben egyedül a DsRed fluoreszcenciája lesz detektálható. Ezzel a módszerrel nyomon követhető a krinoszóma savasodásának hibája, amely során a GFP jel nem oltódik ki.

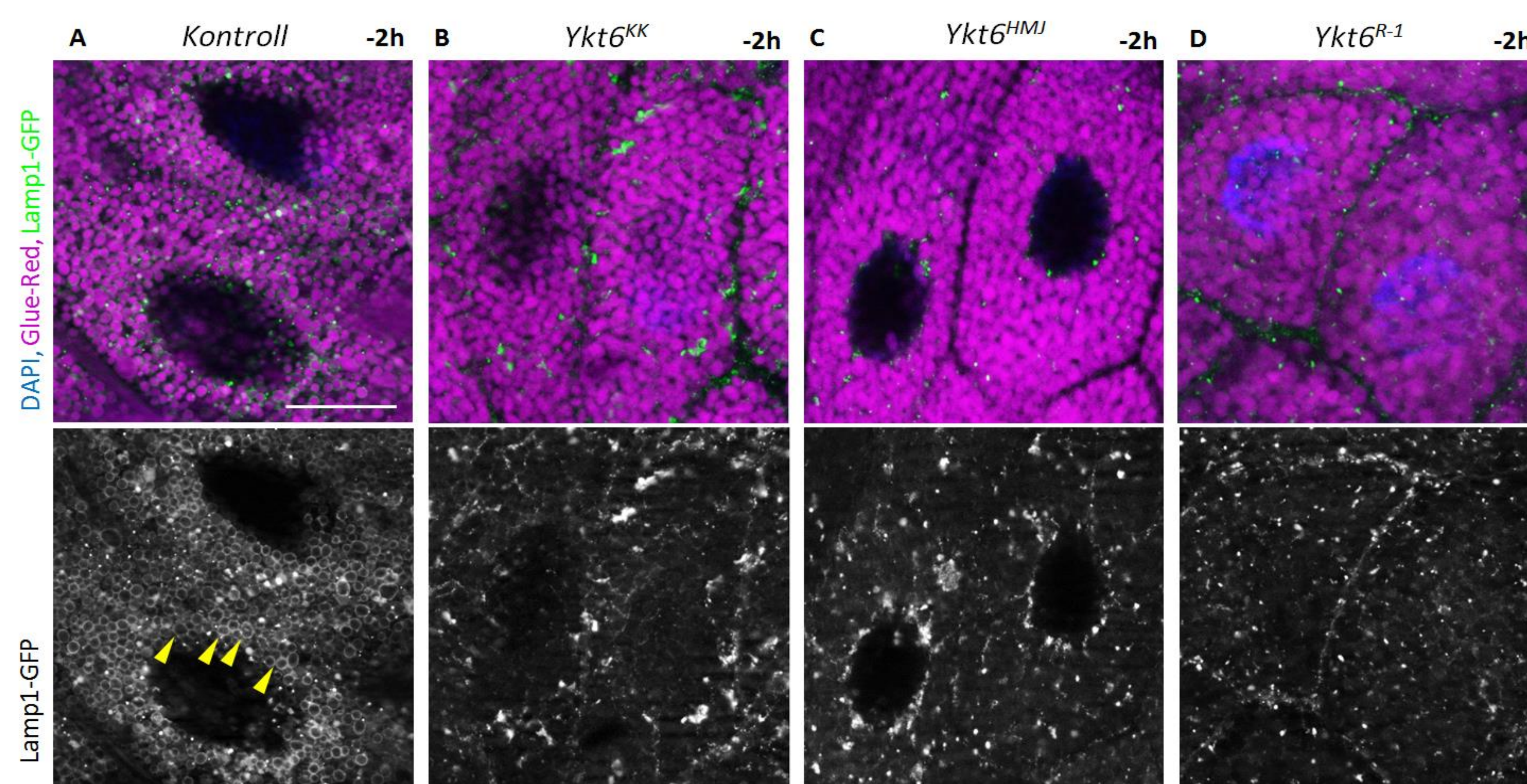


A Lamp-Ring rendszerben az Sgs3-on DsRed, a lizoszomális Lamp1 fehérjén GFP címke található. Utóbbi a lizoszomális struktúrák membránjában helyezkedik el, és – szekréciós granulum-lizozóma fúziót követően – mikroszkópos képen gyűrű alakú jelet mutat. A rendszer fúziós hiba detektálását teszi lehetővé.

Ykt6 csendesítés fúziós hibát okoz krinofágia során

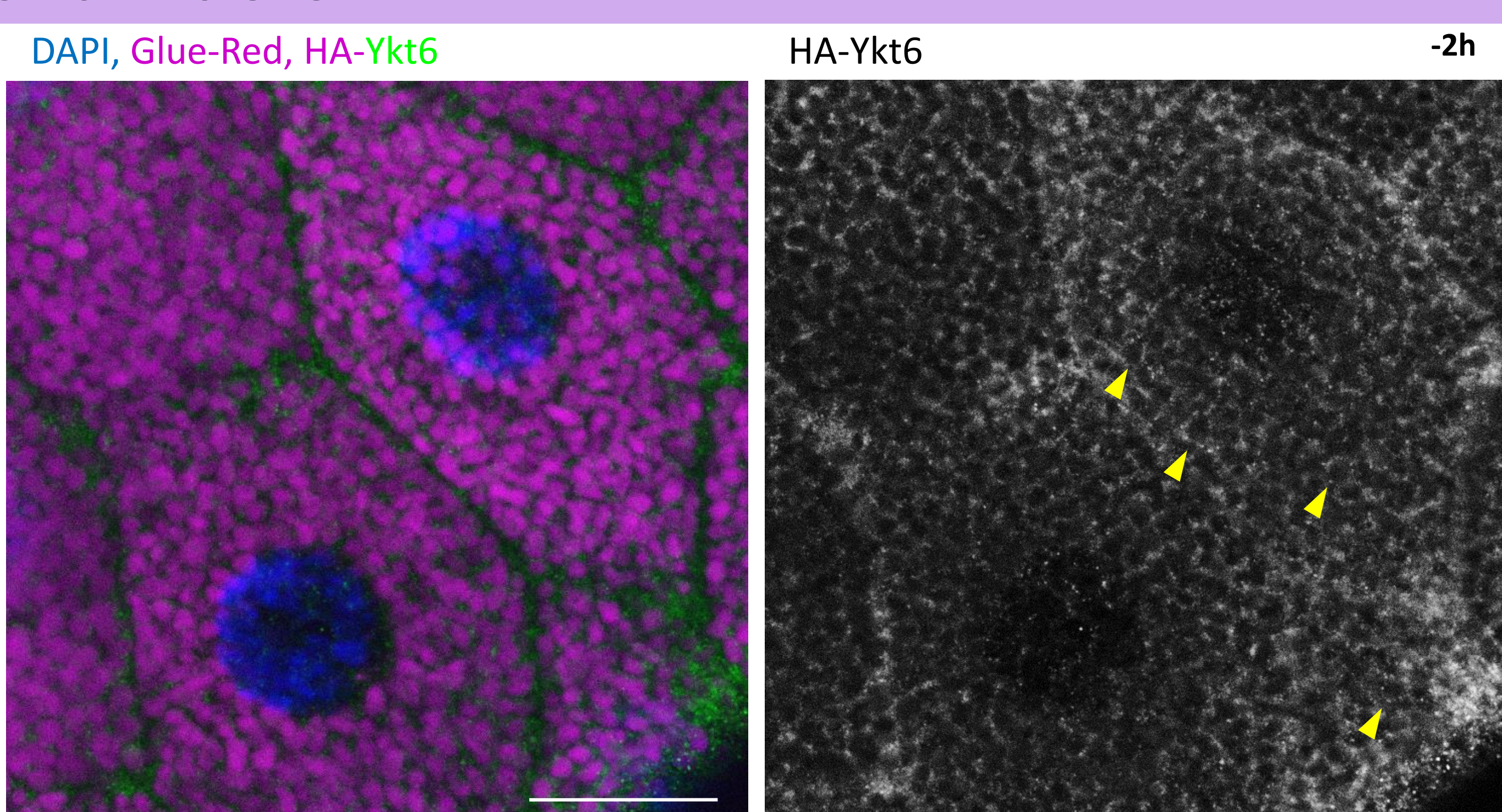


2. ábra *Ecetmuslica* lárvákban közvetlenül bebábozódás előtt glue-flux rendszert alkalmazva az Ykt6 RNSi csendesítése 3 független transzgenikus génkonstrukcióval is savasodási hibát mutatnak (B-D) a kontroll állatokhoz képest (A).



3. ábra Két órával bebábozódás előtti *ecetmuslica* lárvákban Lamp-Ring rendszert alkalmazva a Lamp1-GFP a krinoszóma membránján helyezkedik el (A, sárga nyilak). Ezzel szemben Ykt6 RNSi lárvákban hiányzik a Lamp1 gyűrűszerű lokalizációja (B-D), ami fúziós hibára enged következtetni.

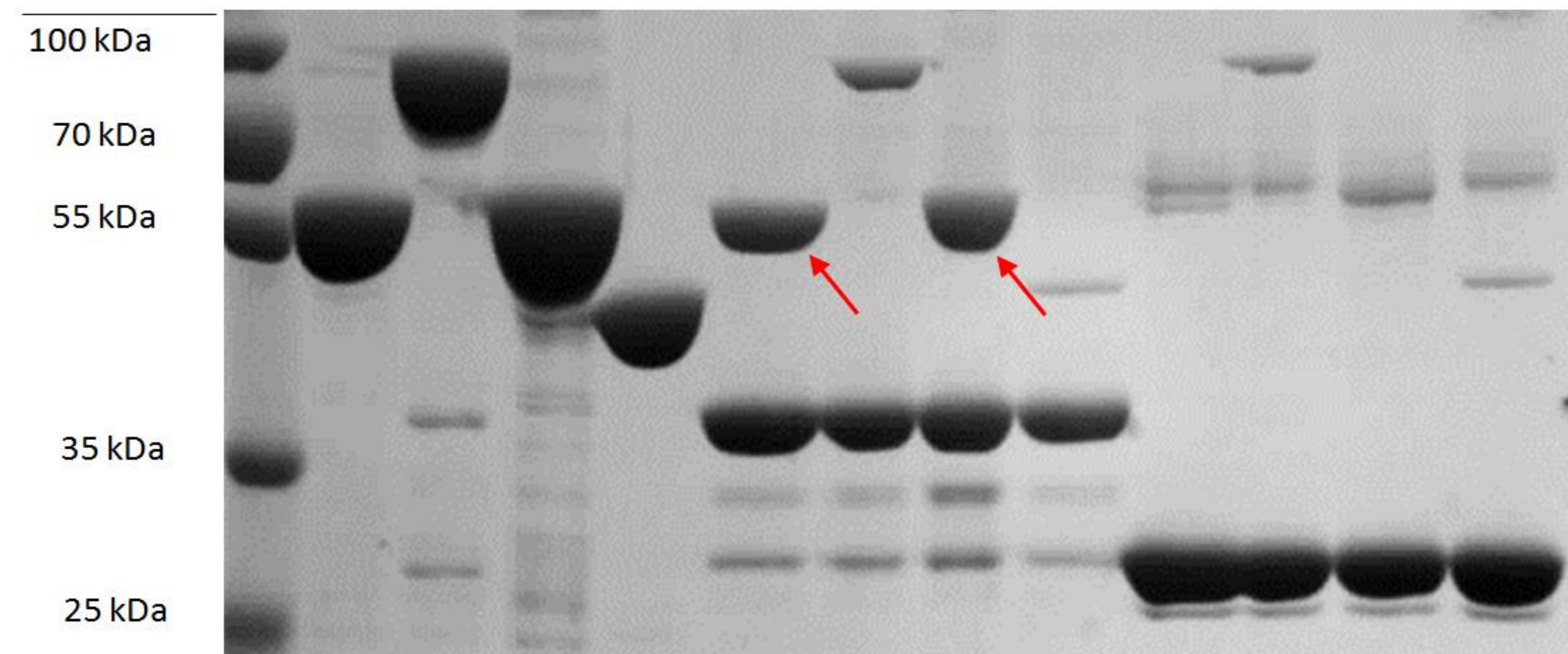
Ykt6 lokalizáció



4. ábra Ykt6 lokalizáció két órával bebábozódás előtti lárvákban. A sárga nyilak a granulumok körüli Ykt6 felhalmozódást jelölik.

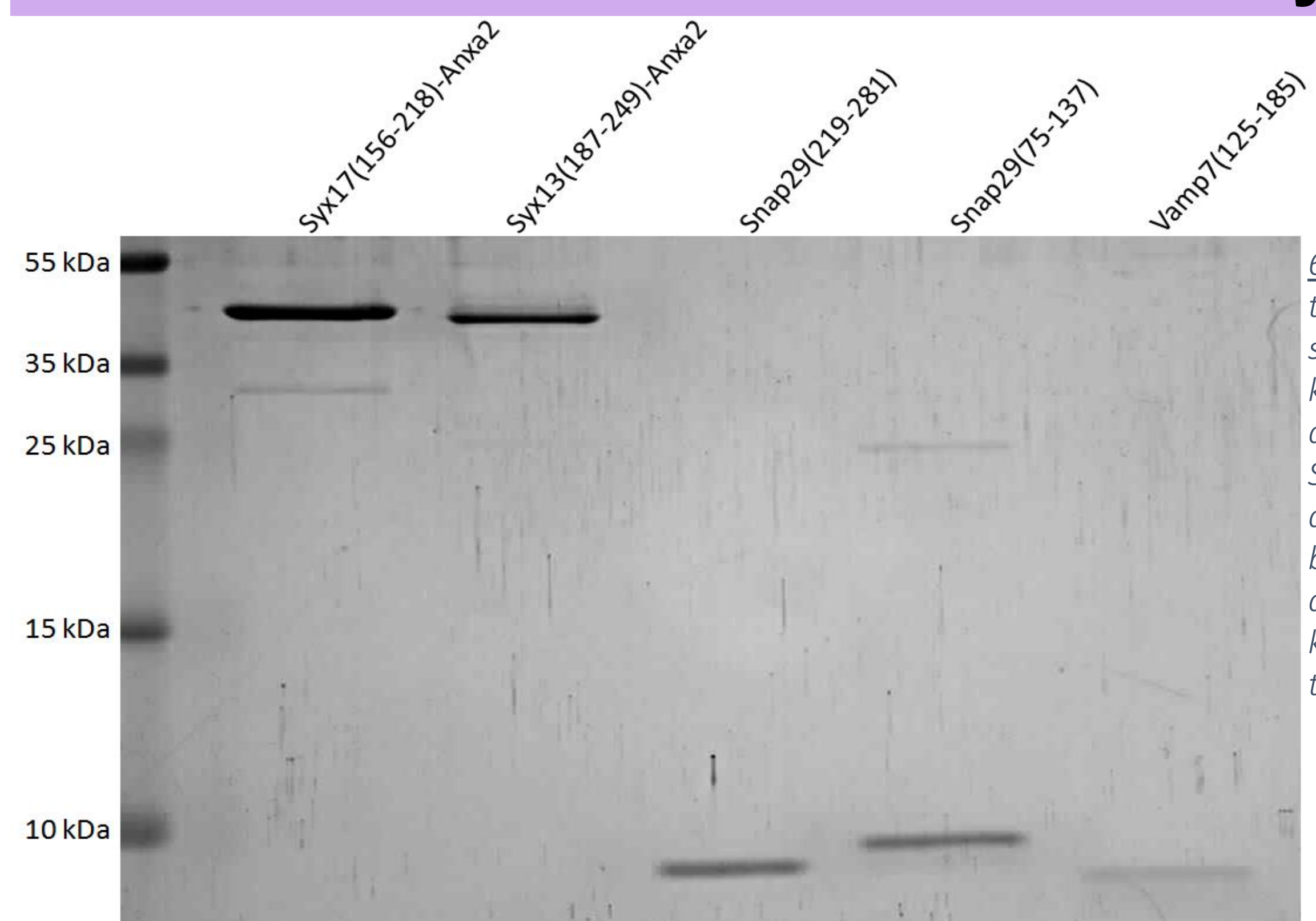
Syx13 erősen köt a Vamp7-hez és Ykt6-hoz

	Töltet				GST-Syx13 Pull-down				GST Pull-down			
GST-Syx13	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
MBP-VAMP7	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
MBP-SNAP29	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
MBP-Ykt6	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
MBP kontroll	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
GST	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+



5. ábra A Syx13 erős kötődést mutat mind a Vamp7-hez, mind az Ykt6-hoz. A vörös nyilak az MBP-Vamp7-et és az MBP-Ykt6-t jelölik.

SNARE domének termelése kristályosításhoz



6. ábra Szeretnénk az Ykt6 tartalmú SNARE komplex szerkezetét feltárni röntgenkristallográfiás módszerrel, amihez megfelelő tisztaságú SNARE domének előállításán dolgozunk. *Escherichia coli* baktériumban termelt fehérjéket affinitás és ioncsere kromatográfiás módszerekkel tisztítottuk.

Következtetések

Jelen munka alapján feltételezhető, hogy az Ykt6 a szekréciós granulumok és a lizoszómák fúziójának szintjén tölt be szerepet a krinofág folyamat során, ugyanis hiánya savasodási és fúziós hibát eredményez a glue-flux és lamp-ring rendszerekkel végzett eredmények szerint. A SNARE fehérje a lizoszómák membránjába lokalizálódva szállítható a fúzió helyére, ahol a Syx13-al való kölcsönhatása révén vehet részt a fúziós folyamatban. Célunk a projektben Ykt6 tartalmú SNARE komplex szerkezetének feltárása röntgenkristallográfiás módszerrel.

Támogatás:



Hivatkozási jegyzék

1. Weckman et al. Autophagy in endocrine glands. *J Mol Endocrinol.* 2014;52:R151-63
2. Csizmadia et al. Molecular mechanisms of developmentally programmed crinophagy in *Drosophila*. *J Cell Biol.* 2018;217:361-74
3. Takats et al. Non-canonical role of the SNARE protein Ykt6 in autophagosome-lysosome fusion. *PLoS Genet.* 2018;14:e1007359
4. Kiegenburg et al. The multi-functional SNARE protein Ykt6 in autophagosomal fusion processes. *Cell Cycle.* 2019;18:639-651