

Nodweddu effaith signalu  
ghrelin-GHS-R ar  
awtoffagi niwronaidd

Luke David Roberts


Cyflwynwyd i gyflawni'r gofynion ar gyfer Gradd Doethur  
mewn Athroniaeth

2022

## **Datganiad a gosodiadau**

### Datganiad

Nid yw sylwedd y gwaith hwn wedi'i dderbyn yn flaenorol ar gyfer unrhyw radd ac nid yw'n cael ei gyflwyno ar yr un pryd mewn ymgeisyddiaeth am unrhyw radd.

Wedi'i arwyddo: 

Dyddiad: 27/09/2021

### Gosodiad 1

Mae'r traethawd ymchwil hwn yn ganlyniad fy ymchwiliadau fy hun, ac eithrio lle nodir yn wahanol. Lle defnyddiwyd gwasanaethau cywiro, mae maint a natur y cywiriad wedi'u nodi'n glir mewn troednodyn(au).

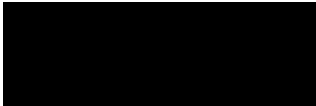
Mae ffynonellau eraill yn cael eu cydnabod gan droednodiadau sy'n rhoi cyfeiriadau amlwg. Atodir llyfryddiaeth.

Wedi'i arwyddo: 

Dyddiad: 27/09/2021

### Gosodiad 2

Rhoddaf ganiatâd drwy hyn i'm traethawd ymchwil, os caiff ei dderbyn, fod ar gael i'w lungopïo ac i'w fenthyg rhwng llyfrgelloedd, ac i'r teitl a'r crynodeb fod ar gael i sefydliadau allanol.

Wedi'i arwyddo: 

Dyddiad: 27/09/2021

## Cydnabyddiadau

Heb os nac oni bai, mae'r blynyddoedd a dreuliais yn gwneud y ddoethuriaeth hon wedi bod yn rhai anoddaf a mwyaf heriol fy mywyd (yn anffodus mae hyn yn ymddangos fel thema gyffredin ymhlith ymgeiswyr PhD!). Yn sicr, caiff heriau digynsail pandemig Covid 19 effaith amlwg ac arwyddocaol yn ystod cyfnod olaf y ddoethuriaeth. Ond ges i drafferth gydag iechyd meddwl, diffyg hunan-barch, a phwysau o ganlyniad i hunan-disgwyliadau afrealistig, trwy gydol fy ymgeisyddiaeth. Ac roedd y materion hyn yn fwyaf amlwg yn ystod blwyddyn 1af y PhD, pan oeddwn i'n mynd trwy chwalfa perthynas wenwynig iawn. Roedd fy iechyd meddwl yn eithriadol o wael, roeddwn i'n teimlo'n ansicr iawn am fy mhwrpas a'm cyfeiriad mewn bywyd, ac roedd methiannau arbrol dro ar ôl tro a diffyg data wedi gwneud i mi gwestiynu fy addasrwydd fel ymgeisydd PhD. Yn sicr, doeddwn i ddim yn rhagweld y byddwn i'n gallu cwblhau'r radd hon ar y pryd. Ond o ganlyniad i gefnogaeth anhygoel fy nheulu, ffrindiau, a goruchwylwyr a mentoriaid academiaidd, roeddwn i'n gallu gweld y daith hon drwodd i'w chwblhad, gan wneud hi allan yr ochr arall fel person cryfach.

Yn gyntaf, hoffwn ddiolch fy ngoruchwylwyr anhygoel Dr Jeff Davies a Dr Alwena Morgan. Mewn labordy gwahanol, gyda goruchwylwyr llai gofalgaf, empathetig a chefnogol, rwy'n credu y byddai fy PhD wedi dod i ben ar ôl blwyddyn. Ond wnaethon nhw gefnogi fi drwy bob cam o'r ddoethuriaeth, gan gynnwys yr amseroedd mwyaf heriol, ac maen nhw wedi bod yn amhrisiadwy i fy natblygiad academiaidd a phersonol dros y blynyddoedd diwethaf. Rwy mor ddiolchgar am eu cefnogaeth barhaus, ac mae'n bleser gennyf allu parhau i weithio â nhw fel aelod o'r staff addysgu ar ôl y ddoethuriaeth.

Rwyf hefyd am dynnu sylw at gyfraniad Dr Lauren Blake, a wnaeth sefyll mewn ar gyfer Alwena pan roedd hi ar gyfnod mamolaeth yn ystod ail flwyddyn y PhD. Wnaeth Lauren helpu fi lawer iawn yn y labordy ar adeg pan oeddwn i wedi colli pob hyder yn fy ngallu i gynnal arbrolfion yn gymwys. Heb ei chefnogaeth ar yr adeg hon, rwy'n ansicr a fyddwn wedi gallu parhau fel gwyddonydd ymchwil. Ni allaf ddweud mewn geiriau pa mor ddiolchgar ydw i am hynny.

Rwyf hefyd wedi derbyn cymorth academiaidd oddi wrth nifer o bobl dros y blynyddoedd. Rwy am ddiolch Dr Roberto Angelini, Dr Nick Jones, Dr James Cronin, Dr Owain Howell, Dr Tom Wilkinson, a Dr Geertje van Keulen, am eu cyngor dros y blynyddoedd. Rwyf hefyd am ddiolch Yr Athro Cathy Thornton a'r Athro Venkat Kanamarlapudi am ganiatáu i mi ddefnyddio eu hoffer blotio gorllewinol a gweithfannau. Hefyd diolch i Sally James am ei chefnogaeth gyda gwaith microsgopeg y traethawd ymchwil hwn, a diolch i Dr Dan Rees am ei gefnogaeth gyda'r dadansoddiadau CellProfiler. Diolch hefyd i'n cydweithwyr Dr Tim Wells a Dr Amanda Hornsby ym mhrifysgol Caerdydd am eu gwaith a chefnogaeth gyda'r arbrolfion anifeiliaid.

Wrth gwrs, rydw i hefyd wedi cael fy nghefnogi gan y cydweithwyr a ffrindiau rydw i wedi'u gwneud ar yr ail a trydydd llawr yn ILS1 yn ystod fy amser yma. Ac mae'n rhaid i mi sôn am fy nghyd-aelodau o fyddin JSD a gwblhaodd eu doethuriaethau'r un pryd â mi; Dr Luke Buntwal, Dr Martina Sassi, Dr Carla Carisi a Dr Gang Han. Llongyfarchiadau i chi gyd!

### ***I fy nheulu***

Ti sydd wedi cefnogi fi fwyaf ar draws fy mywyd, a phe bawn i'n manylu maint cyflawn eich cefnogaeth a chyfraniadau yn ystod y blynyddoedd diwethaf byddai'r adran hon siŵr o fod yr un maint ar traethawd ymcwih ei hunain! Rwy'n gobeithio bydd y geiriau ar y tudalen hwn yn cyfleu pa mor ddiolchgar y rhydwyl am bopeth.

I mam-gu. Diolch o'r galon am yr holl gefnogaeth yn ystod fy nhaith academaidd hir. Heb y cymorth moesol ac ariannol cefais wrthot ti a dad-cu yn ystod fy ngraddau israddedig a meistr, mae'n annhebygol y byddwn erioed wedi cyrraedd y PhD yn y lle cyntaf!

I nain. Er hoffai i ti dderbyn fy mod i wedi tyfu lan, rwy mor ddiolchgar dy fod di dal yn rhoi'r un lefel o gysur, cefnogaeth a chariad i mi a beth wnest ti pan roeddwn un plentyn bach. Roedd wir angen dy gefnogaeth arna i yn ystod y blynyddoedd diwethaf!

I dad. Yn ogystal â'r cymorth ariannol, rwy'ti wedi bod yna i ddarparu cyngor hollbwysig pryd bynnag rwy ei angen. Mae ein sgysiau hir dros y blynyddoedd wedi helpu fi i ffeindio persbectifau newydd ar fywyd yn ystod rhai o'r cyfnodau mwyaf anodd.

I James. Dim jest fy mrawd wyt ti, ond un o fy ffrindiau agosaf hefyd. Wnest ti gefnogi a rhoi cymorth hanfodol i mi yn ystod cyfnodau anodd ac rwy wir yn gwerthfawrogi'r amser rydym wedi rhannu gyda'n gilydd dros y blynyddoedd diwethaf, o wyllo'r teledu a chwarae gemau yn y tŷ i nosweithiau allan ar y dre.

I mam. Rwy'ti wedi byw gyda fi ar fy mwyaf bregus a sâl, a wnest ti oddef straen aruthrol o achos hyn. Ond roeddet ti yna bob tro i godi fi lan ar ôl i mi gwympto lawr, ac i helpu fi trysio fy hunain ar ôl i mi dorri. Byddai wir ar goll hebot ti! Mae rhaid i mi hefyd dy ddiolch am y penderfyniad i roi fi a James mewn i addysg Gymraeg. Llwyddais i gyflawni'r ddoethuriaeth hyn o ganlyniad i fy ngallu i ddeall, siarad ac ysgrifennu'r iaith Gymraeg!

### ***Er cof fy nhad-cu***

Cyflwynir y traethawd ymchwil hon er cof fy nhad-cu, Norman Roberts, a bu farw yn anffodus ar Noswyl Nadolig 2020. Gawr o ddyn o ran ei gymeriad a'i bersonoliaeth, mae yna twll enfawr yn ein bywydau hebdo fe. Er nad oedd cefndir gwyddonol ganddo, roedd e bob amser yn awyddus i drafod fy nghynnydd academaidd a chawsom nifer o sgysiau ystyrllon am fy ngwaith dros y blynyddoedd. Mae'n drist iawn na allai roi copi corfforol o'r traethawd ymchwil hon iddo yn bersonol. Yn lle hynny, gadawaf yr ymroddiad hwn fel y gall darllenwyr werthfawrogi cymaint yr oedd yn ei olygu i mi.

## Termau Cymraeg

Mae'r termau gwyddonol Cymraeg a defnyddir yn y traethawd hir hon naill ai wedi'u safoni, ac eisoes wedi eu rhoi ar Porth Termau Cenedlaethol Cymru (<http://termau.cymru/>), neu yn cael eu safoni gan terminolegydd y Coleg Cymraeg Cenedlaethol.

Lle mae'n briodol, defnyddir byrfoddau cyffredin Saesneg ar gyfer y termau, ar ôl eu hysgrifennu unwaith yn y Gymraeg.

## Byrfoddau

Term	Byrfodd
Avidin-biotin complex	ABC
Acetyl CoA carboxylase	ACC
Alzheimer's disease	AD
Alternate day feeding	ADF
Adenosine diphosphate	ADP
Acyl ghrelin	AG
Agouti related peptide	AgRP
Adult hippocampal neurogenesis	AHN
ATG8-family interacting motif (AIM)	AIM
Protein kinase B	Akt
Ad libitum	AL
Aldehyde dehydrogenase 1A1	ALDH1A1
Adenosine monophosphate	AMP
A-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor	AMPAR
AMP activated- protein Kinase	AMPK
Analysis of Variance	ANOVA
Apolipoprotein E4	APOE4
Amyloid precursor protein	APP
Ammonium persulphate	APS
Acyl protein thioesterase 1	APT1
Arcuate nucleus of the hypothalamus	ARC
Autophagy related (i.e ATG gene or protein)	ATG
Adenosine triphosphate	ATP
Beta-amyloid	A $\beta$
Bafilomycin A1	Baf
Bcl-2-associated X protein	Bax
Blood-brain barrier	BBB
Bicinchoninic acid	BCA
Apoptosis regulator Bcl-2	Bcl-2
Brain derived neurotrophic factor	BDNF
BCL2 interacting protein 3	BNIP3
Bromodeoxyuridine	BrdU
Carnitine palmitoyltransferase	CPT1
<i>Cornu ammonis (1 &amp; 3)</i>	CA1 & CA3
Calcium-calmodulin dependent kinase kinase beta	CaMKK $\beta$
Cyclic AMP	cAMP
Cocaine-amphetamine regulated transcript	CART

Cystathionine beta synthase	CBS
Confidence intervals	CI <sub>s</sub>
Chaperone mediate autophagy	CMA
Chronic ocular hypertension	COH
Chloroquine	CQ
Calorie restriction	CR
Cyclic AMP response element (CRE) binding protein	CREB
Cryptochrome circadian regulator 1	Cry1
DAB (3'3' diaminobenzidine) immunohistochemistry	DAB-IHC
Diacylglycerol	DAG
Doublecortin	Dcx
Double distilled water	ddH <sub>2</sub> O
DEP domain-containing mTOR-interacting protein	DEPTOR
Dentate gyrus	DG
[D-lys 3]-GHRP-6	D-lys 3
Dulbecco's modified eagle medium	DMEM
Dimethyl sulphoxide	DMSO
Deoxyribonucleic acid	DNA
Dietary restriction	DR
Dopamine receptors D1 & D2	DRD (1 & 2)
Dithiothreitol	DTT
Enhanced chemiluminescence	ECL
Ethylenediaminetetraacetic acid	EDTA
Enzyme-linked immunosorbent assay	ELISA
Endoplasmic reticulum	ER
Extracellular signal regulated kinase	ERK
Electron transport chain	ETC
Ethanol	EtOH
Foetal bovine serum	FBS
Focal adhesion kinase (FAK) family kinase interacting protein of 200kda	FIP200
Gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor-associated protein	GABARAP
Guanine activating protein	GAP
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GAPDH
Granule cell layer	GCL
Guanosine diphosphate	GDP
Guanine exchange factor	GEF
Green fluorescent protein	GFP
Growth hormone	GH
Growth hormone receptor	GHR
Growth hormone secretagogue receptor	GHS-R
Growth hormone secretagogues	GHS <sub>s</sub>
G protein-activated inward rectifier potassium channel 2	GIRK2
Glucose oxidase	GO
Ghrelin-o-acyltransferase	GOAT
G-protein coupled receptor	GPCR
Grazing	Gr
Guanosine triphosphate	GTP
Hanks balanced salt solution	HBSS

High fat diet	HFD
Horseradish peroxidase	HRP
Heat-shock cognate protein of 70kda	Hsc70
Intracerebroventricular	i.c.v
Intrahippocampal	i.h
Intraperitoneal	i.p
Immunocytochemistry	ICC
Intermittent fasting	IF
Immunofluorescence histochemistry	IFHC
Immunofluorescence microscopy	IFM
Immunoglobulin G	IgG
Immunohistochemistry	IHC
Inositol triphosphate	IP3
Immunoreactivity	IR
Isocaloric twice a day feeding	iTAD
Knockdown	KD
Knockout	KO
L692585	L692
Lysosomal associated membrane protein 1	LAMP1
Microtubule associated protein 1(MAP1) light chain 3	LC3
Leupeptin	Leu
Low fat diet	LFD
LC3 interacting region	LIR
Liver kinase b1	LKB1
Laser scanning confocal microscopy	LSCM
Long term potentiation	LTP
Matrix assisted laser desorption ionisation- time of flight-mass spectrometry	MALDI-TOF-MS
Mild cognitive impairment	MCI
Meal-fed	MF
Maximum intensity projection	MIP
Molecular layer	ML
Mammalian lethal with SEC13 protein 8	mLST8
1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine	MPTP
Messenger RNA	mRNA
Mechanistic target of rapamycin	mTOR
mTOR complex (1 & 2)	mTORC
Numerical aperture	NA
Non-alcoholic fatty liver disease	NAFLD
Nuclear domain 10 protein NDP52	NDP52
New England Journal of Medicine	NEJM
Neuronal nuclear protein	NeuN
Non-fat milk	NFM
Normal goat serum	NGS
Nickel-3'-3'-diaminobenzidine	Ni-DAB
BCL2 interacting protein 3 like	Nix/BNIP3L
N-methyl-D-aspartate receptor	NMDAR
Neuropeptide Y	NPY
NBR1 autophagy cargo receptor	NRB1

Nuclear receptor binding factor 2	NRBF2
Neural stem progenitor cells	NSPCs
Optical density	OD
Oxygen glucose deprivation	OGD
Penicillin-streptomycin	P/S
Phosphate buffered saline	PBS
PBS with Triton x100	PBS-T
Prohormone convertase 1/3	PC1/3
Parkinson's disease	PD
Paraformaldehyde	PFA
Phosphatidyl inositol 3 kinase class 3 complex 1	PI3KC3C1
Phosphatidylinositol 3 phosphate	PI3P
PRKCA-binding protein	PICK1
Protein kinase a	PKA
Phospholipase C-beta	PLC $\beta$
Pro-opiomelanocortin	POMC
Proline-rich AKT substrate of 40 kDa	PRAS40
Prospero homeobox protein 1	Prox1
Presenilin 1	PS1
Post synaptic density protein 95	PSD-95
Post-translational modification	PTM
Polyvinylidene difluoride	PVDF
Paraventricular hypothalamus	PVN
Ras-related protein Rab-7	Rab7
Ras-related GTP-binding protein	Rag
Rapamycin	Rap
Reactive oxygen species	ROS
Regulatory-associated protein of mTOR	Raptor
Resveratrol	Resv
Red fluorescent protein	RFP
Ras homolog enriched in brain	Rheb
Ribonucleic acid	RNA
Rotations per minute	RPM
Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis	SDS-PAGE
Sub granular zone	SGZ
Sh3 and multiple ankyrin repeat domains 3	SHANK3
Short-hairpin RNA	shRNA
Small interfering RNA	siRNA
Substantia nigra	SN
Signal peptidase	SP
Sequestosome 1	SQTM1/p62
Tax1 binding protein 1	TAX1BP1
Transcriptional blocking cassette	TBC
TBC1 domain family member 7	TBC1D7
Tris buffered saline	TBS
Transmission electron microscopy	TEM
Tetramethyl ethylenediamine	TEMED
Transcription factor E3	TFE3



Transcription factor EB	TFEB
Tyrosine hydroxylase	TH
Translocase of outer membrane 20	TOM20
Time restricted feeding	TRF
Tropomyosin receptor kinase B	TrkB
Tuberous sclerosis complex subunits 1 & 2	TSC (1 & 2)
Terminal deoxynucleotidyl transferase (tdt) dUTP Nick-End Labelling	TUNEL
Unacyl ghrelin	UAG
Unc-51-like autophagy activating kinase	ULK
Uncoupling protein 2	UCP2
Ubiquitin-proteasome system	UPS
Vacuolar H <sup>+</sup> -translocating ATPase	v-ATPase
Vehicle control	Veh
Ventromedial hypothalamus	VMH
Vacuolar protein sorting associated protein(s)	Vps
Western blot	WB
WD-repeat protein interacting with phosphoinositides	WIPI
Wild-type	WT

## Crynodeb

Mae echelin signalu ghrelin-GHS-R, ac awtoffagi, yn rheolyddwyr allweddol o metabolaeth systemig yn ystod prinder maeth, ac yn mynnu effeithiau niwrogenig a niwroamddiffynol. O'r herwydd, ystyrir y ddwy broses fel dargedau therapiwtig gwerthfawr ar gyfer ymestyn iechyd a brwydro yn erbyn dirywiad gwybyddol sy'n gysylltiedig ag oed. Fodd bynnag, nid yw'r cyswllt rhwng signalu ghrelin-GHS-R ac awtoffagi niwronaidd wedi ei diffinio'n clir.

Brif nod y traethawd hir hon felly, oedd i nodweddi effaith signalu ghrelin-GHS-R ar awtoffagi niwronal gan ehangu ar y gwybodaeth prin sydd ar gael yn y llenyddiaeth. Nodweddwyd felly, effaith peptidau asyl-ghrelin (AG), ghrelin sydd heb ei asyleiddio (UAG), yn ogystal â'r gweithydd GHS-R di-peptidyl L692585, ar fflwcs awtoffagig yn llinachau celloedd niwronaidd *in vitro*, tra asesir effaith abladiad gennynau echelin ghrelin ar awtoffagi yn ymennydd llygod *in vivo*. Aseswyd hefyd effaith patrymau bwydo amserol ar awtoffagi *in vivo*, gan gymharu effeithiau hepatic yn ogystal a rhai niwral.

Ni datgelir canfyddiadau *in vitro* unrhyw tystiolaeth bod echelin signalu-ghrelin GHS-R yn ysgogi awtoffagi yng nghelloedd SN4741 neu HT-22. Yn hytrach darperir dystiolaeth ystadegol fod triniaethau echelin ghrelin yn lleihau awtoffagi yn celloedd SN4741, tra welir arsylwadau tebyg gyda cyfyngiad maeth weddol ysgafn.

Dengys canfyddiadau *in vivo* bod yna lleihad arwyddocaol ym mynegiad Beclin-1, yn DG a CA1 hipocampau llygod sydd a blocâd systemig o trawsgrifiad GHS-R (GHS-R<sup>-/-</sup>). Ni gwelir effeithiau o'r fath gyda llygod ghrelin<sup>-/-</sup> neu llygod GOAT<sup>-/-</sup>.

Yn diddorol, datgelwyd nodweddiadau eilradd o awtoffagi hepatic un o canfyddiadau mwyaf addawol y traethawd ymcwheil; gyda phatrwm bwydo pori yn modiwlleiddio fflwcs awtoffagi hepatic, a cholled yr effaith hyn yn llygod GHS-R<sup>-/-</sup>.

Awgrymwyd canlyniadau *in vivo* felly bod colled GHS-R yn amharu gyda awtoffagi yn yr hipocampws ac yn effeithio ymateb awtoffagi yr afu i amodau bwydo penodol.

# Contents

<b>Pennod 1: Cyflwyniad.....</b>	<b>27</b>
<b>1.1. Heneiddio ac yr ymennydd .....</b>	<b>27</b>
<b>1.2. Nodweddion cellog a moleciwlaidd heneiddio'r ymennydd .....</b>	<b>32</b>
1.2.1. Camweithrediad mitocondria.....	34
1.2.2. Llwybrau clirio ac atgyweirio diffygiol .....	35
1.2.3. Niwrogenesis hipocampws oedolion.....	38
<b>1.3. Cyfyngu dietegol: Ymyrryd addawol ar gyfer gwella rhychwant iechyd ac atal clefydau sy'n cysylltiedig a heneiddio .....</b>	<b>40</b>
1.3.1. Cyfyngu caloriau, ymprydio ysbeidiol, ac amser bwydo cyfyngiedig .....	41
1.3.2. Dynwardwyr DR.....	44
<b>1.4. Ghrelin.....</b>	<b>48</b>
1.4.1. Synthesis, proresi a secretiad ghrelin .....	49
1.4.2. Signalu AG-GHS-R.....	52
1.4.3. A yw ghrelin yn hormon archwaeth?.....	54
1.4.4. A yw ghrelin yn hormon goroesiad? .....	57
1.4.5. Effeithiau niwrogenig a niwroamddiffynol ghrelin .....	59
<b>1.5. Awtoffagi.....</b>	<b>62</b>
1.5.1. Rheoleiddiad moleciwlaidd awtoffagi.....	64
1.5.2. Awtoffagi detholus.....	68
1.5.3. Awtoffagi niwronaidd .....	69
<b>1.6. Ghrelin ac awtoffagi niwral .....</b>	<b>72</b>
1.6.1. Gwerthusiad beirniadol .....	72
1.6.2. Crynodeb.....	76
<b>1.7. Nodau ac amcanion .....</b>	<b>77</b>
<b>Pennod 2: Dulliau a defnyddiau .....</b>	<b>78</b>
<b>2.1. Defnyddiau .....</b>	<b>78</b>

2.2. Modelau ac arbrofion <i>in vitro</i> .....	81
2.2.1. Meithrin Celloedd Arferol.....	81
2.2.2 Dull Cyfri Glas Trypan.....	83
2.2.3 Lysis celloedd ac echdyniad protein .....	84
2.2.4 Prawf asid bicinconinig (BCA).....	84
2.2.5 WB a SDS-PAGE.....	86
2.2.6. Microsgopeg fflworoleuedd .....	95
2.3 Modelau ac arbrofion <i>in vivo</i> .....	111
2.3.1 Arbrofion imiwnohistocemeg .....	111
2.3.2. Arbrofion blotio Gorllewinol .....	120
2.3.3 Meintoli crynodiad plasma AG .....	123
2.4. Dadansoddiadau ystadegol.....	126
<b>Pennod 3: Nodweddu rheoleiddiad awtoffagi niwronal gan echelin signalu ghrelin-GHS-R <i>in vitro</i> .....</b>	<b>127</b>
3.1 Cyflwyniad.....	127
3.1.1 Dehongli profion awtoffagi .....	127
3.1.2 Ghrelin a awtoffagi niwronaidd: Canfyddiadau o Modelau <i>in vitro</i> .....	131
3.1.3 Nodau ac amcanion.....	132
3.2 Dulliau a Defnyddiau .....	133
3.2.1 Defnyddiau.....	133
3.2.2 Aseidiadau WB.....	133
3.2.4. Aseidiadau microsgopeg fflworoleuedd .....	135
3.2.5 Dadansoddiad ystadegol a chyflwyniad data.....	141
3.3. Canlyniadau .....	142
3.3.1. Data WB LC3 a p62 celloedd SN4741 .....	142
3.3.2. Data WB LC3 a p62 celloedd HT-22.....	145
3.3.3 Optimeiddiaeth profion microsgopeg fflworoleuedd .....	148

3.3.4. Data Cyto ID o effeithiau triniaethau echelin ghrelin yng nghelloedd SN4741 o dan amodau maeth cyflawn .....	159
3.3.5. Data Cyto ID o effeithiau triniaethau echelin ghrelin yng nghelloedd SN4741 o dan amodau maeth cyfyngedig ysgafn .....	162
3.3.6. Data Cyto ID o effeithiau triniaethau echelin ghrelin yng nghelloedd HT-22 o dan amodau maeth cyflawn.....	165
3.3.7. Data Cyto ID o effeithiau triniaethau echelin ghrelin yng nghelloedd HT-22 o dan amodau maeth cyfyngedig ysgafn .....	168
3.3.8. Data Cyto ID o effaith gwrthweithiant GHS-R1a mewn celloedd SN4741 maeth cyflawn.....	171
3.3.9. Data Cyto ID o effaith gwrthweithiant GHS-R1a mewn celloedd SN4741 maeth cyfyngedig ysgafn .....	174
3.3.10. Optimeiddiaeth profion microsgopeg fflwroleuedd ar gyfer gwerthuso cyd-lleoleiddiad awtoffagosomau a mitochondria.....	177
3.3.11. Data cyd-lleoleiddiad pwncta Cyto ID a mitotracker yng nghelloedd SN4741 maeth cyflawn.....	179
3.3.12. Data cyd-lleoleiddiad pwncta Cyto ID a mitotracker yng nghelloedd SN4741 maeth cyfyngedig ysgafn .....	182
3.4 Trafodaeth .....	185
3.4.1. Canfyddiadau ac arsylwadau am effeithiau triniaethau echelin ghrelin o dan amodau maeth cyflawn.....	185
3.4.2. Canfyddiadau ac arsylwadau am effeithiau triniaethau echelin ghrelin o dan amodau maeth cyfyngedig ysgafn.....	190
3.4.3. Canfyddiadau ac arsylwadau am effaith D-lys 3 ar ymatebiad Cyto ID celloedd SN4741 i triniaeth gyda pheptidau ghrelin.....	196
3.4.4. Canfyddiadau ac arsylwadau am effaith triniaethau echelin ghrelin ar cyd-lleoleiddiad awtoffagosomau a mictochondria .....	198
3.4.5. Cyfyngiadau .....	202
3.5. Crynodeb o ganfyddiadau'r pennod .....	206
<b>Pennod 4: Nodweddu rheoleiddiad awtoffagi niwronal gan echelin signalu ghrelin-GHS-R <i>in vivo</i>.....</b>	<b>207</b>

4.1 Cyflwyniad.....	207
4.1.1 Heriau asesiadau awtoffagi <i>in vivo</i> .....	207
4.1.2 Ghrelin ac awtoffagi niwronal: Canfyddiadau o modelau <i>in vivo</i> ....	209
4.1.3 Nodau ac amcanion .....	209
4.2 Dulliau a Defnyddiau .....	210
4.2.1. Modelau Cnofilod .....	210
4.2.2 IHC Ni-DAB.....	212
4.2.3 IFHC .....	212
4.2.4 Echdynnu protein o feinwe wedi'u rhewi.....	213
4.2.5 Nodweddiadau WB o echdyniadau protein.....	213
4.2.6 Meintioli crynodiad AG plasma llygod mawr .....	213
4.2.7 Cyflwyniad data a dadansoddiadau ystadegol .....	214
4.3 Canlyniadau .....	215
4.3.1 Optimeiddiaeth protocolau IHC ar gyfer Beclin-1 a p62 .....	215
4.3.2. Nodweddiadau IHC o fynegiad hipocampaidd Beclin-1 yn llygod ghrelin <sup>-/-</sup> , GOAT <sup>-/-</sup> a GHS-R <sup>-/-</sup> .....	218
4.3.5. Llygod GHS-R <sup>-/-</sup> .....	223
4.3.3. Nodweddu fynegiad p62 yn hipocampau llygod ghrelin <sup>-/-</sup> , GOAT <sup>-/-</sup> a GHS-R <sup>-/-</sup> .....	226
4.3.4 Ymchwiliad i gyd-llleoleiddiad Beclin-1-BrdU yn DG llygod mawr llawn dwf.....	228
4.3.5. Nodweddiadau WB o awtoffagi niwral a hepatig yn cnofilod sydd ar patrymau bwydo amserol .....	234
4.4 Trafodaeth .....	258
4.4.1. Amcan 1: Arbrofion IHC .....	258
4.4.2. Amcan 2: Arbrofion WB .....	263
4.5 Crynodeb o ganfyddiadau'r pennod .....	271
<b>Pennod 5: Trafodaeth .....</b>	<b>272</b>
<b>5.1 Y brif canfyddiadau a'i perthnasedd .....</b>	<b>272</b>

5.1.1. Arbrofion <i>in vitro</i> .....	272
5.1.2. Arbrofion <i>in vivo</i> IHC: Awtoffagi hipocampaidd.....	273
5.2 Arbrofion pellach.....	277
5.2.1 Delweddu fflwcs awtoffagig gyda dull microsgopeg fflworoleuedd fyw .....	277
5.2.2. Nodweddiadau <i>in vivo</i> gyda gohebwy LC3 sy'n sensitif i pH.....	280
5.2.3. Asesu effaith patrymau bwydo amserol ar rhythm circadaidd awtoffagi hepatic.....	284
5.3. Cydnabyddiaethau ehangach .....	284
5.3.1. Pwysigrwydd ystyried patrymau bwydo amserol i astudiaethau DR .....	284
5.3.2. Potensial therapiwtig ghrelin .....	285
5.3.3. Cydnabyddiaeth am awtoffagi .....	287
5.4 Datganiad i gloi .....	288
Atodiad A: Data Atodol Pennod 3 .....	289
Atodiad B: Data Atodol Pennod 4 .....	327
Cyfeiriadau.....	370

## Rhestr Ffigurau

### Pennod 1:

**Ffigur 1.1.** Yr hipocampws

**Ffigur 1.2.** Trosolwg o niwropatholeg clefyd Alzheimer

**Ffigur 1.3.** Trosolwg o niwropatholeg clefyd Parkinson

**Ffigur 1.4.** Prif llwybrau awtoffagi

**Ffigur 1.5.** Niwrogenesis hipocampws oedolion (AHN)

**Ffigur 1.6.** Trosolwg o synthesis a phrosesi ghrelin

**Ffigur 1.7.** Trosolwg o lwybrau signalu GHS-R1a

**Ffigur 1.8.** Signalu orecsigenig ghrelin yn y hypothalamws

**Ffigur 1.9.** Trosolwg o awtoffagi a'r straenachoswyr sydd yn eu ysgogi

**Ffigur 1.10.** Systemau cyfunedd awtoffagi (debyg i wbcwitin)

**Ffigur 1.11.** Trosolwg o recriwtiad cymhlygion ATG yn ystod biogenesis awtoffagosomau mamaliaid

**Ffigur 1.12.** Awttoffagi niwronaidd

### Pennod 2:

**Ffigur 2.1.** Amlinell o dull cyfrû glas trypan

**Ffigur 2.2.** Prawf asid bicinoninig (BCA assay)

**Ffigur 2.3.** Trosolwg o brif camau arbrofion blotio gorllewinol

**Ffigur 2.4.** Lluniau o gel polyacrylamid tu fewn i'r mowld castio (A) a rhediad SDS-PAGE (B).

**Ffigur 2.5.** Darlun o'r pentwr trosglwyddo (top) a lluniau o'r cyfarpar a defnyddir ar gyfer trosglwyddiad rhannol sych (gwaelod).

**Ffigur 2.6.** Peiriant selio gwres (A) a defnyddir i selio pilennau PVDF mewn bagiau plastig (B) ar gyfer magiad gyda gwrthgyrff. Peiriant Chemidoc XRS a defnyddir ar gyfer datblygiad chemi-ymoleuol (C).

**Ffigur 2.7.** Trosolwg o'r dadansoddiad imageJ o dwyseddau optegol bandiau protein WB.

**Ffigur 2.8.** Trosolwg o cynllun ac egwyddor microsgopeg fflworoleuedd.

**Ffigur 2.9.** Trosolwg o egwyddor microsgopeg sganio laser cydffocal (LSCM).

**Ffigur 2.10.** Trosolwg o'r pib-linell cyffredinol a defnyddir i canfod a chyfri nifer y pwncta (awtoffagosomau, mitochondria, lysosomau) y gell, ar ôl delweddu microsgopeg sganio laser cydffocal.

**Ffigur 2.11.** Sgrinlun o echdyniad metadata o ffeiliau LSM yn meddalwedd CellProfiler.



**Ffigur 2.12.** Sgrinlun o'r paramedrau a defnyddir i gwahanu ffeiliau LSM i delweddau graddlwyd unigol.

**Ffigur 2.13.** Sgrinlun o paramedrau a delweddau cynrychioladol o'r modiwlau 'Smooth' (ochr chwith) ac 'EnhanceAndSuppressFeatures' (ochr dde) y pib-linell CellProfiler.

**Ffigur 2.14.** Sgrinlun o paramedrau a delweddau cynrychioladol o'r modiwl 'IdentifyPrimaryObjects' a defnyddir i canfod cnewyll cellau yn CellProfiler.

**Ffigur 2.15.** Sgrinlun o paramedrau a delweddau cynrychioladol o'r modiwl 'IdentifySecondaryObjects' a defnyddir i canfod cellgyrff yn CellProfiler.

**Ffigur 2.16.** Sgrinlun o paramedrau a delweddau cynrychioladol o'r modiwl 'IdentifyTertiaryObjects' a defnyddir i canfod cytoplasmau celloedd yn CellProfiler.

**Ffigur 2.17.** Sgrinlun o paramedrau a delweddau cynrychioladol o'r modiwl 'MaskImage', a defnyddir i guddio delweddau 'FilteredGreen' neu 'FilteredRed' gyda'i cytoplasmau cyfatebol.

**Ffigur 2.18.** Sgrinlun o paramedrau a delweddau cynrychioladol o'r modiwl 'IdentifyPrimaryObjects', a defnyddir i ganfod a chyfri pwncta mewn cytoplasmau delweddau sydd wedi'u masgio.

**Ffigur 2.19.** Sgrinlun o'r paramedrau a defnyddir yn y modiwl 'RelateObjects' i neulltio pwncta i'w cytoplasmau cyfatebol, er mwyn canfod nifer o pwncta/cell.

**Ffigur 2.20.** Paramedrau a defnyddir i asesu cydberthyniad a gorgyffyrddiad rhwng arddwyseddau picseli delweddau Cyto-ID a Mitotracker.

**Ffigur 2.21.** Paramedrau a delweddau cynrychioladol o'r modiwl 'ClassifyObjects' a defnyddir i neulltuo pwncta i finiau cyd-llleoleiddig a heb-gyd-llleoleiddio

**Ffigur 2.22.** Trosolwg sgematig o protocol Ni-DAB IHC.

**Ffigur 2.23.** Canfod celloedd imiwnoadweithiol o brotocol Ni-DAB IHC gyda ImageJ.

**Ffigur 2.24.** Trosolwg sgematig o protocol IFHC dwbl.

**Ffigur 2.25.** Sgrinlun o'r modiwl 'IdentifyObjectsManually' a defnyddir i ganfod/labeli celloedd BrdU positive yn CellProfiler.

### Pennod 3:

**Ffigur 3.1.** Trosolwg o ddeinameg fflwcs awtoffagig a chroniad strwythurau awtoffagig o dan wahanol amodau

**Ffigur 3.2.** Cymhariaeth o awtoffagi gwaelodol ac ysgogedig yn dilyn triniaeth ag atalyddion lysosomaidd, ac ataliad fflwcs awtoffagig.

**Ffigur 3.3.** Trosolwg o'r cynllun driniaeth a ddefnyddir ar gyfer nodweddiadau WB o effeithiau triniaethau echelin ghrelin ar awtoffagi.

**Ffigur 3.4.** Trosolwg o'r cynllun driniaeth a ddefnyddir ar gyfer nodweddiadau prawf Cyto ID o effeithiau triniaethau echelin ghrelin ar awtoffagi.

**Ffigur 3.5.** Trosolwg o'r cynllun driniaeth a defnyddir ar gyfer nodweddiadau prawf Cyto ID o effaith gwrthweithiant GHS-R1a yng nghelloedd SN4741.

**Ffigur 3.6.** Trosolwg o'r cynllun driniaeth a defnyddir ar gyfer nodweddiadau prawf Cyto ID- Mitotracker o effaith triniaethau echelin ghrelin ar cyd-llleoleiddiad awtoffagosomau a mitochondria

**Ffigur 3.7.** Nodweddiad WB o effaith triniaethau echelin ghrelin ar awtoffagi mewn celloedd SN4741.

**Ffigur 3.8.** Nodweddiad WB o effaith triniaethau echelin ghrelin ar awtoffagi mewn celloedd HT-22.

**Ffigur 3.9.** Cymhariaeth o staenio ID Cyto mewn celloedd SN4741 wedi'u trin â CQ, a delweddyd gyda microsgopau maes llydan (A) a cydffocal (B).

**Ffigur 3.10.** Ymateb dos bafilomycin A1 gyda phrawf Cyto ID mewn celloedd SN4741.

**Ffigur 3.11.** Ymatebion dosau rapamycin (Rap) a resferatrol (Resv) gyda'r prawf Cyto ID mewn celloedd SN4741 wedi'u trin â bafilomycin A1 (Baf).

**Ffigur 3.12.** Optimeiddiaeth dos bafilomycin A1 (Baf) ar gyfer prawf Cyto ID mewn celloedd HT-22.

**Ffigur 3.13.** Ymateb prawf Cyto ID i driniaethau echel ghrelin mewn celloedd SN4741 maeth cyflawn.

**Ffigur 3.14.** Ymateb prawf Cyto ID i driniaethau echel ghrelin mewn celloedd SN4741 maeth cyfyngedig.

**Ffigur 3.15.** Ymateb prawf Cyto ID i driniaethau echel ghrelin mewn celloedd HT-22 maeth cyflawn.

**Ffigur 3.16.** Ymateb prawf Cyto ID i driniaethau echel ghrelin mewn celloedd HT-22 maeth cyfyngedig.

**Ffigur 3.17.** Ymateb prawf Cyto ID i driniaethau echelin ghrelin mewn celloedd SN4741 maeth cyflawn, sydd wedi'u cyn-drin gyda gwrthweithydd GHS-R1a (D-lys 3)

**Ffigur 3.18.** Ymateb prawf Cyto ID i driniaethau echelin ghrelin mewn celloedd SN4741 maeth cyfyngedig, sydd wedi'u cyn-drin gyda gwrthweithydd GHS-R1a (D-lys 3)

**Ffigur 3.19.** Optimeiddiaeth profion microsgopeg fflworoleuedd i ganfod cyd-llleoleiddiad awtoffagosomau, mitochondria a lysosomau.

**Ffigur 3.20.** Effaith triniaethau echel ghrelin ar cyd-llleoleiddiad pwncta Cyto-ID a mitotracker yn celloedd SN4741 maeth cyflawn

**Ffigur 3.21.** Effaith triniaethau echel ghrelin ar cyd-llleoleiddiad pwncta Cyto-ID a mitotracker yn celloedd SN4741 maeth cyfyngedig

**Ffigur 3.22.** Cymhariaeth o maent effeithiau triniaethau AG, UAG, L692, Rap a Resv, fel cymhareb y rheolydd Veh, yn arbrofion blotio Gorllewinol (WB) ym mhresenoldeb CQ, ac arbrofion Cyto ID ym mhresenoldeb Baf, yng nghelloedd SN4741 maeth cyflawn.

**Ffigur 3.23.** Cymhariaeth o maent effeithiau triniaethau AG, UAG, L692, Rap a Resv, fel cymhareb y rheolydd Veh, yn arbrofion blotio Gorllewinol (WB) ym mhresenoldeb CQ, ac arbrofion Cyto ID ym mhresenoldeb Baf, yng nghelloedd HT-22 maeth cyflawn.

**Ffigur 3.24.** Data arbrofion Cyto ID ar gyfer celloedd SN4741 wedi'u trin gyda Baf o dan amodau maeth cyflawn a chyfyngedig ysgafn, wedi'u ail-blotio er mwyn rhoi cymhariaeth well o maent effeithiau triniaethau AG, UAG, L692, Rap a Resv.

**Ffigur 3.25.** Data arbrofion Cyto ID ar gyfer celloedd HT-22 wedi'u trin gyda Baf o dan amodau maeth cyflawn a chyfyngedig ysgafn, wedi'u ail-blotio er mwyn rhoi cymhariaeth well o maent effeithiau triniaethau AG, UAG, L692, Rap a Resv.

**Ffigur 3.26.** Gwerthusiad o atgynhyrchedd effaith ar draws y tri phrif arbrawf microsgopeg fflwroleuedd

#### Pennod 4:

**Ffigur 4.1.** Trosolwg o arbrofion patrymau bwydo amserol llygod mawr Sprague-Dawley (A) a llygod GHS-R<sup>-/-</sup> (B)

**Ffigur 4.2.** Optimeiddiaeth IHC Ni-DAB o wrthgyrff gwrth-Beclin-1 a gwrth-SQSTM-1/p62.

**Ffigur 4.3.** Mynegiad Beclin-1 yn hipocampau llygod ghrelin<sup>-/-</sup> a WT o'r un dorllwyth.

**Ffigur 4.4.** Mynegiad Beclin-1 yn hipocampau llygod GOAT<sup>-/-</sup> a WT o'r un dorllwyth.

**Ffigur 4.5.** Mynegiad Beclin-1 yn hipocampau llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a WT o'r un dorllwyth.

**Ffigur 4.6.** Delweddau cynrychioladol o imiwnoadweithedd p62 yn hipocampws llygoden, a chymerwyd gyda wrthrychydd 10x, yn dilyn IHC Ni-DAB gyda lot newydd o wrthgorff gwrth-SQSTM1/p62 at gwanhad 1:200.

**Ffigur 4.7.** Delweddau cynrychioladol o imiwnoadweithedd p62 yn hipocampau llygod WT (o'r arbrawf GOAT<sup>-/-</sup>) yn dilyn protocol IHC Ni-DAB arferol.

**Ffigur 4.8.** Optimeiddiaeth o brotocol imiwnofflwroleuedd lluosog ar gyfer canfod mynegiad Beclin-1 yn niwronau newydd anedig yn DG llygod mawr.

**Ffigur 4.9.** Mynegiad Beclin-1 a BrdU yn DG llygod mawr cfwl-Lister sydd wedi'u trin gyda AG neu Veh.

**Ffigur 4.10.** Crynodiad plasma AG terfynol llygod mawr Sprague Dawley

**Ffigur 4.11.** Effaith patrymau bwydo amserol ar mynegiad LC3 cortigol llygod mawr Sprague-Dawley.

**Ffigur 4.12.** Effaith patrymau bwydo amserol ar mynegiad LC3 hypothalamig llygod mawr Sprague-Dawley.

**Ffigur 4.13.** Effaith patrymau bwydo amserol ar mynegiad LC3 hipocampaidd llygod mawr Sprague-Dawley.

**Ffigur 4.14.** Effaith patrymau bwydo amserol ar mynegiad LC3 hepatig llygod mawr Sprague-Dawley.

**Ffigur 4.15.** Effaith patrymau bwydo amserol ar mynegiad LC3 blaen-ymennydd llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a WT

**Ffigur 4.16.** Effaith patrymau bwydo amserol ar mynegiad LC3 hypothalamig llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a WT

**Ffigur 4.17.** Effaith patrymau bwydo amserol ar mynegiad LC3 hepatig llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a WT

#### Pennod 5:

**Ffigur 5.1.** Trosolwg o gynllun arbrofol ar gyfer mesur fflwcs awtoffagig *in vitro*, yn seiliedig ar protocol du Toit e tal., 2018.

**Ffigur 5.2.** Cynllun arbrofol ar gyfer asesu rol awtoffagy yn gweithredau hipocampaidd ghrelin

## Atodiad A:

Ffigur A1. Dwyseddau optegol (ODs) normaleiddedig LC3-II celloedd SN4741 a defnyddir i gynhyrchu'r data newid yn ffigur 3.7.

Ffigur A2. Dwyseddau optegol (ODs) normaleiddedig LC3-I celloedd SN4741 a defnyddir i gynhyrchu'r data yn ffigur 3.7.

Ffigur A3. Dwyseddau optegol (ODs) normaleiddedig p62 celloedd SN4741 a defnyddir i gynhyrchu'r data yn ffigur 3.7.

Ffigur A4. Dwyseddau optegol (ODs) normaleiddedig LC3-II celloedd HT-22 a defnyddir i gynhyrchu'r data yn ffigur 3.8.

Ffigur A5. Dwyseddau optegol (ODs) normaleiddedig LC3-I celloedd HT-22 a defnyddir i gynhyrchu'r data yn ffigur 3.8.

Ffigur A6. Dwyseddau optegol (ODs) normaleiddedig p62 celloedd HT-22 a defnyddir i gynhyrchu'r data yn ffigur 3.8.

Ffigur A7. Delweddau cynrychioladol o staenio GFP-LC3 celloedd SN4741, o'r optimeiddiaethau cynnar (aflywyddiannus). Delweddwyd gyda gwrthrychiadur 40x y system In-Cell-Analyzer.

Ffigur A8. Delweddau cynrychioladol o staenio Cyto ID yng nghelloedd SN4741 ar ôl triniaeth gyda clorocwin neu rheolydd am 1, 4 ac 24 awr.

Ffigur A9. Cymhariaeth nifer o gelloedd SN4741 yn dilyn magiad 1 awr o dan amodau maeth cyflawn neu newyn maetholion a serwm.

Ffigur A10. Delweddau cynrychioladol o staenio Cyto ID yng nghelloedd SN4741 ar ôl newyn maetholion a triniaeth gyda CQ neu Veh am naill ai 1 neu 4 awr.

Ffigur A11. Delwedd cynrychioladol o cyd-staenio Cyto ID ac LC3 yng nghelloedd SN4741 sydd wedi'u trin gyda rapamycin a baffilomycin.

Ffigur A12. Staenio Cyto ID yng nghelloedd SN4741 maeth cyflawn sydd wedi'u trin gyda rapamycin (Rap) a resveratrol (Resv) yn absenoldeb a phresenoldeb Baf.

Ffigur A13. Plotiau blwch a wisger o ddata pwncta Cyto ID/cell ar gyfer celloedd SN4741 maeth cyflawn sydd wedi'u trin gyda Baf.

Ffigur A14. Staenio Cyto ID yng nghelloedd SN4741 maeth cyfyngedig sydd wedi'u trin gyda rapamycin (Rap) a resveratrol (Resv) yn absenoldeb a phresenoldeb Baf.

Ffigur A15. Plotiau blwch a wisger o ddata pwncta Cyto ID/cell ar gyfer celloedd SN4741 maeth cyfyngedig sydd wedi'u trin gyda Baf.

Ffigur A16. Staenio Cyto ID yng nghelloedd HT-22 maeth cyflawn sydd wedi'u trin gyda rapamycin (Rap) a resveratrol (Resv) yn absenoldeb a phresenoldeb Baf.

Ffigur A17. Plotiau blwch a wisger o ddata pwncta Cyto ID/cell ar gyfer celloedd HT-22 maeth cyflawn sydd wedi'u trin gyda Baf.

Ffigur A18. Staenio Cyto ID yng nghelloedd HT-22 maeth cyfyngedig sydd wedi'u trin gyda rapamycin (Rap) a resveratrol (Resv) yn absenoldeb a phresenoldeb Baf.

Ffigur A19. Plotiau blwch a wisger o ddata pwncta Cyto ID/cell ar gyfer celloedd HT-22 maeth cyfyngedig sydd wedi'u trin gyda Baf.

Ffigur A20. Staenio Cyto ID o gelloedd SN4741 sydd wedi'u trin gyda rapamycin (Rap) yn presenoldeb Baf, o'r arbrawf D-lys 3 maeth cyflawn.

Ffigur A21. Plotiau blwch a wisger o ddata pwncta Cyto ID/cell ar gyfer arbrawf D-lys3 maeth cyflawn.

Ffigur A22. Staenio Cyto ID o gelloedd SN4741 sydd wedi'u trin gyda rapamycin (Rap) yn presenoldeb Baf, or arbrawf D-lys 3 maeth cyfyngedig

Ffigur A23. Plotiau blwch a wisger o ddata pwncta Cyto ID/cell ar gyfer arbrawf D-lys3 maeth cyfyngedig.

Ffigur A24. Staenio Cyto ID o gelloedd SN4741 sydd wedi'u trin gyda rapamycin (Rap) yn presenoldeb Baf, or arbrawf Cyto ID-Mitotracker maeth cyflawn.

Ffigur A25. Plotiau blwch a wisger o ddata pwncta Cyto ID/cell ar gyfer arbrawf Cyto-ID maeth cyflawn.

Ffigur A26. Staenio Cyto ID o gelloedd SN4741 sydd wedi'u trin gyda rapamycin (Rap) yn presenoldeb Baf, or arbrawf Cyto ID-Mitotracker maeth cyfyngedig.

Ffigur A27. Delweddau cynrychioladol o rhediad 2 arbrawf Cyto-ID mitotracker maeth cyfyngedig ysgafn, lle roedd gorlwythiad damweiniol o'r llifyn mitotracker.

Ffigur A28. Plotiau blwch a wisger o ddata pwncta Cyto ID/cell ar gyfer arbrawf Cyto-ID maeth cyfyngedig.

Ffigur A29. Methiant gwrthgorff gwrth TOM20 i darparu imiwnoadweithedd penodol ac amlwg gyda WB a ICC.

Ffigur A30. Optimeiddiaeth arbrawf helpa Baf gyda'r prawf Cyto ID yng nghelloedd SN4741 maeth cyflawn.

Ffigur A31. Data WB o gymhareb pULK1 Ser555/ULK1, ar ôl triniaeth 5 munud gyda Veh neu L692 yng nghelloedd SN4741, o dan amodau maeth cyflawn a cyfyngedig

Ffigur A32. Blotiau Gorllewinol am pULK1 Sêr 555, pAMPK Thr172, ULK1, AMPK, ar ôl triniaeth gyda atalyddion mitochondrial (Rotenon (R) & Oligomycin (O) neu Veh am 30 munud, yng nghelloedd SN4741 maeth cyflawn.

## Atodiad B:

Ffigur B1. Delwedd cynrychioladol o protocol IHC Ni-DAB gyda gwrthgorff gwrth LAMP1 (1:200).

Ffigur B2. Delwedd cynrychioladol o imiwnoffloroleuedd Beclin-1 a p62 yn DG llygod mawr, yn dilyn magiad gyda gwrthgyrff gwrth-Beclin-1 a gwrth-p62 ar gwanediadau o 1:200, 1:400 a 1:800.

Ffigur B3. Data cymeriant bwyd dyddiol a chronnus o arbrawf patrymau bwydo llygod mawr Sprague Dawley.

Ffigur B.4. Data cymeriant bwyd a pwysau corff arbrawf patrymau bwydo amserol llygod GHS-R<sup>-/-</sup>.

Ffigur B5. Cymariaethau ystadegol ANOVA dwyffordd a phrawf cymariaethau lluosog Tukey, o gymeriant bwyd cronnus, newidiad pwysau, a hyd o'r trwyn i'r anws, o'r arbrawf patrymau bwydo amserol yn llygod GHS-R<sup>-/-</sup>.

Ffigur B6. Cymariaethau ystadegol ANOVA dwyffordd a phrawf cymariaethau lluosog Tukey, o pwysau'r afu, chwarren bitwidol ac adipos gwyn, o'r arbrawf patrymau bwydo amserol yn llygod GHS-R<sup>-/-</sup>.

Ffigur B7. Mynegiad LC3 y blaen-ymennydd, hypothalamws ac afu mewn perthynas i amser marw, o'r arbrawf patrymau bwydo amserol llygod GHS-R<sup>-/-</sup>.

Ffigur B8. Gwahaniaethau yn amseroedd marw grwpiau yr arbrawf patrymau bwydo amserol yn llygod GHS-R<sup>-/-</sup>.

## Rhestr Tablau

### Pennod 1:

Tabl 1.1. Nodweddion cellog a moleciwlaidd heneiddio systemig, a diffinir gan Lopez-Otin et al. (2013), a'r ymennydd, a diffinir gan Mattson and Arumugam (2018)

Tabl 1.2. Cymhlygion ATG, eu cydrannau, a'u swyddogaethau

### Pennod 2:

Tabl 2.1. Tabl defnyddiau allweddol, wedi'u seilio ar dablau STAR methods cyhoeddiadau Cell

Tabl 2.2. Cydrannau ar gyfer paratoi byfferau SDS-PAGE a WB

Tabl 2.3. Cyfeintiau adweithyddion a defnyddir er mwyn paratoi geliau cydrannu a pentyrru

Tabl 2.4. Cyfeintiau o byffer a safonau ghrelin a defnyddir i baratoi cromlin safonol ar gyfer ELISA 'active ghrelin'

Tabl 2.6. Arddull cyflwyno gwerthoedd P NEJM

### Pennod 4:

Tabl 4.1. Crynodeb o modelau cnofilod a defnyddir i asesu awtoffagi niwral/niwronal *in*

*vivo*

### Atodiad A:

Tabl A1. Crynodeb o gymariaethau lluosog Dunnett's o dwyseddau optegol normaleiddedig LC3-II celloedd SN4741

Tabl A2. Crynodeb o gymariaethau lluosog Dunnett's o dwyseddau optegol normaleiddedig LC3-I celloedd SN4741

Tabl A3. Crynodeb o gymariaethau lluosog Dunnett's o dwyseddau optegol normaleiddedig p62 celloedd SN4741

Tabl A4. Crynodeb o gymariaethau lluosog Dunnett's o dwyseddau optegol normaleiddedig LC3-II celloedd HT-22

Tabl A5. Crynodeb o gymariaethau lluosog Dunnett's o dwyseddau optegol normaleiddedig LC3-I celloedd HT-22

Tabl A6. Crynodeb o gymariaethau lluosog Dunnett's o dwyseddau optegol normaleiddedig p62 celloedd HT-22

Tabl A7. Crynodeb o gymariaethau ystadegol prawf Dunnet ar gyfer effeithiau triniaethau echelin ghrelin ar croniad pwncta Cyto ID yng nghelloedd SN4741 o dan amodau maeth cyflawn.

## Atodiad B:

Tabl B1. Ystadegau disgrifiadol ar gyfer mynegiad Beclin-1 yn hipocampau llygod Ghrelin<sup>-/-</sup> a WT o'r un dorllwyth (perthnasol i ffigur 4.3)

Tabl B2. Ystadegau disgrifiadol ar gyfer mynegiad Beclin-1 yn hipocampau llygod GOAT<sup>-/-</sup> a WT o'r un dorllwyth (perthnasol i ffigur 4.4)

Tabl B3. Crynodeb o ganlyniadau profion-t heb-bar, ar gyfer mynegiad hipocampaid Beclin-1, rhwng llygod Ghrelin<sup>-/-</sup> a WT (perthnasol i ffigur 4.4)

Tabl B4. Crynodeb o ganlyniadau profion-t heb-bar, ar gyfer mynegiad hipocampaid Beclin-1, rhwng llygod GOAT<sup>-/-</sup> a WT (perthnasol i ffigur 4.4)

Tabl B5. Ystadegau disgrifiadol ar gyfer mynegiad Beclin-1 yn hipocampau llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a WT o'r un dorllwyth (perthnasol i ffigur 4.5)

Tabl B6. Crynodeb o ganlyniadau prawf ANOVA dwyffordd ar gyfer mynegiad Beclin-1 rhwng DG llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a WT (perthnasol i ffigur 4.5)

Tabl B7. Crynodeb o ganlyniadau prawf ANOVA dwyffordd ar gyfer mynegiad Beclin-1 rhwng CA1 llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a WT (perthnasol i ffigur 4.5)

Tabl B8. Crynodeb o ganlyniadau prawf ANOVA dwyffordd ar gyfer mynegiad Beclin-1 rhwng CA1 llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a WT (perthnasol i ffigur 4.5)

Tabl B9. Crynodeb o ganlyniadau prawf cymhariaeth lluosog Tukey o fynegiad Beclin-1 rhwng DG llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a WT gwrywaidd a benywaidd (perthnasol i ffigur 4.5)

Tabl B10. Crynodeb o ganlyniadau prawf cymhariaeth lluosog Tukey o fynegiad Beclin-1 rhwng CA1 llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a WT gwrywaidd a benywaidd (perthnasol i ffigur 4.5)

Tabl B11. Crynodeb o ganlyniadau prawf cymhariaeth lluosog Tukey o fynegiad Beclin-1 rhwng CA3 llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a WT gwrywaidd a benywaidd (Perthnasol i ffigur 4.5)

Tabl B12. Crynodeb o ganlyniadau prawf cymariaethau lluosog Tukey o fynegiad LC3 cortigol rhwng llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.11)

Tabl B13. Crynodeb o ganlyniadau prawf cymariaethau lluosog Tukey o fynegiad LC3 hypothalamig rhwng llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.12)

Tabl B14. Crynodeb o ganlyniadau prawf cymariaethau lluosog Tukey o fynegiad LC3 hipocampaid rhwng llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.13)

Tabl B15. Crynodeb o ganlyniadau prawf cymariaethau lluosog Tukey o fynegiad LC3 hepatic rhwng llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.14)

Tabl B16. Cydberthyniadau rhwng mynegiad LC3 cortigol a chrynodiad plasma AG yn llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.11)

Tabl B17. Cydberthyniadau rhwng mynegiad LC3 hypothalamig a chrynodiad plasma AG yn llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.12)



Tabl B18. Cydberthyniadau rhwng mynegiad LC3 hipocampaidd a chrynodiad plasma AG yn llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.13)

Tabl B19. Cydberthyniadau rhwng mynegiad LC3 hepatic a chrynodiad plasma AG yn llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.14)

Tabl B20. Cydberthyniadau rhwng crynodiad plasma AG a chymeriant bwyd llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.10)

Tabl B21. Cydberthyniadau rhwng mynegiad LC3 cortigol a chymeriant bwyd cronnus llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.11)

Tabl B22. Cydberthyniadau rhwng mynegiad LC3 cortigol a chymeriant bwyd diwrnod olaf llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.11)

Tabl B23. Cydberthyniadau rhwng mynegiad LC3 hypothalamig a chymeriant bwyd cronnus llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.12)

Tabl B24. Cydberthyniadau rhwng mynegiad LC3 hypothalamig a chymeriant bwyd diwrnod olaf llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.12)

Tabl B25. Cydberthyniadau rhwng mynegiad LC3 hipocampaidd a chymeriant bwyd cronnus llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.13)

Tabl B26. Cydberthyniadau rhwng mynegiad LC3 hipocampaidd a chymeriant bwyd diwrnod olaf llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.13)

Tabl B27. Cydberthyniadau rhwng mynegiad LC3 hepatic a chymeriant bwyd cronnus llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.14)

Tabl B28. Cydberthyniadau rhwng mynegiad LC3 hepatic a chymeriant bwyd diwrnod olaf llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.14)

Tabl B29. Crynodeb o ganlyniadau prawf ANOVA Dwyffordd o fynegiad LC3 y blaenymennydd rhwng llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a llygod WT sydd wedi bwydo ar patrymau bwydo amserol penodol

Tabl B30. Crynodeb o ganlyniadau prawf Tukey o gwahaniaethau yn LC3-II y blaenymennydd rhwng patrymau bwydo amserol llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a llygod WT

Tabl B31. Crynodeb o ganlyniadau prawf Tukey o gwahaniaethau yn LC3-I y blaenymennydd rhwng patrymau bwydo amserol llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a llygod WT

Tabl B32. Crynodeb o ganlyniadau prawf Tukey o gwahaniaethau yn LC3-II/LC3-I y blaenymennydd rhwng patrymau bwydo amserol llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a llygod WT

Tabl B33. Crynodeb o ganlyniadau prawf ANOVA Dwyffordd o fynegiad LC3 y hypothalamws rhwng llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a llygod WT sydd wedi bwydo ar patrymau bwydo amserol penodol

Tabl B34. Crynodeb o ganlyniadau prawf Tukey o gwahaniaethau yn LC3-II y hypothalamws rhwng patrymau bwydo amserol llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a llygod WT

Tabl B35. Crynodeb o ganlyniadau prawf Tukey o gwahaniaethau yn LC3-I y hypothalamws rhwng patrymau bwydo amserol llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a llygod WT

Tabl B36. Crynodeb o ganlyniadau prawf Tukey o gwahaniaethau yn LC3-II/LC3-I y hypothalamws rhwng patrymau bwydo amserol llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a llygod WT

Tabl B37. Crynodeb o ganlyniadau prawf ANOVA Dwyffordd o fynegiad LC3 y blaenymennydd rhwng llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a llygod WT sydd wedi bwydo ar patrymau bwydo amserol penodol

Tabl B38. Crynodeb o ganlyniadau prawf Tukey o gwahaniaethau yn LC3-II yr afu rhwng patrymau bwydo amserol llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a llygod WT

Tabl B39. Crynodeb o ganlyniadau prawf Tukey o gwahaniaethau yn LC3-I yr afu rhwng patrymau bwydo amserol llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a llygod WT

Tabl B40. Crynodeb o ganlyniadau prawf Tukey o gwahaniaethau yn LC3-I yr afu rhwng patrymau bwydo amserol llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a llygod WT

## Pennod 1: Cyflwyniad

### 1.1. Heneiddio ac yr ymennydd

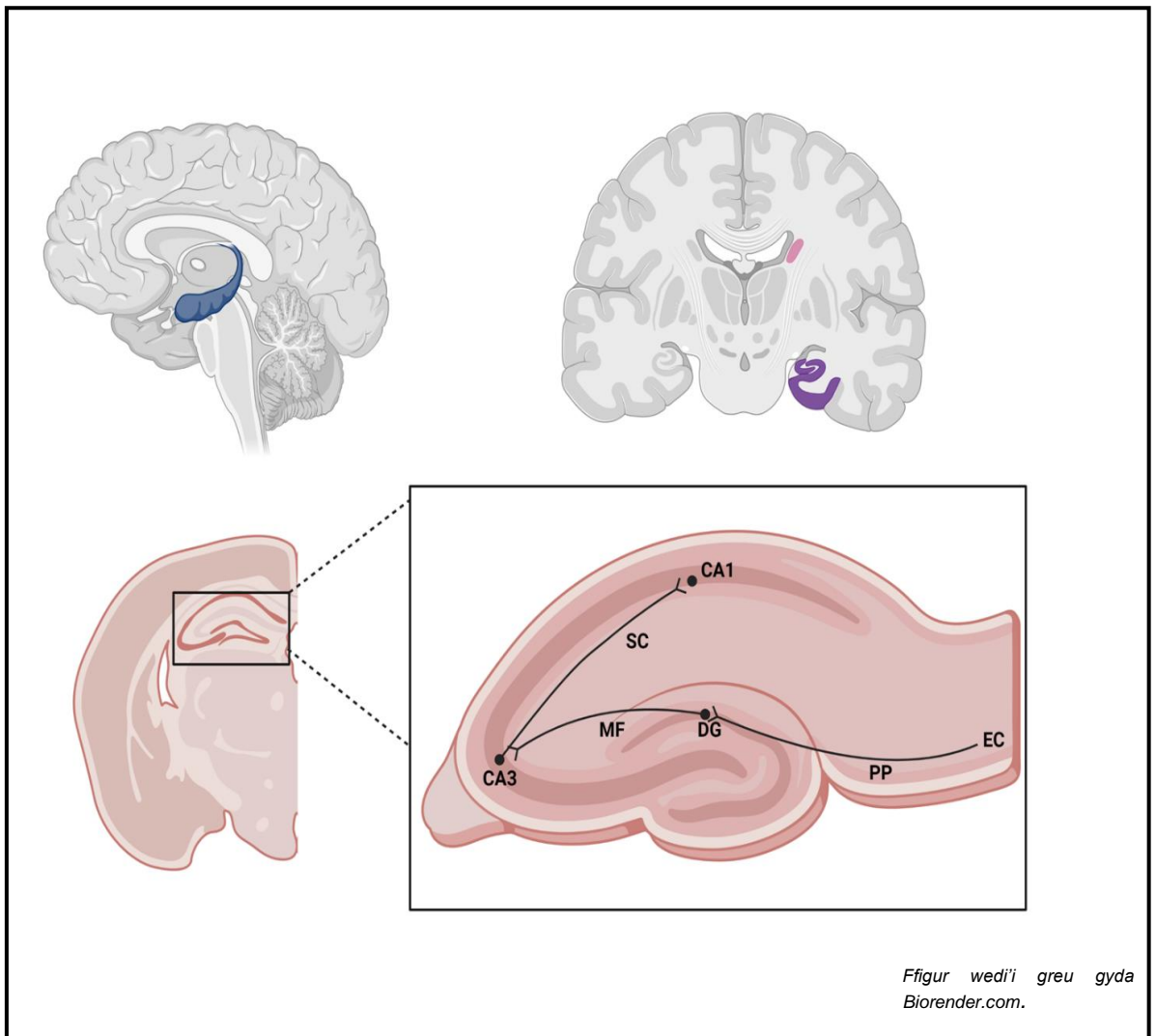
Gellir diffinio heneiddio fel dirywiad cynyddol mewn cyfanrwydd corfforol, meddyliol a gwybyddol sy'n arwain at nam ar swyddogaeth organebol (Barzilai, Huffman, Muzumdar, & Bartke, 2012; Chang, Skirbekk, Tyrovolas, Kassebaum, & Dieleman, 2019; Lopez-Otin, Blasco, Partridge, Serrano, & Kroemer, 2013). Yn syml, mae'n broses anochel lle mai ein cyrff a'n meddyliau yn gwanhau dros amser.

Er mai'r dirywiad swyddogaethol sy'n gysylltiedig ag oed yn effeithio ar bob system y corff, mae effeithiau heneiddio ar yr ymennydd yn hynod o amlwg. Hyd yn oed yn ystod heneiddio 'normal', mae swyddogaeth yr ymennydd sy'n pylu yn effeithio ar ein sylw, cyflymder penderfyniadau, cydsymud modur, canfyddiad synhwyrdd, a dysgu a chof (Mattson & Arumugam, 2018). Ar y lefel anatomegol, mae'r 'newidiadau arferol hyn yn gysylltiedig â gostyngiadau yng nghyfaint y breithell a gwynnin (Mattson & Arumugam, 2018), gyda crebachiad breithell yn llabed yr arlais, gan gynnwys yr hipocampws (ffigur 1.1), yn gysylltu'n gryf gyda nam gwybyddol (Fletcher et al., 2018; Jernigan et al., 2001).

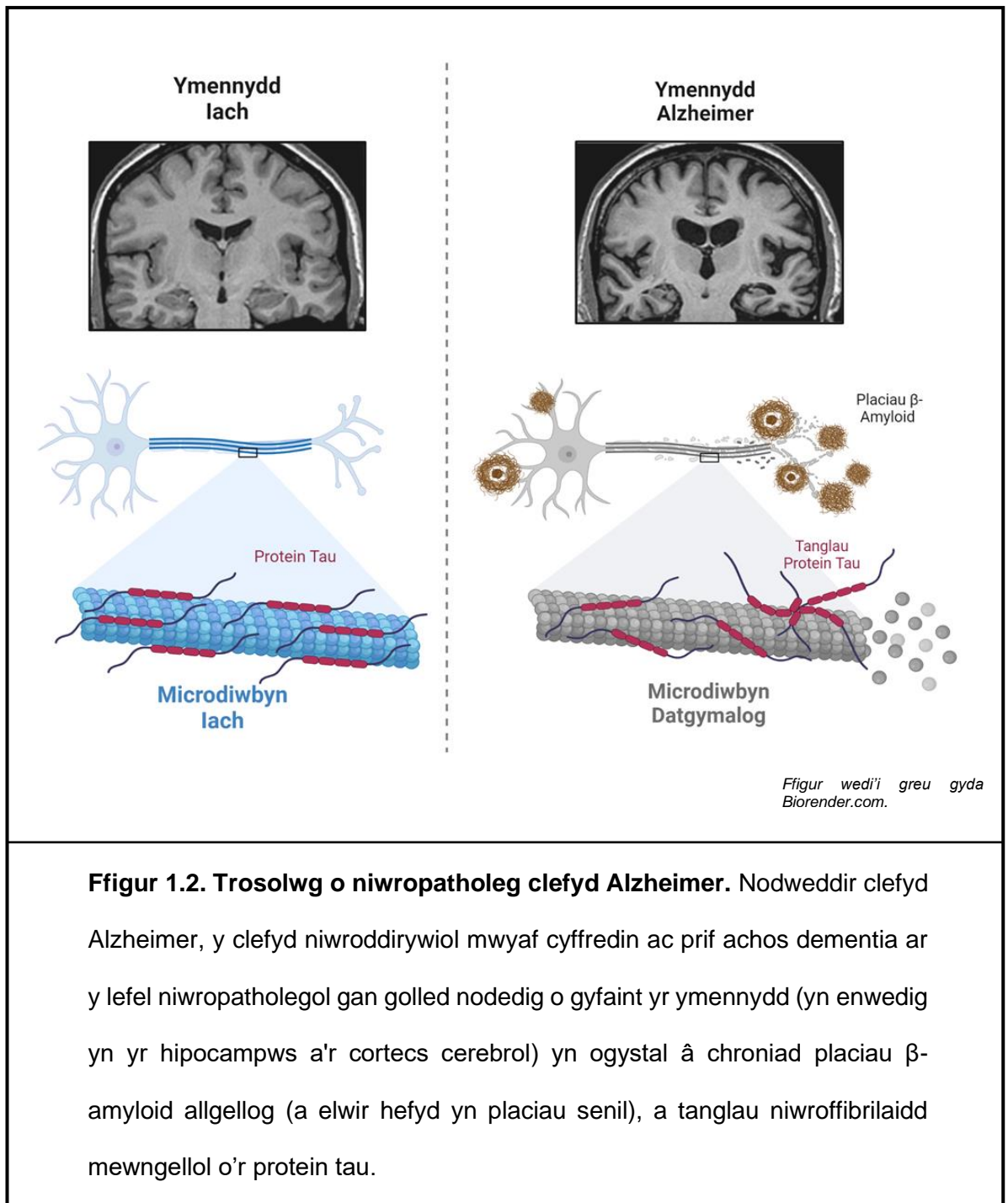
Gwelir nodweddion clinigol hynod fwy difrifol mewn cleifion sy'n dioddef â chlefydau niwroddirywiol gysylltiedig ag oed, sy'n cael eu nodweddu gan golled raddol poblogaethau niwronau bregus a chroniad cysylltiedig mewn agregau proteinaidd fel placiau senil, tanglau niwrofibrillaidd a chyrrff Lewy (Dugger & Dickson, 2017; Kovacs, 2019; Wyss-Coray, 2016). Y clefydau niwroddirywiol mwyaf cyffredin sy'n gysylltiedig ag oedran yw clefyd Alzheimer (AD) (Breijyeh & Karaman, 2020; Querfurth & LaFerla, 2010) (ffigur 1.2) a chlefyd Parkinson (PD) (Bloem, Okun, & Klein, 2021; Dauer & Przedborski, 2003) (ffigur 1.3), gyda'r ddau yn arwain at dementia.

Mae dementia yn syndrom a ddiffinnir gan ddirywiad dysgu, cof a deall, i'r pwynt lle mae'n rhwystro swyddogaeth ymreolaethol annibynnol (Gale, Acar, & Daffner, 2018; Livingston et al., 2020; Wahl et al., 2019). Dengys adroddiadau diweddaraf bod tua 50 miliwn o dioddefwyr dementia ar draws y byd eang, ac maint yn amcangyfrif bydd y nifer hwn yn cynyddu mewn triphlyg erbyn 2050 (Livingston et al., 2020). Ymhellach, amcangyfrifir bod cost blynyddol byd eang dementia tua 1 triliwn (Livingston et al., 2020).

Er gall triniaethau cyfredol lliniaru symptomau clefydau niworddirywiol am gyfnod, ni allant atal na gwrthdroi ei effeithiau (Bloem et al., 2021; Breijyeh & Karaman, 2020). Ymhellach, mae methiannau clinigol proffil uchel wedi cwestiynu ymarferoldeb arbrofol ac ariannol datblygu triniaethau nofel sydd gallu atal neu gwrthdroi symptomau clefydau niwroddiwrywiol. Enghraifft fwyaf nodedig o hyn yw gyda triniaethau ar gyfer AD, gyda threialon clinigol a wnaeth canolbwyntio ar therapiwtegau gwrth- $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) yn darparu ychydig o lwyddiant dros y degawd diwethaf (Hardy & De Strooper, 2017; Makin, 2018; Shi, Sabbagh, & Vellas, 2020). Felly, mae angen dehongli'r union fecanweithiau moleciwlaidd sy'n gwaelodi nid yn unig yn glefydau niwroddiwrywiol gysylltiedig ag oed ond heneiddio ymennydd arferol hefyd, er mwyn datblygu therapiwtegau newydd a all frwydron effeithiol yn erbyn canlyniadau gwanychol heneiddio'r ymennydd.

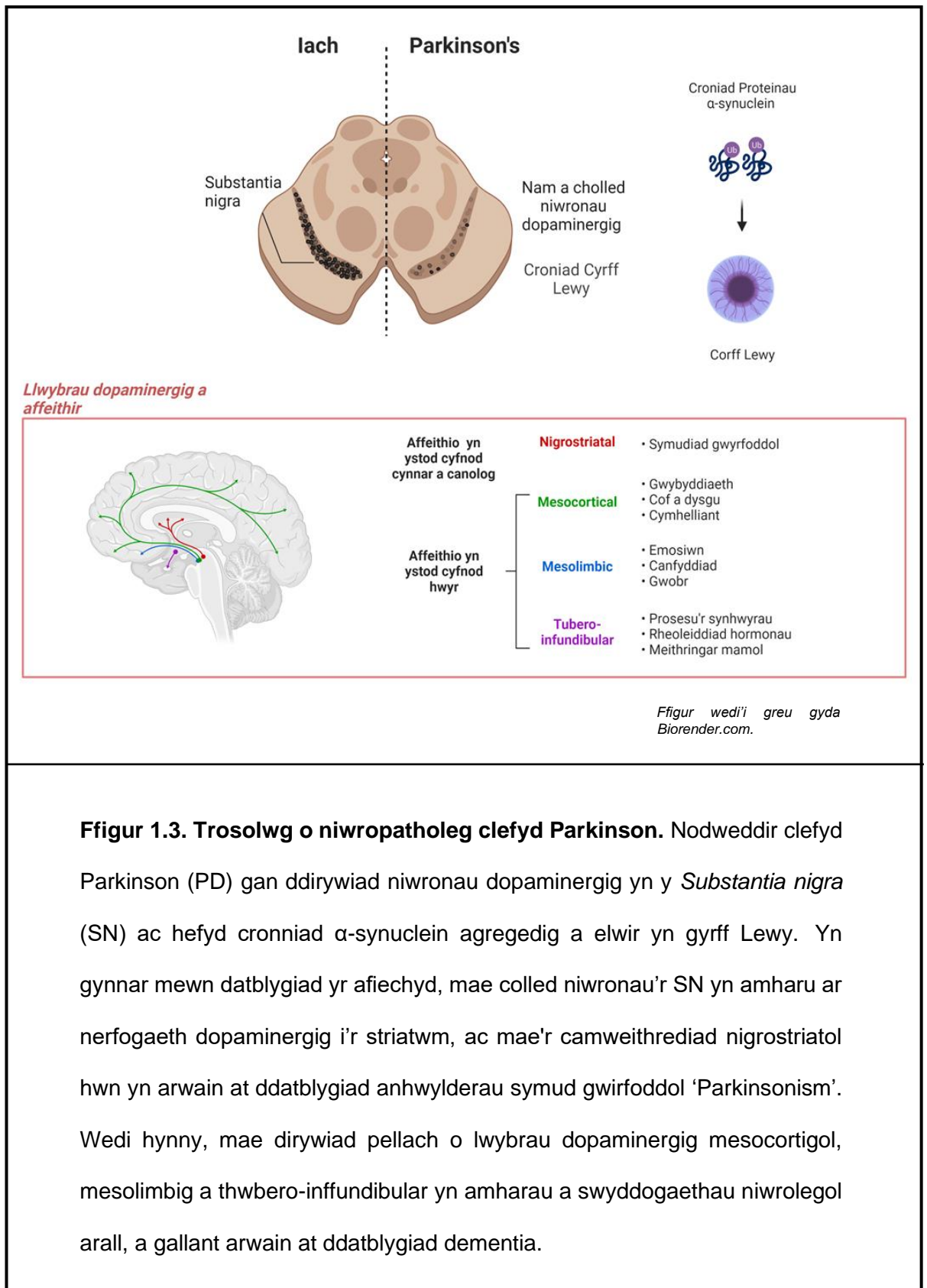


**Ffigur 1.1. Yr hippocampws.** Mae'r hippocampws yn rhanbarth ymennydd sy'n hanfodol ar gyfer gweithrediad cof datganiadol ac episodig ac mae'n arbennig o agored i grebachiad sy'n gysylltiedig ag oed. Llwybr niwronaidd diffiniedig gorau'r hippocampws yw'r llwybr trisynaptig rhwng niwronau'r *dentate gyrus* (DG), CA3 a CA1.



Figur wedi'i greu gyda Biorender.com.

**Ffigur 1.2. Trosolwg o niwropatholeg clefyd Alzheimer.** Nodweddir clefyd Alzheimer, y clefyd niwroddirywiol mwyaf cyffredin ac prif achos dementia ar y lefel niwropatholegol gan golled nodedig o gyfaint yr ymennydd (yn enwedig yn yr hipocampws a'r cortecs cerebról) yn ogystal â chroniad placiau  $\beta$ -amyloid allgellog (a elwir hefyd yn placiau senil), a tanglau niwroffibrilaidd mewngellol o'r protein tau.



## 1.2. Nodweddion cellog a moleciwlaidd heneiddio'r ymennydd

Yn 2013, diffiniodd Lopez-Otin et al., 9 nodwedd cellog a moleciwlaidd (Table 1.1.) ar gyfer heneiddio systemig. Seiliodd yr awduron y nodweddion hyn yn ar y meini prawf y dylai pob nodwedd amlygu yn ystod heneiddio arferol, cyflymu heneiddio yn dilyn gwaethygiad arbrofol ac ymestyn rychwant iechyd (healthspan) (Lopez-Otin et al., 2013); cyfran y bywyd heb afiachusrwydd sy'n cysylltiedig ag oedran (h.y. rychwant bywyd iach). Mae'r rhan fwyaf o'r nodweddion hyn yn berthnasol i'r ymennydd sy'n heneiddio. Fodd bynnag, mae morffoleg a swyddogaethau arbenigol niwronau, a'r cyfathrebiad tynn rhwng celloedd yn yr uned niwrofasglaidd, yn rhoi heriau penodol i'r ymennydd a ni welir mewn systemau organau eraill (Mattson & Arumugam, 2018). Wrth ystyried hyn, diffiniodd Mattson ac Arumugam (2018) y nodweddion cellog a moleciwlaidd sy'n perthnasol i'r ymennydd sy'n heneiddio (Tabl 1.1).

*Tabl 1.1. Nodweddion cellog a moleciwlaidd heneiddio systemig, a diffinir gan Lopez-Otin et al. (2013), a'r ymennydd, a diffinir gan Mattson and Arumugam (2018)*

<b>Nodweddion Cellog a Moleciwlaidd Heneiddio</b>	
<b>Systemig (Lopez-Otin et al., 2013)</b>	<b>Ymennydd (Mattson &amp; Arumugam, 2018)</b>
Newid cyfathrebiad mewn-gellog	Actifedd rhwydwaith niwronaidd gwyrol
Heneiddedd cellog	Bioegniëg camweithredol
Synhwyro maeth camweithredol	Camweithrediad homeostasis calsiwm niwronaidd
Newidiadau epigenynnol	Camweithrediad signalu addasol sy'n ymateb i straen
Ansefydlogrwydd genomeg	Atgyweirio difrod camweithredol
Colled proteostasis	Llwybrau clirio mewngellog camweithredol
Mitochondria camweithredol	Llid
Disbyddiad bon-gelloedd	Mitochondria camweithredol
Athreuliad telomerau	Difrod ocsidiol
	Disbyddiad bon-gelloedd



Mae'n bwysig gwerthfawrogi fod y nodweddion uchod wedi'u cydblethu'n drwm â'i gilydd. Er enghraifft, gall mwntaniad mewn DNA mitocondriaidd, sy'n codio cydrannau allweddol cymhylgion y gadwyn trosglwyddo electronau (ETC), amharu ar resbiradaeth mitocondriaidd, sy'n hanfodol ar gyfer cwrdd gofynion bioegniëg niwronau (Mattson & Arumugam, 2018). Mae trosglwyddiad electronau camweithredol yn ei dro yn gwaethygu straen ocsideiddiol, gan arwain at ddifrod ocsideiddiol proteinau a ffurfiad agregau camweithredol (Mattson & Arumugam, 2018). Amharir camweithrediad mitocondria ar ddeinameg calsiwm mewngelloi hefyd, ac fe all hyn wedyn amharu ar swyddogaeth y lysosom, trwy atal cliriad agregau protein a mitocondria camweithredol (Mattson & Arumugam, 2018). Mae'r cronriad dilynol o mitocondria ac agregau camweithredol yn gwaethygu difrod ocsideiddiol a chamweithrediad cellog ymhellach, gan arwain at farwolaeth niwronau (Mattson & Arumugam, 2018).

Gall nodweddion systemig, yn enwedig camweithrediad synhwyro maetholion, sy'n gysylltiedig â ffordd o fyw eisteddog, diabetes math 2 a gordewdra, hefyd gael effaith ddwys ar heneiddio'r ymennydd, trwy ddadreoleiddio bioegniëg niwronau, hyrwyddo llid a gwaethygu straen ocsideiddiol (Di Francesco, Di Germanio, Bernier, & de Cabo, 2018).

Yn yr is-adrannau dilynol, bydd effeithiau camweithrediad mitocondria, llwybrau clirio, a niwrogenesis yn cael eu hystyried yn fwy manwl.

### 1.2.1. Camweithrediad mitochondria

Mae nodweddu swyddogaethol ac isadeiledd mitochondria yn ystod heneiddio wedi tynnu sylw at amrywiaeth o newidiadau sy'n gysylltiedig ag oedran, gan gynnwys camweithrediad ETC (Pandya et al., 2015; Pandya, Royland, MacPhail, Sullivan, & Kodavanti, 2016; Pollard, Craig, & Chakrabarti, 2016), ac amhariad ar ddeinameg ymholltiad ac ymasiad (fission and fusion) (Morozov, Datta, Paspalas, & Arnsten, 2017; Stahon et al., 2016). Mae newidiadau o'r fath yn debygol o gael canlyniadau nodedig ar swyddogaeth yr ymennydd, o gofio bod niwronau'n defnyddio ocsidiad pyrwfad mitochondriaidd sy'n deillio o glwcos yn bennaf i fodloni eu gofynion egniol (Cunnane et al., 2020). Sefydlwyd hyn yng nghyd-destun y system dopamin nigrostriatal, sy'n gwaelodi'r camweithredau symudol a welir yn PD a syndromau Parkinsonism eraill (Dauer & Przedborski, 2003). Yn wir, mae cemegau sy'n atal cymhlygyn 1 o'r ETC, megis rotenon a MPTP (Cleeter, Cooper, & Schapira, 1992) yn achosi syndrom Parkinsonism mewn cnofilod (Duan & Mattson, 1999; Sherer, Kim, Betarbet, & Greenamyre, 2003), primatiaid annynol (non-human primates) (Maswood et al., 2004) a mewn bodau dynol (Ballard, Tetrud, & Langston, 1985). Dengys hefyd bod galluedd ocisdeiddiol mitochondrial nigrostriataidd yn cydberthyn â difrifoldeb camweithrediad symudiad mewn primatiaid annynol yn absenoldeb unrhyw sarhad ffarmacolegol (Pandya et al., 2015).

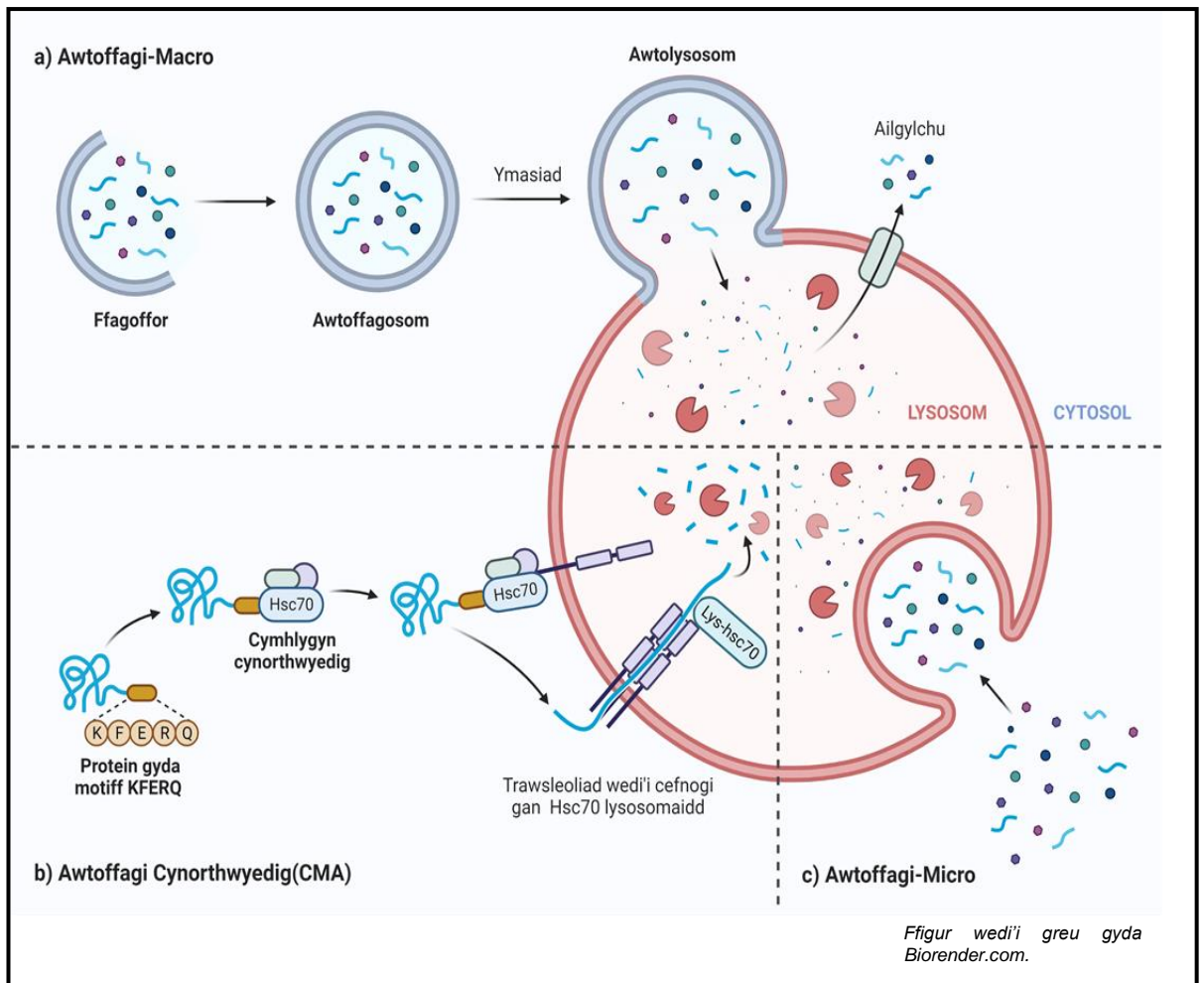
## 1.2.2. Llwybrau clirio ac atgyweirio diffygiol

Gan fod niwronau yn agored iawn i groniad difrod cellog, mae'n sefyll i reswm bod angen llwybrau clirio ac atgyweirio effeithlon iawn arnynt er mwyn atal dirywiad swyddogaethol sy'n gysylltiedig ag oed (Mattson & Arumugam, 2018). Yn wir, mae prosesau a swyddogaethau llwybrau atgyweirio DNA (Leandro, Sykora, & Bohr, 2015; J. L. Yang, Tadokoro, Keijzers, Mattson, & Bohr, 2010), y system wbcwitin proteasom (UPS) (Graham & Liu, 2017; VerPlank & Goldberg, 2017) ac awtoffagi (Nixon, 2013; Nixon & Yang, 2011), yn hanfodol i frwydro yn erbyn difrod DNA, agregau protein, ac organynnau camweithredol, mewn niwronau. Fel disgwylir, mae pob un o'r prosesau hyn yn cael ei dadreoleiddio yn ystod heneiddio a niwroddirywiad gysylltiedig ag oed (Mattson & Arumugam, 2018).

Gan ystyried mai awtoffagi yw prif bryder y traethawd ymchwil hwn, darperir trosolwg byr o'r broses, a'r diffygion awtoffagi'r ymennydd sy'n gysylltiedig ag oed mewn awtoffagi fan yma. Bydd trafodaethau manwl o'r mecanweithiau moleciwlaidd sy'n sail i awtoffagi, gan gynnwys y rhai sy'n digwydd mewn niwronau, yn cael eu darparu yn yn adran 1.5.

### 1.2.2.1. Trosolwg o awtoffagi

Mae'r term awtoffagi yn cyfeirio at grŵp o lwybrau mewngellol sy'n cludo cynhwysion cytoplasmig i'r lysosom er mwyn eu ddiraddio (Klionsky et al., 2021). Fel dengys ffigur 1.4, y tair brif llwybr awtoffagi yw awtoffagi-macro, awtoffagi-micro, ac awtoffagi cynorthwyedig (chaperone mediated autophagy CMA). Fodd bynnag, defnyddir y term awtoffagi yn bennaf i gyfeirio tuag at y broses awtoffagi macro. Felly, yn unol gyda confensiynau maes ymchwil awtoffagi (Klionsky et al., 2021) bydd pob defnydd o'r term awtoffagi o'r pwynt hwn ymlaen yn cyfeirio'n gyfan gwbl at y broses awtoffagi-macro.



**Ffigur 1.4. Prif Llwybrau Awtoffagi.** Yn awtoffagi-macro (a), atafaelir cargo cytoplasmig mewn organyn fesigwlar a elwir yr awtoffagosom, sydd wedyn yn ymasio â'r lysosom i ffurfio awtolysosom diraddiol. Yn awtoffagi cynorthwyedig (CMA), mae'r protein Hsc70 (heat-shock cognate protein of 70kDa) yn trawsleoli proteinau sy'n cynnwys y motiff KFERQ mewn i'r lysosom. Yn awtoffagi-micro (C), mae cargo cytoplasmig yn cludo mewn i'r lysosom drwy ymweiniad y bilen lysosomaidd.

#### 1.2.2.2. Pwysigrwydd awtoffagi i'r ymennydd

Er bod awtoffagi camweithredol yn nodwedd o rhan fwyaf o glefydau niwroddirywiol gysylltiedig ag oed, welir yr enghraifft mwyaf amlwg yn AD (Nixon & Yang, 2011). Yn wir, dengys nodweddiad isadeiledd (ultrastructural) o ymennydd AD post-mortem bresenoldeb nifer o niwritau dystroffig a gyfoethogwyd gyda adrannau awtoffagig â chynnwys cytoplasmig sydd heb ei diraddio (Nixon et al., 2005). Mae'r patholeg system awtoffagi-lysosom camweithredol a welir yn AD hefyd yn debyg i'r hyn a welir yn ymennydd cleifion ag anhwylderau etifeddol sy'n amharu ar cludiad ac asideiddio lysosomaidd (Darios & Stevanin, 2020; Nixon & Yang, 2011). Yn nodedig, mae nam niwrolegol difrifol yn nodwedd o lawer o'r afiechydon hyn (Nixon & Yang, 2011); sy'n ddarparu tystiolaeth bellach bod awtoffagi a swyddogaeth lysosomaidd yn hanfodol ar gyfer cynnal iechyd yr ymennydd. Mae ffactorau etifeddol sy'n dylanwadu ar weithgaredd lysosomaidd, ac felly awtoffagi, hefyd wedi'u nodi ar gyfer AD, gan gynnwys APOE4, y ffactor risg genynnol mwyaf ar gyfer AD dechreuad hwyr (Ji et al., 2006), a presenilin 1 (PS1) prif achos AD teuluol (J. H. Lee et al., 2010).

Mae pwysigrwydd awtoffagi ar gyfer cynnal iechyd niwral a swyddogaeth niwrolegol hefyd wedi'i ddangos mewn modelau cnofilod. Yn wir, dengys canfyddiadau arloesol Hara et al., (2006) a Komatsu et al., (2006) bod llygod sydd ag abladiad amodol niwral eang o enynnau awtoffagi hanfodol ATG5 neu ATG7 yn datblygu nodweddion patholegol niwroddirywiad, camweithrediad symudol, ac yn y pen draw yn marw cyn pryd

Mae sawl astudiaeth ddiweddar hefyd wedi cysylltu awtoffagi gyda rheolaeth cof hir dymor sy'n cysylltiedig a'r hipocampws. Yn wir, gwleir fod gweiniad uniongyrchol atalyddion ffarmacolegol o awtoffagi neu shRNA yn erbyn genynnau awtoffagi allweddol, mewn i'r hipocampws, yn amharu gyda perfformiad cnofilod mewn tasgau cof cyflyru ofn a chof gofodol (Glatigny et al., 2019; Hylín et al., 2018; Pandey, Yu, Steinmetz, & Alberini, 2021; Shehata et al., 2018).

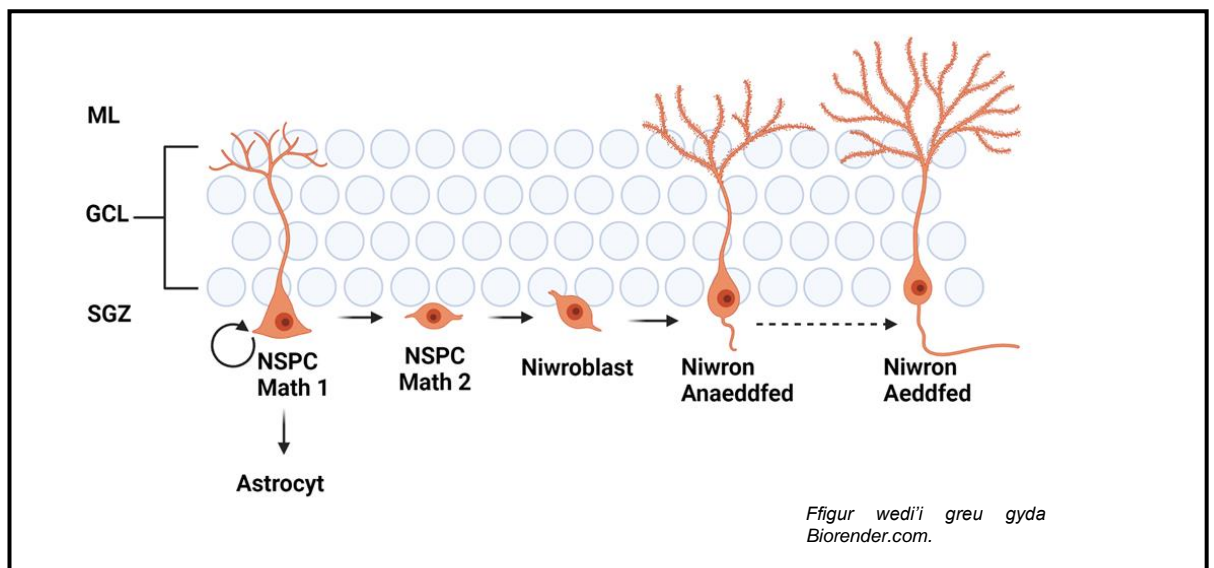
### 1.2.3. Niwrogenesis hipocampws oedolion

Mae niwrogenesis hipocampws oedolion (adult hippocampal neurogenesis-AHN) (ffigur 1.5) yn math o blastigrwydd niwronaidd gydol oes, lle mae bon-gelloedd epilol niwral (neural stem progenitor cells- NSPCs) yn ardal is-gronynnol (sub granular zone-SGZ) DG yr hipocampws, yn lluosogi, gwahaniaethu ac yn aeddfedu mewn i niwronau swyddogaethol sy'n hintegreiddio'n a'r rhyngwrdd y DG (Buntwal, Sassi, Morgan, Andrews, & Davies, 2019).

Yn nodedig, dengys niwronau newydd anedig trothwy is ar gyfer tanio potensial gweithredu rhwng 4-6 wythnos o ddatblygiad, oherwydd mynegiad is-uned NR2B derbynyddion NMDA (S. Y. Ge, Yang, Hsu, Ming, & Song, 2007). Rhoddir y priodweddau electroffisiolegol unigryw hyn y galluedd i niwronau newydd anedig i gyfrannu at gof gwahanu patrwm, lle mae atgofion gorgyffwrdd tebyg iawn yn cael eu gwahanu i gynrychioliadau cof sydd ddim yn gorgyffwrdd (Aimone, Deng, & Gage, 2011; Yassa & Stark, 2011). Yn wir, mae abladiad detholus o AHN mewn llygod, naill ai trwy arbelydru X ffocal dos isel neu fynegiad lentifiral o Wnt (cyfryngwr AHN allweddol) negyddol amlwg (dominant negative), yn amharu ar gof gwahanu patrwm (Clelland et al., 2009), tra bod ysgogiad AHN, trwy abladiad amodol o Bax ac is-reoleiddiad marwolaeth cellog apoptotig, yn gwella cof gwahanu patrwm (Sahay et al., 2011). Ymhellach, er bod AHN yn y DG rostral yn ymwneud a rheoleiddio cof episodig, mae AHN yn y DG caudal yn gysylltiedig a rheoleiddio cof sy'n gysylltiedig a phryder a straen (Anacker & Hen, 2017; Kheirbek et al., 2013).

Er gwaethaf honiadau i'r gwrthwyneb, (Sorrells et al., 2018), mae AHN dynol yn amlwg trwy gydol pob cam o fywyd (Boldrini et al., 2018; Moreno-Jimenez et al., 2019; Tobin et al., 2019). Serch hynny, mae AHN dynol yn dirywio mewn modd sy'n ddibynnol ar oed (Kozareva, Cryan, & Nolan, 2019), tra welir aflonyddiadau pellach yn AD (Moreno-Jimenez et al., 2019). Yn wir, nodwyd astudiaethau diweddar disbyddiad y pwll NSPC math 1 yn y DG wrth heneiddio (Boldrini et al., 2018), lleihad

niwroblastau mewn cleifion sydd a nam gwybyddol ysgafn (mild cognitive impairment MCI) (Tobin et al., 2019), fod lefelau uwch o AHN yn cydberthyn a chanlyniadau gwybyddol well (Tobin et al., 2019), a gostyngiadau sydyn yn nifer y niwronau anaeddfed yn ymennydd cleifion AD yng nghanam 1 Braak o gymharu â rheolyddion (Moreno-Jimenez et al., 2019). Y tu hwnt i'r canfyddiadau dynol hyn, mae astudiaethau model cnofilod wedi awgrymu ocsidiad mitochondriaidd (Beckervordersandforth et al., 2017; Stoll et al., 2011) a atgyweiriad DNA camweithredol (Regnell et al., 2012) yn ogystal â mwy o lid (Ekdahl, Claasen, Bonde, Kokaia, & Lindvall, 2003) mewn gostyngiadau AHN sy'n gysylltiedig ag oed.



**Ffigur 1.5. Niwrogenesis hipocampws oedolion (AHN).** Mae bon-gelloedd epilol niwral (NSPCs) math 1, sy'n ymrannu'n araf, yn gweithredu fel ffynhonnell cychwynnol ar gyfer genedigaeth niwronau yn ardal is-gronynnol (SGZ) y *dentate gyrus* (DG). Ymrannir y NSPCs math 1 i NSPCs math 2, sy'n lluosogi gyflym ac yn arwain at furffiad niwroblastau.

Gwahaniaethir y niwroblastau i niwronau newydd anedig, sy'n aeddfedu dros cyfnod o 6-8 wythnos, gan datblygu morffoleg nodweddiadol niwron gronynnol y dentad a integreiddio mewn i cylchedwaith cyfnodol niwronau'r haen celloedd gronynnol (GCL).

### 1.3. Cyfyngu dietegol: Ymyrryd addawol ar gyfer gwella rhychwant iechyd ac atal clefydau sy'n cysylltiedig a heneiddio

Er mwyn brwydro'n effeithiol yn erbyn morbidrwydd sy'n gysylltiedig ag oedran, yn yr ymennydd ac ar y lefel systemig, mae angen ymyriadau priodol sy'n targedu'r nodweddion moleciwlaidd sydd yn eu gwaelodi. Ymyriadau arweiniol i'r achos hyn yw cyfyngiad dietegol (dietary restriction- DR), sy'n canolbwyntio ar lleihau naill ai cymeriant calorig dyddiol, cymeriant macrofaetholion, hyd bwydo, neu gymysgedd o rain, heb gymell diffyg maeth (Di Francesco et al., 2018; Fontana & Partridge, 2015).

Mae'r paradeimau hyn wedi dod i'r amlwg fel ymyriadau cadarn ar gyfer gohirio ac atal nifer yr achosion o glefydau sy'n gysylltiedig ag oedran a chamweithrediad metabolig mewn cnofilod ac primatiaid annynol (Di Francesco et al., 2018; Fontana & Partridge, 2015; Mattison et al., 2017). Ymhellach, er gwaethaf pryderon ynghylch cydymffurfiaeth cyfranogwyr, mae paradeimau DR wedi dangos ymatebion buddiol yng nghyd destun rhychwant iechyd mewn treialon clinigol dynol gyda chyfranogwyr gordew, a rhai sydd ddim yn ordew (Dorling et al., 2021; Most, Tosti, Redman, & Fontana, 2016; Ravussin et al., 2015). Mae astudiaethau hydredol o ganmlwyddwyr Okinawan, yn darparu tystiolaeth bellach sy'n awgrymu bod DR hir dymor, ochr yn ochr â maeth digonol, yn ymestyn rhychwant iechyd ac rhychwant bywyd (Willcox et al., 2007; Willcox et al., 2004).

Yn bwysig, dengys nodweddiadau o'r mecanweithiau moleciwlaidd sy'n sail i effeithiau buddiol DR eu bod yn targedu'r un llwybrau moleciwlaidd sy'n cael eu dadreoleiddio wrth heneiddio (Di Francesco et al., 2018; Mattson & Arumugam 2018).



### 1.3.1. Cyfyngu calorïau, ymprydio ysbeidiol, ac amser bwydo cyfyngiedig

Tri patrymedd DR nodedig a ymchwiliir fel ymyriadau rhychwant iechyd yw cyfyngiad calorïau ysgafn (mild calorie restriction CR), amser bwydo cyfyngiedig (time restricted feeding-TRF) ac ymprydio ysbeidiol (intermittent fasting-IF) (Di Francesco et al., 2018).

#### 1.3.1.1. CR

Ymyrraeth lle mae cymeriant calorïau dyddiol yn cael ei leihau rhwng 10 i 40%, wrth sicrhau cymeriant maetholion a fitaminau digonol er mwyn osgoi diffyg maeth, yw CR (Di Francesco et al., 2018). CR yw'r patrwm DR a astudiwyd orau, ac ymchwiliir i'w effeithiau buddiol ar iechyd mewn dwy astudiaeth primatiaid annynol proffil uchel (Colman et al., 2009; Mattison et al., 2012) yn ogystal ag mewn treialon clinigol cam 1 (Heilbronn et al., 2006; Larson-Meyer et al., 2006; Racette et al., 2006) a cham 2 (Dorling et al., 2021; Ravussin et al., 2015; Rickman et al., 2011) gyda cyfranogwyr dynol.

Mae canfyddiadau treial clinigol CALERIE cam 2 yn arbennig o nodedig, gan eu bod yn dangos amrywiad o welliannau systemig sy'n seiliedig a rhychwant iechyd, mewn oedolion ifanc i ganol oed, heb fod yn ordew; er methodd y cyfranogwyr CR i gyrraedd y targed CR 25% bod dydd, gan cyrraedd dim ond tua 10% CR ar gyfartaledd dros dwy blynedd (Dorling et al., 2021; Ravussin et al., 2015).

Mae ymyriadau CR hefyd wedi datgelu sawl canfyddiad allweddol sy'n berthnasol i iechyd yr ymennydd. Mae'r rhain yn cynnwys, lleihau camweithrediad gwybyddol sy'n gysylltiedig ag oed ym model llygoden 3xTgAD (Halagappa et al., 2007), niworamddiffyniad yn erbyn MPTP mewn modelau Parknisonism cnofilod (Andrews et al., 2009; Bayliss et al., 2016) a primatiaid annynol (Maswood et al., 2004), ysgogiad AHN mewn cnofilod (Hornsby et al., 2016; J. Lee, Seroogy, & Mattson, 2002), lleihad mewn crebachiad breithell mewn primatiaid annynol (Colman et al.,

2009) a gwelliant cof geiriol mewn pobl henoed (Witte, Fobker, Gellner, Knecht, & Floel, 2009).

#### 1.3.1.2. TRF

Mae TRF yn cyfeirio at set o ymyriadau dyddiol sy'n canolbwyntio ar gyfyngu hyd bwyta i gyfnodau penodol o'r dydd (ffenestr 4 i 12 awr yn nodweddiadol) yn hytrach na gostyngiad mewn cymeriant calorïau (Di Francesco et al., 2018). Yn seiliedig ar ganfyddiadau mewn modelau cnofilod, mae TRF wedi dod i'r amlwg fel targed addawol ar gyfer brwydro yn erbyn gordewdra a achosir gan ddiet braster uchel (HFD), yn ogystal â phatholegau afu brasterog a chamweithrediad metabolig cysylltiedig, trwy gywiro rhythmau cricadaidd sydd wedi aflonyddu (Chaix, Manoogian, Melkani, & Panda, 2019; Hatori et al., 2012). Dangoswyd bod TRF 16:8, lle mae ffenestr ymprydio 16awr a ffenestr fwydo 8awr, yn rheoleiddio plastigrwydd synaptig hipocampaidd mewn llygod, hefyd (Dasgupta, Kim, Manakkadan, Arumugam, & Sajikumar, 2018).

Dylid nodi hefyd bod arbrofion CR safonol mewn cnofilod hefyd yn ymgorffori elfennau TRF yn anfwriadol, gan fod yr anifeiliaid yn bwyta eu holl fwyd penodedig o fewn ffrâm amser fer iawn (1-2 awr cyntaf y cyfnod tywyll) ac wedi hynny yn cael ei amddifadu o fwyd tan y ffenestr fwydo nesaf y diwrnod canlynol (Acosta-Rodriguez, de Groot, Rijo-Ferreira, Green, & Takahashi, 2017). Felly mae darganfod a yw effeithiau buddiol CR mewn astudiaethau cnofilod, gan gynnwys y rhai sy'n ymwneud â gwybyddiaeth a niwroamddiffyniad, o ganlyniad i gymeriant calorig, TRF, neu cymysgedd o'r dau yn hynod o bwysig (Aon et al., 2020; Mitchell et al., 2019).

### 1.3.1.3. IF

Mae IF yn cyfuno egwyddorion sylfaenol CR a TRF, trwy fodiweiddio cymeriant calorïau a hyd y cymeriant bwyd (Di Francesco et al., 2018). Fodd bynnag, yn wahanol i'r patrymau dietegol uchod, nid yw IF yn ymyrraeth ddyddiol ac yn hytrach yn cynnwys cylchoedd ysbeidiol o fwydo ad libitum ac ymprydio, lle mae'r unigolyn yn bwyta naill ai dim neu ddim mwy na 25% o'u cymeriant calorig arferol (Di Francesco et al., 2018). Mae enghreifftiau nodedig yn cynnwys bwydo bob yn ail ddiwrnod (alternate day feeding ADF), sy'n ailadrodd cylchoedd bwydo ac ymprydio 24awr, a 5: 2 IF, sy'n cynnwys 5 diwrnod o fwydo AL a 2 ddiwrnod ymprydio annilydol yr wythnos (Di Francesco et al., 2018).

Mae IF wedi ennill sylw arbennig fel ymyrraeth ar gyfer ysgogi iechyd a gwybyddiaeth niwral, yn seiliedig ar ganfyddiadau addawol o fodolau cnofilod a osodwyd ar ADF. Mae'r rhain yn cynnwys ysgogiad grymiant hirdymor (long term potentiation LTP) hipocampaid, AHN a phrosesau cof a dysgu cysylltiedig (Dias et al., 2021 ; Fontan-Lozano et al., 2007; J. Lee et al., 2002), niwroamddiffyniad hipocampaid ar ôl niwed gyda asid cainic (Bruce-Keller, Umberger, McFall, & Mattson, 1999), ac niwroamddiffyniad dopaminergig ar ôl niwed gyda MPTP (Duan & Mattson, 1999).

Ar y lefel foleciwlaidd, mae'r ffactor niwrotroffig BDNF wedi'i nodi fel cyfryngwr allweddol ymatebion IF niwronau (Duan & Mattson, 1999; J. Lee et al., 2002), tra fod modiweiddiad is-unedau derbynnnydd NMDA hefyd yn bwysig (Fontan-Lozano et al., 2007). Cynigiwyd hefyd bod newid o metaboledd sydd yn seiliedig ar glwcos, yn ystod bwydo a champau cychwynol ymprydio, i metaboledd cetonau yn ystod camau olaf ymprydio, yn ysgogi signalu ymateb straen addasol niwronau a hyrwyddo gwytnwch yn erbyn cronïad difrod sy'n gysylltiedig ag oed (Mattson, Moehl, Ghena, Schmaedick, & Cheng, 2018).

### 1.3.2. Dynwardwyr DR

Pan cymhwysir mewn oedolion ifanc a chanol oed, mae gan y patrymau DR a drafodwyd uchod botensial sylweddol i ohirio ac atal morbidrwydd systemig a niwral sy'n gysylltiedig ag oed. Ond nid yw eu haddasrwydd fel ymyrraeth therapiwtig ddefnyddiol mewn cleifion oedrannus sy'n dioddef o gyflyrau o'r fath yn eglur. Yn benodol, pryderir fydd ymyriadau DR yn gwaethygu eiddilwch yn ogystal â thueddiad i glefyd heintus (Di Francesco et al., 2018).

Felly, i gymhwyso effeithiau buddiol DR ar gleifion oedrannus sy'n dioddef o batholegau sy'n gysylltiedig ag oed, mae angen cyfryngau ffarmacolegol sy'n efelychu'r llwybrau moleciwlaidd sylfaenol. Yn nodweddiadol cyfeiriwyd at yr cyfryngau hyn fel dynwardwyr CR (CR mimetics) yn y llenyddiaeth (Di Francesco et al., 2018; Mattson & Arumugam, 2018), fodd bynnag cyfeirir atynt fel dynwardwyr DR yn y traethawd hir hwn, i gwmpasu TRF ac IF hefyd.

Darganfuwyd ymchwil dros y ddau ddegawd diwethaf sawl ymgeisydd blaenllaw ar gyfer dynwardwyr DR, gan gynnwys rapamycin (Rap), resferatrol (Resv) metformin, 2-deocsiglwcoc a nicotinamid ribosid (Mattson & Arumugam, 2018). Er bod dynwardwyr DR penodol yn targedu agweddau penodol o'r ymatebiad DR, megis sensitifedd inswlin, signalau ymateb i straen addasol a actifedd BDNF (Mattson & Arumugam, 2018), thema cyffredin a welir yw newid o lwybrau anabolig, sy'n ddrud yn nhermau egnïol, i lwybrau catabolig sy'n cynhyrchu egni (ATP) (Mattson et al., 2018). Rheoleiddion mewngellol hanfodol y cydbwysedd metabolig hwn yw'r echelin signalu AMPK-mTORC1, gydag AMPK yn gweithredu fel y prif reoleidd pro-catabolig (Hardie, Ross, & Hawley, 2012) a mTORC1 yn gweithredu fel y prif reoleidd pro-anabolig (Howell & Manning, 2011). Fel amlygir yn yr adrannau dilynol (1.4, 1.5, 1.6) mae'r llwybr signalu hwn yn hynod berthnasol i gynnwys y traethawd ymchwil hwn.

### 1.3.2.1. AMPK

Mae cinas protein sydd wedi'i actifadu gan AMP (AMPK) yn synhwyrdd egni hollbresennol ewcaryotaidd, sy'n hyrwyddo goroesiad y cell mewn ymateb i disbyddiad egni mewngellog trwy is-rheoleiddo prosesau anabolig sy'n ddrud iawn o rhan eu defnydd egni (i.e ATP), ac uwch-rheoleiddo prosesau catabolig sy'n cynhyrchu ATP (Gowans, Hawley, Ross, & Hardie, 2013; Hardie, 2011; Kahn, Alquier, Carling, & Hardie, 2005).

Bodolir y cinas fel heterotrimer sy'n cynnwys is-unedau  $\alpha$ ,  $\beta$  ac  $\gamma$ , ac wedi'i rannu'n ddau fodiwl strwythurol; parth catalytig ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) a pharth rhwymo niwcleotid ( $\gamma$ ) (Xiao et al., 2007; Xiao et al., 2011; Xin, Wang, Zhao, Wang, & Wu, 2013). Cyfryngir y swyddogaeth synhwyro egni trwy rwymo cystadleuol rhwng y niwcleotidau adenin, AMP, ATP, ac i raddau llai, ADP, i'r pcedai rhwymo niwcleotid a ffurfiwyd gan 4 parth synthas-cystathionin- $\beta$ - (CBS) yn yr is-uned  $\gamma$  (Gowans et al., 2013; Xiao et al., 2007). Mae rhwymiad AMP yn actifadu'r cinas trwy mecanwaith alosterig, gan amddiffyn hydrocsyl ochr-gadwyn thr 172 yn y dolen actifadu cinas N-derfynell rhag dadffosfforyleiddiad (Gowans et al., 2013). Ar y llaw arall mae rhwymiad ATP yn agor thr172 i dadffosfforyleiddiad ac felly yn atal actifedd yr ensym (Gowans et al., 2013). Dengys profion *in vitro* 'cell free' bod ffosfforyleiddiad y gweddill hon yn cynyddu actifedd yr ensym 100-gwaith drosodd (Hawley et al., 1996). Y brif cinasau sy'n gweithredu'r ffosfforyleiddiad ysgogol hwn yw cinas yr afu B1 (LKB1) (Hawley et al., 2003; Shaw et al., 2004; Woods et al., 2003) a cinas cinas-beta sy'n dibynnu ar calsiwm-calmodwlin (CaMKK $\beta$ ) (Hawley et al., 2005; Woods et al., 2005).

### 1.3.2.2. mTORC1

Mae mTORC1 yn un o dau cymhlygyn nodedig a ffurfiwyd gan y cinas serin-threonin y targed mecanyddol rapamycin (mechanistic target of rapamycin -mTOR), ac yn cynnwys yr is-unedau rheoleiddio craidd Raptor a mLST8, yn ogystal a'r is-unedau atodol PRAS40 a DEPTOR (G. Y. Liu & Sabatini, 2020). Mewn cyferbyniad i AMPK, mae mTORC1 yn ysgogi llwybrau anabolig ac yn atal llwybrau catabolig mewn ymateb i amodau maeth cyflawn, gan hybu twf ac ymraniad cellog (Liu & Sabatini, 2020).

Rheolwyd actifedd mTORC1 yn bennaf gan cyflwr llwytho niwcleotidau-gwanylyl dau GTPas bach math-Ras Rheb a Rag, sy'n trawsddygu signalau o ffactorau twf ac asidau amino, yn ei tro (Liu & Sabatini, 2020). Pan mae GTP wedi'i llwytho, mae Rheb yn actifadu mTORC1 (Sancak et al., 2008). Ar y llaw arall, nid yw Rheb yn actifadu mTORC1 pan mae GDP wedi'u llwytho (Sancak et al., 2008). Cyd-drefnwyd cyflwr llwytho GTP/GDP Rheb gan y cymhlygyn TSC1-TSC2-TBC1D7, gyda TSC2 yn gweithredu fel protein actifadu GTPas (GAP) (Dibble et al., 2012; Inoki, Li, Xu, & Guan, 2003). Mewn ymateb i ffactorau twf mae cinasau mitogenig fel ERK (Ma, Chen, Erdjument-Bromage, Tempst, & Pandolfi, 2005) ac AKT (Inoki, Li, Zhu, Wu, & Guan, 2002) yn atal actifedd GAP TSC2, sydd yn atal actifedd GTPas Rheb ac yn sicrhau bod GTP wedi'u llwytho (Inoki et al., 2003), gan arwain at ysgogiad mTORC1 (Sancak et al., 2008). Yn absenoldeb signalu ffactorau twf, mae TSC2 yn ysgogi actifedd GTPas Rheb (Inoki et al., 2003), sy'n arwain at hydrolysis GTP i GDP, a felly nid yw Rheb yn ysgogi mTORC1 (Long, Lin, Ortiz-Vega, Yonezawa, & Avruch, 2005). Fodd bynnag, mae ysgogiad mTORC1 gan Rheb yn dibynnu ar recriwtiad mTORC1 i bilenni endo-lysosomaidd lle mae Rheb wedi'u lleoli (Liu & Sabatini, 2020). Hyrwyddwyd y broses hwn gan llwybr signalu eang, sy'n sensitif i lefelau asidau amino ac yn cyfuno ar y GTPasau Rhag (Liu & Sabatini, 2020). Gellir ffeindio trafodaeth fanwl o'r rhyngweithiadau a mecanweithiau sy'n

gwaelodi rheoleiddiad mTORC1 ar bilenni lysosomaidd yn adroddiad Liu a Sabaini (2020).

#### 1.3.2.3. Heriau ar gyfer therapiwtegau niwral

Her fawr sy'n wynebu cymhwysiad niwral dynwardwyr DR, ac unrhyw therapiwtig yn erbyn cyflyrau niwrolegol o ran hynny, yw bioargaeledd gwael ar gyfer ymlifiad niwronaidd. Achosir hyn yn bennaf gan fethiant therapiwtigau i dreiddio'r gwahanfur gwaed-ymennydd (blood brain barrier BBB) (Abbott, Dolman, & Patabendige, 2008). Er gellir goresgyn y rhwystr hwn trwy gweiniad uniongyrchol i'r ymennydd mewn astudiaethau mecanistig yn modelau cnofilod, nid yw'r strategaeth hwn yn dichonadwy ar gyfer trin clefyd dynol, neu hyd yn oed fodelu ffisiolegol mewn cnofilod. Mae'n hanfodol felly bod asiantau ffarmacolegol a bwriedir i drin clefydau niwroddirywiol neu wella gwybyddiaeth, yn cael eu gweini trwy'r cylchrediad, ac wedi hynny yn croesi'r BBB gydag effeithiolrwydd uchel (Abbott et al., 2008). Felly mae cyffuriau sy'n croesi'r BBB yn rhwydd, neu'r rhai sy'n ysgogi ffactorau niwrogenig a niwroamddiffynol mewndarddol yn delfrydol ar gyfer trin camweithrediad niwrolegol sy'n cysylltiedig ag oedran. Un enghraifft o'r fath yw'r hormon mewndarddol ghrelin, a secretir mewn ymateb i gyfyngiad dietegol, yn croesi'r BBB (Banks, Tschop, Robinson, & Heiman, 2002; Diano et al., 2006), ac yn yn rheoleiddio, swyddogaeth niwronau allweddol a metaboledd systemig (Buntwal et al., 2019; Yanagi, Sato, Kangawa, & Nakazato, 2018).

## 1.4. Ghrelin

Hormon gastroberfeddol orecsigenig sy'n cael ei rhyddhau i'r cylchrediad yn ystod cydbwysedd egni negyddol (h.y. cyfyngu calorïau ac ymprydio) yw ghrelin (Yanagi et al., 2018), a darganfuwyd yn wreiddiol gan (Kojima et al., 1999) mewn echdyniadau o stumog llygod mawr. Cyfryngir ghrelin myrdd o effeithiau ffisiolegol gan gynnwys secretiad hormon twf o'r chwarren bitwidol, rheoleiddio symudedd a gwagio gastrig, a chyfathrebu'r cyflwr maeth perifferol i'r hypothalmws er mwyn cynnal homeostasis metabolig (Yanagi et al., 2018). Yn ogystal ar swyddogaethau uchod, mae ghrelin hefyd yn ysgogi plastigrwydd hipocampaidd (Diano et al., 2006) gan gynnwys AHN (Hornsby et al., 2016; Kent et al., 2015) ac yn mynnu effeithiau niwroamddiffynol mewn modelau cnofilod PD (Andrews et al., 2009; Bayliss et al., 2016) ac AD (Kang, Moon, Kim, Kim, & Park, 2015; Santos et al., 2017). Felly mae gan ghrelin botensial therapiwtig sylweddol ar gyfer modiwlleiddio iechyd, ac yn benodol, iechyd niwral wrth heneiddio.



### 1.4.1. Synthesis, prosesi a secretiad ghrelin

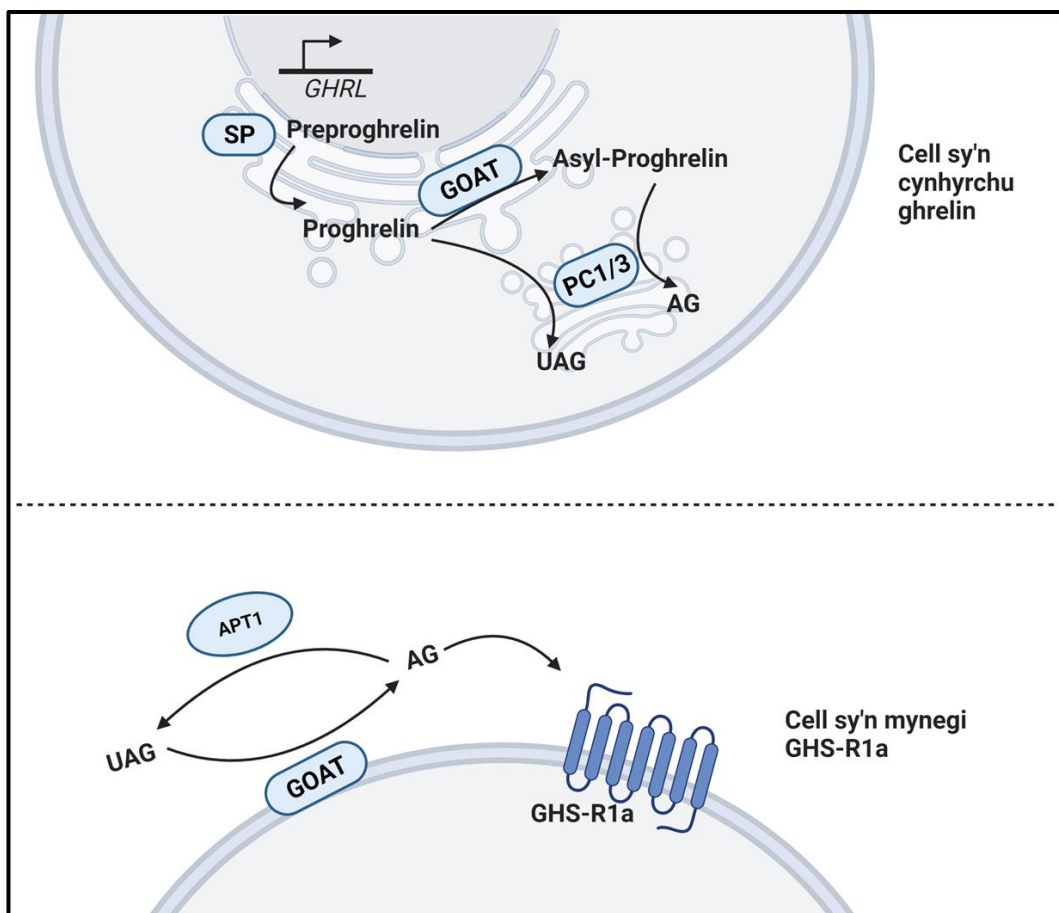
Mae celloedd sy'n secretu ghrelin wedi'u lleoli ledled haen mwcosaidd y llwybr gastroberfeddol (Sakata et al., 2002), gyda'r poblogaeth fwyaf, sef y celloedd math X/A, wedi'u leoli yn y ffwdws gastrig (Date et al., 2000). Cynhyrchwyd ghrelin gan celloedd organau arall hefyd, ond ar lefelau llawer is mewn cymhariaeth i'r stwmog ar coluddyn (Yanagi et al., 2018). Mynegir ghrelin i ddechrau fel polypeptid preproghrelin 117-gweddillion asidau amino, sy'n cynnwys dilyniant signal N-derfynell 23-gweddillion a'r dilyniant proghrelin 94-gweddillion dilynol (Kojima & Kangawa, 2005).

Fel darlunnir ffigur 1.6 mae cyfres o drawsnewidiadau ensymol ar hyd y llwybr secretiad yn trosi preproghrelin i'r peptid ghrelin aeddfed a gweithredol (Muller et al., 2015; Yanagi et al., 2018). Y mwyaf nodedig o'r rhain yw asyleiddiad hydrocsyl serin-3 gan yr ensym asyltransferas-O-ghrelin (Ghrelin-O-acyltransferase-GOAT) sydd wedi'u rhwymo i bilen y reticwlwm endoplasmig (ER) (Gutierrez et al., 2008; J. Yang, Brown, Liang, Grishin, & Goldstein, 2008). O ganlyniad i'r adwaith hon, bodolir ghrelin fel dau brif ffurf, asyl-ghrelin (acyl-ghrelin AG) ac ghrelin heb ei asyleiddio (unacyl-ghrelin UAG) (Hosoda, Kojima, Matsuo, & Kangawa, 2000; Kojima et al., 1999).

Yn bennaf, defnyddir GOAT asid ocatnoig fel swbstrad ar gyfer asyleiddiad ghrelin (Gutierrez et al., 2008; Kirchner et al., 2009; Yang et al., 2008). Er hynny, gellir GOAT defnyddio asidau brasterog cadwyn-byr a cadwyn-canolog eraill ar gyfer yr adwaith (Kirchner et al., 2009). Dengys, Kirchner et al. (2009) bod gan lygod sy'n bwydo ar ddiet llawn tri-hepatanoad lefelau AG sydd wedi cyfuno i asid heptanoig uwch na AG sydd wedi cyfuno i asid octanoig. Ymddengys felly bod asyleiddiad ghrelin gan GOAT yn gysylltiedig â chyflenwad dietegol asidau brasterog rhydd.

Ar ôl cynhyrchiad, pecynnir AG ac UAG mewn i ronigion secretiad, a secretir i'r cylchrediad (Muller et al., 2015). UAG yw'r ffurf gylchredol fwyaf niferus, gyda chrynodiad cylchredol AG tua 20% hynny UAG (Hosoda et al., 2000). Fodd bynnag,

ar lefelau ffisiolegol, dim ond AG sy'n gweithredu fel ligand mewndarddol ar gyfer y derbynnydd cytras; derbynnydd secretwyr hormon twf (Growth hormone secretagogue receptor GHS-R) (Kojima et al., 1999). Reolir asyleiddiad ghrelin hefyd gan sawl ensym dadasyleiddio, gan gynnwys thioesteras asyl-protein 1 (APT1) a colinesteras-bwtyryl (Satou, Nishi, Yoh, Hattori, & Sugimoto, 2010; Satou & Sugimoto, 2012). O ganlyniad, mae gan AG hanner oes cylchredol isel iawn (Satou et al., 2010; Satou & Sugimoto, 2012).



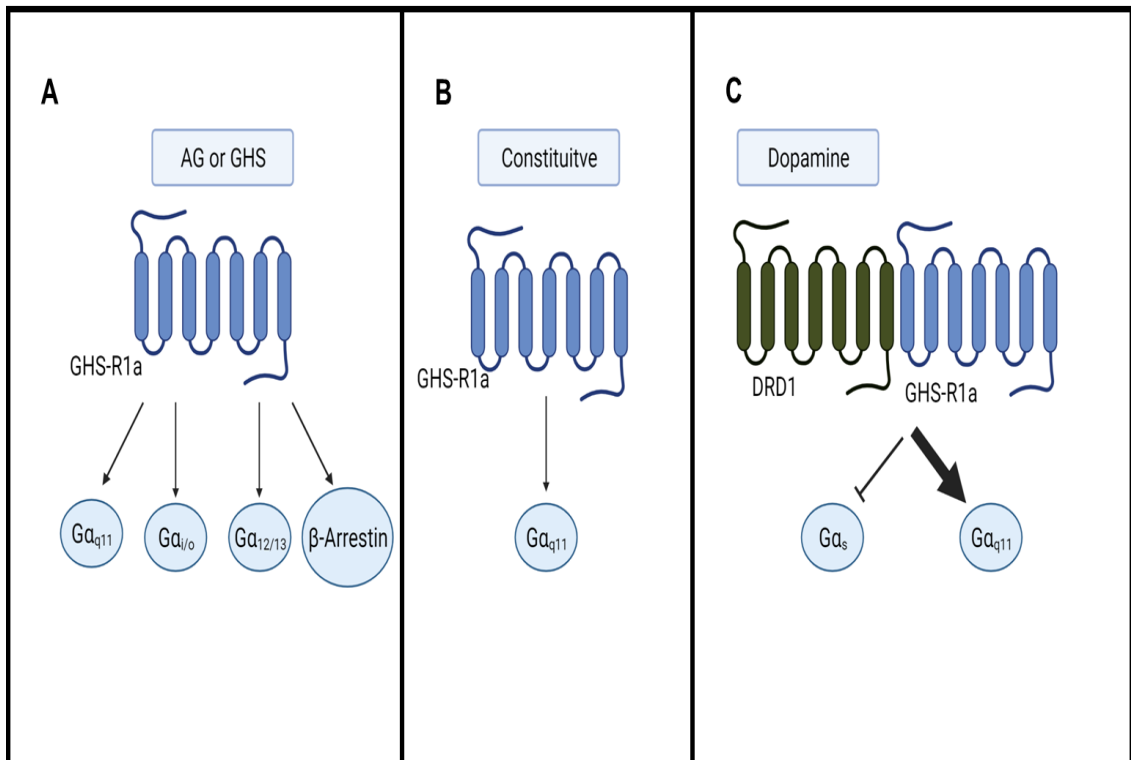
**Ffigur 1.6. Trosolwg o synthesis a phrosesi ghrelin, a brif cydrannau'r echelin signalu ghrelin.** Syntheseiddir ghrelin o'r gennyn GHRL fel polypeptid 117-gweddillion a elwir preproghrelin. Targedir, preproghrelin i lwmen y reticwlwm endoplasmig (ER), ar gyfer mynediad i'r llwybr secretiad, gan signal N-terfynell 23-gweddillion. Wedi hynny cynhyrchir polypeptid 94-gweddillion proghrelin trwy ymraniad y peptid signalu gan yr ensym signal peptidas (SP). Mae asyleiddiad proghrelin gan asyltransferas o-ghrelin (GOAT), sydd wedi'i rhwymo i bilen yr ER ac yn defnyddio asid octanoig yn bennaf fel cyd-swbstrad yn arwain at ddau bwl penodol o proghrelin. Yn dilyn cludiant i'r organyn golgi, mae proghrelin ac asyl-proghrelin yn cael eu trawsnewid, gan yr ensym trawsnewidas prohormonau (prohormone convertase), i peptidau aeddfed 28 gweddillion, ghrelin sydd heb ei asyleiddio (unacyl-ghrelin UAG) ac asyl-ghrelin (AG). Ar ôl secretu i'r cylchrediad mae AG yn agored i dadasyleiddiad gan sawl ensymau dadasyleiddio, megis thioesteras protein-asil 1 (APT1). Mewn rhai meinweodd, gellir GOAT sydd wedi rhywmo i'r bilen plasmadd gwrthwynebu'r dadasyleiddiad hwn. Ysgogir signalu ghrelin yng nghelloedd targed trwy rhwymiad AG i'r derbynydd cytras y derbynydd secretwyr hormon twf 1a (growth hormone secretagogue receptor GHS-R1a).

### 1.4.2. Signalu AG-GHS-R

Mae GHS-R1a yn derbynnydd sydd wedi cwpledi a phrotein-G (G-protein coupled receptor (GPCR), a ddarganfuwyd fel derbynnydd amddifad ar gyfer secretwyr hormon twf synthetig (GHSs) dair blynedd cyn darganfyddiad ghrelin (Howard et al., 1996). Sefydlwyd asesiadau cychwynnol fod GHS-R1a yn ysgogi rhyddhad GH drwy'r llwybr signalu ffosfolipas C $\beta$  (Phospholipase C $\beta$  PLC $\beta$ ) is-lawr i G $\alpha_{q/11}$  (Howard et al., 1996). Mae'r llwybr canonaidd hwn hefyd yn cyfryngu effeithiau AG-GHS-R1a yn y hypothalamws (Andrews et al., 2008) a'r Substantia Nigra (Bayliss et al., 2016).

Fodd bynnag, nid yw signalu GHS-R1a, wedi'i gyfyngu i'r llwybr canonaidd G $\alpha_{q/11}$ -PLC $\beta$ . Yn wir, gellir GHS-R1a signalu hefyd trwy broteinau G eraill, megis G $\alpha_{12/13}$  a G $\alpha_{i/o}$ , yn ogystal a  $\beta$ -arrestin (Hedegaard & Holst, 2020). Ymhellach, gellir, GHS-R1 heterodimeru gyda sawl derbynnydd arall (Hedegaard & Holst, 2020), gyda derbynnyddion dopamin DRD1 yn y hipocampws (Kern et al., 2015) a DRD2 yn y hypothalamws (Kern, Albarran-Zeckler, Walsh, & Smith, 2012) yn enghreifftiau nodedig.

Ychwanegir cymhlethdod pellach wrth ystyried bod GHS-R1a yn arddangos lefel uchel o weithgaredd cyfansoddiadol (constitutive) yn absenoldeb rhwymo ligand *in vitro* (Holst, Cygankiewicz, Jensen, Ankersen, & Schwartz, 2003). At ei gilydd, mae signalau GHS-R1a yn anhygoel o gymhleth (Hedegaard & Holst, 2020).

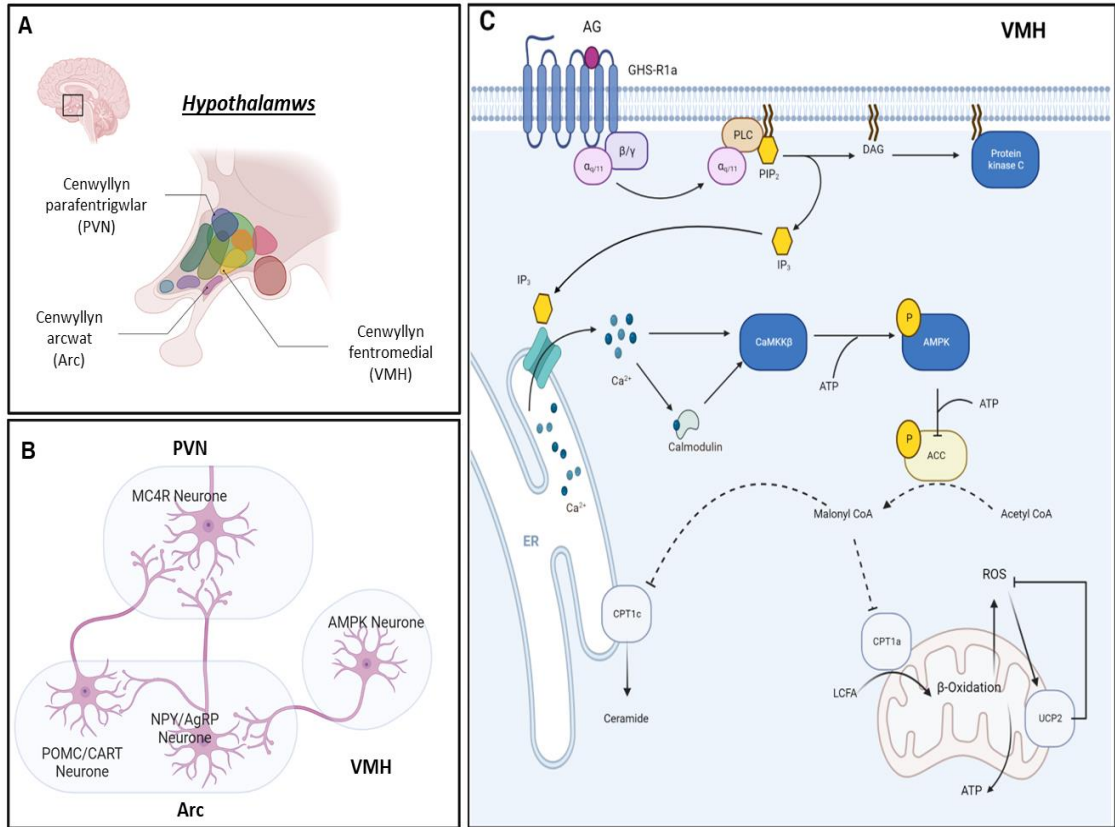


**Ffigur 1.7. Trosolwg o lwybrau signalu GHS-R1a.** Yn ogystal a signalu trwy proteinau G ac  $\beta$ -arrestin mewn ymateb i rhymo ligand AG neu secretwyr hormon twf synthetig (GHS) (A), mae gan GHS-R actifedd cyfansoddol (B), tra mae heterodimereiddio gyda derbynyddion eraill mewn modd sy'n annibynnol o AG, yn modiwlleiddio llwybrau cypledig y derbynydd mae GHS-R yn ei rhwymo i (fel derbynydd dopamin DRD1).

### 1.4.3. A yw ghrelin yn hormon archwaeth?

Yn fuan ar ôl ei ddarganfod (Kojima et al., 1999), canfuwyd sawl astudiaeth fod triniaeth alldarddol AG, naill ai i'r perifferi, neu'n uniongyrchol i'r hypothalmws, yn hyrwyddo cymeriant bwyd, codi pwysau a blonegrwydd (adiposity) mewn modelau cnofilod (Nakazato et al., 2001; Tschop, Smiley, & Heiman, 2000; Wren, Small, et al., 2001; Wren et al., 2000). Yn unol a'r canfyddiadau cyn-clinigol hyn, dengys treialon clinigol gyda samplau fyr o gyfranogwyr dynol, bod gweiniad AG yn cynyddu cymeriant egni ar ôl bwydo (Wren, Seal, et al., 2001), a fod lefelau cylchredol AG mewndarddol yn cynyddu cyn bwyta, ac yn disgyn i eu lefelau isaf awr ar ôl bwyta (Cummings et al., 2001).

Dengys astudiaethau mecanistig dilynol bod swyddogaethau orecsigenig asyl-ghrelin yn cael ei gweithredu gan nerfogaeth uniongyrchol niwronau sy'n cyd-mynegi niworpeptid Y (NPY) a pheptid-cysylltiedig-Agouti (Agouti-related-peptide-AgRP) (H. Y. Chen et al., 2004; Cowley et al., 2003) (ffigur 1.8B). Hyrwyddwyd cymeriant bwyd gan y niwronau orecsigenig hyn trwy wrthwynebu gweithrediad niwronau anorecsigenig melanocortin yn yr hypothalmws parafentrigwlar (Baldini & Phelan, 2019; Cone, 2005). Gweithiwyd hyn drwy effeithiau synaptig ataliol uniongyrchol a hefyd drwy atal nerfogaeth anorecsigenig gan niwronau POMC/CART yn yr Arc (Baldini & Phelan, 2019; Cone, 2005) (ffigur 1.8B). Ymhellach, mae sawl astudiaeth wedi dadorchuddio pwysigrwydd signalu AG-GHS-R1a mewn niwronau glwtamatergig yn y VMH, ar gyfer ysgogiad niwronau AgRP/NPY yn yr Arc (ffigur 1.8B,C) (Andrews et al., 2008; Gao et al., 2013; Lopez et al., 2008; Ramirez et al., 2013; Yang et al., 2011).



**Ffigur 1.8. Signalu orecsigenig ghrelin yn y hypothalamws. A)** Diagram o'r hypothalamws dynnol, gyda'r cnewyll parafentrigwlar (PVN), fentromedial (VMH) ac arcwat (Arc) wedi'u labeli. **B)** Trosolwg o'r brif llwybrau niwronaidd sy'n gweithredu effeithiau orecsigenig ghrelin. **C)** Llwybr signalu arfaethedig AG-GHS-R1a yn y VMH.

Sefydlodd y canfyddiadau uchod statws ghrelin fel hormon archwaeth (cychwynnwr pryd bwydo ffisiolegol) yn ogystal a tharged therapiwtig nodedig ar gyfer trin gordewdra (Uchida, Zigman, & Perello, 2013).

Fodd bynnag, ni welir yn gyffredinol y canlyniadau disgwylidig ar gyfer hormon archwaeth, ar gymeriant bwyd, pwysau corff, neu fàs braster, gydag addasiadau genynnol prif cydrannau echelin signalu ghrelin mewn llygod (Mani & Zigman, 2017; Uchida et al., 2013). Yn wir, ni cynyddir pwysau corff neu fàs braster mewn llygod gyda gor-mynegiad trawsgenynnol ghrelin (Bewick et al., 2009; Reed et al., 2008) neu ghrelin sydd wedi'i addasu i gael actifedd parhaus (trwy amnewid serin 3 i tryptoffan) (Yamada et al., 2010), tra welir canfyddiadau anghyson ar gyfer cymeriant bwyd. Yn yr un modd, nid yw abladiad genynnol ghrelin (Sun, Ahmed, & Smith, 2003; Wortley et al., 2004) neu GOAT (Gutierrez et al., 2008; Kirchner et al., 2009; Zhao et al., 2010) yn lleihau pwysau corff neu fàs braster mewn anifeiliaid sydd wedi bwydo ar diet arferol.

Mae dileu genynnau ghrelin a GHS-R gyda'i gilydd yn cynyddu pwysau'r corff yn sylweddol, ond mae hyn o ganlyniad i gynnydd mewn gwariant egni a gweithgaredd modur, heb unrhyw effeithiau ar gymeriant bwyd (Pfluger et al., 2008). Yn y diwedd, er bod rhai astudiaethau wedi nodi canlyniadau cadarnhaol, yn enwedig o ran bwydo hedonig a gordewdra a achosir gan HFD (Zigman et al., 2005), ni awgrymir y tystiolaeth o modelau genynnol echelin signalu ghrelin bod ghrelin mewndarddol yn gweithredu fel hormon archwaeth homeostatig (Mani & Zigman, 2017; Uchida et al., 2013).



#### 1.4.4. A yw ghrelin yn hormon goroesiad?

Tra bo anghydfod ynghylch swyddogaeth ghrelin fel hormon archwaeth, mae yna tystiolaeth nodedig bod rheolaeth metaboledd glwcos systemig gan yr echelin ghrelin yn broses ffisiolegol allweddol ar gyfer iechyd a goroesiad organebol (Mani & Zigman, 2017; Mani, Shankar, & Zigman, 2019).

Yn ystod cydbwysedd egni negyddol aciwt (e.e cyn bwydo neu yn ystod ymprydio dros nos) mae'r echelin ghrelin yn cynnal lefelau glwcos cylchredol trwy wrthwynebu gweithgaredd inswlin ar ymlifiad glwcos, wrth atal secretiad inswlin o celloedd  $\beta$  y pancreas (Broglio et al., 2001; Dezaki et al., 2004; Dezaki, Kakei, & Yada, 2007; Reimer, Pacini, & Ahren, 2003; Tong et al., 2010), ac ysgogi secretiad glwcagon o celloedd  $\alpha$ - y pancreas (Chuang et al., 2011). Mae secretiad somatostatin o gelloedd  $\delta$  hefyd yn gysylltiedig â rheoleiddio inswlin a glwcagon mewn ymateb i ghrelin yn y pancreas (Adriaenssens et al., 2016; DiGruccio et al., 2016). Yn nodedig, mae gwrthweithyddion ffarmacolegol GHS-R1a (Dezaki et al., 2006; Esler et al., 2007; Longo et al., 2011) neu GOAT (Barnett et al., 2010), yn ogystal a abladiad genynnau ghrelin (Bewick et al., 2009; Dezaki et al., 2006; Reed et al., 2008; (Sun, Butte, Garcia, & Smith, 2008) GOAT (Zhao et al., 2010) neu GHS-R (Longo et al., 2008), yn gwella sensitifedd inswlin a goddefedd glwcos mewn llygod.

Fodd bynnag, mae pwysigrwydd cynnal homeostasis glwcos gan ghrelin yn dod yn hynod amlwg yn ystod newyn hir, yn enwedig ar ôl disbyddu cronfeydd braster (Fang, Shi, Brown, Goldstein, & Liang, 2019; R. L. Li et al., 2012; Zhang, Fang, Goldstein, Brown, & Zhao, 2015). Yn wir, mae llygod sydd ar gennyn GOAT wedi ei ddileu (GOAT knockout (KO) mice), lle mae absenoldeb llwyr o AG cylchredol, yn datblygu hypoglycemia dwys ac ar fun marw ar ol bwydo ar ddietau CR difrifol (> 60% CR) am wythnos (Zhao et al., 2010). Yn nodedig, mae gweiniad alldarddol swbstradau glwconeogenig (lactad, pyrwfad, alanîn, neu asidau brasterog), yn adfer hypoglycemia mewn llygod GOAT KO (Li et al., 2012), trwy mecanwaith sy'n dibynnu

ar y derbynnydd hormon twf (GHR) hepatic (Fang et al., 2019). Ymhellach, yn absenoldeb swbstradau glwconeogenig alldarddol, mae echelin signalu AG-GH yn cynnal homeostasis glwcos, trwy ysgogiad awtoffagi yn yr afu, sydd yn cynhyrchu asidau amino glwcoenig o diraddiad proteinau (Zhang et al., 2015) (bydd y canfyddiad hwn yn cael ei thrafod ymhellach yn y adrannau dilynol).

Felly, mae rheoleiddio homeostasis glwcos yn ystod ymrydio yn swyddogaeth ffisiolegol hanfodol echelin signalu ghrelin, ac yn gefnogi'r rhagdybiaeth bod ghrelin yn gweithredu fel hormon goroesiad yn hytrach na hormon archwaeth (Mani & Zigman, 2017). Mae'r canfyddiadau hyn hefyd yn caniatáu ail-destunoli gweithredoedd orecsigenig AG alldarddol fel ffordd o gynnal pwysau'r corff yn ystod adegau o brinder maetholion (Mani & Zigman, 2017). Ategir hyn ymhellach gan arsylwadau bod lefelau ghrelin cylchredol yn uwch mewn cleifion ag anorecsia nerfosa ond eto wedi gostwng mewn cleifion â gordewdra (Shiyya et al., 2002; Tschop et al., 2001), yn ogystal â chanlyniadau buddiol ar bwysau a chymeriant bwyd yn dilyn gweiniad AG mewn cleifion â cahecsia (Mani & Zigman, 2017).

## 1.4.5. Effeithiau niwrogenig a niwroamddiffynol ghrelin

### 1.4.5.1. Plastigrwydd hipocampaidd

Canfuwyd astudiaethau model cnofilod tystiolaeth sylweddol bod AG yn ysgogi plastigrwydd hipocampaidd a swyddogaeth cof episodig a gofodol cysylltiedig (Buntwal et al., 2019).

Dengys ymchwiliadau cychwynnol (Carlini et al., 2002; Carlini et al., 2004) fod triniaethau intracerebrofentrigwlar (i.c.v) neu intrahipocampaidd (i.h) AG yn hyrwyddo dargadwedd cof mewn llygod mawr Wistar gwrywaidd. Yn dilyn hynny, dengys Diano et al., (2006) fod triniaeth berifferol AG yn ysgogi ffurfiad synaps pigau dendritig (dendritic spine synapse) ac yn hyrwyddo LTP yn niwronau CA1, gan gwella cof gofodol cysylltiedig. Yn hanfodol, canfuwyd yr awduron hefyd fod abladiad gennyn ghrelin yn lleihau dwysedd synaps pigau dendritig ac yn amharu ar gof gofodol sy'n ddibynnol ar y hipocampws (Diano et al., 2006).

Fel gyda IF (Fontan-Lozano et al., 2007), mae AG yn hyrwyddo LTP trwy mecanweithiau sy'n rheoleiddio mynegiad is-unedau NMDAR (Gherzi et al., 2015) tra mai'r gweithydd GHS-R1a dipeptidyl MK-0677, yn hyrwyddo cyflwyniad synaptig derbynyddion AMPA sy'n cynnwys GluA1 (Ribeiro et al., 2014). Awgrymir canfyddiadau diweddar ein grwp fod echelin signalu ghrelin-GHS-R hefyd yn rheoleiddio mynegiad hipocampaidd BDNF (Hornsby et al., 2020). Yn ddiddorol, mae canfyddiadau Kern et al., (2015) yn nodi bod GHS-R1a yn modiwlleiddio plastigrwydd hipocampaidd trwy heterodimeru gyda derbynydd dopamin DRD1 a symud signalau DRD1 i ffwrdd o'i lwybr cypledig Gas canonaidd. Yn nodedig, dangoswyd bod y ddau dderbynydd yn rhan o gymhleth sydd wedi cwpledi i  $G\alpha_q$  *ex vivo*, tra bod cyd-weiniad gwrthweithydd GHS-R1a JMV2959 yn rhwystro'r cynnydd mewn cof gofodol sy'n gysylltiedig â thriniaeth gwrthydd DRD1 (Kern et al., 2015).

#### 1.4.5.2. AHN

O ran AHN, dengys, astudiaethau Johansson et al. (2008), a Moon, Kim, Hwang, & Park, (2009) fod asyl-ghrelin uwch-ffisiolegol yn ysgogi lluosogiad NPSCs *in vitro* (Johansson et al., 2008), ac yn cynyddu'r nifer o gelloedd newydd-anedig a niwronau anaeddfed yn hipocampws llygod llawn dwf *in vivo* (Moon et al., 2009). Wedi hynny, cyhoeddwyd ein grwp sawl astudiaeth sy'n adeiladau ar y canfyddiadau cychwynnol hwn.

Yn gyntaf, gwelwn bod cwrs triniaeth 14-diwrnod gyda AG, ar lefelau sy'n gymharol i'r rhai cylchredol a welir ar ôl ymrydio am 24 awr, y cynyddu'r nifer o niwronau anaeddfed (Dcx +), a newydd-anedig (BrdU +/- NeuN +) a welir yn DG llygod mawr cfwl-Lister (Kent et al., 2015) Yn bwysig, trosglwyddwyd ysgogiad hwn mewn i gwelliant hirdymor yng ngof gwahanu patrymau (Kent et al., 2015). Gan defnyddio llygod traws-genynnol eGFP-GHS-R, dangoswyd yn astudiaeth dilynol bod GHS-R yn cael eu mynegi ar niwronau aeddfed y GCL ond nid ar NSPCs (Hornsby et al., 2016). Awgrymir y canfyddiad hon bod effeithiau AG ar AHN yn cael ei gweithredu drwy mecanweithiau paracrin yn y DG, lle mae secretiad ffactorau niwrotroffig, megis BDNF, o niwronau aeddfed yn ysgogi lluosogiad a gwahaniaethiad NSPCs. Cyferbynnir y canfyddiad hwn gyda rhai cynharach Moon et al., (2009), a darganfuwyd mynegiad GHS-R ar NSPCs. Fodd bynnag, defnyddiodd yr awduron gwrthgorff gwrth-GHS-R ammenodol yn eu nodweddiadau (Ratcliff et al., 2019).

Yn hanfodol, dengys ein grwp bod effeithiau buddiol CR ar AHN yn dibynnu ar echelin signalu ghrelin-GHS-R, gan ni welir ysgogiad AHN a cof cysylltiedig mewn llygod gyda blocâd systemig o trawsgrifiad GHS-R (Hornsby et al., 2016). Rydym hefyd wedi adrodd yn ddiweddar bod cynyddu lefelau cylchredol UAG, naill ai trwy gweiniad alldarddol neu abladiad gennyn GOAT, yn amharu ar AHN, tra bod gweiniad ffarmacolegol AG yn achub diffygion cof hipocampaidd mewn llygod GOAT KO (Hornsby et al., 2020). Ymddengys felly bod AG ac UAG yn ennyn swyddogaethau

gwrthwynebol ar AHN, a chefnogir y casgliad hon gan canfyddiadau mewn celloedd cynradd cymysg hipocampaidd *in vitro* lle diddymodd cyd-driniaeth â UAG effeithiau AG ar lluosogiad a goroesiad, yn yr un modd a chyd-driniaeth â gwrthweithydd GHS-R1a (Hornsby et al., 2020).

#### 1.4.5.3. Niwroamddiffyniad

O ran AD, mae AG yn amddiffyn rhag diffygion hipocampaidd a achosir gan weiniad i.h. oligomerau  $\beta$ -amyloid mewn llygod (Moon et al., 2011; Santos et al., 2017) a llygod mawr (Kang et al., 2015). Mae'r effeithiau niwroamddiffynol hyn yn cynnwys, lleihad lid niwral (Santos et al., 2017), achub gostyngiad LTP a diffygion cof (Kang et al., 2015; Moon et al., 2011; Santos et al., 2017) lleihad baich placiau  $\beta$ -amyloid (Kang et al., 2015), a gwelliant metabolaidd glwcos (Kang et al., 2015). Gwelwyd effeithiau niwroamddiffynol AG hefyd yn model llygoden drawsennynol 5xFAD, gyda gweiniad AG cronig yn lleihau marwolaeth niwronau sy'n cysylltiedig ag AD yn yr hipocampws (Moon et al., 2014).

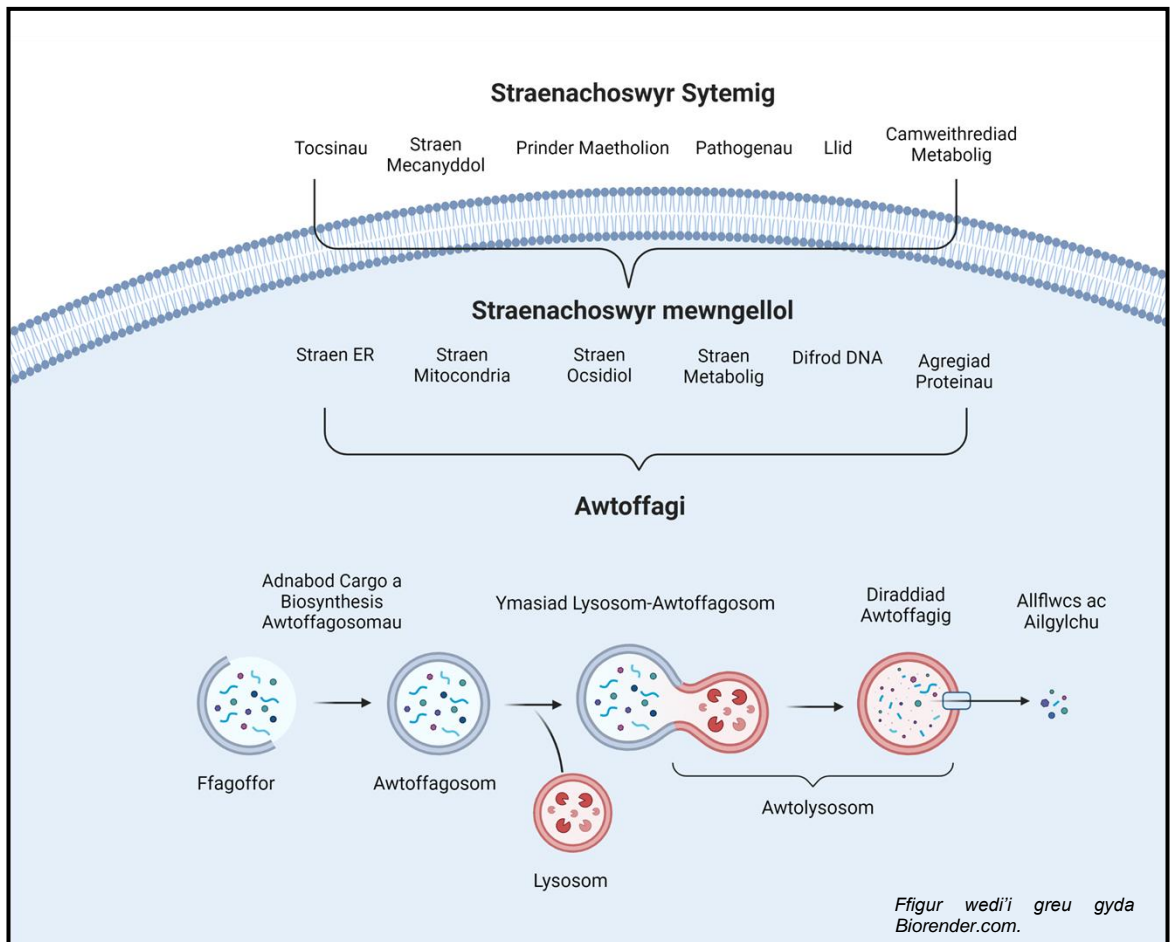
O ran PD a parkinsonism, mae gweiniad alldarddol AG yn amddiffyn celloedd dopaminergig yn yr SN rhag marwolaeth, ac yn cynnal niwrodrowsyrriad dopaminergig nigrostriataidd, ar ôl i lygod C57BL/6 gael eu niweidio gan MPTP (Andrews et al., 2009; Bayliss et al., 2016). I'r gwrthwyneb, mae abladiad y genynnau ghrelin neu GHS-R yn gwaethgu marwolaeth niwronau dopaminergig a achosir gan MPTP (Andrews et al., 2009). Ar ben hynny, mae effeithiau amddiffynol CR ysgafn yn erbyn niwro-wenwyndra MPTP yn dibynnu ar signalu ghrelin, gan eu bod yn cael eu diddymu mewn llygod ghrelin KO (Bayliss et al., 2016).

## 1.5. Awtoffagi

Wedi'i nodweddu gyntaf gan Christian De Duve yn y 1960au (Sabatini & Adesnik, 2013; Z. Yang & Klionsky, 2010), mae awtoffagi yn broses homeostatig hanfodol lle mae cynnwys cytoplasmig, megis proteinau hirhoedlog ac organynnau camweithredol, yn cael eu hatafaelu mewn fesigl ddwbl bilennog, a elwir yr awtoffagosom, ac yna'i ddiraddio mewn awtolysosom asidig, yn dilyn ymasiad lysosom-awtoffagosom (Klionsky et al., 2021) (ffigur 1.9).

Mae awtoffagi yn hynod ddeinamig a ysgogir mewn ymateb i lu o straenachoswyr allgellog a mewngelloi (ffigur 1.9) (Kroemer, Marino, & Levine, 2010) y mwyaf nodedig ohonynt sef prinder maetholion (Mizushima, 2004; Mizushima, Yamamoto, Matsui, Yoshimori, & Ohsumi, 2004). Dengys astudiaethau arloesol, a defnyddir meinwe a homogenadau celloedd o lygod mawr, fod cysylltiad annatod rhwng rheoleiddio awtoffagi hepatic â statws egni cellog, argaeledd maetholion, a hormonau endocrin (i.e glwcagon a inswlin) (Amherdt, Harris, Renold, Orci, & Unger, 1974; Deter, Baudhuin, & De Duve, 1967; Mortimore & Schworer, 1977; Pfeifer, 1978; Seglen, Gordon, & Poli, 1980). Dengys astudiaethau mwy diweddar bod ysgogiad awtoffagi hepatic yn ystod newyn hirfaith yn ffynhonnell o asidau amino glwconeogenig ar gyfer synthesis glwcos (Ezaki et al., 2011; Fang et al., 2019; Zhang et al., 2015). Mae asidau amino sy'n deillio o awtoffagi hefyd yn hanfodol ar gyfer goroesiad yn ystod y cyfnod llwgu ôl-enedigol ar ôl colled maeth trawsbrychol (transplacental) (Kuma et al., 2004).

Fel trafodir yn adran 1.2.2.2, mae awtoffagi hefyd yn hanfodol ar gyfer cynnal iechyd niwral a swyddogaethau niwrolegol wrth heneiddio, gan gynnwys prosesau dysgu a chof sy'n cysylltiedig a'r hipocampws, tra bod camweithrediad awtoffagig yn amlwg mewn clefydau niwroddirywiol. Bydd yr adrannau dilynol yn trafod y mecanweithiau moleciwlaidd sy'n rheoleiddio awtoffagi, gan gynnwys y rhai sy'n digwydd mewn niwronau.



**Ffigur 1.9. Trosolwg o awtoffagi a'r straenachoswyr sydd yn eu ysgogi.**

Mae biogenesis awtoffagosomau yn digwydd mewn modd de novo o bilen shap cwpan a elwir y ffagoffor. Ffurfiwyd yr awtoffagosom o amgylch cargo cytoplasmig wrth i'r ffagoffor ehangu a wedyn cae, trwy ymasiad homotypig rhwng dwy ben y bilen dwbwl. Wedi hynny, mae awtoffagosomau yn ymasu gyda fisiglau endosomaidd, sy'n ffurfio strwythurau rhyngol a elwir yn amffisomau (heb dangos yn y ffigur), a wedyn lysosomau sy'n ffurfio awtolysosomau diraddol gyda lwmn asidig. Tu fewn i'r awtolysosom, mae hydrolasau lysosomaidd yn diraddio cynhwysion ac bilen mewnol yr awtoffagosom, ac wedi hynny mae'r lysosom yn ail-ffurfio ac mae cynhyrchion y diraddiad awtoffagig (h.y asidau amino a metabolion eraill) yn cael eu allforio i'r cytosol.

### 1.5.1. Rheoleiddiad moleciwlaidd awtoffagi

Rheolir fflwcs awtoffagi gan set graidd o broteinau, a elwir yn proteinau sy'n cysylltiedig ag awtoffagi (autophagy related (ATG) (Klionsky et al., 2003), a dosbarthir i 6 cymhlygyn gweithredol (Tabl 1.2) ar sail dadansoddiadau genynnol hierarchaidd (Itakura & Mizushima, 2010; Kishi-Itakura, Koyama-Honda, Itakura, & Mizushima, 2014). Yn mamaliaid rhain yw'r: cymhlygyn ULK (Hara et al., 2008; Hosokawa et al., 2009; Jung et al., 2009); ATG9A a'i fisiglau cysylltiedig (Yamamoto et al., 2012; Young et al., 2006); cinas ffosffatidyl inositol 3 dosbarth 3 cymhlygyn 1 (Phosphatidyl inositol three kinase class 3 complex 1- PI3KC3C1) (Itakura, Kishi, Inoue, & Mizushima, 2008; Kim et al., 2013); proteinau WIPI (Bakula et al., 2017; Polson et al., 2010) a ATG2 (Velikkakath, Nishimura, Oita, Ishihara, & Mizushima, 2012); a'r systemau cyfunedd debyg i wbicwitin (ubiquitin like conjugation systems) (ffigur 1.10) ATG5-ATG12-ATG16L (Mizushima, Sugita, Yoshimori, & Ohsumi, 1998; Romanov et al., 2012), a theulu ATG8 (Kabeya et al., 2004; Sou et al., 2008) (sy'n cynnwys LC3). Er bod y mecanweithiau penodol sy'n gwaelodi biogenesis awtoffagosomau dal i gael ei datrys, yn enwedig o safbwynt dynameg pilennau a lipidau (Melia, Lystad, & Simonsen, 2020) deellir yn dda y gweithredoedd cydunol, a threfn recriwtio y cymhlygion ATG (Dudley, Makar, & Gammoh, 2020; Nakatogawa, 2020; Nishimura & Tooze, 2020; Walker & Ktistakis, 2020) (Nishimura & Tooze, 2020; Walker & Ktistakis, 2020) (ffigur 1.11).

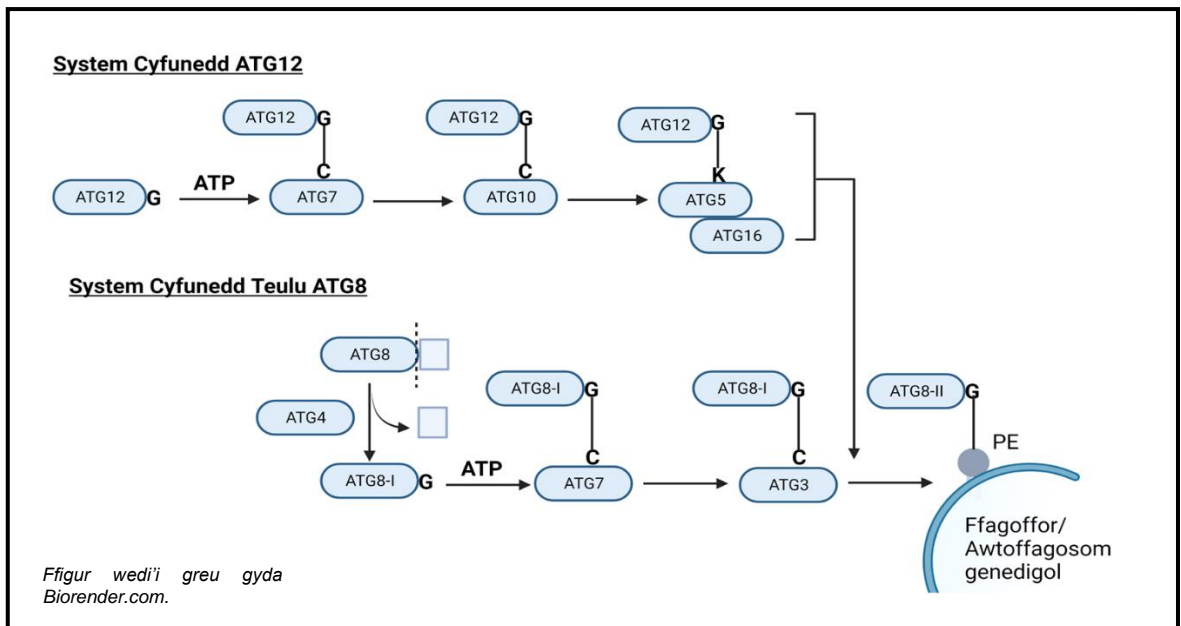
Yn ogystal a'r cymhlygion ATG, mae fflwcs awtoffagig cyflawn hefyd yn dibynnu ar y systemau cludiant ac endolysosomaidd sydd yn rheoleiddio ymasiad lysosom-awtoffagosom, pH ac actifedd ensymau lysosomaidd, ac allffwcs metabolynnau o'r lysosom (Lorincz & Juhasz, 2020; Y. G. Zhao & Zhang, 2019). Rheolir awtoffagi hefyd gan amrywiaeth o lwybrau signalu sydd nail ai yn modiweiddio actifedd neu mynegiad proteinau ATG yn uniongyrchol trwy addasiadau ôl-drosiadol (Popelka & Klionsky, 2015; Wani et al., 2015), neu yn anuniongyrchol trwy modiweiddio actifedd ffactorau



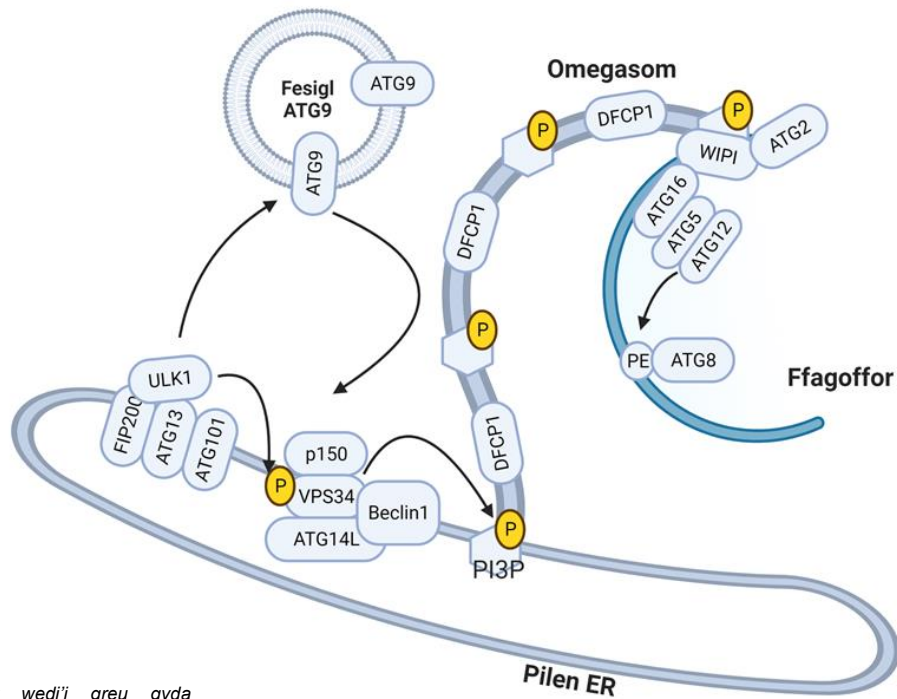
trawsgriadiad fel TFEB a TFE3 (Fullgrabe, Ghislat, Cho, & Rubinsztein, 2016; Penaloza et al., 2011). Yr enghraifft mwyaf nodedig o echel signalu mewngellol sydd yn rheoleiddio awtoffagi yw'r echelin AMPK-mTORC1 (Akers, Löffler, Wesselborg, & Stork, 2012).

*Tabl 1.2. Cymhlygion ATG, eu cydrannau, a'u swyddogaethau*

<b>Cymhlygyn</b>	<b>Swyddogaeth</b>
<b>ULK</b>	<b>Cychwyn biogenesis awtoffagosomau trwy recriwto'r cymhlygion eraill</b>
ULK1/ULK 2 ATG13 FIP200 ATG101	Cinas ser/thr Ffurfiad a sefydlogiad y cymhlygyn Ffurfiad a sefydlogiad y cymhlygyn Ffurfiad a sefydlogiad y cymhlygyn
<b>Fisiglau ATG9</b>	<b>Ffynhonnell lipidau ar gyfer biogenesis awtoffagosomau</b>
ATG9A	Cludiant fisiglau
<b>PI3KC3C1</b>	<b>Cynhyrchiad ffosfatidyl-inositol 3 ffosad, sy'n hanfodol ar gyfer ymestyniad pilenni a recriwtio effeithwyr is-lawr</b>
Vps34 Beclin-1 (BECN) p150 (Vps15) ATG14L NRBF2	Cinas ffosfatidyl inositol 3 (PI3K) Sefydlogi'r cymhlygyn a hwb ar gyfer ei reoleiddiad Cinas ser/thr sy'n uwch reoleiddio actifedd Vps34 Targed i bilenni Ffurfiad a sefydlogiad y cymhlygyn
<b>ATG2-WIPI</b>	<b>Cyfuno'r ffagoffor i barthau omegasom ER, trosglwyddo lipidau, recriwtio ATG16L</b>
ATG2A & ATG2B WIPI1, WIPI2, WIPI3 & WIPI4	Cyfuno pilenni a trosglwyddo lipidau Rhwymp PtdIns3P ac yn recriwtio ATG16L1
<b>System cyfuno ATG5-ATG12-ATG16L</b>	<b>Yn pennu lleoleiddiad pilen lipeiddiad proteinau teulu ATG8</b>
ATG12 ATG5 ATG7 ATG10 ATG16L1	Protein sy'n debyg i wbicitin Targed cyfuniad ATG5 Ensym E1 ar gyfer cyfuniad ATG12-ATG5 Ensym E2 ar gyfer cyfuniad ATG12-ATG5 Rhwymp i ATG5 a WIPI2b
<b>System cyfuno ATG8-family</b>	<b>Rolau lluosog mewn awtoffagi, gan gynnwys aeddfedu awtoffagosom, ymasiad lysosom-awtoffagosom, a rhwymp derbynyddion awtophagi detholus ar gyfer diraddiad cargoau penodol</b>
Homologau ATG8 (LC3A, LC3B, LC3C, GABARAP, GABARAPL1 & GABARAPL2)  ATG4  ATG7 ATG3	Protein sy'n debyg i wbicwitin sy'n bodoli fel ffurf cytosolig (ATG8-I) a sydd wedi'i cyfuno i ffosfatidylethanolamin a'i rhwymp i bilenni awtoffagosomaidd (ATG8-II) Proteas sy'n hollti terfynell C proteinau ATG8 i ffurfio ATG8-I. Hefyd yn gwaredu ATG-II oddi wrth pilen allanol awtoffagosomau Ensym E1 ar gyfer cyfuniad ATG8 Ensym E2 ar gyfer cyfuniad ATG8



**Ffigur 1.10. Systemau cyfunedd awtoffagi (debyg i wbcwitin). ATG12:** Yn y system gyfunedd ATG12-ATG5-ATG16, mae'r protein ATG12, sy'n debyg i wbcwitin, yn cael ei actifadu'n gyntaf, trwy fond thioester ynni uchel rhwng ei gweddill glycin C-derfynell a weddill cystein yn safle gweithredol yr ensym ATG7, sy'n debyg i ensym E1. Yn dilyn hynny, trosglwyddir ATG12 i'r ensym ATG10, sy'n debyg i ensym E2, trwy fond thioester glycin-cystein arall, cyn gyfunedd trwy fond isopeptid i weddill lysin yn y protein ATG5. Mae ATG5 yn ei dro wedi'i rwymo i ATG16 (L), sy'n homodimereiddio i ffurfio cymhlygyn ATG12-ATG5-ATG16 (L) dimerig. **ATG8:** Yn system gyfunedd teulu ATG8, mae proteinau teulu ATG8, fel LC3, yn cael eu hollti gyntaf ar eu derfynell-C gan y proteas ATG4. Datgelir hyn gweddill glycin C-derfynell, a chyfeirir at y protein ATG8 canlyniadol, a lleolir yn y cytosol fel ATG8-I (e.e.LC3-I). Yn yr un modd â'r system gyfunedd ATG12, mae ATG8-I yn cael ei actifadu gyntaf trwy ffurfiad bond thioester gyda ATG7. Yna caiff ei drosglwyddo i'r ensym, ATG3, ensym arall sy'n debyg i ensym E2, cyn i'r cymhlygyn ATG12-ATG5-ATG16 (L) cynorthwyo gyfunedd ATG8 i ffosfatidylethanolamin (PE) sydd wedi'i leoli ar bilenni mewnol ac allanol y ffagoffor/awtffagosom genedigol. Cyfeirir at y ffurf hon sydd wedi'i rhwymo â philen fel ATG8-II (e.e. LC3-II).



Ffigur wedi'i greu gyda Biorender.com.

### Ffigur 1.11. Trosolwg o recriwtiad cymhlygion ATG yn ystod biogenesis

#### awtoffagosomau mamaliaid.

Cychwynnwyd biogenesis awtoffagosomau mamaliaid trwy trawsleoliad y cymhlygyn ULK1 i bilenni'r reticwlwm endoplasmig (ER) ar safleoedd cyswllt ER-mitochondria, sy'n cael ei sefydlogi gan cydgysylltiadau hyfyr gyda fisiglau ATG9A. Wedi hynny, mae ULK1 yn ffosfforyleiddio, recriwtio, sefydlogi ac actifadu'r cymhlygyn PI3KC3C1, sydd yn cynhyrchu PI3P. Arweiniwyd hyn at ffurfiad parthau sydd wedi gyfoethogi gyda PI3P, a elwir yn omegasom(au), ac yn dilyn hynny, recriwtiad y effeithyddion rhwymo PI3P, WIPI, ac ATG2. Hyrwyddwyd cnewylliad y ffagoffor gan priodweddau trosglwyddo lipidau ATG2 ac hefyd cydgysylltiadau hyfyr gyda fisiglau ATG9A, tra bod proteinau WIPI sydd wedi'u lleoli ar y ffagoffor yn recriwtio'r cymhlygyn ATG12-ATG5-ATG16 drwy rhwymo ATG16. Wedi hynny, mae'r cymhlygyn ATG12-ATG5-ATG16 yn hyrwyddo cyfunedd proteinau ATG8, fel LC3, i ffosffatidylethanolamin yn bilen y ffagoffor.

### 1.5.2. Awtoffagi detholus

Mae'r prosesau a'r mecanweithiau awtoffagig a drafodwyd hyd yma yn cyfeirio at brosesau annetholus, lle mae cargo cytoplasmig yn cael ei atafaelu a'i ddiraddio mewn modd diwahân. Fodd bynnag, mae awtoffagi hefyd yn digwydd mewn modd detholus, lle mae cargo cellog penodol yn cael eu targedu ar gyfer diraddiad lysosomaidd (Johansen & Lamark, 2020). Yn wir, darganfuwyd prosesau awtoffagig detholus ar gyfer pob prif organyn, y mwyaf nodedig ohonynt yw mitoffagi (diraddiad detholus mitochondria) (Montava-Garriga & Ganley, 2020), yn ogystal ag agregau protein, glycogen, defnynnau lipid a bacteria (Klionsky et al., 2021).

Mae'r sylfaen foleciwlaidd sy'n gwaelodi awtoffagi detholus wedi'i diffinio gan broteinau teulu ATG8, cargo sydd wedi'u wbicwitineiddio, a derbynyddion awtoffagi detholus, megis SQSTM1/p62 (y cyfeirir atynt fel p62 o hyn ymlaen), optinwrin, NDP52, TAX1BP1, NRB1, Nix, a BNIP3 (Johansen & Lamark, 2020). Cynhwysir y derbynyddion hyn barth rhwymo wbicwitin, sy'n cydnabod cargo sydd wedi'i wbicwitineiddio, a motiffau rhanbarth sy'n rhyngweithio a LC3 (LC3-interacting region-LIR) (y cyfeirir atynt hefyd fel motif sy'n rhyngweithio a ATG8 (ATG8 interacting motif-AIMs)). Mae'r LIR yn ddilyniant 15-20 asidau amino o hyd, gyda motiff craidd WxxL (lle mae x yn cynrychioli unrhyw asid amino) sy'n cydnabod safleoedd docio hydroffobig penodol yn y proteinau ATG8 (Johansen & Lamark, 2020).

Mae derbynyddion awtoffagi detholus felly yn cysylltu cargo sydd wedi'i thagio ar gyfer diraddiad awtoffagig gyda phroteinau teulu ATG8 sydd wedi'u rhwymo i bilen fewnol y ffagoffor ymledig (Johansen & Lamark, 2020). Yn dilyn ymlediad a chaead y ffagoffor, mae'r cargo sydd wedi'i wbicwitineiddio (a'r derbynydd awtoffagi detholus) yn cael eu pecynnu y tu mewn i'r awtoffagosom a'i chludo i'r lysosom ar gyfer ddiraddiad wedi hynny (Johansen & Lamark, 2020).

### 1.5.3. Awtoffagi niwronaidd

Yn unol â'u natur ôl-mitotig a'u tueddiad i gronni difrod cellog dros amser, mae niwronau'n arddangos lefel uwch o weithgaredd awtoffagig cyfansoddol o'i gymharu â'r mwyafrif o gelloedd ymylol (Boland et al., 2008).

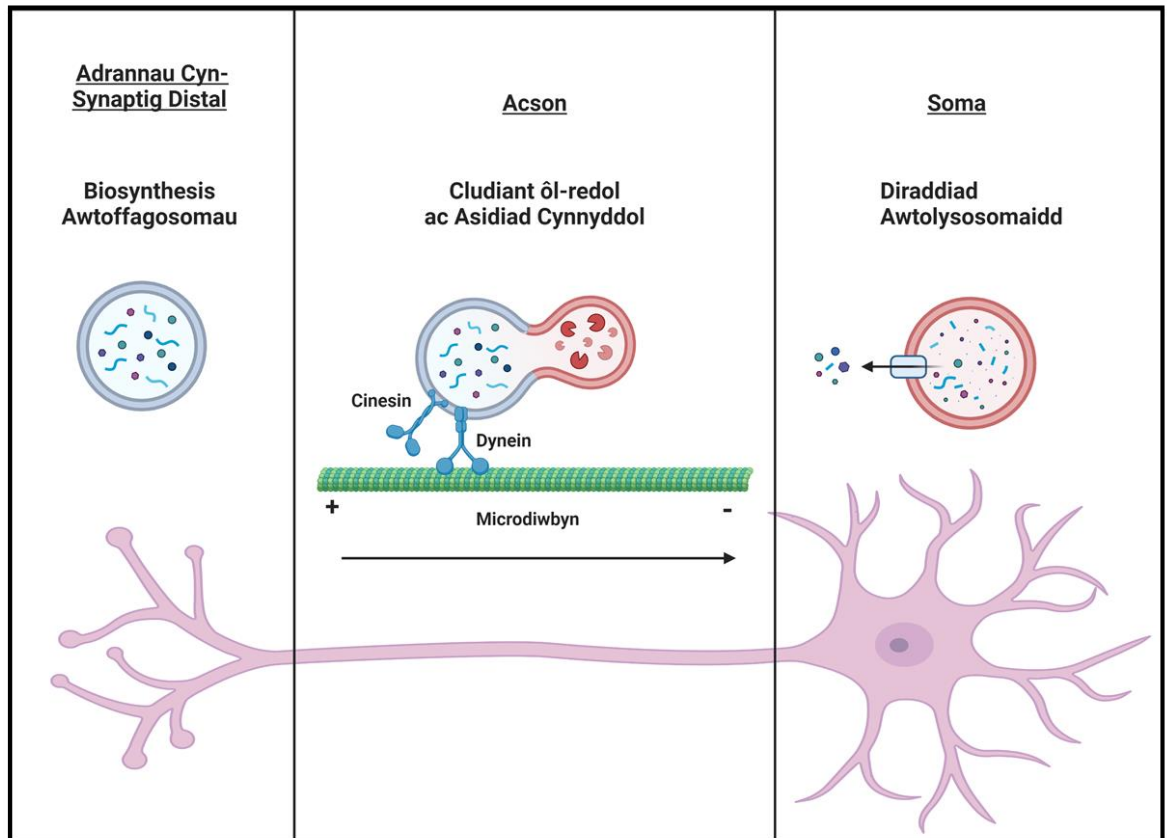
Mae awtoffagi niwronau hefyd wedi'i reoleiddio'n ofodol (ffigur 1.12), gydag awtoffagosomau'n ffurfio yn bennaf yn derfynellau'r acson, a maent yn aeddfedu'n raddol wrth iddynt gludo tuag at y gellgorff trwy ymasiad gyda fisiglau enodlysosomaidd ar hyd yr acson (Maday & Holzbaur, 2014, 2016; Maday, Wallace, & Holzbaur, 2012). O ganlyniad, leolir awtolysosomau aeddfed yn bennaf yn y cellgyrff a'r dendridau (Maday & Holzbaur, 2014, 2016; Maday et al., 2012). Ymhellach, mae biogenesis awtoffagosomau yn digwydd yn yr un modd mewn niwronau fel y darlunnir yn gyffredinol gan ffigur 1.11, gyda chymhlygion ATG yn hyrwyddo cnewylliad y ffagoffor o barthau omegasom sy'n gysylltiedig â philen yr ER (Axe et al., 2008; Maday & Holzbaur, 2014) Fodd bynnag, dylid nodi fod ffurfiad awtoffagosomau hefyd yn cael ei arsylwi, er i raddau llawer is, ar ganol yr acson, y cellgyrff a'r dendridau (Maday & Holzbaur, 2014; Maday & Holzbaur 2016).

Yn gyson gyda fflwcs sydd wedi reoli yn ofodol (Maday & Holzbaur, 2016), a'i cyfraniad tuag at prosesau dysgu a chof (Glatigny et al., 2019; Hysin et al., 2018 Pandey et al., 2021; Shehata et al., 2018), dengys nodweddiadau moleciwlaidd bod awtoffagi niwronaidd yn cynnal amrywiaeth o swyddogaethau yn adrannau cyn- ac ôl-synpatig (Lieberman & Sulzer, 2020). Dengys Hoffman et al., (2019) bod awtoffagi yn cael ei ysgogi'n gyflym, i diraddio proteinau cyn-synaptig, yn dilyn difrod ocsideiddiol mewn niwronau hipocampaidd (Hoffmann et al., 2019). Enghraifft arall o swyddogaeth cyn-synaptig awtoffagi yw atal niwrodrowsyrriad dopaminergig, trwy diraddio fesiglau cyn-synaptig sy'n cynnwys dopamin (Hernandez et al., 2012). Gwelir hefyd tystiolaeth bod awtoffagi yn diraddio proteinau ol-synaptig PSD-95, PICK1 a SHANK3 gan astudiaeth (Nikoletopoulou, Sidiropoulou, Kallergi, Dalezios, &

Tavernarakis, 2017). Yn diddorol, nododd Shehata et al., (2018) bod diraddiad endosomau sy'n cynnwys AMPAR gan awtoffagi, a synthesis dilynol protein AMPAR newydd, yn mecanwaith sy'n gwaelodi effeithiau awtoffagi mewn diraddiad cofion ofn-cyd-destunol sy'n gwrthsefyll cydgrynhoad yn yr amygdala basolateral.

Mae canfyddiadau diweddar hefyd wedi sefydlu cysylltiad swyddogaethol rhwng awtoffagi niwronaidd a signalau BDNF. Yn wir, dangosodd Nikolettou et al. (2017) bod signalu BDNF-TrkB yn dadreoleiddio awtoffagi mewn niwronau cortigol a hipocampaidd, tra darganfydd (Kononenko et al., 2017) bod cludiant ol-redol awtoffagosomaidd yn fecanwaith ar gyfer cyflwyniad somatig derbynnydd TrkB sydd wedi'i actifadu gan BDNF. Gellir hyn naill ai arwain at ddiraddiad lysosomaidd y derbynnydd, fel y cynigiwyd gan (Nikolettou & Tavernarakis, 2018), neu hyrwyddo signalu TrkB ôl-redol. Yn unol â'r rhagdybiaeth olaf, dengys Kononenko et al., (2017) fod atal cludiant awtoffagosomaidd TrkB, trwy triniaeth gyda tamocsiffen, yn amharu gyda datblygiad cymhlethdod arbor niwronau hipocampaidd *in vitro*.

Mae sawl astudiaeth hefyd wedi cysylltu awtoffagi gyda rheoleiddiad AHN (Leeman et al., 2018; Schaffner et al., 2018; Wu et al., 2016; Xi et al., 2016; Yu et al., 2008). Yn nodedig, awgrymir canfyddiadau Xi et al. (2016) bod atal fflwcs awtoffagig, trwy dileu ATG5 yn amodol mewn NSPCs, yn amharu a goroesiad ac yn oedi aeddfediad niwronau newydd anedig y DG.



**Ffigur 1.12. Awtoffagi niwronaidd.** Mae biogenesis awtoffagosomau yn niwronau yn digwydd yn bennaf ar terfynellau cyn-synaptig yr acson, gyda'r awtoffagosomau yn ymddangos cludiant dwy-ochrog a cydgysylltiad gwan gyda marcwyr endo-lysosomaidd fel LAMP1 a Rab7. Ar ôl gadael terfynellau'r acson ymddengys awtoffagosomau cludiant ôl-redol tuag at y cell-gorff, a hyrwyddir gan is-reoleiddiad modurau cinesin anterograd. Wrth i awtoffagosomau cludo tuag at y soma maint yn aeddfedu'n raddol trwy ymasiad gyda fisiglau endo-lysosomaidd, sy'n newid cyfansoddiad y pilen ac yn asideiddio lwm y fisiglau awtoffagig. Mae'r broses aeddfedu hwn yn cwblhau yn y soma ar dendridau, lle mae awtolysosomau asidig aeddfed yn diraddio'r cargo awtoffagig (yn ogystal a cargo o'r endosomau sydd wedi ymasu gyda'r awtoffagosomau).

## **1.6. Ghrelin ac awtoffagi niwral**

Er y ffaith bod y ddwy broses yn fodiwleiddio plastigrydd niwronau, ysgogi swyddogaeth wybyddol a chynnal niwro-amddiffyniad, nid yw'r cysylltiad rhwng echelin ghrelin-GHS-R a awtoffagi mewn niwronau ac mewn meinwe niwral wedi'i astudio'n eang. Yn wir, er bod cryn dystiolaeth gyberthynol yn bodoli rhwng y ddwy broses yn seiliedig ar ganfyddiadau y gall ghrelin gymell signalau AMPK a mTORC1 mewn gwahanol ranbarthau'r ymennydd, gan gynnwys yr hypothalamws, hipocampus, a substantia nigra (Morgan, Andrews, & Davies, 2017), dim ond ychydig o ymchwiliadau uniongyrchol ar effeithiau ghrelin ac awtoffagi wedi'u cynnal mewn meinwe niwral.

Bydd yr adran dilynol yn ymdrin, yn fanwl, â'r canfyddiadau uniongyrchol cyfredol sy'n ymwneud â ghrelin ac awtoffagi mewn niwronau a meinwe niwral, gan mai'r papurau hyn yw'r rhai mwyaf perthnasol i gynnwys y traethawd ymchwil.

### **1.6.1. Gwerthusiad beirniadol**

#### **1.6.1.1. Ferreira-Marques et al. (2016)**

Hyd yn hyn mae Ferreira-Marques et al., (2016), wedi darparu'r ymchwiliad mwyaf manwl ar effeithiau cyfyngu maetholion a signalu ghrelin ar awtoffagi niwronal *in vitro* (Ferreira-Marques et al., 2016). Gan ddefnyddio blotio Gorllewinol i asesu trosiant LC3-II a p62 ym mhresenoldeb ac absenoldeb 100µM CQ, ddangosant bod cyfyngiad maetholion 6 awr yn ysgogi awtoffagi mewn niwronau cortigol cynradd llygod mawr (Ferreira-Marques et al., 2016). Ar ben hynny, fe wnaethant ddangos bod cyfyngiad maetholion yn cynyddu mRNA a phrotein ghrelin a niwropeptid Y , tra bod triniaeth ag gwrthweithyddwyr derbynnnydd GHS-R1a a NPY yn gwanhau ysgogiad awtoffagi (Ferreira-Marques et al., 2016).

Yn hanfodol, llwyddodd yr awduron i efelychu effeithiau eu protocol cyfyngu maetholion trwy drin celloedd maeth cyflawn gyda naill ai 10nM AG neu 100nM NPY (Ferreira-Marques et al., 2016). Eto, welodd yr awduron colled o ysgogiad awtoffagi



pan ceith celloedd eu cyd-drin gyda AG a gwrthweithyddwyr GHS-R neu NPYR (Ferreira-Marques et al., 2016).

Awgrymir y data hyn felly bod ysgogiad aciwt signalau ghrelin-GHS-R1a mewn niwronau cortigol, naill ai trwy gyfyngiad maetholion neu weiniad alldarddol dos ffisiolegol AG, yn ysgogi awtoffagi trwy actifadu signalau NPY. Dylid nodi, fodd bynnag, fod y cyfyngiad maetholion a ddefnyddir yn yr astudiaeth hon yn cyfateb i ostyngiad o tua 80% yng nghynnwys glwcos y cyfrwng meithrin a choled llwyr o B27 ac glutamin (Ferreira-Marques et al., 2016). Felly, nid yw'r amodau CR a adroddir yma yn wirioneddol adlewyrchu CR ysgafn 30-40%.

#### 1.6.1.2. Cecarini et al. (2016)

Asesodd Cecarini et al., (2016) effaith triniaeth 6awr a 24awr AG (dosau 0.1µM ac 1µM) ar weithgaredd awtoffagi a proteasomaidd mewn celloedd niwroblastoma SH-SY5Y a drawsffurfiwyd â phrotein rhagflaenydd amyloid (Amyloid precursor protein APP) math gwyllt (APP wt) neu mwtagenig (717 valine i glycine) (APP mut). Mewn celloedd heb eu trawsffurfio, roedd triniaethau 6awr a 24awr (gyda'r naill ddos) yn codi lefelau protein Beclin-1 a Bcl-2 yn arwyddocaol (Cecarini et al., 2016). Ar ben hynny, cynyddodd triniaeth 24awr gyda AG fynegiad protein p62 yn arwyddocaol (Cecarini et al., 2016). Fodd bynnag, ni welwyd unrhyw newidiadau arwyddocaol yn mynegiad LC3-II, tra na chynyddodd AG weithgaredd Cathepsin B yn arwyddocaol (Cecarini et al., 2016). Felly, nad oedd newidiadau mewn mynegiad proteinau ATG awtoffagi yn gysylltiedig gyda cynnydd mewn weithgaredd diraddiol lysosomaidd. Mewn celloedd APP mut, cynyddodd triniaeth 24 awr AG mynegiad LC3-II, p62 a Beclin-1 yn arwyddocaol, ond gwelwyd gostyngiad sylweddol (llai na 50% o weithgaredd Veh) yng ngweithgaredd cathepsin B (Cecarini et al., 2016). Awgrymir hyn felly bod AG yn atal fflwcs awtoffagig trwy lleihau gweithgaredd diraddiol cathepsin B mewn model cellog o batholeg Amyloid.

### 1.6.1.3. Chung, Choi a Park (2018)

Asesodd (Chung, Choi, & Park, 2018), effaith AG ar awtoffagi mewn NSPCs hipocampaidd llygod mawr llawn dwf yn dilyn amddifadedd glwcos ocsigen (oxygen glucose deprivation- OGD) i fodelu isgemia ymennydd. Er bod 24 awr OGD yn cynyddu mynegiad LC3-II ac lleihau mynegiad p62 ar yr un pryd, cafodd yr effeithiau hyn eu gwanhau gan driniaeth 24awr gyda 0.1 $\mu$ M AG (Chung et al., 2018). Ar ben hynny, gostyngodd AG arddwysedd fflwroleuol llifyn Cyto ID yn ogystal â nifer y pwncta GFP-LC3, o'i gymharu â chelloedd hypocsig nad oeddent wedi'u trin ag AG (Chung et al., 2018). Er bod y canlyniadau hyn yn awgrymu bod AG yn atal awtoffagi mewn NSPCs hipocampaidd, mae rhai problemau gyda'r papur hwn. Yn nodedig, yn ffigurau 2B a 3, mae'r awduron yn ailddefnyddio delweddau cynrychioliadol o reolydd llwytho actin y blotiau Gorllewinol ar gyfer pedwar protein gwahanol, LC3 (~ 14-18 kDa), p62 (~ 62 kDa), Beclin-1 (~ 60 kDa) a Bcl-2 (~ 28 kDa), heb egluro eu rhesymu (Chung et al., 2018). Pe bai pob un o'r proteinau hyn yn cael eu rhedeg ar yr un gel SDS-PAGE (a fyddai'n debygol o fod angen stripio ac ail-asesu ar gyfer p62 a Beclin-1 o ystyried eu pwysau moleciwlaidd tebyg), yna nid oes angen ailddefnyddio'r un rheolaeth lwytho sawl gwaith o fewn pob ffigur. Fodd bynnag, os aseswyd pob protein ar geliau gwahanol, yna mae cyflwyno'r rheolyddion llwytho yn y ffurf hon yn amhriodol ac yn annilysu'r data a gyflwynir ym mhob ffigur, gan fod angen rheolydd actin ei hun ar bob gel.

#### 1.6.1.4. Modelau *in vivo* MPTP

Mae papur diweddar gan Wang et al., (2020), yn adrodd am ymateb awtoffagig y SN a'r striatwm yn dilyn gweiniad AG intraperitoneal (ip) o 80µg / kg / dydd (ac yna amddifadedd bwyd 6 awr) aml diwrnodau olynol, mewn model MPTP llygoden o Parkinsonism.

Ni ddatgelodd dadansoddiad blot gorllewinol o LC3-II, Beclin-1 a p62 mewn homogenedau meinwe nigral a striatal, unrhyw wahaniaeth amlwg rhwng anifeiliaid wedi'u trin gyda AG neu Veh, yn absenoldeb MPTP. Achosodd triniaeth MPTP newidiadau amlwg mewn signalu awtoffagig, gyda gostyngiadau sylweddol yn mynegiad Beclin-1 a LC3-II, a chynnydd cydredol yn mynegiad p62; canfyddiadau sy'n awgrymu nam mewn fflwcs awtoffagig Yn hanfodol, gwanhaodd AG y newidiadau yn awtoffagi a oedd yn cysylltiedig a MPTP gan awgrymu bod gweiniad cronig AG yn adfer fflwcs awtoffagig nigrostriatal diffygiol yn ystod niwro-wenwyndra MPTP.

Mae canfyddiadau Wang et al., (2020) yn gyson i raddau â chanfyddiadau astudiaeth gydweithredol rhwng ein labordy ac ymchwilyr ym Mhrifysgol Monash (Bayliss et al., 2016). Er bod prif ganfyddiadau'r astudiaeth hon yn ymwneud â rôl AMPK mewn niwro-amddiffyniad cyfryngol ghrelin mewn modelau MPTP cnofilod, aseswyd mynegiad LC3-II nigral a striatal mewn sawl model arbrofol. Yn bwysig, dangosodd yr astudiaeth hon fod newidiadau yn LC3-II sy'n gysylltiedig a MPTP yn yr SN wedi'u gwrthdroi mewn llygod WT a ghrelin KO, gyda MPTP yn lleihau mynegiad LC3-II mewn anifeiliaid WT (effaith a waethygyd gan gyfyngiad calorïau ysgafn) ond eto'n cynyddu LC3-II yn llygod heb gennyn ghrelin.

#### 1.6.1.5. Zhu et al., 2017

Astudiaeth ychwanegol a adroddodd ar effeithiau ghrelin ar awtoffagi mewn cyd-destun niwral yw (Zhu et al., 2017). Yn yr astudiaeth hon, asesir yr awduron effaith gweiniad i.p AG ar ddos 40µg / kg / dydd am 7 diwrnod, ar awtoffagi yn nghyd-destun gorbwysedd intraocwlaidd cronig (COH). Dangosodd dadansoddiad blotiau Gorllewinol o fynegiad retinol LC3-II a Beclin-1 fod COH yn cynyddu mynegiad y ddau brotein yn sylweddol, tra bod gweiniad AG yn gwanhau'r cynnydd hyn. Roedd newidiadau yn y mynegiad o caspase-3 holltrog hefyd yn adlewyrchu'r newidiadau mewn mynegiad protein awtoffagi, tra bod gweiniad AG hefyd yn lleihau nifer y celloedd TUNEL positif mewn retinas COH. Ar ben hynny, cynyddodd AG hefyd ffosfforyleiddiad Akt a ffosfforyleiddiad mTOR yn dilyn COH. Gyda'i gilydd, mae'r canfyddiadau hyn yn awgrymu bod AG yn amddiffyn rhag COH trwy atal awtoffagi ac apoptosis, yn debygol trwy ysgogi signalau Akt-mTOR.

#### 1.6.2. Crynodeb

Mae canfyddiadau o'r gwerthusiad beirniadol o astudiaethau sy'n asesu ghrelin ac awtoffagi mewn meinwe niwral *in vivo* a diwylliannau niwronau *in vitro*, yn awgrymu fod rheoleiddiad awtoffagi niwral / niwronau gan yr echelin ghrelin-GHS-R yn dibynnu ar y cyd-destun, gan ei fod yna arsylwadau pro-awtoffagig a gwrth-awtoffagig. Mae hyn yn gyson â gallu'r echelin ghrelin-GHS-R i ysgogi signalu AMPK neu mTORC1 (Morgan et al., 2017). Cyfyngiadau nodedig y llenyddiaeth gyfredol, fodd bynnag, yw'r defnydd anaml o atalyddion lysosomaidd, a ddefnyddiwyd gan Ferreira-Marques et al., 2016 yn unig, yn ogystal â'r diffyg canfyddiadau yn asesu awtoffagi yn dilyn addasiadau genynnol echelin ghrelin. Defnyddiwyd y ddau ddull hyn yn effeithiol iawn yn y llenyddiaeth ehangach, gyda Zhang et al., (2015) yn dangos nam mewn fflwcs awtoffagig yn afu llygod GOAT KO yn ystod diffyg maeth hir.

## 1.7. Nodau ac amcanion

Prif nod y traethawd ymchwil hwn yw nodweddu ymhellach effaith echelin ghrelin-GHS-R ar awtoffagi yn yr ymennydd, gan ehangu ar y canfyddiadau cyfyngedig sydd ar gael yn y llenyddiaeth gyfredol. I gyflawni hyn, defnyddir modelau *in vitro* a modelau *in vivo*.

*in vitro*: bydd effaith triniaethau echelin ghrelin ar fflwcs awtoffagig yn cael ei asesu mewn modelau cellog sefydledig o niwronau dopaminergig a hipocampaid; celloedd SN4741 (J. H. Son et al., 1999) a chelloedd HT-22 (Davis & Maher, 1994). Bydd fflwcs awtoffagig yn cael ei asesu yn y celloedd hyn trwy WB a microscopeg fflwroleuedd, gydag arbrofion yn cael eu cynnal yn absenoldeb a phresenoldeb atalyddion lysosomaid, yn unol â'r canllawiau ar gyfer monitro awtophagy (Klionsky et al., 2021).

*In vivo*: bydd imiwnohistocemeg (IHC) yn cael ei ddefnyddio i nodweddu mynegiad proteinau ATG yn hipocampau llygod sydd a'r gennyn ghrelin wedi'u ddileu (ghrelin knockout KO), gennyn GOAT wedi'u ddileu (GOAT KO) a gyda blocâd o drawsgrifiad GHS-R (loxTB-GHS-R), a'r llygod math gwyllt (WT) o'r un torllwythi.

Asesir yr hipocampws fel y prif ranbarth o ddiddordeb ar gyfer yr astudiaethau hyn o ystyried bod signalu AG-GHS-R1a, ac awtoffagi yn rheoleiddio plastigrwydd hipocampaid, gan gynnwys AHN, a phrosesau dysgu a chof cysylltiedig. Bydd IHC fflwroleuol lluosog hefyd yn cael ei ddefnyddio i asesu a yw AG yn dylanwadu ar fynegiad proteinau ATG mewn niwronau newydd-anedig y DG llygod fawr llawn dwf. Bydd WB hefyd yn cael ei ddefnyddio i nodweddu newidiadau mewn awtoffagi niwral mewn ymateb i wahanol batrymau bwydo, mewn anifeiliaid WT a llygod loxTB-GHS-R. Er mwyn cymharu newidiadau mewn awtoffagi niwral â newidiadau systemig mewn awtoffagi, bydd homogenedau'r afu hefyd yn cael eu nodweddu trwy WB.

## Pennod 2: Dulliau a defnyddiau

### 2.1. Defnyddiau

Rhestrir yr holl adnoddau ac adweithyddion a defnyddir yn arbrofion y traethawd ymchwil hwn, a'u ffynonellau, yn dabl 2.1 isod.

*Tabl 2.1. Tabl defnyddiau allweddol, wedi'u seilio ar dablau STAR methods cyhoeddiadau Cell*

<b>Adweithyddion neu Adnoddau</b>	<b>Ffynhonnell</b>	<b>Dynodwr</b>
<b>Gwrthgyrff</b>		
Biotinylated goat anti-rabbit	Vectorlabs	BA-1000
Goat anti-rabbit Alexa fluor 488	Life Technologies	A11008
Goat anti-rabbit Alexa fluor 568	Life Technologies	A11011
Goat anti-mouse Alexa fluor 568	Life Technologies	A11004
Goat anti-mouse Alexa fluor 405	Life Technologies	A31553
Goat anti-rat Alexa fluor 488	Life Technologies	A11006
Goat anti-rabbit IgG (Hrp linked)	Cell Signalling Technology	7074
Goat anti-mouse IgG (Hrp linked)	Enzo Life Sciences	ADI-SAB-100-J
Mouse anti-TOM20	Santa Cruz	sc-17764
Mouse anti- $\alpha$ -Tubulin	Sigma-Aldrich (Merck)	T5168
Rabbit anti-Becn1	Novus-Biologicals	NB500-249
Rabbit anti-GAPDH	Abcam	ab181602
Rabbit anti-LAMP1	Novus-Biologicals	NBP1-77241
Rabbit anti-LC3A/B	Cell Signalling Technology	4108
Rabbit anti-phospho-ULK1 (Ser555)	Cell Signalling Technology	5869T
Rabbit anti-SQSTM1/p62	Novus-Biologicals	NBP1-48320
Rabbit anti-ULK1	Cell Signalling Technology	8054
Mouse anti-NeuN	Milipore	AB1779SP
Rat anti-BrdU	Biorad	MCA6143
<b>Cemegau, Peptidau ac Adweithyddion eraill</b>		
[D-lys 3]-GHRP-6	Tocris	1922
Bafilomycin A1	Hellobio	HB1125
Chloroquine	Enzo Life Sciences	ENZ-KIT175-0200
L-692,585	Tocris	2261
Rapamycin	Enzo Life Sciences	BML-A275-0005
Rat acyl-ghrelin	Tocris	1465

Rat des-octanoyl (unacyl) ghrelin	Tocris	2951
Resveratrol	Tocris	1418
High glucose DMEM	ThermoFisher	41965039
Glucose, glutamine and serum free DMEM	ThermoFisher	A1443001
Penicillin-streptomycin-fungizone	ThermoFisher	15240062
Phosphate Buffered Saline	ThermoFisher	10010031
L-glutamine	ThermoFisher	25030081
Foetal bovine serum	ThermoFisher	A4766
Trypan blue	ThermoFisher	15250061
Sarstedt Inc flexiPERM micro12 silicone inserts	ThermoFisher	NC1678905
Prolong-gold anti-fade solution	Life Technologies	P36930
Superfrost+ slides	VWR, France	631-0108
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen	79306
MP Biomedicals™ Lysing Matrix D	ThermoFisher	11422420
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich (Merck)	P3840
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	Sigma-Aldrich (Merck)	P0044
Sodium deoxycholate	Sigma-Aldrich (Merck)	D6750
IGEPAL	Sigma-Aldrich (Merck)	I8896
Triton-x-100	Sigma-Aldrich (Merck)	X100
Tween20	Sigma-Aldrich (Merck)	P9416
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Melford	L22010-100.0
Glycine	FisherBioreagents	10061073
Tris hydrochloride	FisherBioreagents	10060390
Tris base	FisherBioreagents	10103203
ProtoGel acrylamide-bisacrylamide (30% Solution at 37.5:1 Ratio)	Geneflow	A2-0072
TEMED (tetramethylethylenediamine)	Sigma-Aldrich (Merck)	T9281
Ammonium persulfate	Sigma-Aldrich (Merck)	A3678
Dithiothritol	FisherBioreagents	BP172-25
NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X)	ThermoFisher	NP0008
BLUeye Pre-Stained Protein Ladder	Geneflow	S6-0024
Immun-Blot® PVDF Membrane	Biorad	1620177
<b>Profion</b>		
Pierce BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher	23227
VectaStain Elite ABC-HRP Kit	Vectorlabs	PK-6100

Cyto-ID® Autophagy Detection Kit 2.0	Enzo Life Sciences	ENZ-KIT175-0200
Amersham ECL Select Western blotting detection reagent	GE Healthcare	RPN2235
Rat/mouse active ghrelin ELISA	Millipore	EZRGRA-90K
<b>Modelau Arbrofol: Llinechau Celloedd</b>		
SN4741		Son et al., 1999
HT-22		Davis et al., 1994
<b>Modelau Arbrofol: Organebau/Straeniau</b>		
Homozygous ghrelin knockout (KO) mice (C57BL/6J background)		Sun et al., 2003
Homozygous GOAT knockout (KO) mice (C57BL/6J background)		Zhao et al., 2010
Homozygous loxTB-GHS-R mice (C57BL/6J background)		Zigman et al., 2005
Lister-hooded rats		Kent et al., 2015
Sprague-Dawley rats		Tilston et al., 2019
<b>Meddalwedd</b>		
GraphpadPrism (ver 6 to 9.0)	<a href="https://www.graphpad.com">https://www.graphpad.com</a>	N/A
ImageJ/FIJI	<a href="https://imagej.net/software/fiji/">https://imagej.net/software/fiji/</a>	N/A
CellProfiler (ver 3.1 to 3.9)	<a href="https://cellprofiler.org/">https://cellprofiler.org/</a>	N/A
Zen lite	<a href="https://www.zeiss.com/microscopy/int/products/microscope-software/zen.html">https://www.zeiss.com/microscopy/int/products/microscope-software/zen.html</a>	N/A
<b>Systemau</b>		
In Cell Analyzer 2000	GE healthcare	N/A
Eclipse 50i light microscope	Nikon	N/A
Axioscope fluorescent microscope	Zeiss	N/A
LSM710 META confocal microscope	Zeiss	N/A
POLARstar Omega plate reader	BMG Labtech	N/A
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell with PowerPac™ basic	Biorad	N/A
Transblot Turbo Transfer System	Biorad	N/A
Chemidoc XRS+	Biorad	N/A
Fastprep FP120 Cell Disruptor	ThermoFisher	N/A



## **2.2. Modelau ac arbrofion *in vitro***

Yn yr isadrannau dilynol, byddaf yn disgrifio'r dulliau cyffredinol a defnyddir ar gyfer yr holl waith *in vitro* y traethawd ymchwil hon. Mae'r rhain yn cynnwys, meithrin celloedd arferol, lysis celloedd ac echdyniad proteinau, blotio Gorllewinol (Western blot-WB) ac electrofforesis gel polyacrylamid sodiwm dodesyl sylffad (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis- SDS PAGE), a gwaith microsgop fflworoleuedd. Gwelir manylion pellach am arbrofion *in vitro* penodol, a'u nodau ac amcanion, yn adran 2 o bennod 3.

### **2.2.1. Meithrin Celloedd Arferol**

#### **2.2.1.1 Celloedd SN4741**

Llinach celloedd o niwronau dopaminergig, a sefydlwyd o'r substantia nigra (SN) mesenceffalig embryonau llygod (diwrnod 13.5), yw'r celloedd SN4741 (Son et al., 1999). Anfarwolwyd y celloedd hyn drwy drawsffurfio gyda adeilad drawsgenynnol a wnaeth cynnwys rhanbarth 5' hyrwyddwr hydrocsylas tyrosin (TH) a oncogenyn mwtagenaidd sy'n sensitif i dymheredd (Son et al., 1999). Pan dyfir rhwng 33 a 37°C mae'r celloedd yn amlhau, tra eu bod yn gwahaniaethu wrth dyfu ar 39°C (Son et al., 1999).

Yn y gwaith hwn, tyfwyd celloedd SN4741 mewn fflasgiau T75 ar 37°C a 5% CO<sub>2</sub>, mewn cyfrwng eryr Dulbecco wedi'i addasu (Dulbecco's modified eagle medium-DMEM) glwcos uchel (4.5g/L), gyda 10% (v/v) serwm ffoetws gwartheg (foetal bovine serum-FBS), 1% (v/v) penisilin-streptomycin (P/S), 1% (v/v) L-glwntamin, a 0.6% (w/v) glwcos ychwanegol. Mae'r amodau hwn yn gyffredinol (Salašová et al., 2017; Schulte et al., 2005), ac rydyn ni wedi ei ddefnyddio yn arbrofion cynt (Bayliss et al., 2016; Beynon et al., 2013). Ar ôl cyrraedd cyfludiad o 90-100%, cafodd y cyfrwng ei sugno, a golchwyd y celloedd mewn 10ml o hydoddiant halwynog byffer ffosffad (PBS), cyn magu am 4 munud mewn 4ml o hydoddiant trypsin-EDTA ar 37°C. Ar ôl hynny, niwtraleiddiwyd y trypsin-EDTA drwy ychwanegu 6ml o gyfrwng

ffres, cyn pasio'r celloedd trwy bibed 10ml, 10 waith i sicrhau daliant unigol. Wedyn, sefydlwyd is-feithrin newydd mewn fflasg T75 glan, gan ddefnyddio cymarebau o 3:17, 2:18, neu 1:19 ml o ddaliant celloedd i gyfrwng ffres, er mwyn cyrraedd cyfludiad o 90-100% mewn 1, 2 neu 3 diwrnod.

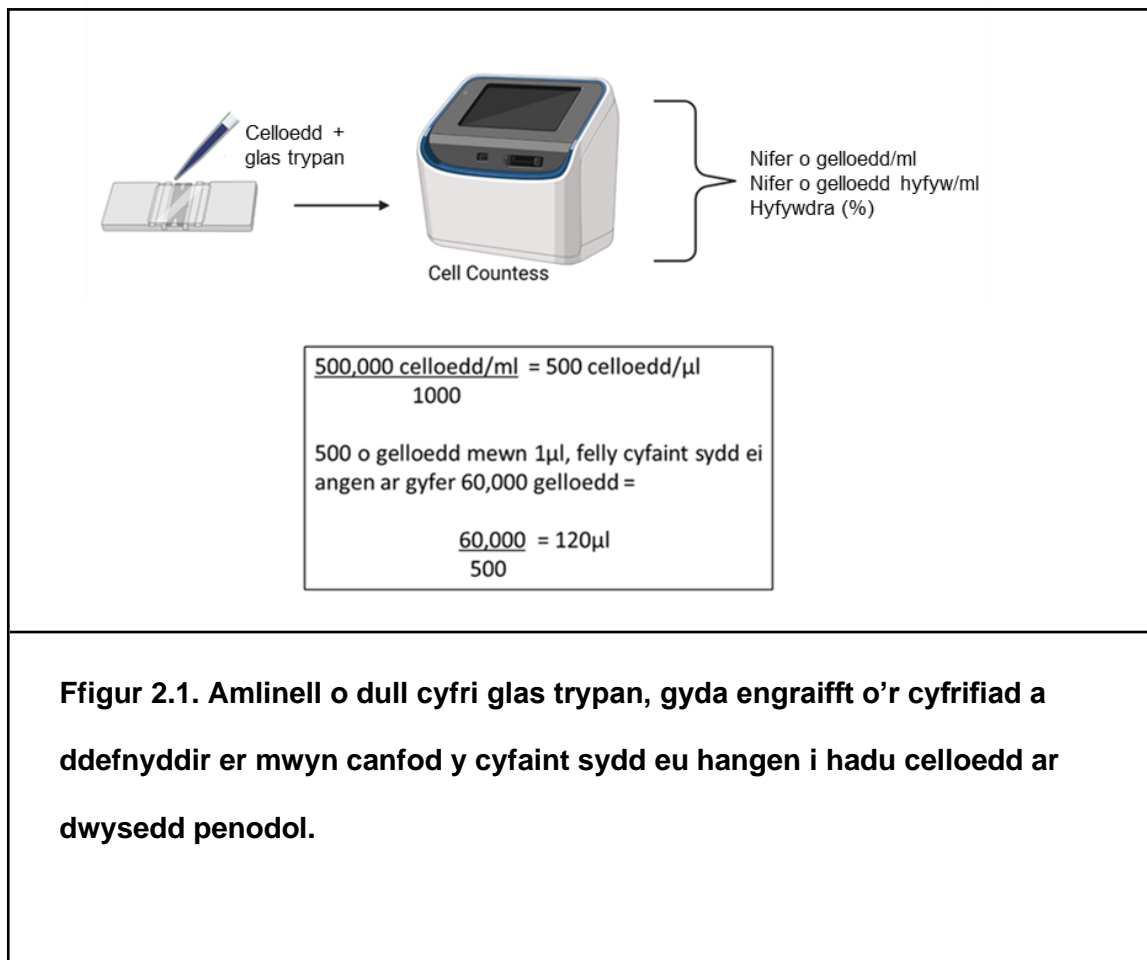
#### 2.2.1.2. Celloedd HT-22

Mae'r celloedd HT-22 yn llinach celloedd niwronau'r hipocampws embryonau llygod (Davis & Maher, 1994). Sefydlwyd y llinach yma drwy is-glonio o'r llinach HT-4, a ddefnyddir fel model ar gyfer gwenwyndra cyffroadol glwtamad gan nad ydynt yn mynegi derbynyddion ionotropig nag ensymau allweddol biosynthesis monoaminau (Davis & Maher, 1994). Er hynny, defnyddir celloedd HT-22 fel model cyffredin i asesu prosesau sy'n berthnasol i'r hipocampws *in vitro* (Aoun, Watson, & Simpkins, 2003; Grohm et al., 2012; Pfister, Ma, Morrison, & D'Mello, 2008).

Yn y gwaith hwn, tyfwyd celloedd HT-22 ar 37°C a 5% CO<sub>2</sub> mewn cyfrwng DMEM glwcos uchel (4.5 g/l heb gyda 10% (v/v) FBS a 1% (v/v), mewn fflasgiau T75. Yn debyg i'r celloedd SN4741, sefydlwyd is-meithrin gelloedd HT-22 ar ôl i'r meithrin cyrraedd cyfludiad o 90-100%. Defnyddiwyd yr un broses a disgrifir ar gyfer y celloedd SN4741, gan newid y cymarebau i 4:16 a 2:18 ml o ddaliant celloedd i gyfrwng ffres er mwyn i'r is-meithrin cyrraedd cyfludiad ar ôl 1 neu 2 diwrnod. Fel gyda'r celloedd SN4741, nid yw'r celloedd HT-22 yn gwahaniaethu i niwronau aeddfed o dan yr amodau arbrolfol hyn.

## 2.2.2 Dull Cyfri Glas Trypan

Er mwyn darganfod y cyfaint o gelloedd sydd angen e'u hadu ar ddwysedd penodol (e.e.. 60,000 celloedd), cymysgwyd 10µl o ddaliant celloedd gyda 10µl o 0.4% glas trypan; llifyn sydd ond yn treiddio trwy gelloedd sydd wedi colli cyfanrwydd pilen (Strober, 2015). Ar ôl cymysgu gyda'r llifyn, mae celloedd hyfyw yn ymddangos gyda cytoplasm clir, gan nad ydynt yn cymryd lan y llifyn, tra bod celloedd anhyfyw yn ymddangos gyda cytoplasm las. Ychwanegwyd 10µl o ddaliant gelloedd-glas trypan i sleid 'cell-countess', a chyfrifir y nifer o gelloedd/ml, a'r gyfran o gelloedd hyfyw i anhyfyw, gyda 'cell countess automated cell counter'. Darganfuwyd y cyfaint o gelloedd sydd angen i hadu ar ddwysedd penodol drwy newid y nifer o gelloedd/ml i gelloedd/µl, a rhannu'r dwysedd hadu penodol gyda'r gwerth hon, fel gwelir yn yr enghraifft isod.



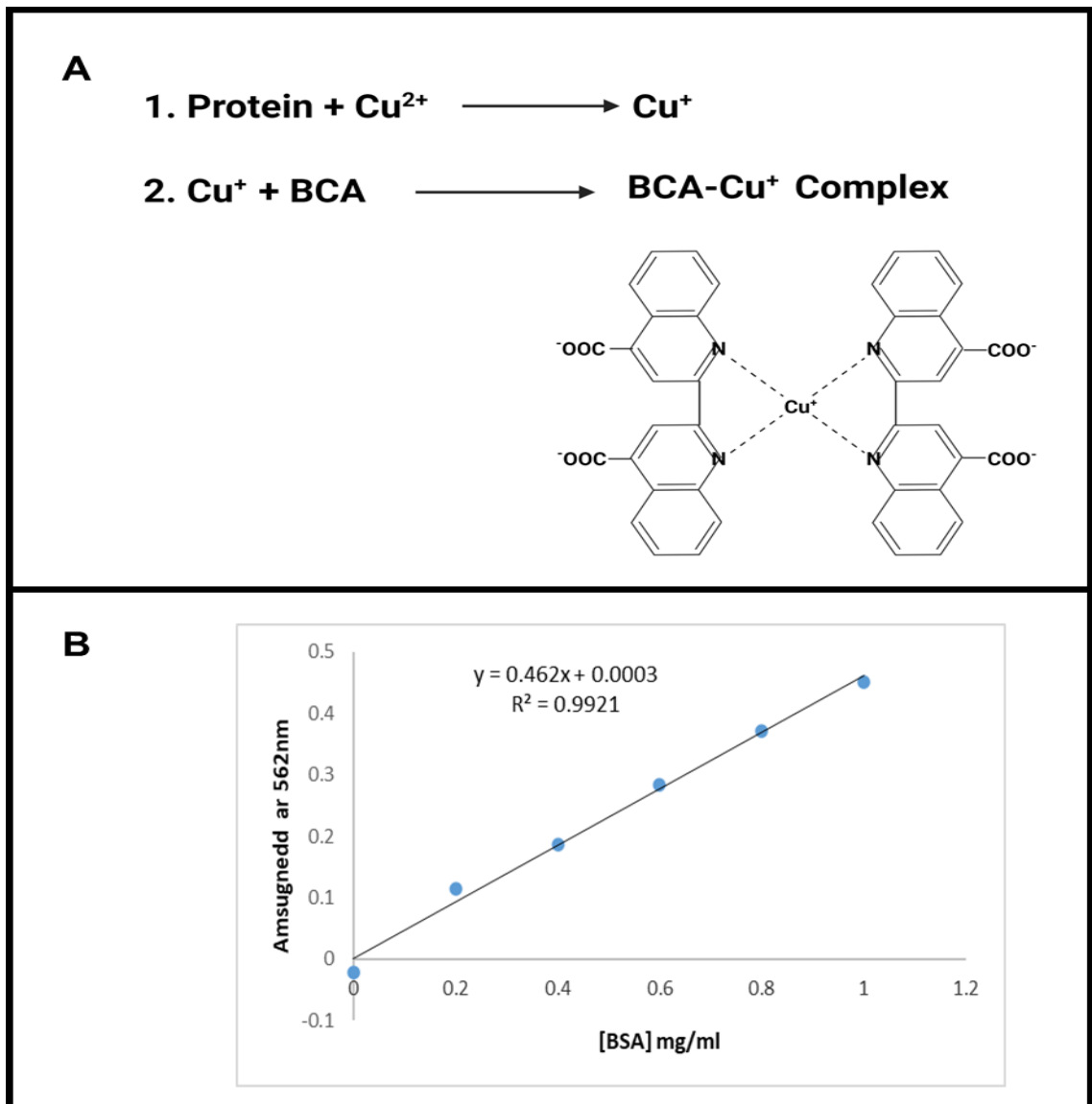
**Ffigur 2.1. Amlinell o dull cyfri glas trypan, gyda enghraifft o'r cyfrifiad a ddefnyddir er mwyn canfod y cyfaint sydd eu hangen i hadu celloedd ar dwysedd penodol.**

### 2.2.3 Lysis celloedd ac echdyniad protein

Ar gyfer lysis celloedd ac echdyniad protein, hadwyd celloedd mewn 2ml o gyfrwng meithrin mewn platiau 6 ffynnon. Defnyddiwyd dwysedd hadu o 120,000 o gelloedd y ffynnon ar gyfer celloedd SN4741, a 200,000 o gelloedd y ffynnon ar gyfer celloedd HT-22. Yn dilyn triniaethau arbrofol, casglwyd y cyfrwng meithrin, a'u storio ar  $-20^{\circ}$ , ac yna golchir y celloedd dwywaith gyda PBS oer ia. Ychwanegwyd 250 $\mu$ l o fyffer lysis oer ia (50mM Tris HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1% (v/v) IGEPAL, 0.5% (w/v) sodiwm deocsicolad, 0.1% (w/v) SDS) i bob ffynnon, a sgrafellir y celloedd o arwyneb y ffynnon gyda luer chwistrell 1ml. Casglwyd y daliant lysad cellog mewn i diwbiau 1.5ml, cyn homogoneiddio wrth basio trwy nodwydd medrydd-23 15 gwaith. Cadwyd y lysad ar ia am 10-15 munud, cyn allgyrchu ar 14,000 chwyldro'r munud (RPM) a  $4^{\circ}\text{C}$  am 10 munud. Ar ôl hynny, trosglwyddwyd yr uwchwaddodion (sy'n cynnwys y protein) i diwbiau newydd, a'u storio ar  $-20^{\circ}\text{C}$  nes eu hangen.

### 2.2.4 Prawf asid bicinconinig (BCA)

Defnyddiwyd y prawf asid bicinconinig (bicinchoninic acid-BCA), (ffigur 2.2A) (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific #23227) i fesur crynodiad protein cyfan sy'n bresennol mewn lysadau celloedd (Smith et al., 1985). Paratowyd yr adweithydd BCA trwy gymysgu halen sodiwm BCA, gyda daliant copr sylffad ar gymhareb 50:1 (Smith et al., 1985). Ychwanegwyd, mewn dyblyg, 10 $\mu$ l o samplau protein, safonau serwm albwmen gwartheg (BSA) (Thermo Scientific #23209) a blanciau byffer i blât 96 ffynnon. Defnyddiwyd amrediad o 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, a 1mg/ml ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ar gyfer crynodiad y safonau BSA. Ychwanegwyd 80 $\mu$ l o'r adweithydd BCA i bob ffynnon, er mwyn cychwyn yr adwaith, cyn magu'r plât ar  $37^{\circ}\text{C}$  am 30 munud a mesur yr amsugnedd ar 562nm gyda darllenydd plât POLARstar Omega (BMG Labtech). Yn dilyn hynny, canfuwyd crynodiad protein y samplau trwy allosod o'r gromlin safonol, fel dengys ffigur 2.2B isod.



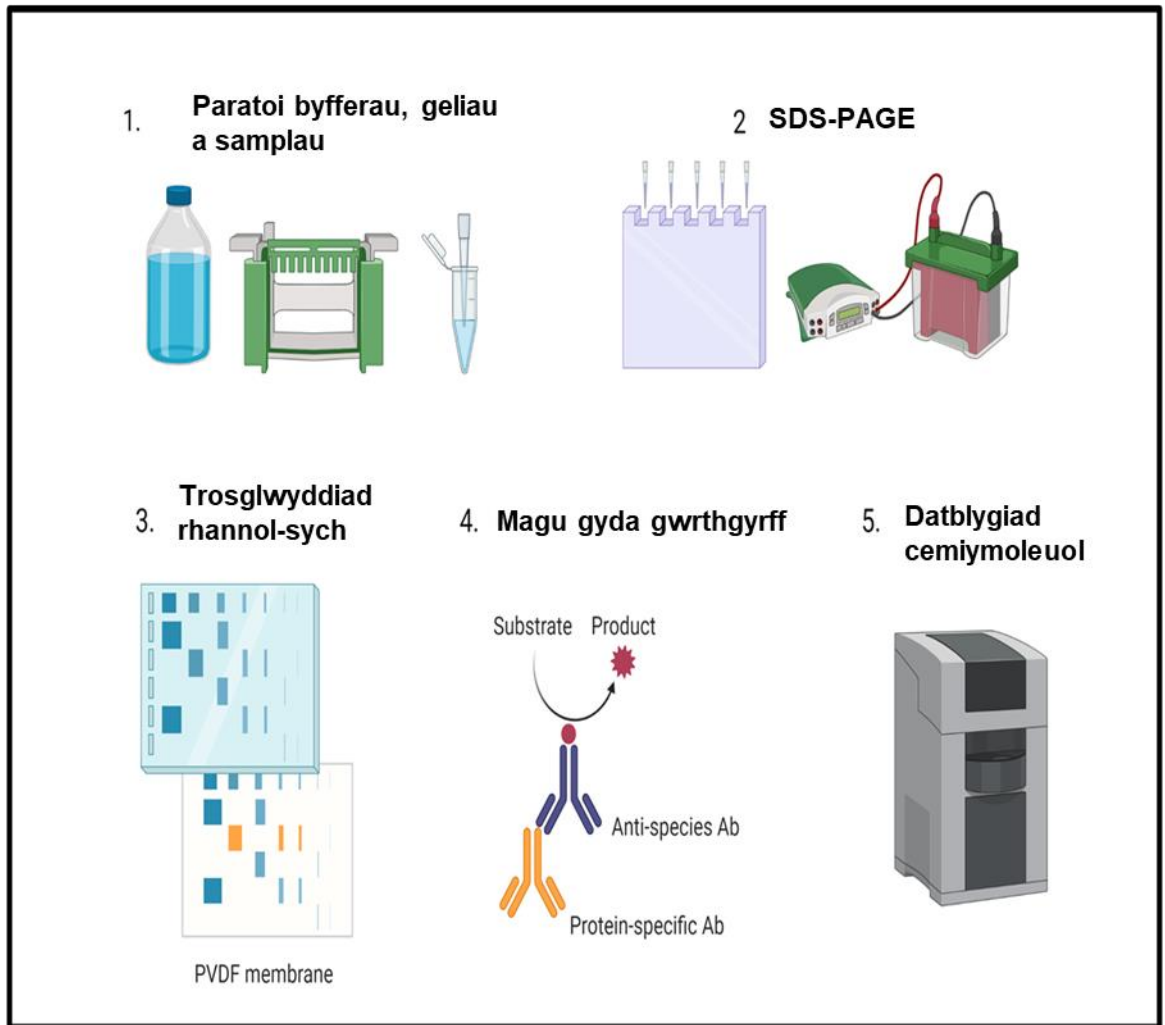
**Ffigur 2.2. Prawf asid bicinonig (BCA assay). A). Darlun o adweithiau y prawf, fel amlinellodd Smith et al., 1985. B). Enghraifft o gromlin safonol a ddefnyddir er mwyn canfod crynodiad protein yn lysadau celloedd. Canfuwyd crynodiad protin llysgadau'r celloedd drwy ad-drefnu hafaliad y llinell ffit orau i  $x = (y - 0.0003)/0.462$ , lle y yw amsugnedd ceith eu mesur gan y prawf a x yw'r crynodiad protein.**

## 2.2.5 WB a SDS-PAGE

Mae WB yn dechneg gyffredin iawn mewn bioleg foleciwlaidd i asesu a chymharu mynegiad proteinau gwahanol, ar ôl iddynt gael eu gwahanu yn ôl eu maint gan SDS PAGE (ffigur 2.3). Yn gyntaf, mae cymysgeddau cymhleth o broteinau yn cael eu dadnatureiddio trwy ferwi mewn byffer SDS. Mae hyn yn datgysylltu'r proteinau i polypeptidau llinol, gan ddarparu gwefr net negatif iddynt. Ar ôl hynny, gydrannir y polypeptidau mewn gel polyacrylamid hydraid, drwy ddylanwad maes trydanol, gyda pholypeptidau llai o maent yn ymfudo'n gynt na pholypeptidau sydd â phwysau moleciwlaidd uwch. Wedyn, trosglwyddir y polipeptidau o'r gel i bilen anadweithiol, megis nitro-cellwlos neu bolyfynyliden deufflorid (PVDF), eto trwy ddefnydd cerrynt trydanol. Yn dilyn hynny, defnyddir gwrthgyrff cynradd penodol yn erbyn y protein dan sylw, gyda systemau cyfunedig enzymol neu fflworoleuol i alluogi datgeliad sensitif y proteinau fel bandiau arwahanol ar y bilen.

### 2.2.5.1 Paratoi'r samplau ar gyfer SDS-PAGE

Er mwyn paratoi samplau ar gyfer SDS-PAGE, defnyddiwyd canlyniadau'r prawf BCA i ddarganfod yr uchafswm o brotein a ellid ei lwytho mewn cyfaint o 21µl. Gwanedwyd y cyfeintiau angenrheidiol o bob sampl i 21µl gyda dŵr distyll dwbl (ddH<sub>2</sub>O), cyn dadnatureiddio trwy ychwanegu 7µl o 4x byffer sampl NUPAGE (Expedeon #NXB3 1010) gyda dithiothreitol (DTT) (Fisher Scientific BP172-25) (5µl:2µl) a berwi ar 95-100°C am 5 munud. Cymysgwyd y samplau gyda fortacs, a allgyrchwyd-micro pen mainc, cyn ac ar ôl dadnatureiddio.



**Ffigur 2.3. Trosolwg o brif camau arbrofion blotio gorllewinol.**

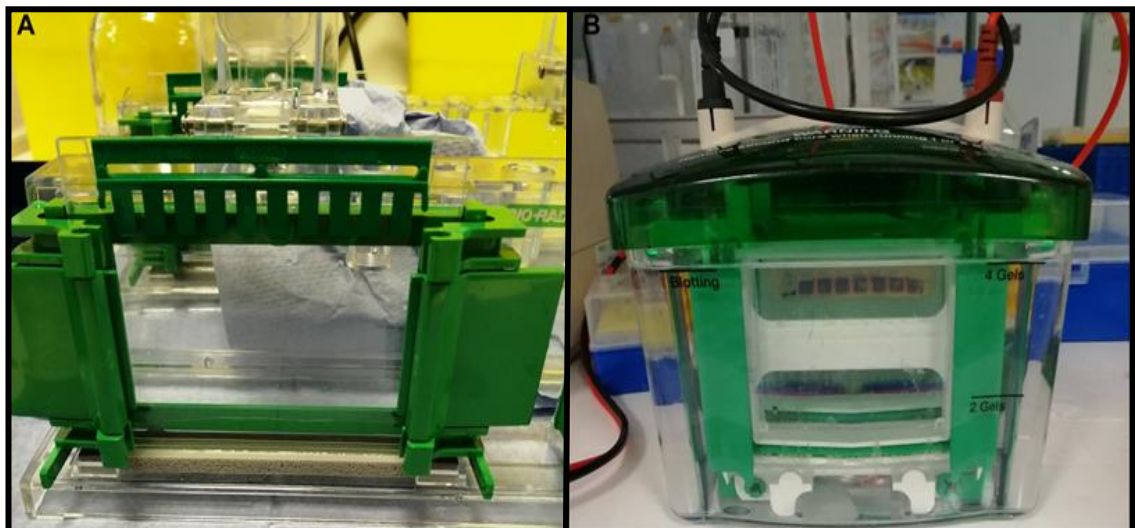
### 2.2.5.2 SDS PAGE

Ar gyfer SDS-PAGE defnyddiwyd system 'Mini-Protean Tetra' gyda phlatiau gwydr mawr 8cm x 10cm, gyda gwahanwyr 1.5mm a phlatiau gwydr bach 7cm x 10cm. Defnyddiwyd geliau polyacrylamid a byfferau (welir tabl 2.2) sy'n seiliedig ar system SDS-Tris-Glycin (Laemmli, 1970). Yn y system hon, a addaswyd o systemau cynharach (B. J. Davis, 1964) ac (Ornstein, 1964), mae'r polypeptidau llinol yn ymfudo trwy ddau gel penodol, sy'n wahanol o ran maint mandwll, cyfansoddiad ïonig a pH, ond yn debyg o ran crynodiad SDS (0.1% w/v) (Laemmli, 1970). Llwythir y samplau ar gel 5% acrylamid sy'n cynnwys 0.125M Tris hydroclorid (HCl), ar pH 6.8, a elwir y gel pentyrru. Mae'r gel pentyrru wedi'i haenu ar ben gel sy'n cynnwys 0.375M Tris HCl ar pH 8.8 a chrynodiad acrylamid rhwng 7.5 a 15%, a elwir y gel cydrannu. Soddir y system gel amharhaol hon mewn byffer sy'n cynnwys 0.192M glycin, 0.025M Tris a 0.1% SDS, a elwir y byffer rhedeg, yn ystod electrofforesis. Gan fod mandyllau mwy o faint yn y gel pentyrru na'r gel cydrannu, mae llai o rym gwrthwynebol ar yr polypeptidau wrth iddynt ymfudo trwy'r gel pentyrru. O achos hyn, mae'r polypeptidau yn cyfuno mewn ardaloedd cychwynol tenau yn y gel pentyrru, cyn iddynt wahanu yn ôl eu mas moleciwlaidd yn y gel cydrannu (Garfin, 2009; Ornstein 1964).

Paratowyd byffer y geliau cydrannu fel nodir yn dabl 2.3, a pharatowyd byffer y geliau pentyrru fel nodir yn dabl 2.4. Ar ôl cychwyn yr adwaith polymeru, trwy ychwanegu amoniwm perswlfad (APS) a tetramethyl-ethylen-diamid (TEMED), ceith ~7ml o fyffer gel cydrannu ei arllwys mewn i fowld castio'r gel. Ychwanegwyd bwtanol dirlawn dwr ar ben y byffer, er mwyn sicrhau ymyl uchaf syth, ac atal ocsidio. Ar ôl i'r gel cydrannu polymeru, rinsiwyd bwtanol dirlawn dwr gyda ddH<sub>2</sub>O, a ychwanegwyd APS a TEMD i'r byffer gel pentyrru, cyn haenu ~3ml dros y gel cydrannu. Yna, gosodwyd crib 15-ffynnon, 1.5mm o drwch, yn y mowld gel i ffurfio'r ffynhonnau ar gyfer llwytho'r samplau protein. Ar ôl i'r gel pentyrru polymeru,



tynnwyd y platiau o'r ffrâm castio a'u rhoi yn y cydosodiad electrod. Rhoddwyd y cydosodiad yn y tanc byffer wedi hynny. Tynnwyd y crib allan o'r gel yn ofalus, cyn rinsio unrhyw acrylamid sydd heb ei polymeru o'r ffynhonnau gyda ddH<sub>2</sub>O. Yna, tywalltwyd byffer rhedeg 1x i'r gronfa ganolog rhwng platiau gwyr y cydosodiad electrod, cyn tywallt byffer i weddill y tanc. Llwythwyd 3µl o safon protein a 25µl o samplau protein i'r ffynhonnau, a rhedir electrofforesis ar 100v, nes i'r llyfn llwytho rhedeg bant o'r gel.



**Ffigur 2.4. Lluniau o gel polyacrylamid tu fewn i'r mowld castio (A) a rhediad SDS-PAGE (B).**

*Tabl 2.2. Cydrannau ar gyfer paratoi byfferau SDS-PAGE a WB*

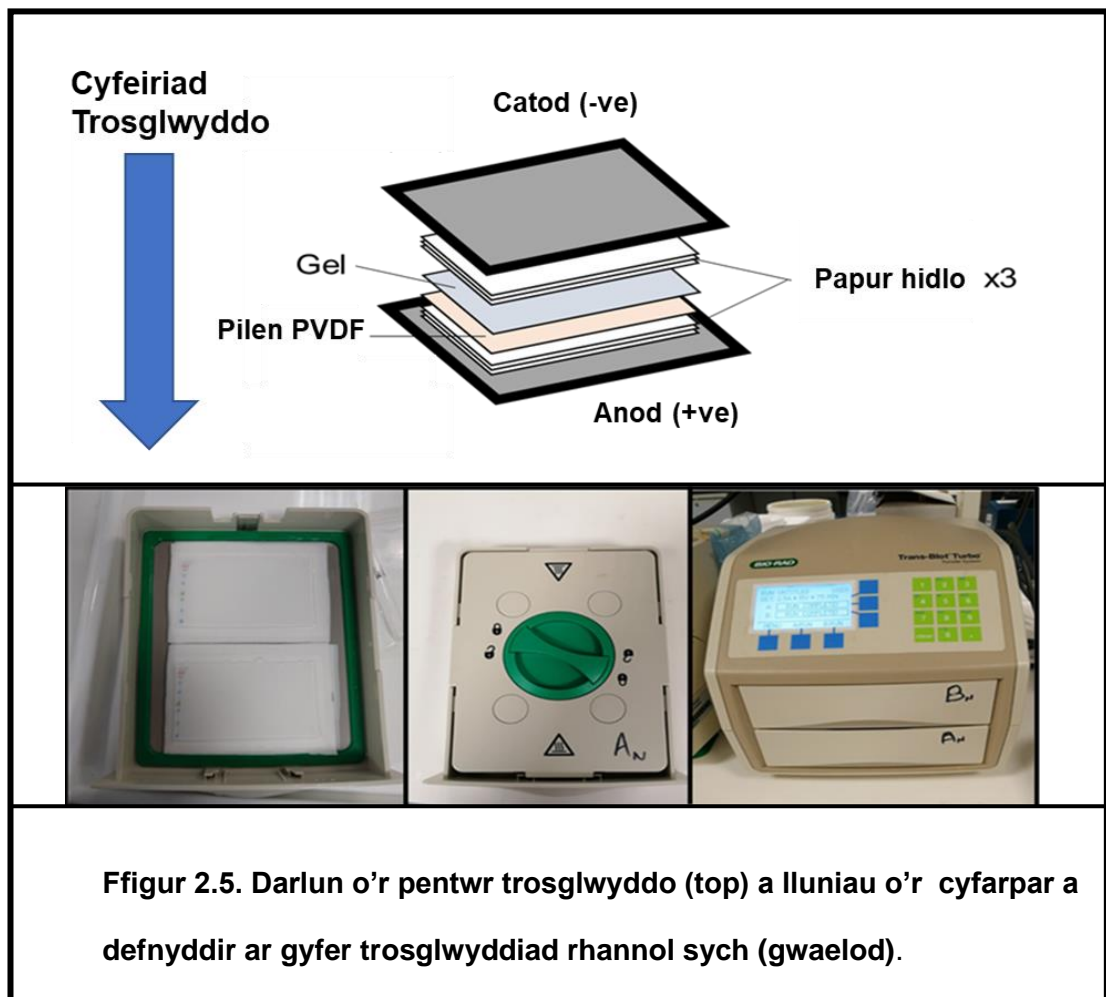
Byffer	Cydrannau
Byffer gel cydrannu (1.5M Tris-HCl pH 8.8, 0.4% w/v SDS)	36.9g Tris HCl, 153.9g Tris bas, 2g SDS. Wedi wneud lan i gyfaint terfynol o 1L gyda ddH <sub>2</sub> O
Byffer gel pentyrru (0.5M Tris HCl, pH 6.8, 0.4% w/v SDS)	6.06g Tris HCl (wedi hydoddi mewn 80ml o ddH <sub>2</sub> O).pH wedi cymhwyso i 6.8. 0.4g SDS. Wedi wneud lan i gyfaint terfynol o 100ml gyda ddH <sub>2</sub> O
Byffer Tris-Glycin 10x	30.25g tris bas, 144.125g glycin. Wedi wneud lan i gyfaint terfynol o 100ml gyda ddH <sub>2</sub> O
Byffer rhedeg 10x	500ml tris glycin, 5g SDS
Byffer rhedeg 1x (ar gyfer electrofforesis)	100ml 10x byffer rhedeg + 900ml ddH <sub>2</sub> O
Byffer trosglwyddo	100ml 10x Tris glycin, 200ml methanol, 700ml ddH <sub>2</sub> O

*Tabl 2.3. Cyfeintiau adweithyddion a defnyddir er mwyn paratoi geliau cydrannu a pentyrru*

Adweithydd	Cydrannu				Pentyrru
	% Acrylamid				
	7.50%	10%	12%	15%	5%
ddH <sub>2</sub> O	5ml	4.2ml	3.5ml	2.5ml	1.75ml
Cymysgedd 30% acrylamid, 0.8% bis-acrylamid	2.5ml	3.3ml	4ml	5 ml	0.5ml
Byffer gel cydrannu (pH 8.8)	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	N/A
Byffer gel pentyrru (pH 6.8)	N/A	N/A	N/A	N/A	0.75ml
10% (w/v) Amoniwm Perswlfad (APS)	100µl	100µl	100µl	100µl	30µl
Tetramethyl-ethylen-diamid (TEMED)	10µl	10µl	10µl	10µl	3µl

### 2.2.5.3 Trosglwyddiad rhannol sych

Yn dilyn SDS-PAGE, trosglwyddwyd proteinau o'r gel polyacrylamid i bilen PVDF gyda mandyllau 0.2  $\mu\text{m}$ , gan ddefnyddio dull rhannol sych (Kurien & Scofield, 2015; Kyhse-Andersen, 1984) a system trosglwyddo turbo-blot (bio-rad). Cyn trosglwyddo, golchwyd y bilen PVDF hydroffobig mewn methanol am 30 eiliad a rinsiwyd gyda ddH<sub>2</sub>O, cyn golchi am oleuaf 5 munud mewn byffer trosglwyddo wedi'u seilio ar brotocol (Towbin, Staehelin, & Gordon, 1979). Golchwyd, geliau polyacrylamid a phapur hidlo yn y byffer hwn am oleuaf 5 munud hefyd. Ar ôl hynny, ffurfiwyd pentwr trosglwyddo trwy osod tri darn o bapur hidlo ar blât y casét trosglwyddo, yna'r bilen PVDF, wedyn y gel polyacrylamid, ac yn olaf tri darn arall o bapur hidlo (ffigur 2.5). Glowyd plât y catod i'r casét trosglwyddo, ac yna trosglwyddwyd y proteinau ar 15v am 75 munud.

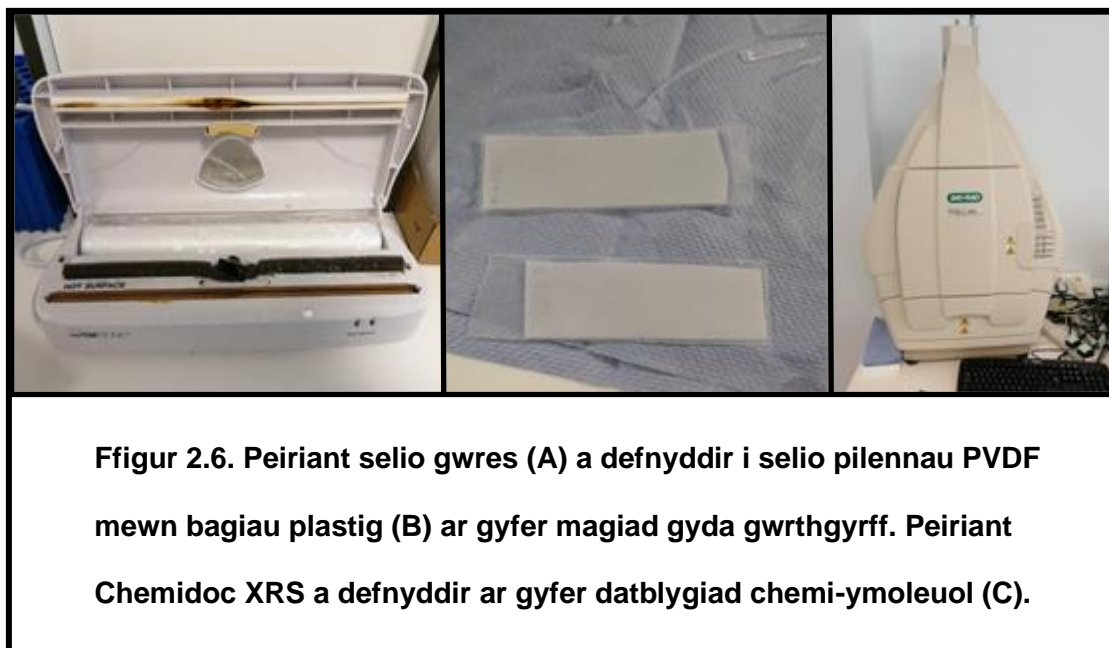


#### 2.2.5.4 Imiwnoblotio

I rwystro rhwymo amhenodol, blociwyd y bilen PVDF gyda hydoddiant 5% (w/v) llaeth heb fraster (NFM) mewn TBSTween20 am 1hr ar siglwr ar dymheredd ystafell. Er mwyn canfod proteinau o feintiau gwahanol, torrwyd y bilen gyda siswrn rhwng y bandiau priodol ar y safon pwysau moleciwlaidd. Ar ôl hynny, gosodwyd pob pilen PVDF rhwng dau len platig, cyn selio tair ochr o'r llenni, gan ddefnyddio mecanwaith selio gwres (ffigur 2.6A), i greu bagiau plastig (ffigur 2.6B) Yna, ychwanegwyd 500-1000µl o wrthgyrff cynradd, cyn selio ochr olaf pob bag. Magwyd y bilen gyda'r gwrthgyrff cynradd dros nos ar 4°C, ar siglwr. Ceith y holl wrthgyrff a defnyddir yn y prosiect hwn eu gwanelu gyda 5% (w/v) BSA mewn TBSTween20. Am ran fwyaf o'r gwrthgyrff, defnyddiwyd ffactor gwanelu 1:1000 o grynodiad y stoc, ond defnyddir ffactor 1:50,000 neu 1:100,000 ar gyfer gwrthgyrff y rheolyddion llwytho (α-twbwlin a GAPDH). Ar ddechrau'r diwrnod nesaf, ailgyrchwyd y gwrthgyrff cynradd, cyn golchi'r belennau 5 gwaith, am 5 munud y tro, mewn TBSTween20, ar y siglwr ar dymheredd ystafell. Wedyn, rhoddwyd y pilennau mewn i fagiau plastig, fel y disgrifir ar gyfer y gwrthgyrff cynradd, cyn ychwanegu 500-1000µl o'r gwrthgyrff eilaidd perthnasol, a magu ar dymheredd ystafell am 90 munud. Yn wahanol i'r gwrthgyrff cynradd, gwanelwyd y gwrthgyrff eilaidd mewn 5% (w/v) NFM TBSTween20 gan ddefnyddio ffactor gwanelu o 1:2500. Ymhellach, labelir y gwrthgyrff eilaidd gyda'r ensym perocsidas marchrudygl (HRP) i alluogi canfod y proteinau trwy dechneg cemi-ymoleuol (ECL).

Cyn i'r ganfod ECL, gwaredwyd a'r gwrthgyrff eilaidd, a cheith rownd arall o gamau golchi eu perfformio. Defnyddiwyd adwaith canfod WB Amersham ECL Select a pheiriant ChemiDoc XRS+ (ffigur 2.6C) ar gyfer ganfod ECL. Paratowyd yr adweithydd drwy gymysgu hydoddiannau liwminol a pherocsid mewn cymhareb 1:1. Yna, gosodwyd y pilennau tu fewn i'r peiriant ChemiDoc gan ychwanegu 350µl o'r

adweithydd i bob un. Llusgwyd pob pilen drwy'r hylif gormodedd ar hambwrdd y Chemidoc, gan ddefnyddio gefel blastig ddi-haint, er mwyn sicrhau trochiad llawn yn yr adweithydd ECL. Wedi hynny, datblygwyd y bilen nes i fandiau ymddangos, gan gymryd gofal i osgoi signal dirlawn, cyn arbed y luniau mewn fformat Tif ar gyfer y dadansoddiad dilynol.

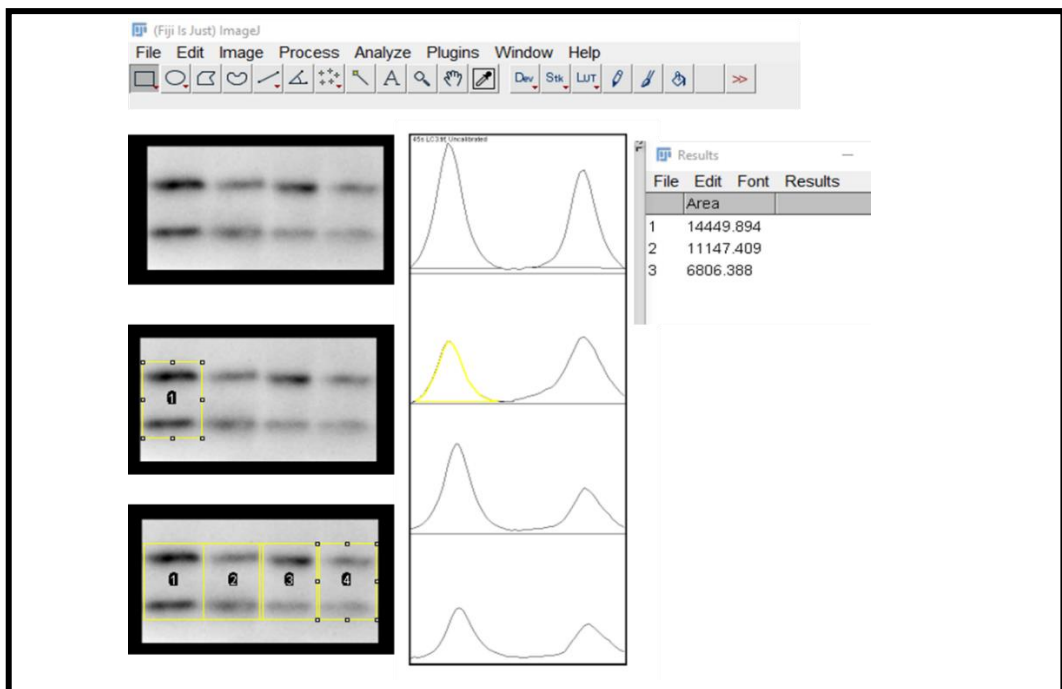


#### 2.2.5.5 Stripio ac ailasesu

Er mwyn ailasesu pilennau PVDF ar gyfer mynegiad proteinau arall sydd ar yr un maint neu faint tebyg i'r proteinau a asesir yn wreiddiol, magwyd y pilennau mewn byffer stripio, gan ddefnyddio bagiau plastig, am 5 munud ar dymheredd ystafell, ar siglwr. Ar ôl golchi'r pilennau gyda dŵr ac wedyn TBSTween20, perfformiwyd imiwnoblotio fel y disgrifir yn adran 2.2.5.4.

### 2.2.5.6 Dadansoddiad ImageJ

Dadansoddwyd dwysedd bandiau WB gyda meddalwedd ImageJ. Tynnwyd bocs o amgylch y band cyntaf, gyda'r erfyn petryal, cyn defnyddio'r gorchymyn dewis lon cyntaf. Yna, llusgwyd yr un bocs draw i'r band nesaf, gan ddefnyddio'r gorchymyn dewis lon nesaf. Ailadroddwyd y broses yma ar gyfer pob band. Yna, plotiwyd brigau dwysedd trwy ddefnyddio'r gorchymyn plotio lonau, a thynnwyd llinell o dan bob histogram cyn mesur eu harwynebeddau. Allforiwyd y gwerthoedd i Microsoft Excel, a cheith dwysedd y proteinau dan sylw eu normaleiddio i ddwysedd y rheolydd llwytho (GAPDH neu  $\alpha$ -twbwlin).

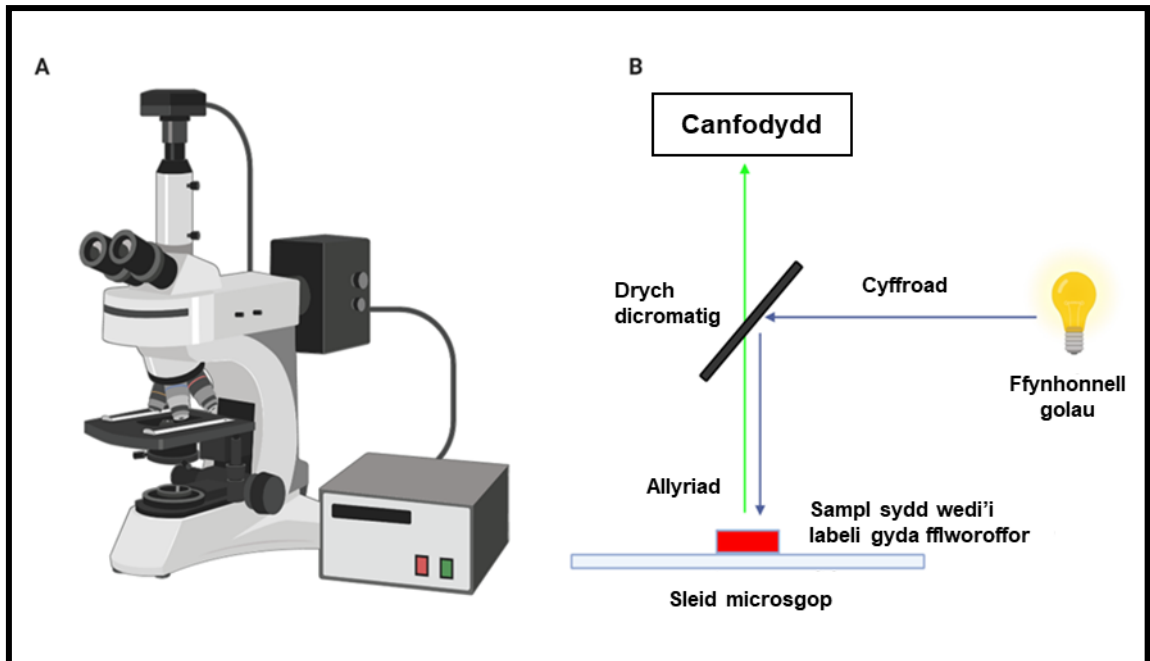


**Ffigur 2.7. Trosolwg o'r dadansoddiad imageJ o dwyseddau optegol bandiau protein WB.** Yn camau cyntaf y dadansoddiad, mae blwch yn cael eu tynnu o amgylch y bandiau dan sylw, a gyda'r gorchymynion dewis lon cyntaf a dewis lon nesaf mae'r lonau yn cael eu dewis. Wedi hynny, mae'r gorchymyn plotio lonau yn plotio brigau sy'n cyfateb i dwysedd optegol y bandiau tu fewn i'r blychau. Gellir mesur yr arwynebedd o dan y gromlin a'i hallforio i Microsoft Excel ar gyfer triniaeth pellach o'r data.

### 2.2.6. Microsgopeg fflworoleuedd

Mae microsgopeg fflworoleuedd yn dechneg hanfodol ym mioleg gellog a moleciwlaidd sy'n galluogi delweddu cydraniad uchel o organynnau, canfod digwyddiadau signalu dynamig yn y fan a'r lle, a chyd-llleoleiddiad rhwng targedau moleciwlaidd penodol (Lichtman & Conchello, 2005). Dibynnir y dechneg hon ar briodweddau fflworoleuol moleciwlau a elwir fflworofforau. Yn aml, llifynnau aromatig bach sy'n gallu dosbarthu eu helectronau orbitol allanol yn hawdd, yw'r rhain (Lichtman & Conchello, 2005). Trwy gyfuno fflworofforau i wrthgyrff neu foleciwlau sy'n croesi organynnau, gellir cynhyrchu offer moleciwlaidd pwerus ar gyfer delweddu swyddogaethau cellog ac isgellog penodol.

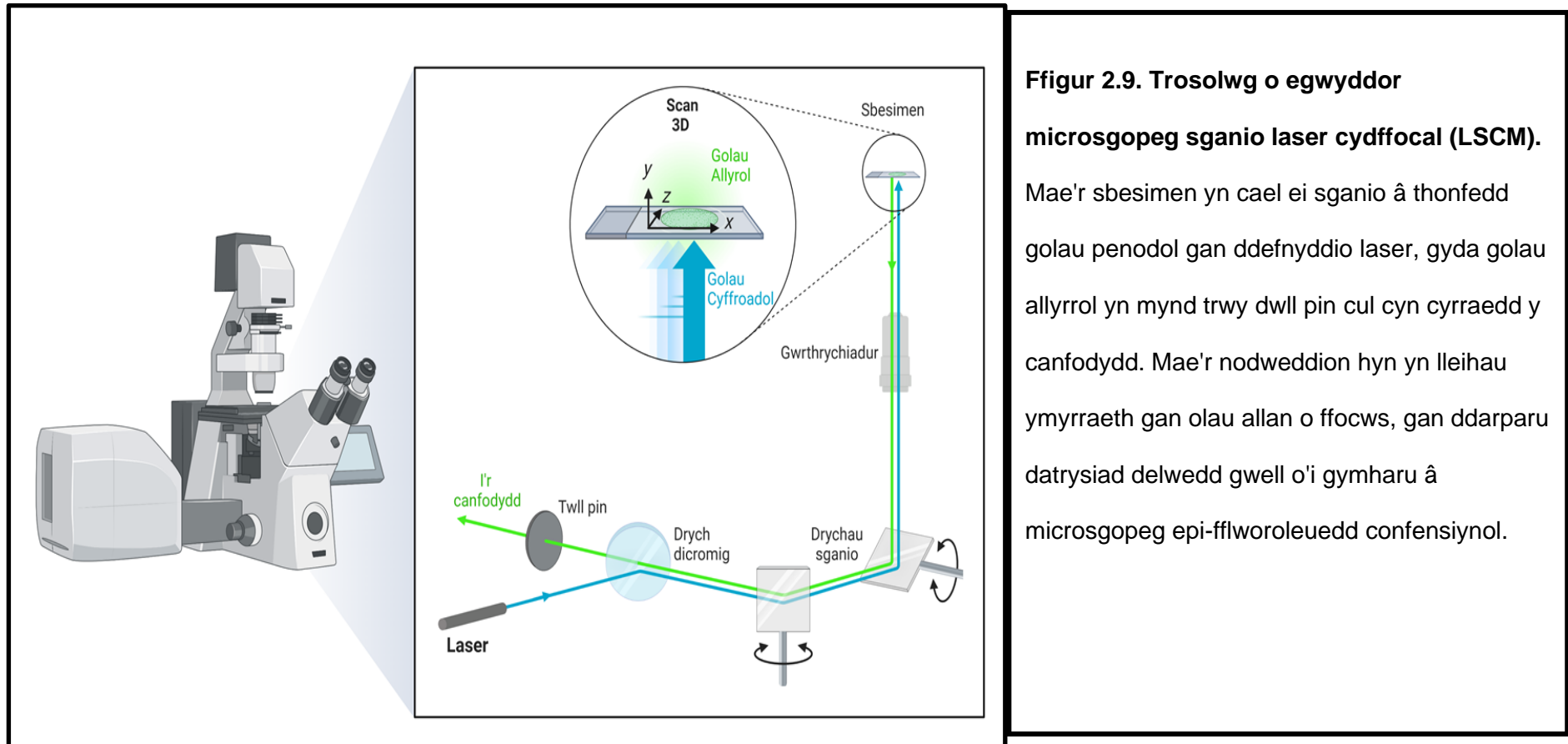
Y microsgop mwyaf cyffredin a ddefnyddir ar gyfer delweddu fflworoleuol, yw'r microsgop epi-fflworoleuedd maes llydan, fel y gwelir yn ffigur 2.8. Ond gwendid mawr sydd gan y systemau hyn yw bod allyriadau olau o fflworofforau sydd y tu allan i'r maes delweddu yn rhwystro gwelededd (Beliën & Wouterlood, 2012). Digwyddir hon gan mae'r lampau mercwri a senon yn goleuo'r sampl gyfan yn lle rhanbarth penodol (Beliën & Wouterlood, 2012). I oresgyn y broblem hon, datblygwyd systemau microsgop sganio laser cydffocal (LSCM). Trwy sganio gyda laser, mae LSCM yn lleihau'r arwynebedd o'r sbesimen sy'n cael ei chyffro gan olau fflworoleuol (Beliën & Wouterlood, 2012; Paddock & Eliceiri, 2014). Ymhellach, mae defnydd twll pin yn y llwybr golau yn lleihau'r cyfanswm o olau y tu allan i'r ffocws sy'n cyrraedd y canfodydd (Beliën & Wouterlood, 2012; Paddock & Eliceiri, 2014). Trwy gyfuno'r priodweddau yma gyda gwrthrychiadur mewn olew agorfa rifiadol uchel, mae LSCM yn galluogi lluniau gyda chyd-raniad llawer mwy uwch na rhai o systemau epi-fflworoleuedd maes llydan (Beliën & Wouterlood, 2012; Paddock & Eliceiri, 2014).



**Ffigur 2.8. Trosolwg o cynllun ac egwyddor microsgopeg fflworoleuedd.**

**A).** Delwedd o microsgop epi-ffloroleuedd maes-llydan cyffredin. **B).** Mae golau cyffroadol, fel arfer o lamp arc mercwri neu senon, yn cael eu adlewyrchu ar y sampl fflworoleuol sydd wedi'u sefydli ar y sleid microsgop. Mae amsugniad ffotonau yn achosi newidiadau mewn egni dirgrynol ac cylchdroi electronau fflworofforau'r sampl, ac wrth i'r electronau ymlacio nol i'w cyflwr isaf, mae golau fflworleuol (sydd a tonfedd uwch a egni llai na'r olau cyffroadol) yn cael eu allyrru. Mae'r ffotonau fflworoleuol yn pasio trwy i'r canfodydd, tra mae golau cyffroadol o'r ffynhonnell golau yn cael eu hidlo allan.





**Ffigur 2.9. Trosolwg o egwyddor microsgopeg sganio laser cydffocal (LSCM).**  
 Mae'r sbesimen yn cael ei sganio â thonfedd golau penodol gan ddefnyddio laser, gyda golau allyrrol yn mynd trwy dwll pin cul cyn cyrraedd y canfodydd. Mae'r nodweddion hyn yn lleihau ymyrraeth gan olau allan o ffocws, gan ddarparu datrysiad delwedd gwell o'i gymharu â microsgopeg epi-ffloroleuedd confensiynol.

#### 2.2.6.1 Hadu celloedd ar gyfer arbrofion microsgop fflworoleuedd

Ar gyfer arbrofion microsgop fflworoleuedd, hadwyd celloedd SN4741 ar ddwysedd 6,000 o gelloedd y ffynnon, a hadwyd celloedd HT-22 ar ddwysedd 10,000 o gelloedd y ffynnon, mewn 100µl o gyfrwng meithrin. Yn bennaf, hadwyd celloedd ar sleidiau microsgop gwydr, gan ddefnyddio siambrau silicon (flexi-perm micro12 silicone inserts) i greu ffynhonnau'r un maint a phlât 96 ffynnon. Elwir y sleidiau hyn yn sleidiau siambr am weddill y traethawd ymchwil. Diheintwyd y sleidiau silicon mewn ddH<sub>2</sub>O trwy ddefnydd ffwrn aerglos, cyn arbelydriad uwchfioled yn y lwfer meithrin celloedd. Yna, sychwyd y siambrau o dan amodau aseptig, cyn atodi i sleidiau gwydr di-haint. Am rhai cymwysiadau, defnyddiwyd platiau 96 ffynnon gyda gwaelodion gwydr yn lle.

#### 2.2.6.2 Premo™ Autophagy Sensor LC3B-GFP (BacMam 2.0)

Hadwyd celloedd SN4741 mewn plât 96 ffynnon, nes iddynt gyrraedd cydlifiad o 70%, cyn magu pob ffynnon gyda 1.8µl o firws Premo™ Autophagy Sensor LC3B-GFP neu firws rheolaidd, mewn 100µl o gyfrwng meithrin, am 24hr. Ar ôl hynny, sugnwyd y cyfrwng meithrin, a golchir y celloedd dwywaith gyda PBS, naill ochr i fagiad 5 munud gyda Hoescht 33342 (1:10,000 mewn PBS). Wedyn, sefydlogwyd gyda PFA (paraformaldehyde) ar dymheredd ystafell yn y tywyllwch, am 15 munud, cyn golchi gyda PBS a storio ar 4°C yn y tywyllwch.

#### 2.2.6.3 Prawf Canfod Awtoffagi Cyto ID 2.0

Heb law am yr arbrofion optimeiddiaeth gwreiddiol, lle defnyddir platiau 96 ffynnon, defnyddiwyd sleidiau siambr ar gyfer arbrofion fflworoleuol prawf canfydd awtoffagi Cyto ID 2.0. Yn dilyn triniaethau arbrofol, sugnwyd y cyfrwng meithrin a golchir y celloedd dwywaith gyda byffer Cyto ID 1x gyda 5% (v/v) FBS. Yna, magwyd y celloedd mewn 100µl o gyfrwng meithrin yn cynnwys yr adweithydd Cyto ID gwyrdd (1:500) a Hoescht (1:1000), ar 37°C a 5% CO<sub>2</sub> am 30 munud i 1 awr. Ar ôl hynny, sugnwyd y cyfrwng meithrin a golchir y celloedd unwaith gyda'r byffer Cyto ID, cyn

sefydlogi gyda PFA ar dymheredd ystafell yn y tywyllwch, am 15 munud. Yn dilyn hyn, golchwyd y celloedd tair gwaith cyn tynnu'r siambr oddi wrth y sleid gwydr a gosodi arwydryn gyda chyfrwng mowntio gwrth-pylu prolong-gold.

#### 2.2.6.4 Cyd-lleoleiddiad awtoffagosomau a mitochondria gyda Cyto ID a mitotracker

Er mwyn asesu cyd-lleoleiddiad awtoffagosomau a mitochondria, perfformiwyd yr un dechneg a disgrifir ar gyfer y prawf Cyto ID, gan ychwanegu'r llifyn mitotracker oren (100nM) i'r adweithydd canfod gyda'r llifyn Cyto ID gwyrdd ac hoescht.

#### 2.2.6.5 Imiwnocytocemeg

Perfformiwyd pob arbrawf imiwnocytocemeg (immunocytochemistry-ICC) mewn sleidiau siambr. Yn dilyn triniaethau arbrol, golchwyd y celloedd dwywaith gyda PBS, cyn sefydlogi gyda PFA am 15 munud ar dymheredd ystafell. Golchwyd y ffynhonnau tair gwaith gyda PBS cyn athreiddio mewn hydoddiant PBS gyda 0.1% (v/v) triton x100 (PBS-T) am 15 munud. Blociwyd antigenau amhenodol yn y sampl trwy fagu gyda 5% (v/v) serwm normal gafr (NGS) mewn 0.1% PBS-T am 1hr. Wedyn, magwyd gyda'r gwrthgorff cynradd penodol, mewn PBS-T, dros nos ar 4°C. Y diwrnod nesaf, golchwyd y celloedd tair gwaith gyda PBS, am 5 munud pob tro, cyn magu gyda gwrthgyrff eilaidd Alecsa-fflworu priodol, wedi'u gwanedu 1:500 mewn PBS-T, am 1hr. Yna, golchwyd y celloedd dwywaith gyda PBS, cyn magu am 5 munud gyda Hoescht 33342 (wedi gwanedu 1:10,000 mewn PBS), a golchi dwywaith gyda PBS eto. Yna, tynnwyd y siambr bant o'r sleid gwydr, cyn gosod arwydryn gyda chyfrwng mowntio gwrth-pylu prolong-gold.

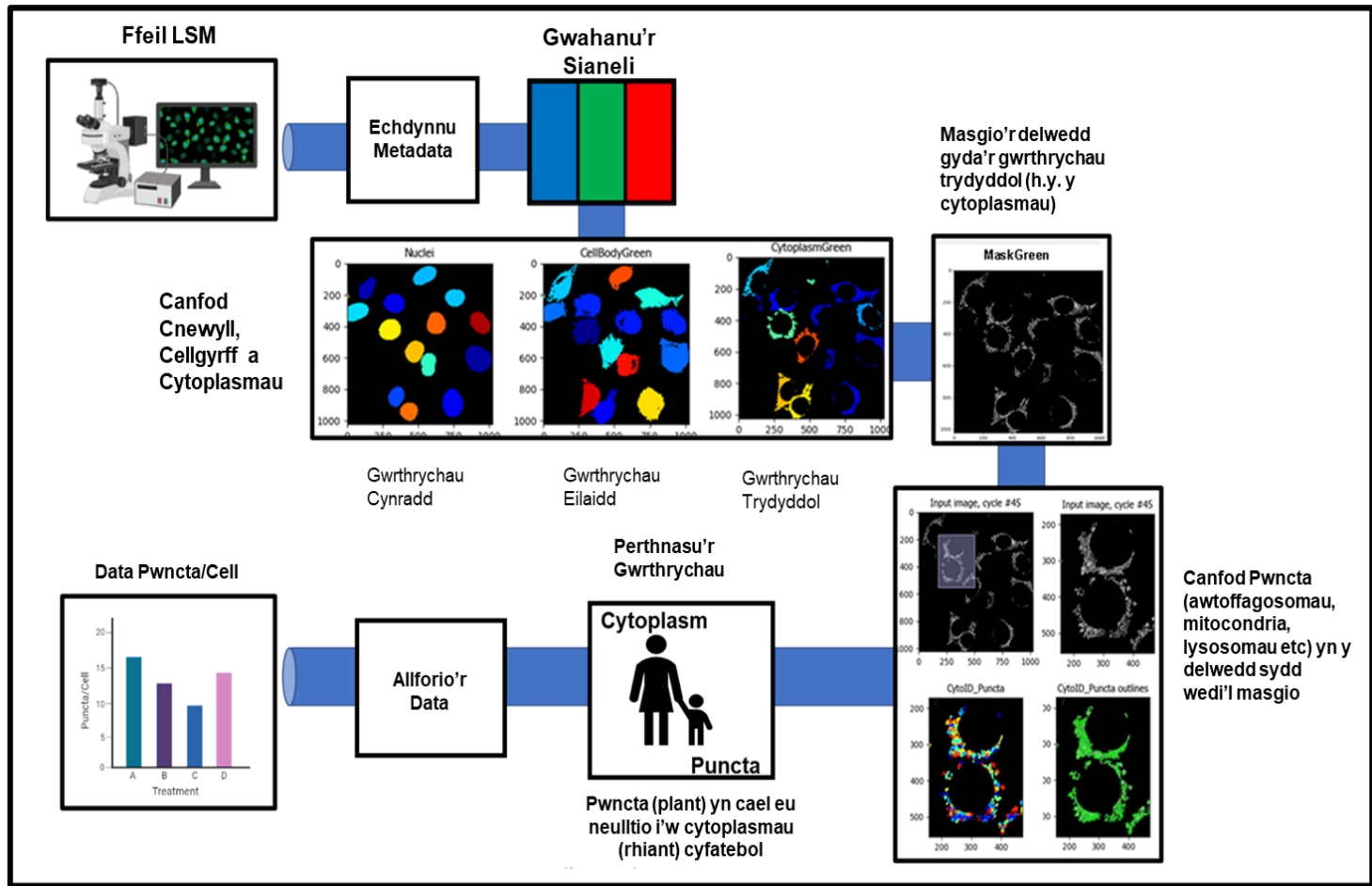
#### 2.2.6.6 Delweddu

Delweddwyd samplau fflworoleuol gyda'r system LSCM LSM 710 (Zeiss).

Dynodwyd celloedd ar sail staen hoescht eu cnewyll, gan ddefnyddio'r modd epi-ffloroleuol gyda gwrthrychiadur sych 10x. Yna, newidiwyd i wrthrychiadur dan olew Plan-Apochromat 63x/1.40 N.A i gasglu delweddau cydraniad uchel yn y modd cydffocal. Casglwyd y delweddau mewn fformat 12-bit (x:1024, y: 1024) drwy sganio'r sbesimen gyda thonfeddi laser 405nm (DAPI/glas), 488nm (FITC/gwyrdd) a 543nm (Rodamin/coch), a chyflymder llinell 4 ar gyfartaledd. Arbedwyd y lluniau fel ffeiliau LSM, sy'n cadw'r metadata; gwybodaeth (ond nid cynnwys) y data (h.y. delweddau) a casglir . Yn ystod arbrofon optimeiddiaeth gwreiddiol y profion GFP-LC3 a Cyto ID, casglwyd lluniau o gelloedd fflworoleuol (mewn plat 96 ffynnon) gyda system epi-ffloroleuedd cyffredin yr In-cell analyser 2000 (GE Healthcare), gan ddefnyddio gwrthrychiadur sych 40x neu 60x.

#### 2.2.6.7 Dadansoddiad Cell Profiler

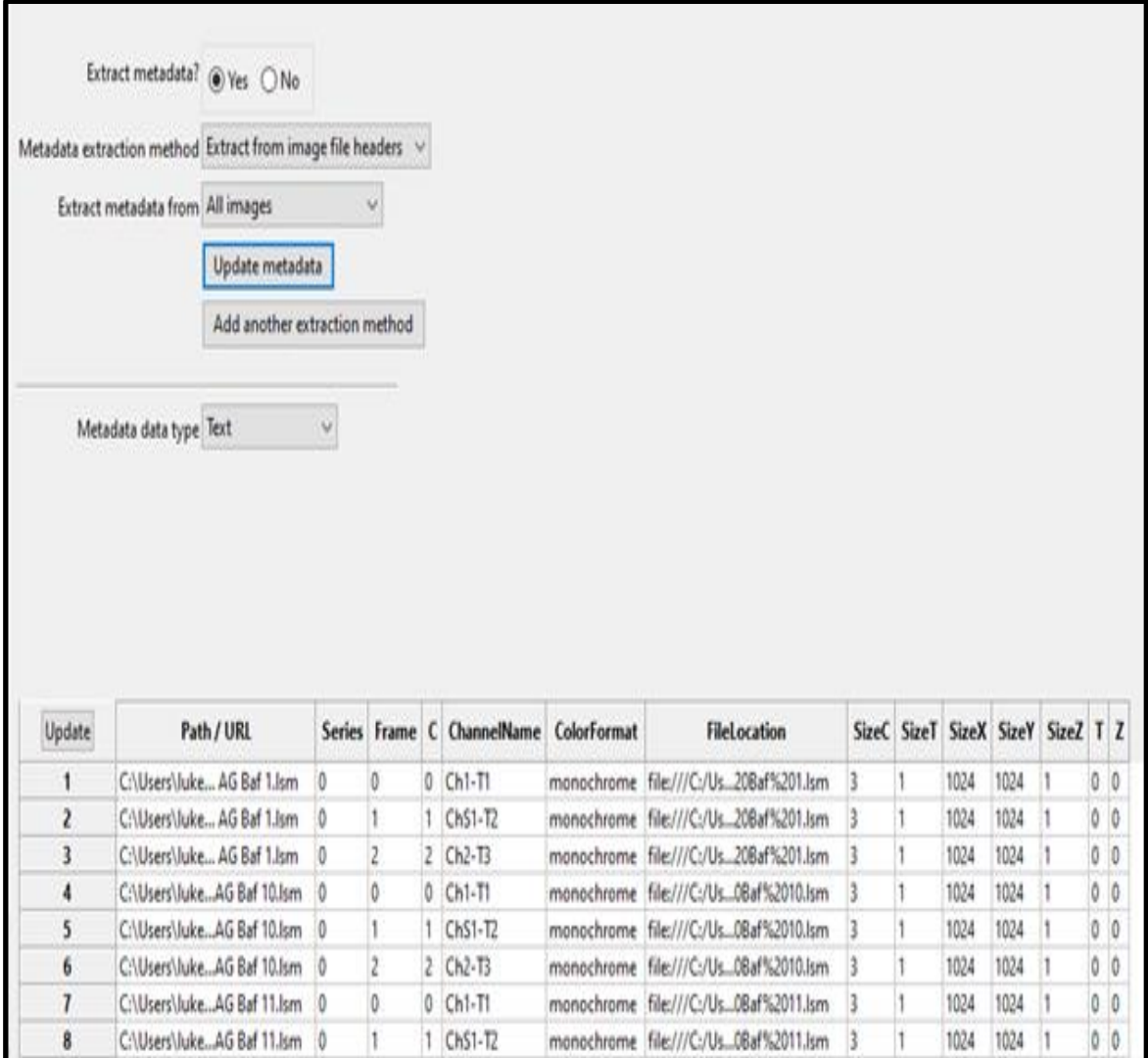
I gyfri'r nifer o bwncta fflworoleuol (e.e awtoffagosomau, mitochondria, lysosomau) yng nghelloedd SN4741 a HT-22, perfformiwyd dadansoddiad delweddu wedi'i hawtomeiddio gan feddalwedd agored CellProfiler (fersiwn 3.1 i 3.1.9). Bydd yr isadrannau dilynol yn rhoi trosolwg cyffredinol o'r protocol a defnyddir, tra gelli ffeindio esboniadau manwl ar sut mae'r protocol yn gweithio yn ein papur diweddar (Rees et al., 2020). Yn fyr, mae'r protocol neu'r bib linell fel elwir CellProfiler, yn cynnwys segmentiad cnewyll a cytoplasmau pob cell yn y ddelwedd, cyn canfod a chyfri'r nifer o bwncta ym mhob cytoplasm annibynnol (ffigur 2.10).



**Ffigur 2.10. Trosolwg o'r pib-linell cyffredinol a defnyddir i canfod a chyfri nifer y pwncta (awtoffagosomau, mitochondria, lysosomau) y gell, ar ôl delweddu microsgopeg sganio laser cydffocal.**

### 2.2.6.7.1 Echdynnu metadata

Mewnforiwyd ffeiliau cydffocal LSM i CellProfiler gan echdynnu'r metadata o benawdau'r ffeiliau (fel gwelir yn ffigur 2.11).



The screenshot shows the 'Extract metadata' settings in CellProfiler. The 'Extract metadata?' checkbox is checked (Yes). The 'Metadata extraction method' is set to 'Extract from image file headers'. The 'Extract metadata from' dropdown is set to 'All images'. There are buttons for 'Update metadata' and 'Add another extraction method'. Below the settings is a 'Metadata data type' dropdown set to 'Text'.

Update	Path / URL	Series	Frame	C	ChannelName	ColorFormat	FileLocation	SizeC	SizeT	SizeX	SizeY	SizeZ	T	Z
1	C:\Users\Juke...AG Baf 1.Ism	0	0	0	Ch1-T1	monochrome	file:///C:/Us...20Baf%201.Ism	3	1	1024	1024	1	0	0
2	C:\Users\Juke...AG Baf 1.Ism	0	1	1	ChS1-T2	monochrome	file:///C:/Us...20Baf%201.Ism	3	1	1024	1024	1	0	0
3	C:\Users\Juke...AG Baf 1.Ism	0	2	2	Ch2-T3	monochrome	file:///C:/Us...20Baf%201.Ism	3	1	1024	1024	1	0	0
4	C:\Users\Juke...AG Baf 10.Ism	0	0	0	Ch1-T1	monochrome	file:///C:/Us...08Baf%2010.Ism	3	1	1024	1024	1	0	0
5	C:\Users\Juke...AG Baf 10.Ism	0	1	1	ChS1-T2	monochrome	file:///C:/Us...08Baf%2010.Ism	3	1	1024	1024	1	0	0
6	C:\Users\Juke...AG Baf 10.Ism	0	2	2	Ch2-T3	monochrome	file:///C:/Us...08Baf%2010.Ism	3	1	1024	1024	1	0	0
7	C:\Users\Juke...AG Baf 11.Ism	0	0	0	Ch1-T1	monochrome	file:///C:/Us...08Baf%2011.Ism	3	1	1024	1024	1	0	0
8	C:\Users\Juke...AG Baf 11.Ism	0	1	1	ChS1-T2	monochrome	file:///C:/Us...08Baf%2011.Ism	3	1	1024	1024	1	0	0

**Ffigur 2.11. Sgrinlun o echdyniad metadata o ffeiliau LSM yn meddalwedd CellProfiler.**

Wedi hynny, defnyddiwyd y modiwl 'NamesAndTypes' i wahanu pob ffeil mewn i ddelweddau graddlwyd ar gyfer pob sianel y microsgop (405nm/glas, 488nm/gwyrdd, 543nm/coch). Fel dengys ffigwr 2.12, ceith hyn ei gyflawni trwy ddefnyddio'r 'rule criteria': Metadata> Does have> C Matching 0, ar gyfer y sianel glas, 1 ar gyfer y sianel wyrdd, a 2 ar gyfer y sianel goch. Elwir y delweddau a chynhyrchwyd ar gyfer y sianelau yn 'OrigiBlue', 'OrigiGreen' ac 'OrigiRed'.

The screenshot displays the 'NamesAndTypes' software interface with three rule configurations. Each configuration is set to match 'All' of the following rules: 'Metadata' > 'Does' > 'Have C matching'.

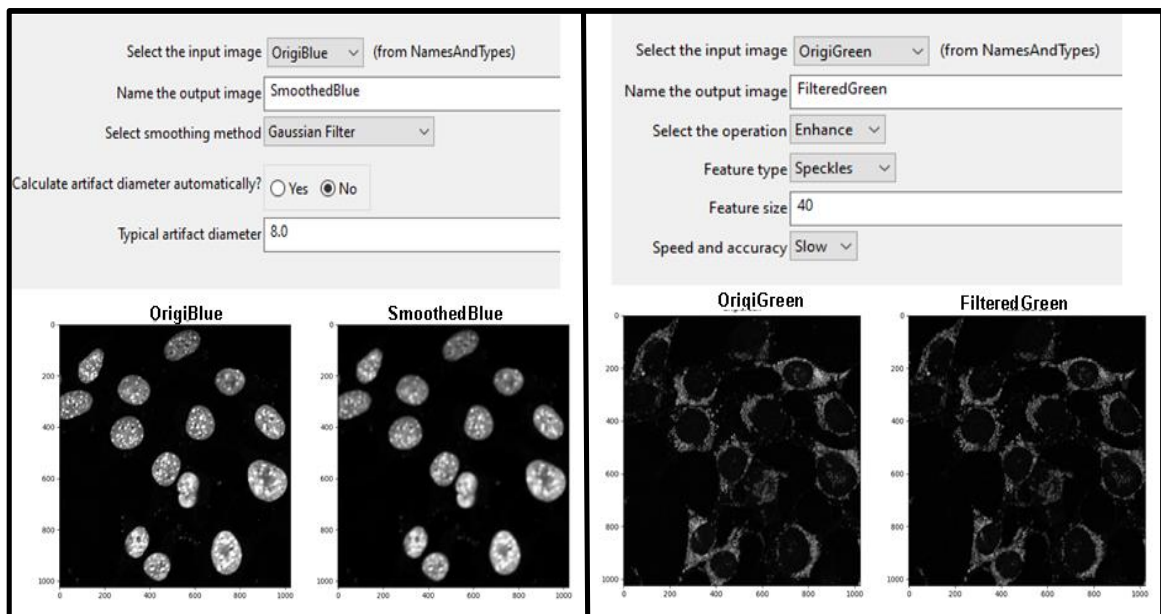
- Rule 1:** Match value is 0. Name to assign these images is 'OrigiBlue'. Image type is 'Grayscale image'. Intensity range is from 'Image metadata'. Buttons: 'Duplicate this image'.
- Rule 2:** Match value is 1. Name to assign these images is 'OrigiGreen'. Image type is 'Grayscale image'. Intensity range is from 'Image metadata'. Buttons: 'Duplicate this image', 'Remove this image'.
- Rule 3:** Match value is 2. Name to assign these images is 'OrigiRed'. Image type is 'Grayscale image'. Intensity range is from 'Image metadata'. Buttons: 'Duplicate this image', 'Remove this image'.

At the bottom, there are buttons for 'Add another image' and 'Add a single image', and a dropdown for 'Image set matching method' set to 'Order'.

**Ffigur 2.12. Sgrinlun o'r paramedrau a defnyddir i gwahanu ffeiliau LSM i delweddau graddlwyd unigol.**

### 2.2.6.7.2 Addasiadau delweddu

Cyn cychwyn canfod nodweddion cellog, addaswyd y delweddau er mwyn gwella'r proses. Defnyddiwyd y modiwl 'Smooth' (ffigur 2.13A) i gywiro gwahaniaethau rhwng arddwyseddau'r cnewyll yn y delweddau 'OrigiBlue' a ddefnyddir y modiwl 'EnhanceOrSuppressFeatures' (ffigur 2.13B) i wella canfod pwncta fflworoleuol yn y delweddau 'OrigiGreen' ac 'OrigiRed'. Elwir y delweddau a cynhyrchir gan y modiwl smooth yn 'SmoothedBlue' (ffigur 2.13A), ar delweddau a cynhyrchir gan y modiwl 'EnhanceOrSuppressFeatures' yn 'FilteredGreen' (ffigur 2.13B) neu 'FilteredRed'.



**Ffigur 2.13. Sgrinlun o paramedrau a delweddau cynrychioladol o'r modiwlau 'Smooth' (ochr chwith) ac 'EnhanceAndSuppressFeatures' (ochr dde) y pib-linell CellProfiler.**



### 2.2.6.7.3 Canfod cnewyll, cellgyrff a cytoplasmau

Yn dilyn yr addasiadau a disgrifir uchod, defnyddiwyd y modiwl

'IdentifyPrimaryObjects' (ffigur 2.14) i ganfod celloedd ar sail eu cnewyll yn y

delweddau 'SmoothedBlue'. Wedi hynny, defnyddiwyd y modiwl

'IdentifySecondaryObjects' (ffigur 2.15) i ganfod ymyl pob cellgorff yn y delweddau

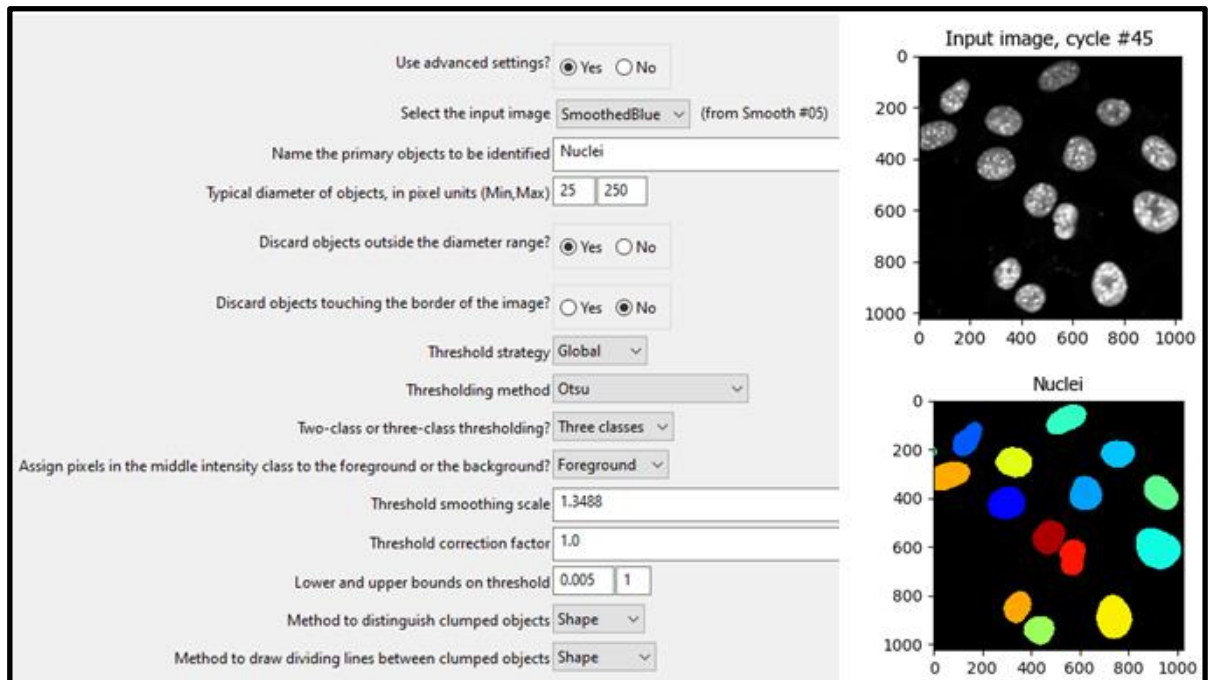
'FilteredGreen' a 'FilteredRed', gan ledaenu o'r cnewyll fel y disgrifir yn Rees et al.,

(2020). Labelir y cellgyrff yn y delweddau 'FilteredGreen', yn 'CellBodyGreen' ar rhai

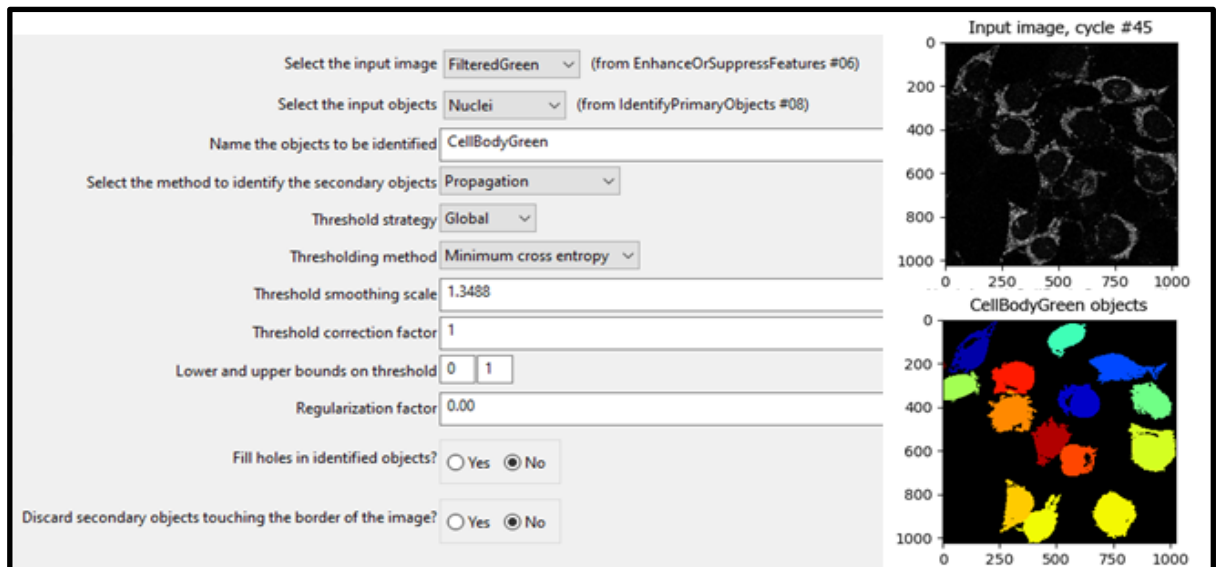
o'r delweddau 'FilteredRed' yn 'CellBodyRed'. Defnyddiwyd wedyn, y modiwl

'IdentifyTertiaryObjects' (ffigur 2.16) i dynnu'r cnewyll oddi wrth y cellgyrff, gan

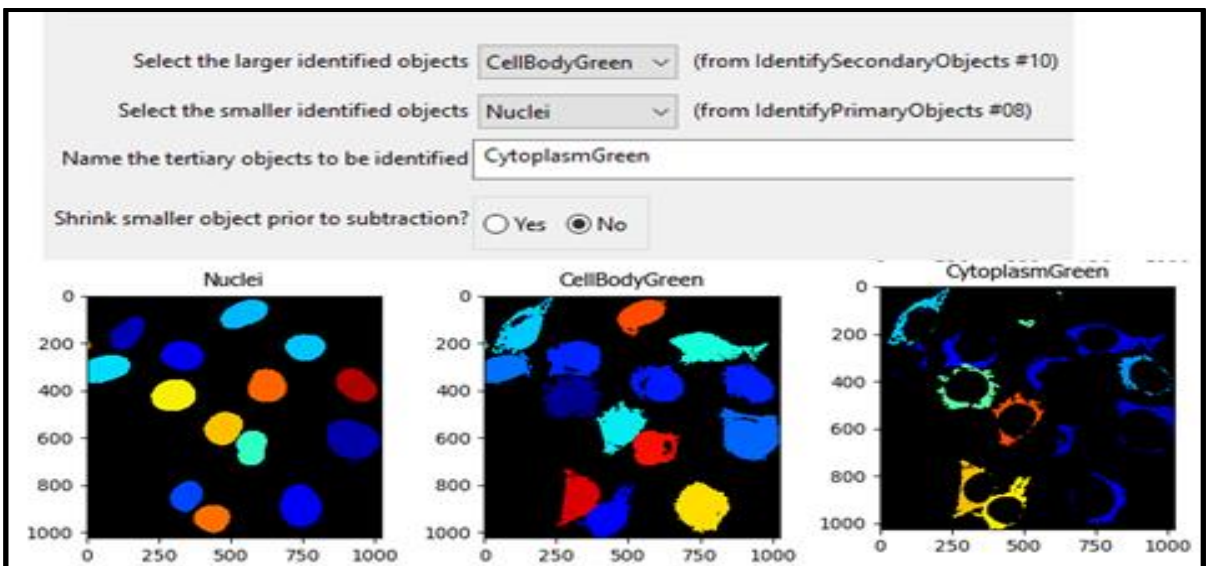
enwi'r gwrthrychau a chynhyrchir yn 'CytoplasmGreen' a 'CytoplasmRed'.



**Ffigur 2.14. Sgrinlun o paramedrau a delweddau cynrychioladol o'r modiwl 'IdentifyPrimaryObjects' a defnyddir i canfod cnewyll cellau yn CellProfiler.**



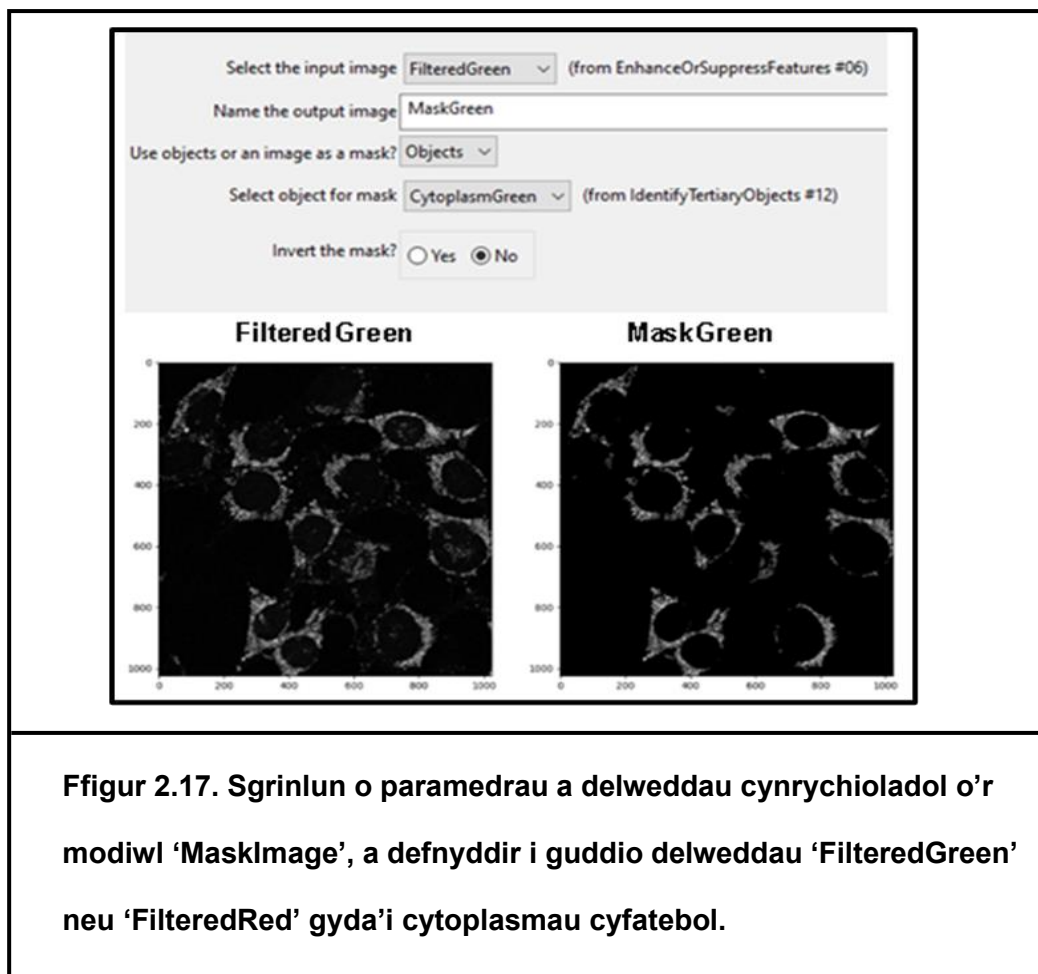
**Ffigur 2.15. Sgrinlun o paramedrau a delweddau cynrychioladol o'r modiwl 'IdentifySecondaryObjects' a defnyddir i canfod cellgyrff yn CellProfiler.**

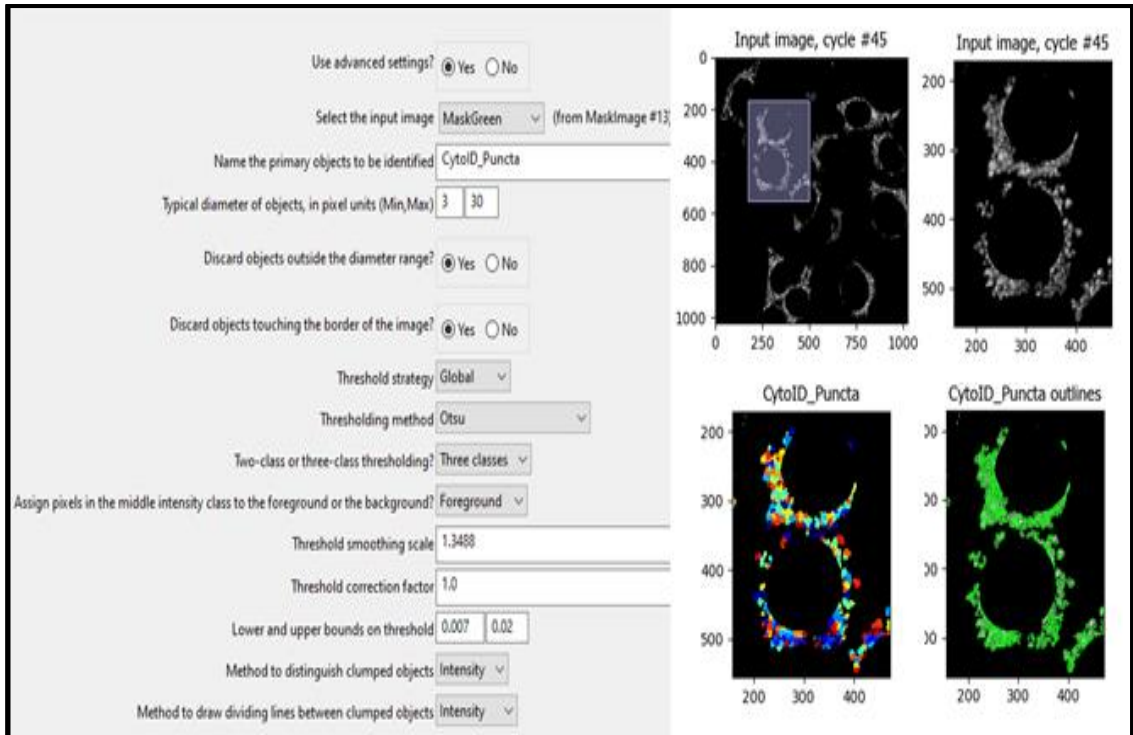


**Ffigur 2.16. Sgrinlun o paramedrau a delweddau cynrychioladol o'r modiwl 'IdentifyTertiaryObjects' a defnyddir i canfod cytoplasmau celloedd yn CellProfiler.**

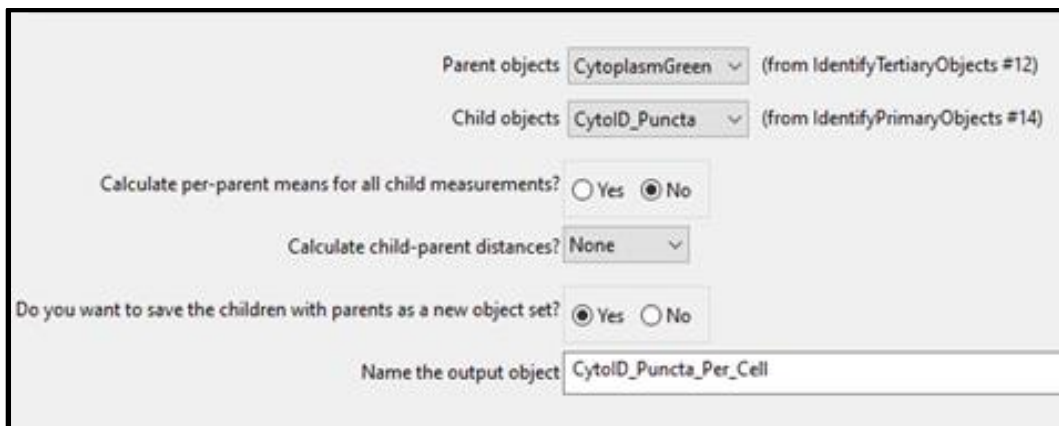
#### 2.2.6.7.4 Canfod a chyfri pwncta

Yn dilyn segmentiad y cytoplasm, gweithredwyd cyfres o gamau i ganfod a chyfri pwncta fflworoleuol ym mhob cell annibynnol yn y delweddau gwyrdd a coch. Yn gyntaf, defnyddiwyd y modiwl 'MaskImage' i guddio'r delweddau 'FilteredGreen' a 'FilteredRed' gyda'r cytoplasmau cyfatebol (i.e CytoplasmGreen neu CytoplasmRed) fel gwelir yn ffigur 2.17. Elwir y delweddau a chynhyrchir yn 'MaskedGreen' a 'MaskedRed'. Defnyddiwyd y delweddau hyn fel y mewnbwn yn y modiwl 'IdentifyPrimaryObjects' er mwyn canfod pwncta fflworoleuol (ffigur 2.18). Ar gyfer prawf Cyto ID, labelwyd y pwncta (o'r ddelwedd MaskedGreen) yn Cytoid\_Puncta, a labelir pwncta o'r prawf Mitotracker yn Mito\_Puncta. Ar ôl hynny, defnyddiwyd y modiwl 'RelateObjects' i gyfri'r nifer o pwncta ym mhob cell, gan osod y cytoplasmau (gwyrdd a coch) fel rhieni (parent objects) a'r pwncta (Cytoid\_Puncta a Mito\_Puncta) fel plant (children) (ffigur 2.19).





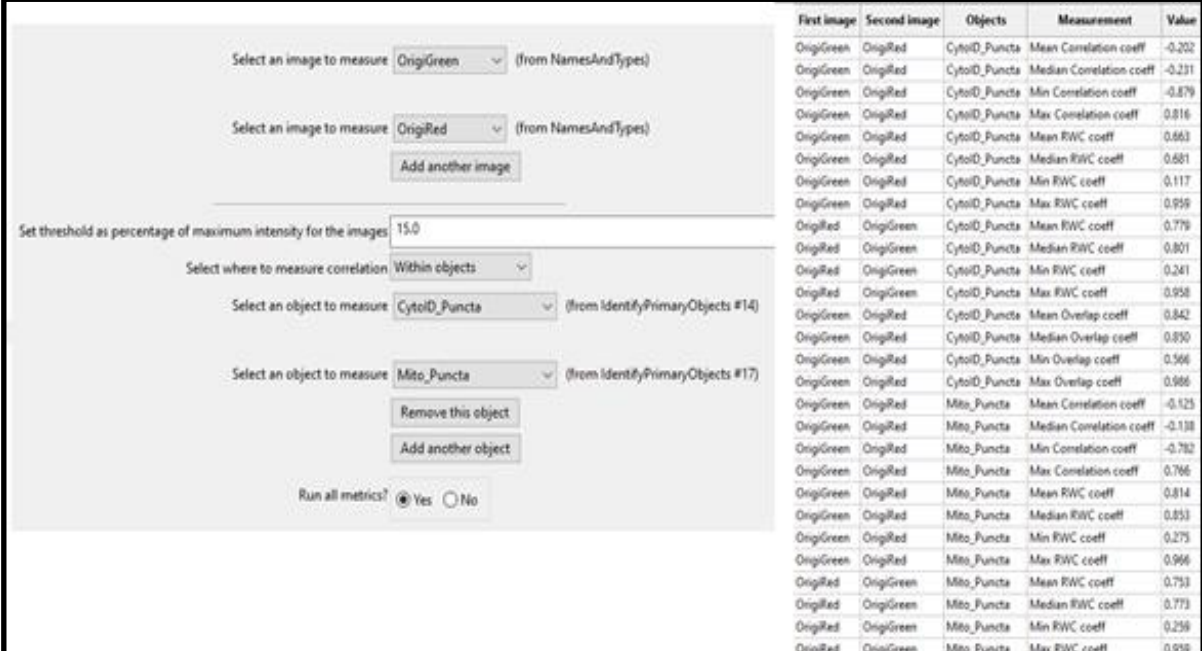
**Ffigur 2.18. Sgrinlun o paramedrau a delweddau cynrychioladol o'r modiwl 'IdentifyPrimaryObjects', a defnyddir i ganfod a chyfri pwncta mewn cytoplasmau delweddau sydd wedi'u masgio.**



**Ffigur 2.19. Sgrinlun o'r paramedrau a defnyddir yn y modiwl 'RelateObjects' i neulltio pwncta i'w cytoplasmau cyfatebol, er mwyn canfod nifer o pwncta/cell.**

### 2.2.6.7.5 Asesu cyd-leoleiddiad pwncta

Defnyddiwyd sawl modiwl i asesu cyd-leoli rhwng pwncta Cyto-ID (gwrdd) a Mitotracker (coch). Yn gyntaf, defnyddiwyd y modiwl 'MeasureColocalization' (ffigur 2.20) i fesur paramedrau cydberthyniad a chyd-leoleiddiad yn y delweddau gwrdd a coch wreiddiol (heb eu haddasu). Wedyn, defnyddiwyd y modiwl 'RelateObjects' i neilltuo pwncta Cyto-ID fel rhieni a pwncta Mitotracker fel plant, yn debyg i beth disgrifir uchod ar gyfer cyfri'r nifer o pwncta y gell (ffigwr 2.18). Yn olaf, defnyddiwyd y modiwl 'ClassifyObjects' i neilltuo pwncta i finiau cyd-leoleiddedig a heb cyd-leoleiddio (ffigur 2.21).



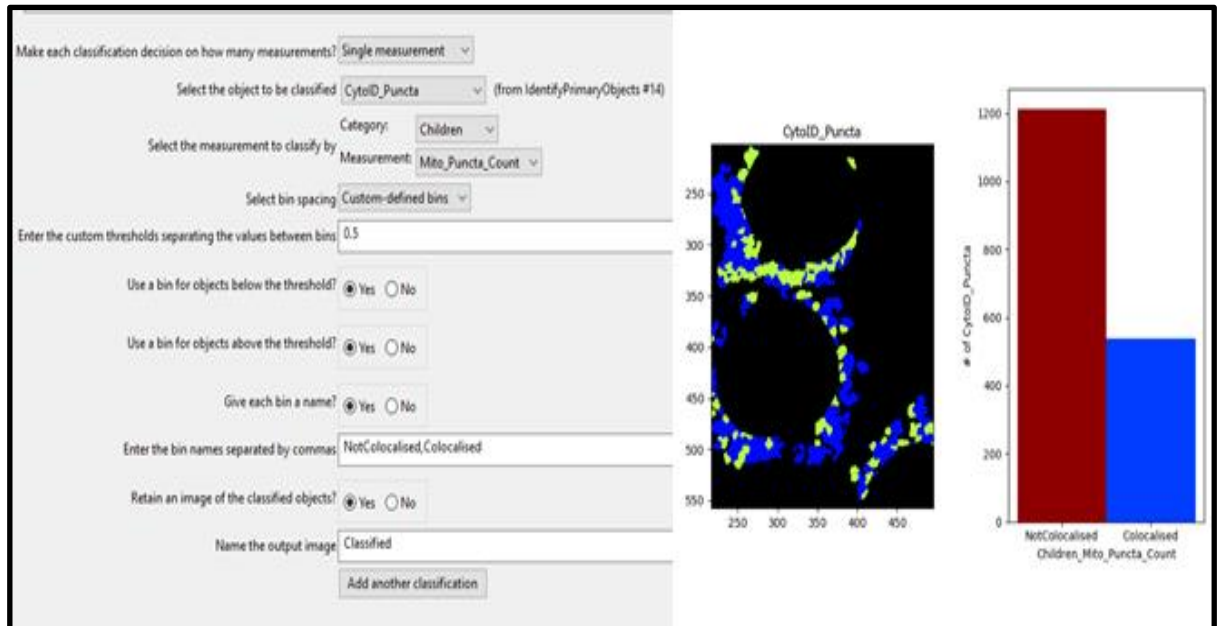
The screenshot shows the 'MeasureColocalization' software interface. On the left, there are several configuration options:

- Select an image to measure: OrigGreen (from NamesAndTypes)
- Select an image to measure: OrigRed (from NamesAndTypes)
- Add another image
- Set threshold as percentage of maximum intensity for the images: 15.0
- Select where to measure correlation: Within objects
- Select an object to measure: Cytoid\_Puncta (from IdentifyPrimaryObjects #14)
- Select an object to measure: Mito\_Puncta (from IdentifyPrimaryObjects #17)
- Remove this object
- Add another object
- Run all metrics?  Yes  No

On the right, there is a table with the following columns: First image, Second image, Objects, Measurement, and Value.

First image	Second image	Objects	Measurement	Value
OrigGreen	OrigRed	Cytoid_Puncta	Mean Correlation coeff	-0.202
OrigGreen	OrigRed	Cytoid_Puncta	Median Correlation coeff	-0.231
OrigGreen	OrigRed	Cytoid_Puncta	Min Correlation coeff	-0.879
OrigGreen	OrigRed	Cytoid_Puncta	Max Correlation coeff	0.816
OrigGreen	OrigRed	Cytoid_Puncta	Mean RWC coeff	0.663
OrigGreen	OrigRed	Cytoid_Puncta	Median RWC coeff	0.681
OrigGreen	OrigRed	Cytoid_Puncta	Min RWC coeff	0.117
OrigGreen	OrigRed	Cytoid_Puncta	Max RWC coeff	0.959
OrigRed	OrigGreen	Cytoid_Puncta	Mean RWC coeff	0.779
OrigRed	OrigGreen	Cytoid_Puncta	Median RWC coeff	0.801
OrigRed	OrigGreen	Cytoid_Puncta	Min RWC coeff	0.241
OrigRed	OrigGreen	Cytoid_Puncta	Max RWC coeff	0.958
OrigGreen	OrigRed	Cytoid_Puncta	Mean Overlap coeff	0.842
OrigGreen	OrigRed	Cytoid_Puncta	Median Overlap coeff	0.850
OrigGreen	OrigRed	Cytoid_Puncta	Min Overlap coeff	0.566
OrigGreen	OrigRed	Cytoid_Puncta	Max Overlap coeff	0.986
OrigGreen	OrigRed	Mito_Puncta	Mean Correlation coeff	-0.123
OrigGreen	OrigRed	Mito_Puncta	Median Correlation coeff	-0.138
OrigGreen	OrigRed	Mito_Puncta	Min Correlation coeff	-0.782
OrigGreen	OrigRed	Mito_Puncta	Max Correlation coeff	0.766
OrigGreen	OrigRed	Mito_Puncta	Mean RWC coeff	0.814
OrigGreen	OrigRed	Mito_Puncta	Median RWC coeff	0.853
OrigGreen	OrigRed	Mito_Puncta	Min RWC coeff	0.273
OrigGreen	OrigRed	Mito_Puncta	Max RWC coeff	0.966
OrigRed	OrigGreen	Mito_Puncta	Mean RWC coeff	0.753
OrigRed	OrigGreen	Mito_Puncta	Median RWC coeff	0.773
OrigRed	OrigGreen	Mito_Puncta	Min RWC coeff	0.256
OrigRed	OrigGreen	Mito_Puncta	Max RWC coeff	0.958

**Ffigur 2.20. Paramedrau a defnyddir i asesu cydberthyniad a gorgyffyrddiad rhwng arddwyseddau picseli delweddau Cyto-ID a Mitotracker.**



**Ffigur 2.21. Paramedrau a delweddau cynrychioladol o'r modiwl 'ClassifyObjects' a defnyddir i neilltuo pwncta i finiau cyd-llleoleiddedig a heb-gyd-llleoleiddio**

## **2.3 Modelau ac arbrofion in vivo**

Yn yr isadrannau dilynol, byddaf yn disgrifio'r dulliau cyffredinol a'r modelau cnofilod a defnyddir ar gyfer yr holl waith *in vivo* y traethawd ymchwil hon. Mae'r rhain yn cynnwys arbrofion immiwnohistocemeg (IHC), homogeneiddio meinwe ac echdyniad protein, WB, ac ELISAs.

### **2.3.1 Arbrofion imiwnohistocemeg**

Perfformiwyd arbrofion (IHC) ar doriadau ymennydd cnofilod coronaidd, 30µm o drwch, a geith eu sefydlogi a'i cryo-warchodi. Storiwyd y meinweoedd hyn o arbrofion blaenorol gan ein grŵp (Hornsby et al., 2016; Hornsby et al., 2020; Kent et al., 2015; Ratcliff et al., 2019) tra addasir y protocolau IHC o'r rhai a defnyddir yn yr astudiaethau hyn. Aseswyd mynegiad targedau sengl yn doriadau gan ddefnyddio protocol cromogenig nicel-3'3'-diaminobensidin (Ni-DAB), tra asesir cyd-llleoedd targedau lluosol gan brotocol histocemeg imwiwnoffloroleuedd (IFHC).

#### **2.3.1.1 IHC Ni-DAB**

##### **2.3.1.1.1 Modelau cnofilod**

###### **2.3.1.1.1.1 Llygod sydd a'r gennyn ghrelin wedi'u ddileu (*Ghrelin*<sup>-/-</sup>)**

Yn wreiddiol, daeth llygod sydd a'r gennyn ghrelin wedi'u ddileu (ghrelin knockout (KO) mice) o labordy'r Athro Yuxiang Sun (Texas A&M University, College Station, USA). Fel disgrifir yn Sun et al., (2003), ablodwyd gennyn ghrelin trwy ddileu ecsonau 2 a 3 gan ddull ailgyfunol homologaidd gyda chasét dethol neomycin/LacZ. Ar ôl glonio mewn bon-gelloedd embryonig, chwistrellwyd y lluniad dileu mewn i blastocystau, a cheith y llygod cimerig a chynhyrchir eu croesi i'r cefndir C57BL/6J. Cartrefwyd llygod homosygaid sydd a'r gennyn ghrelin wedi'i ddileu (*ghrelin*<sup>-/-</sup>), a llygod math gwyllt (wild type-WT) o'r un dorllwyth, ym Mhrifysgol Caerdydd, o dan yr amodau a gyda'r cymeradwyaeth moesegol a disgrifir yn Ratcliff et al., (2019). Defnyddiwyd yr anifeiliaid hyn ar gyfer arbrawf 4-wythnos, cyn iddynt gael eu

haberthu trwy ddatgymalu'r fertebra gyddfól o dan anaesthesia terfynol. Tynnwyd yr ymennydd cyfan syth ar ôl aberthu, a'i throchi mewn PFA (4%) oer ia am 24 awr. Cryo-warchodwyd yr ymennydd mewn swcros (30%) wedi hynny. Yn dilyn hynny, torrwyd yr ymennydd i doriadau coronaidd 30µm o drwch mewn cyfres 1:12, gan ddefnyddio microtom gyda llwyfan rhewi. Storiwyd y toriadau ar 4°C wedi hynny, nes bod eu hangen.

#### *2.3.1.1.1.2 Llygod sydd a'r gennyn GOAT wedi'u ddileu (GOAT<sup>-/-</sup>)*

Cartrefwyd llygod homosygaidd sydd a'r gennyn GOAT wedi'i ddileu (GOAT KO mice- GOAT<sup>-/-</sup>), a llygod WT o'r un dorllwyth, yn labordy'r Athro Zane Andrews (Prifysgol Monash, Melbourne, Awstralia) dan yr amodau a gyda'r cymeradwyaeth moesegol a disgrifir yn Hornsby et al., (2020). Cynhyrchwyd y llygod GOAT<sup>-/-</sup> yn wreiddiol gan Regeneron pharmaceuticals, fel y disgrifir yn Zhao et al., 2010.

Cyflawnwyd abladiad GOAT trwy amnewid rhanbarth codio'r gennyn gyda chasét dethol neomycin/LacZ. Gloniwyd y lluniad hwn mewn fector cromosom bacteriol artiffisial, cyn poriotrydanol mewn i fon-gelloedd embryonig o lygod C57BL6/129SvEV. Wedi hynny, chwistrellwyd clonïau positif mewn i blastocytâu, a cheith y llygod cimerig a chynhyrchir eu croesi i'r cefndir C57BL/6J.

#### *2.3.1.1.1.3 Llygod loxTB-GHS-R (GHS-R<sup>-/-</sup>)*

Daeth llygod loxTB-GHS-R o labordy'r Athro Jeffrey Zigman (Canolfan Meddygol UT Southwestern, Dallas, Tecsas). Fel y disgrifir yn Zigman et al., (2005), abladiwyd mynegiad GHS-R trwy fewnosod casét blocio trawsgrifiad (transcriptional blocking cassette-TBC), wedi'i ochro gyda dilyniant loxP, rhwng safleoedd cychwyn trawsgrifiad a throsi'r gennyn GHS-R. Yn wahanol i fodolau dileu ecson, fel y rhai a disgrifir uchod, mae'r dull hwn yn caniatáu ail fynegiad GHS-R trwy waredu'r TBC gyda ailgyfunas-Cre .

Cartrefwyd llygod homosygaidd loxTB-GHS-R (GHS-R<sup>-/-</sup>), a llygod WT o'r un dorllwyth, ym Mhrifysgol Tecsas A & M, o dan yr amodau a gyda'r cymeradwyaeth

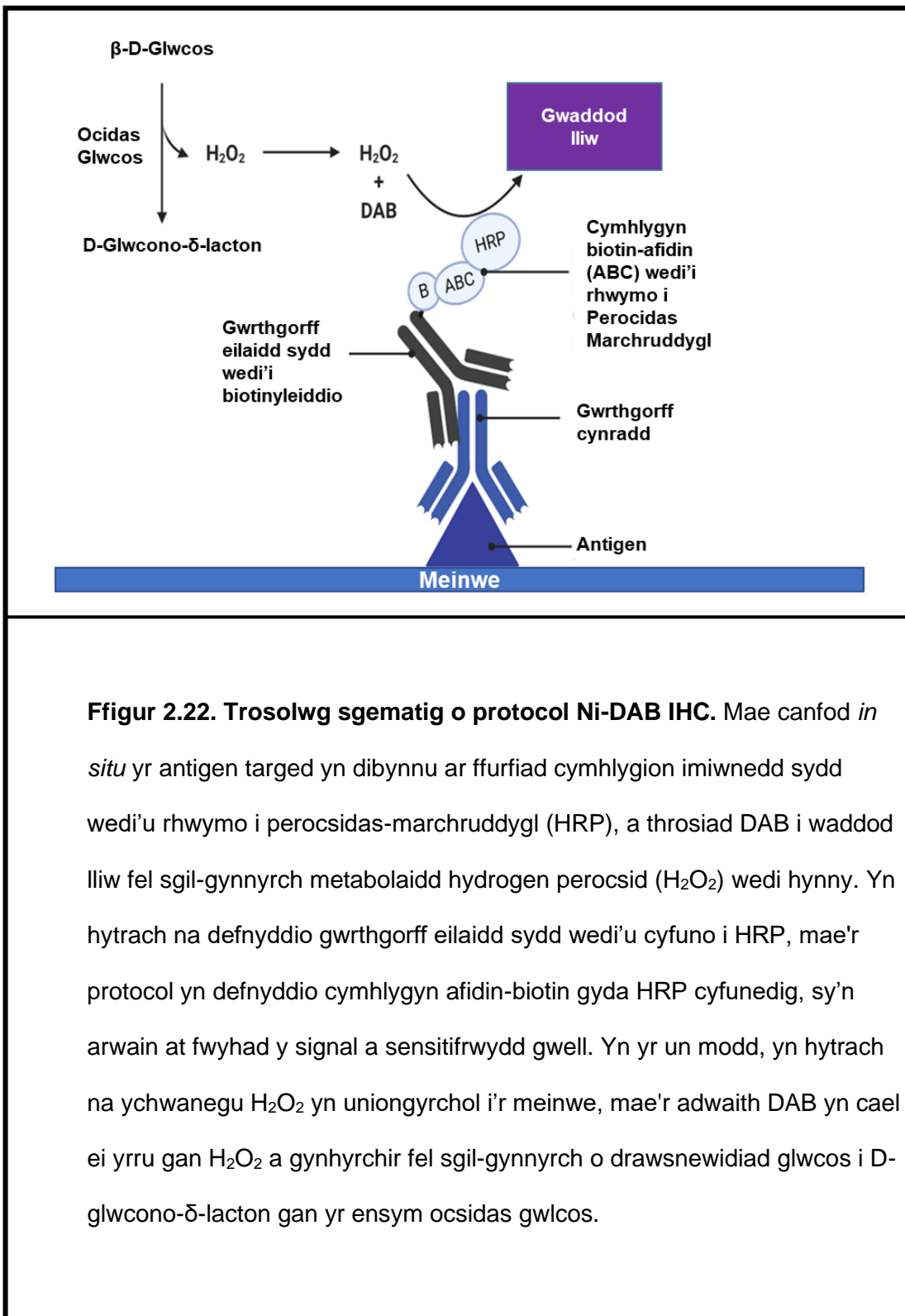


moesegol a disgrifir yn Hornsby et al., (2016). Rhannwyd y llygod yn bedwar grŵp ar gyfer arbrofion: WT AL, WT CR, GHS-R<sup>-/-</sup> AL, GHS-R<sup>-/-</sup> CR. Bwydwyd llygod CR, 70% o'r bwyd a rhoddir i lygod AL am ddwy wythnos gyntaf yr arbrawf, cyn iddynt ddychwelyd nôl i fwydo ad libitum am weddill yr arbrawf. Ar ddiwrnod 45 o'r arbrawf, aberthwyd yr anifeiliaid trwy ddatgymalu'r fertebra gyddfol o dan anaesthesia terfynol. Yn dilyn hynny, torrwyd yr ymennydd i doriadau coronaidd 30µm o drwch mewn cyfres 1:12, gan ddefnyddio microtom gyda llwyfan rhewi. Storiwyd y toriadau ar 4°C wedi hynny, nes bod eu hangen.

#### 2.3.1.1.2 Protocol IHC

Golchwyd toriadau ddwywaith mewn PBS ac unwaith mewn 0.03% PBS-T, gyda phob golchiad yn para 10 munud. Yna, magwyd mewn hydoddiant hydrogen perocsid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 1.5%, wedi'i gwanedu mewn PBS, am 20 munud ar dymheredd yr ystafell, er mwyn atal gweithgaredd perocsidas mewndarddol. Yn dilyn rownd arall o olchion, blociwyd antigenau amhenodol yn y feinwe trwy fagu gyda 5% NGS, wedi'i gwanedu yn PBS-T, am 1 awr ar dymheredd yr ystafell. Yna, magwyd gyda gwrthgorff cynradd, wedi'u gwanedu yn PBS-T gyda 2% NGS, dros nos ar 4 °C. Golchwyd y toriadau'r bore dilynol, cyn magu am 70 munud (ar dymheredd ystafell yn y tywyllwch) gyda gwrthgorff eilaidd a thag biotin. Gwanedwyd y gwrthgorff eilaidd 1: 400 yn PBS-T gyda 2% NGS. Dilynwyd rownd arall o olchion, cyn i'r toriadau gael eu magu mewn hydoddiant chymhlygion biotin-afidin HRP (ABC) (0.4% mewn PBS-T) am 90 munud ar dymheredd yr ystafell yn y tywyllwch. Cymysgwyd yr hydoddiant ABC ymlaen llaw am 30 munud cyn magu. Yn dilyn rownd arall o olchion, a magiad 10 munud mewn hydoddiant asetad sodiwm, cychwynnwyd yr adwaith DAB trwy ychwanegu 1ml o hydoddiant Ni-DAB a 60µl ocsidas-glwcos (GO). Ar ôl i'r adwaith cwblhau golchwyd yr adrannau ddwywaith yn PBS, cyn mowntio ar sleidiau superfrost, wedi'i boddni mewn byffer halwynog Tris (TBS). Gadawyd toriadau i sychu dros nos cyn dadhydradu mewn cyfres o

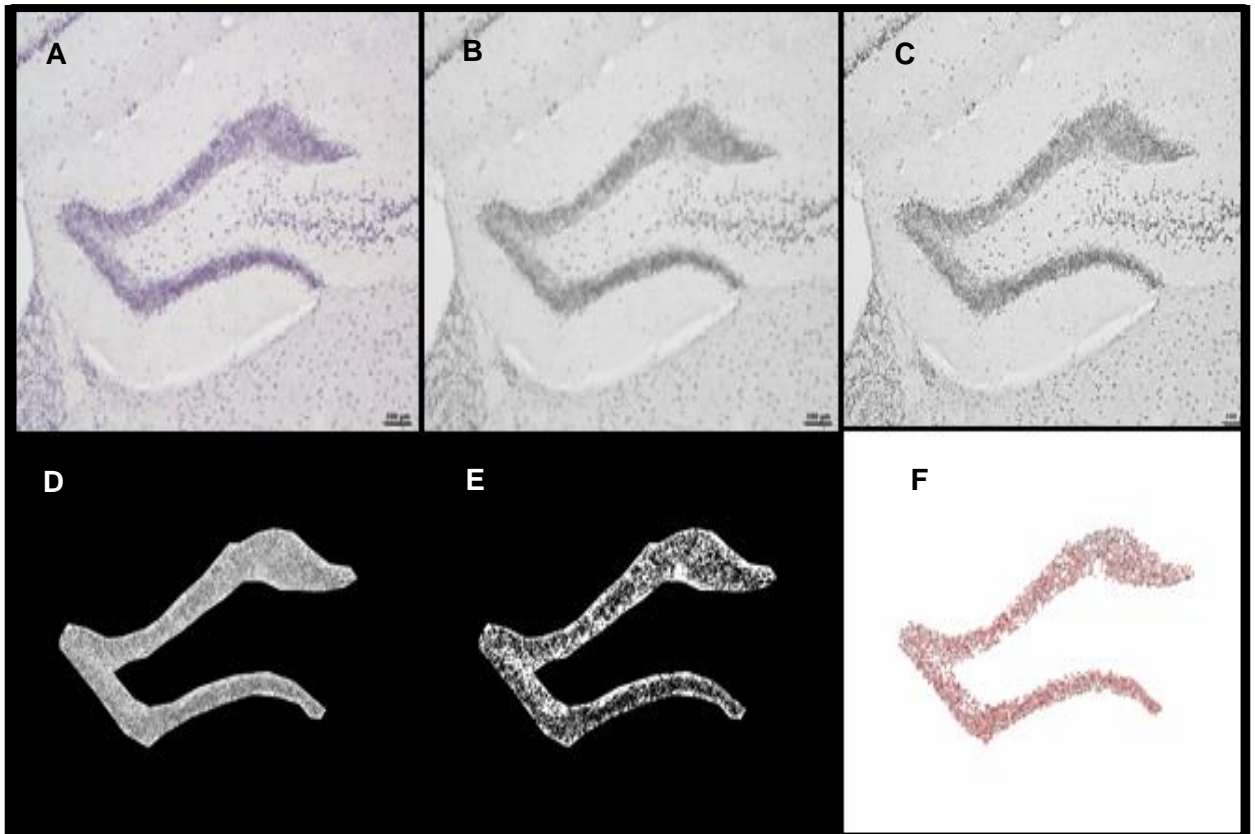
olchiadau 3 munud mewn ethanol (70%, 90% a 100%) a histoclear. Yn olaf, gorchuddiwyd y sleidiau gyda arwydryn gan ddefnyddio cyfrwng mowntio entellan.



**Ffigur 2.22. Trosolwg sgematig o protocol Ni-DAB IHC.** Mae canfod *in situ* yr antigen targed yn dibynnu ar ffurfiad cymhlygion imiwnedd sydd wedi'u rhwymo i perocsidas-marchrudygl (HRP), a throsiad DAB i waddod lliw fel sgil-gynnyrch metabolaidd hydrogen perocsid ( $H_2O_2$ ) wedi hynny. Yn hytrach na defnyddio gwrthgorff eilaidd sydd wedi'u cyfuno i HRP, mae'r protocol yn defnyddio cymhlygyn avidin-biotin gyda HRP cyfunedig, sy'n arwain at fwyhad y signal a sensitifwydd gwell. Yn yr un modd, yn hytrach na ychwanegu  $H_2O_2$  yn uniongyrchol i'r meinwe, mae'r adwaith DAB yn cael ei yrru gan  $H_2O_2$  a gynhyrchir fel sgil-gynnyrch o drawsnewidiad glwcos i D-glwcono- $\delta$ -lacton gan yr ensym ocsidas glwcos.

#### 2.3.1.1.3 Delweddu a Dadansoddiad ImageJ

I fesur imiwnoadweithedd yn yr hipocampws ar ôl staenio NI-DAB, defnyddiwyd dadansoddiad ImageJ gyda delweddau Tiff o'r DG, CA1 a CA3, delweddir gyda microsgop olau Nikon gyda gwrthrychiadur 10x. Troswyd delweddau tiff i '8-bit' a'u prosesu gyda'r 'unsharp mask filter' (radiws = 7, mwgwd = 0.6). Yna, gatiwyd y rhanbarth dan sylw (ROI) trwy ddefnyddio'r teclyn polygon, gan ddileu'r ardal y tu allan o'r ROI gyda'r gorchymyn clirio (clear outside). Fesurwyd arwynebedd y ROI, mewn unedau picselel, a'i drawsnewid i  $\mu\text{m}^2$ , trwy rannu â 3.2 (1.6 x 2). Cyflawnwyd y trawsnewidiad graddfa trwy dynnu llinell ar hyd bar graddfa 100 $\mu\text{m}$  a rhannu maint y llinell mewn unedau picselel (160) â 100. Canfuwyd celloedd imiwnoadweithiol yn y ROI gan ddefnyddio'r algorithm trothwy rhagosodedig, cyn trosi'r lluniau i ddeuaidd. Er mwyn gwella gwahaniad celloedd unigol mewn rhanbarthau imiwnoadweithiol cryf, defnyddiwyd yr algorithm (watershed).



**Ffigur 2.23. Canfod celloedd imiwnoadweithiol o brotocol Ni-DAB IHC gyda ImageJ.** Trosglwyddwyd delweddau Tif, a chesglir gyda gwrthrychedd 10x **(A)** i 8-bit **(B)**, cyn defnyddio'r hidlydd 'unsharp mask' **(C)**. Gwaredwyd ar rhanbarthau'r delwedd sydd tu allan i'r rhanbarth dan sylw (ROI) gyda'r gorchymyn 'clear outside' **(D)**, a defnyddir y trothwy rhagosodedig i ganfod celloedd imiwnoadweithiol **(E)**. Gwahanwyd clympiau o gelloedd trwy defnyddio'r gorchymyn 'watershed', a cyfrifir y nifer o gwrthrychau sydd rhwng 30-2000 unedau picstel sgwâr, gan arddangos amlinellau'r gwrthrychau wedi hynny **(F)**.

### 2.3.1.2 IFHC

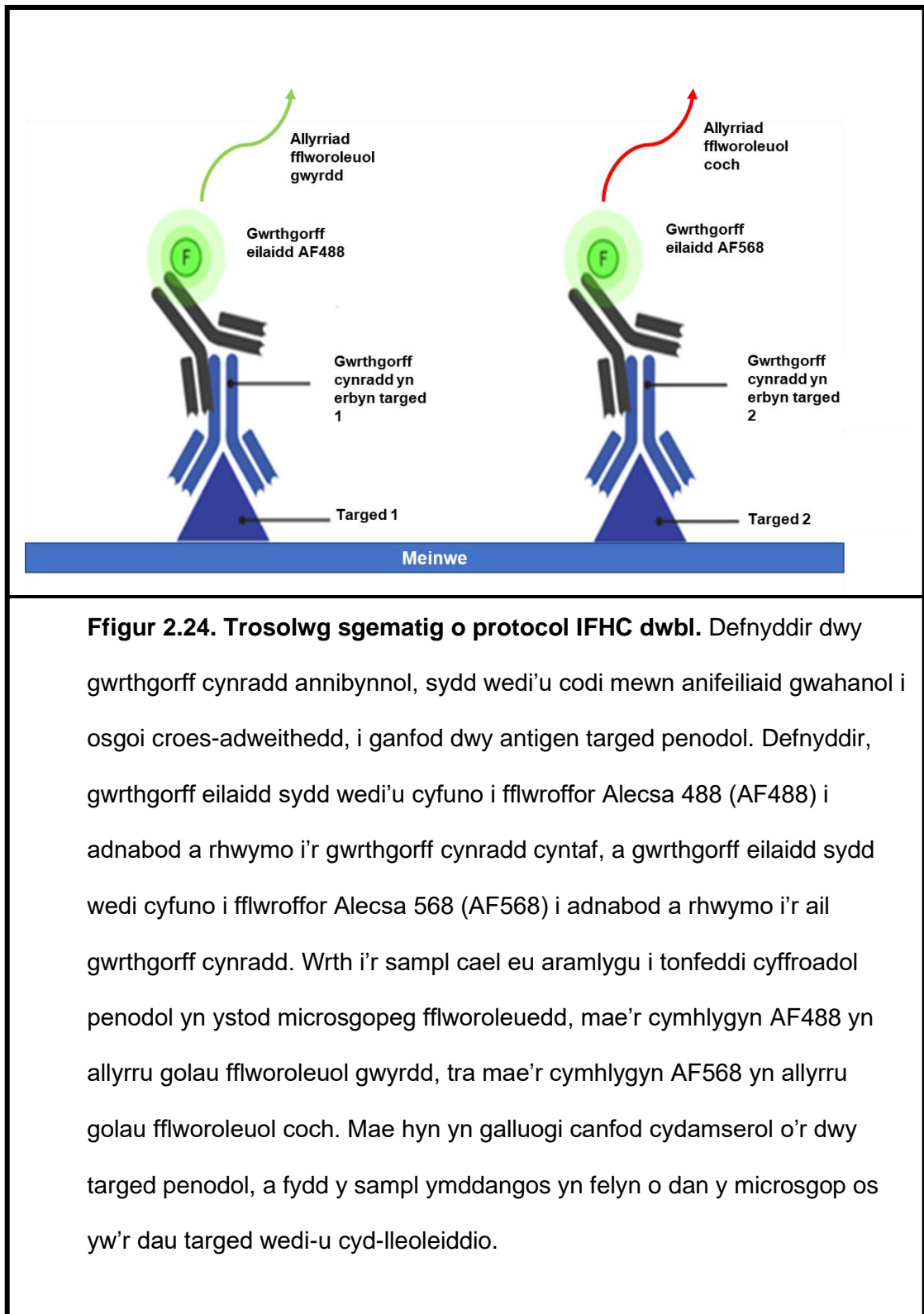
#### 2.3.1.2.1 Llygod mawr cwfl-Lister

Perfformiwyd arbrofion IFHC ar feinwe llygod mawr gwfl Lister a oedd yn rhan o arbrawf 28 diwrnod, a dangosodd fod asyl-ghrelin yn ysgogi AHN (Kent et al., 2015). Yn ystod dwy wythnos gyntaf yr arbrawf, ceith yr anifeiliaid eu chwistrellu'n ddyddiol gyda AG (10µg/kg), neu hydoddiant halwynog. Chwistrellwyd pob anifail gyda BrdU (50mg/kg) ar ddiwrnodau 5-8 hefyd, tra ceith asesiad adnabod lleoliad digymell (spontaneous location recognition (SLR) task) eu perfformio ar ddiwrnodau 22-26. Ar ddiwedd yr arbrawf, aberthwyd yr anifeiliaid gyda euthatal cyn darlifiad trawscardaidd gyda PBS ac wedyn byffer fformalin niwtral (neutral buffered formalin). Wedi hynny, trochwyd yr ymennydd mewn fformalin am 24awr ac yna swcros am o leiaf 48 awr, cyn ei thorri yn doriadau coronaidd 30µm o drwch gan ddefnyddio microtom gyda llwyfan rhewllyd. Casglwyd y toriadau 1:12 ar gyfer IHC a'i storio ar 4°C nes bod eu hangen.

#### 2.3.1.2.2 Protocol IFHC dwbl

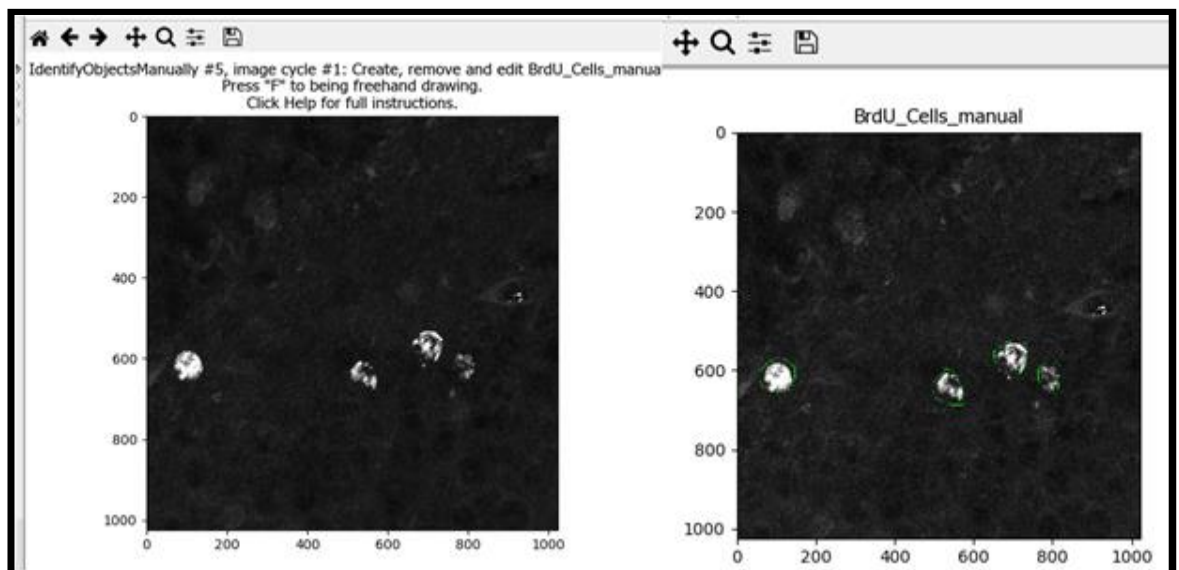
Golchwyd toriadau dair gwaith yn PBS, am 5 munud y golchiad, cyn athreiddio mewn methanol oer iâ am 2 funud. Dilynwyd rownd arall o dri golchiad PBS, cyn i rwydo amhenodol gael ei rwystro trwy fagu gyda 5% NGS, wedi'i gwanedu mewn 0.1% PBS-T, am 1awr. Yna, magwyd y toriadau gyda'r gwrthgorff cynradd cyntaf dros nos ar 4 ° C yn PBS-T gyda 2% NGS. Ar ddechrau'r diwrnod dilynol, perfformiwyd rownd arall o olchiadau PBS, cyn i'r toriadau cael eu magu gyda gwrthgorff eilaidd fflwor Alexa, am 1awr yn y tywyllwch, ar dymheredd yr ystafell. Ar ôl olchi mewn PBS eto, magwyd y toriadau gyda'r ail wrthgorff cynradd wedi'i godi mewn rhywogaeth wahanol i'r gwrthgorff cynradd cyntaf, am 1awr yn y tywyllwch ar dymheredd yr ystafell. Yn dilyn golchiadau PBS pellach, magwyd y toriadau â gwrthgorff eilaidd sy'n cydnabod yr ail wrthgorff cynradd, yn y tywyllwch am 30 munud ar dymheredd yr ystafell. Dilynwyd rownd olaf o olchion, cyn i

doriadau gael eu mowntio ar sleidiau 'superfrost', eu trochi mewn TBS, a'u gorchuddio ag arwydryn gan ddefnyddio ymweithredydd mowntio prolong gold.



### 2.3.1.2.3 Delweddu a Dadansoddiad Zen a CellProfiler

Ar gyfer dadansoddiadau cyd-leoleiddiad imiwnoflworoleuol, casglwyd pentyrrau Z (Z stacks) or DG toriadau coronaidd gan ddefnyddio'r microsgop cydffocal LSM710 gyda gwrthrychiadur mewn olew 63x. Troswyd y pentyrrau Z i 'maximum intensity projections' (MIPs) gan ddefnyddio meddalwedd ffynhonnell agored 'Zen black', a mewnforiwyd y ffeiliau LSM canlyniadol i CellProfiler. Yn dilyn echdyniad y metadata, a gwahanu pob delwedd yn sianeli gwyrdd a choch (fel gwnaethpwyd yn ffigur 2.11 a 2.12), crëwyd pib linell lled awtomataidd syml. Yn gyntaf, nodwyd celloedd positif ar gyfer un o'r targedau dan sylw (fel celloedd BrdU positif) trwy dynnu llun o amgylch pob cell gan ddefnyddio'r modiwl 'IdentifyObjectsManually'. Yna cyfrifwyd arddwysedd fflwroleuedd y ddau darged yn y celloedd hyn, gan ddefnyddio'r modiwl 'MeasureObjectIntensity', tra defnyddir y modiwl 'colocalization' i asesu'r gydberthyniad rhwng arddwyseddau picseli o'r ddau darged.



**Ffigur 2.25. Sgrinlun o'r modwil 'IdentifyObjectsManually' a defnyddir i ganfod/labeli celloedd BrdU positif yn CellProfiler.**

### 2.3.2. Arbrofion blotio Gorllewinol

Defnyddiwyd WB i nodweddu mynegiad proteinau ATG mewn homogenedau wedi'u rhewi o ymennydd ac afu cnofilod. Echdynnwyd proteinau o'r homogenedau mewn paralel gyda RNA gan ddefnyddio'r dull gwahanu ffenol-clorofform. Er hynny, ni aseswyd mynegiad mRNA genynnau ATG fel rhan o'r prosiect hwn, gyda'r RNA yn cael ei storio ar  $-20^{\circ}\text{C}$  ar gyfer arbrofion yn y dyfodol.

#### 2.3.2.1. Arbrawf llygod mawr Sprague Dawley

##### 2.3.2.1.1. Cartrefu, amodau arbrofol, a chasglu meinwe

Cartrefwyd llygod mawr Sprague-Dawley gwrywaidd (a brynir o Charles River) eu ym Mhrifysgol Caerdydd, o dan yr amodau a gyda'r cymeradwyaeth moesegol a disgrifir yn (Tilston et al., 2019). Ar ôl bwydo ar ddieta ad libitum (AL) safonol i ddechrau, gwahanwyd yr anifeiliaid i grwpiau bwydo ad libitum, pori (grazing-Gr) a gyda phrydau (meal-fed). Ymhellach, ceith pob anifail hawl at ddieta braster isel (LFD) (10% braster) a dieta braster uchel (HFD) (45% braster), er mwyn asesu dewisiadau bwydo. Yn dilyn arbrawf 6 wythnos, aberthwyd anifeiliaid o dan anaesthesia terfynol, a dyrannir y cortecs, hipocampws a hypothalmws o un hemisffer bob ymennydd, cyn eu rhewi'n gyflym ar ia sych. Casglwyd hefyd darn o afu, a samplau gwaed, o bob llygoden fawr er mwyn dadansoddi awtoffagi hepatig, a lefelau ghrelin yn y plasma. Storiwyd pob sampl ar  $-80^{\circ}\text{C}$  nes eu hangen.

##### 2.3.2.1.2 Echdynnu protein

Ceith talpiau o gortecs, hipocampws, hypothalmws ac afu, eu homogoneiddio mewn  $500\mu\text{l}$  o Adweithydd Lysis QIAzol®, ar gymhareb o 1mg meinwe i  $50\mu\text{l}$  o fyffer, gan ddefnyddio tiwbiau homogoneiddio Lysing Matrix D (MP BIO 691300) a homogoneiddwr Fast Prep™ FP120, wedi'i osod ar gyflymder 5.0 am 40 eiliad. Trosglwyddwyd yr homogenedau i diwbiau eppendorf glân a'u gadael i sefyll ar dymheredd ystafell am o leiaf 5 munud, cyn ychwanegu  $100\mu\text{l}$  clorofform. Gwrthdrowyd y samplau sawl gwaith a'u gadael i sefyll ar dymheredd ystafell am o leiaf



10 munud, cyn eu hallgyrchu ar 12,000 x g am 15 munud ar 4°C. Casglwyd tua 100µl o'r wedd ddyfrllyd uchaf er mwyn arunigo'r RNA, a chymysgwyd y gweddau organig a rhyngffas gydag 150µl 100% ethanol a'i allgyrchu ar 2000 x g am 5 munud. Trosglwyddwyd 100µl o'r uwchwaddod dilynol i 900µl isopropanol ar gyfer dyddodiad proteinau, a storir gweddill yr uwchwaddod a'r belen ar -20°C. Yna, ceith y gwaddod protein ei beledu ar 12,000 x g am 10 munud, ar 4 ° C, a golchwyd y belen mewn 95% ethanol wedi hynny. Allgyrchwyd y samplau ar 7,500 x g am 5 munud ar 4 ° C, cyn i'r camau golchi ac allgyrchu cael eu hailadrodd. Gwaredwyd yr ethanol wedi hynny, a sychir y samplau mewn aer yn fyr, cyn i'r pelennau gael ei hydoddi mewn 100-200µl o fyffer lysis (5% w/v SDS, 100mM Tris HCl (pH 7.5), 140mM NaCl & 10mM EDTA, 1% coctel atalyddion proteas, 1% coctel atalyddion ffosffatas). Cynheswyd samplau am sawl awr ar dymheredd o 70-100°C i gynorthwyo hydoddeiddiad y proteinau.

#### 2.3.2.1.3. Prawf BCA a blotio Gorllewinol

Perfformiwyd prawf BCA, er mwyn canfu grynodiad protein ym mhob sampl, fel y disgrifir yn adran 2.2.4 ar gyfer arbrofion in vitro. Perfformiwyd arbrofion SDS-PAGE a blotio Gorllewinol dilynol fel y disgrifir yn adran 2.2.5, gyda samplau protein yn cael eu gwanhau i gyfaint terfynol o 42µl yn lle 21µl cyn ychwanegu 14µl LDS / DTT.

### 2.3.2.2 Arbrawf llygod GHS-R<sup>-/-</sup>

#### 2.3.2.2.1 Cartrefu, amodau arbrofol, a chasglu meinwe

Yn debyg i'r arbrawf llygod mawr Sprague-Dawley, cynhaliwyd arbrawf patrwm bwydo ar effeithiau dietau ad libitum, pori a phrydau, gyda llygod GHS-R<sup>-/-</sup> (a ddisgrifiwyd yn flaenorol yn adran 2.3.1.1.3) gwrywaidd. Ond, yn wahanol i'r arbrawf llygod mawr, nad oedd dewis dyddiol rhwng LFD ac HFD yn yr arbrawf hwn. Cartrefwyd y llygod GHS-R<sup>-/-</sup>, a llygod WT o'r un dorllwyth, yn yr un labordy ym Mhrifysgol Caerdydd a'r llygod mawr Sprague-Dawley. Yn dilyn tair wythnos ar y dietau, aberthwyd yr anifeiliaid o dan anesthesia terfynol, a thynnir ymennydd cyfan a'i ddyrannu i hemisfferau chwith a de, gydag un hemisffer yn cael ei drochi mewn 4% PFA, a'r llall yn cael ei rewi'n gyflym ar ia sych. Casglwyd meinweoedd eraill o ddiddordeb, gan gynnwys yr afu, hefyd. Nid oedd modd dyrannu'r hemisffer a cheith ei rewi ar y pryd, gan nad oedd digon o staff ar gael yn y cyfleuster anifeiliaid o ganlyniad i rheolau sy'n seiliedig a COVID-19. Ar ôl i'r meinweoedd cael eu danfon i Brifysgol Abertawe o Brifysgol Caerdydd, dyrannwyd pob hemisffer wedi'i rewi i ranbarthau blaen-ymennydd (yn cynnwys y cortecs a hipocampws), hypothalmws, a serebelwm.

#### 2.3.2.2.2 Echdynnu protein

Newidiwyd cymhareb y meinwe (mg) i adweithydd lysis QIAzol o 1:50, a ddefnyddir yn yr arbrawf blaenorol, i o leiaf 1:20, gyda 50-100mg o feinwe'r blaen-ymennydd yn cael ei homogoneiddio mewn 1ml, 12-18mg o feinwe'r afu yn cael ei homogoneiddio mewn 300µl, a 5-10mg o hypothalmws yn cael ei homogoneiddio mewn 150µl.

Addaswyd gosodiadau homogoneiddwr fastprep hefyd, gan ddefnyddio dau gylchred 20 eiliad ar gyflymder 6.5, 5 munud ar wahân, gyda'r samplau'n cael eu storio ar ia rhwng y cylchrediadau. Ar gyfer y gwahaniad clorofform ffenol ac echdyniad RNA a phrotein, cadwyd cymarebau hydoddion organig i QIAzol yn gyson â'r rhai o'r protocol cynharach. Un gwahaniaeth nodedig fodd bynnag oedd

ychwanegiad cyfaint cyfan yr uwchwaddod ar gyfer samplau afu (~ 300µl) a hypothalmws (~ 150µl), yn ogystal â 300µl (~ 1/3 o'r holl gyfaint) ar gyfer uwchwaddod samplau blaen ymennydd, ar gyfer dyddodiad proteinau mewn isopropanol (1.5ml isopropanol fesul 1ml QIAzol).

#### 2.3.2.2.3 Prawf BCA a nodweddi blotio Gorllewinol

Er mwyn gwella cywirdeb mesuriad crynodiad protein samplau gyda'r prawf BCA, gwanhawyd safonau'r gromlin safonol yn y byffer lysis a defnyddir ar gyfer hydoddi proteinau, yn lle dwr. Ymhellach, er mwyn sicrhau llinoledd y gromlin safonol, newidiwyd amrediad y safonau o 0, 0.2m 0.4, 0.6, 0.8 ac 1mg/ml i 0, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1 a 1.5mg/ml, yn unol ag argymhelliad y gwneuthurwr.

Ar gyfer blotio Gorllewinol, paratwyd samplau protein yn yr un modd â'r protocol cychwynnol, a'r unig eithriad i'r protocol oedd defnydd geliau datrys SDS-PAGE 15% yn lle 12%, er mwyn wella gwahaniad bandiau LC3-I a LC3-II.

#### 2.3.3 Meintoli crynodiad plasma AG

Pennwyd crynodiad plasma AG llygod mawr Sprague-Dawley trwy defnyddio prawf ELISA 'rat/mouse active ghrelin' (Millipore; #EZRGRA-90K). Defnyddiwyd y prawf hwn tair gwrthgyrff; gwrthgorff IgG gwrth-ghrelin sy'n rhwymo i AG yn y sampl, gwrthgorff ansymudol (ynghlwm i ffynnon y plât microtiter) sy'n rhwymo i'r gwrthgorff-gwrth ghrelin ac yn eu angori, a gwrthgorff-gwrth AG sydd wedi'u cyfuno i HRP. Trwy gweithgaredd HRP, trawsnewidir y swbstrad cromogenig 3,3',5,5'-tetra-methylbensidin i gynnyrch lliw, ac ar ôl ffurfiad cynnyrch digonol, atalir yr adwaith trwy ychwanegu asid HCl. Mae'r cynnydd yn yr amsugnedd ar 450nm, ar ôl cywiro am amsugnedd ar 590nm, yn rhoi mesuriad o actifedd ensymol. Gan fod hyn yn cyfraneddol i swm gwrthgorff gwrth-AG sydd wedi'u dal, gellir pennu crynodiad AG y sampl trwy allosod o gromlin safonol.

Paratowyd y cromlin safonol trwy ailansoddi y safon lyoffiledig i grynodiad 1760pg/ml yn 2ml of ddH<sub>2</sub>O, a wedyn cyfres o 6 gwanediadau dau blyg, fel dengys y tabl isod. Paratowyd rheolyddion ansawdd trwy ailansoddi yn 500µl o ddH<sub>2</sub>O a cheith y byffer golchi 1x eu paratoi trwy gwanedu'r byffer golchi HRP 10x 1:10 gyda ddH<sub>2</sub>O.

*Tabl 2.4. Cyfeintiau o byffer a safonau ghrelin a defnyddir i baratoi cromlin safonol ar gyfer ELISA 'active ghrelin'*

Tiwb #	Cyfaint byffer (µl)	Cyfaint safon (µl)	Crynodiad safon (pg/ml)
1	500 µl	500	880
2	500 µl	500 o diwb 1	440
3	500 µl	500 o diwb 2	220
4	500 µl	500 o diwb 3	110
5	500 µl	500 o diwb 4	55
6	500 µl	500 o diwb 5	27.5

Ar ôl paratoi'r holl adweithyddion angenrheidiol, golchwyd pob ffynnon yn y plât microtiter dair gwaith gyda byffer golchi 300µl 1x. Ar ôl arllwys y byffer golchi, cafodd y plât ei wrthdroi a'i flotio ar dyweli arsugnydd sawl gwaith, i gael gwared ar byffer weddilliol. Wedi hynny, ychwanegwyd 20µl o hydoddiant matrices i ffynhonnau gwag, safonol a rheolyddion ansawdd, cyn i 30µl o byffer assay gael ei ychwanegu at ffynhonnau gwag a sampl, a 10µl o byffer assay ei ychwanegu i'r ffynhonnau rheolyddion safonol ac ansawdd. Yna ychwanegwyd 20µl o safonau ghrelin, rheolyddion ansawdd, a samplau at eu ffynhonnau priodol. Profwyd pob safon, rheolydd ansawdd a sampl yn ddyblyg. Ychwanegwyd 50µl o hydoddiant gymysgedd gwrthgorff (cymysgedd 1:1 o wrthgyrff dal a chanfod) at bob ffynnon, a

gorchuddir y plât â seliwr plât a'i magu ar dymheredd yr ystafell ar siglwr plât microtiter orbital wedi'i osod i 450 rpm, am 2 awr.

Yn dilyn magu, tynnwyd y seliwr plât, gwaredir yr hydoddiant o'r ffynhonnau a pherfformir tri cham golchi gyda 300µl o byffer assay 1x. Wedi hynny, ychwanegwyd 100µl o hydoddiant ensym at bob ffynnon, a chafodd y plât ei selio a'i magu ar dymheredd yr ystafell am 30 munud ar 450rpm ar yr siglwr plât orbital. Yna tynnwyd yr hydoddiant o'r plât a golchir y ffynhonnau 6 gwaith gyda byffer assay 1x. Ar ôl hynny, ychwanegwyd 100µl o hydoddiant swbstrad at bob ffynnon, a gorchuddir y plât cyn magu ar yr siglwr am tua 20 munud, nes bod lliw glas yn ffurfio yn y ffynhonnau. Yn dilyn hyn, ychwanegwyd 100µl o hydoddiant stop asidig i bob ffynnon. Yna mesurwyd yr amsugnedd ar 450nm a 590nm gan ddefnyddio darllynydd plât POLARstar Omega (BMG Labtech).

## 2.4. Dadansoddiadau ystadegol

Perfformiwyd holl dadansoddiadau ystadegol y traethawd ymchwil hon gyda meddalwedd Graphpad Prism. Ar dechrau'r prosiect defnyddiwyd fersiynau 6 a 7, ond defnyddir fersiynau 8 ac 9 ar diwedd y prosiect. Gwiriwyd pob dadansoddiad ystadegol yn Graphpad fersiwn 9, a dyma'r fersiwn cyfeirir tuag at yn allweddau ffigyrau penawdau 3 a 4.

Cymerwyd  $P = < 0.05$  i fod yn ystadegol arwyddocaol, a chyflwynir gwerthoedd P yn arddull NEJM (New England Journal of Medicine) (gweler tabl isod). Dylid nodi bod gwerthoedd P rhwng 0.0450 ac 0.0499 dal yn cael eu hystyried yn arwyddocaol gan graphpad gyda'r arddull hwn, er eu fod yn cael eu cyflwyno fel  $P = 0.05$  yn y tabl canlyniadau. Felly ar gyfer y gwerthoedd P hyn, rwyf wedi eu cyflwyno fel  $P = < 0.05$ .

Tabl 2.6. Arddull cyflwyno gwerthoedd P NEJM

Gwerth P	Crynodeb
< 0.001	***
0.001 i 0.01	**
0.01 i 0.05	*
≥ 0.05	ns

## Pennod 3: Nodweddu rheoleiddiad awtoffagi niwronal gan echelin signalu ghrelin-GHS-R *in vitro*

### 3.1 Cyflwyniad

#### 3.1.1 Dehongli profion awtoffagi

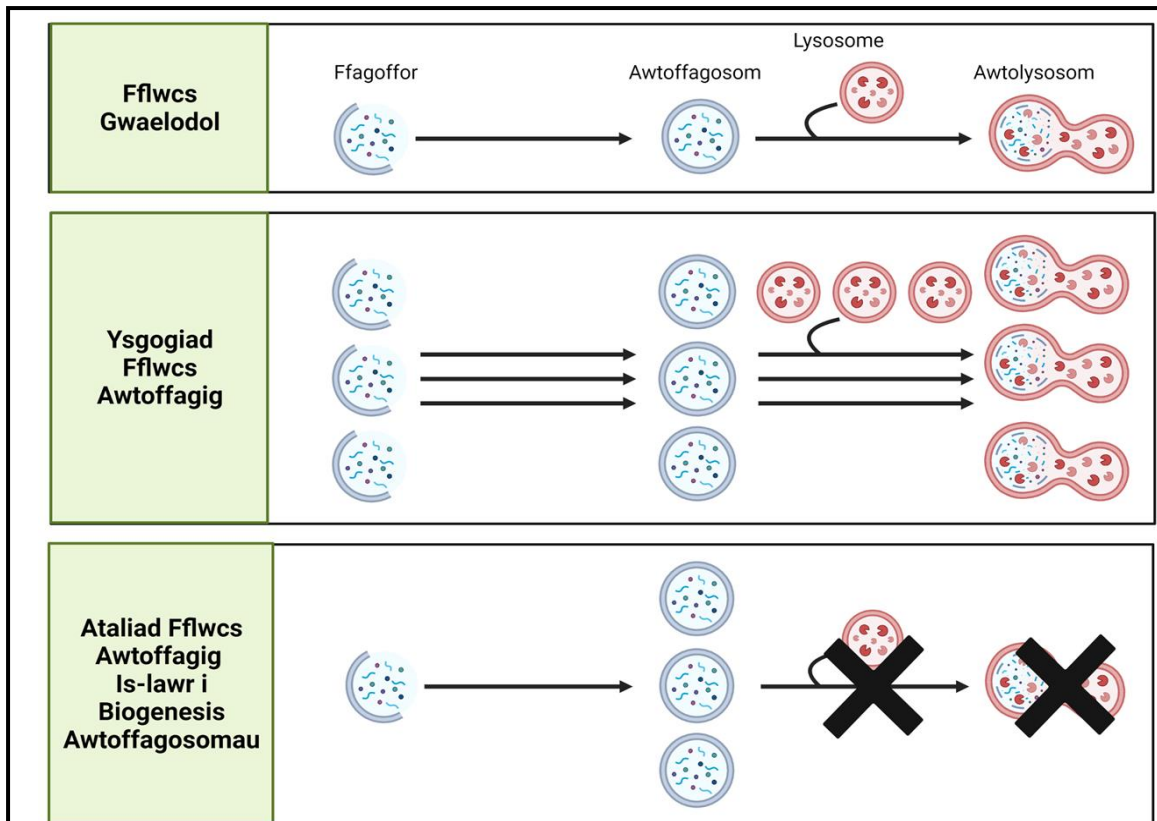
Y dulliau mwyaf cyffredin a ddefnyddir i asesu awtoffagi yw rhai sy'n fesur y nifer o awtoffagosomau ac awtolysosomau sydd tu fewn i'r gell. Yn bennaf, defnyddir WB i asesu newidiadau mewn lefelau'r maciwr awtoffagosomaidd LC3-II (Kabeya et al., 2000) , tra defnyddir microsgopeg fflwroleuedd i gyfri awtoffagosomau (Klionsky et al., 2021; Mizushima, Yoshimori, & Levine, 2010). Techneg rymus arall sydd ar gael i gyfri awtoffagosomau ac awtolysosomau yw microsgopeg trawsyrru electronau (transmission electron microscopy- TEM) (Klionsky et al., 2021; Mizushima et al., 2010). Ond ni ddefnyddir y dechneg hon yn gyffredinol, oherwydd yr arbenigedd sydd ei hangen i gymhwyso, dadansoddi a dehongli canlyniadau'r dechneg. Waeth bynnag y prawf a defnyddir, camsyniad cyffredin a welir wrth ddehongli profion awtoffagi, yw bod cynnydd yn y nifer o awtoffagosomau yn adlewyrchu actifedd awtoffagi (Klionsky et al., 2021; Mizushima et al.,2010).

Mewn gwirionedd, gallai'r arsylwad yma cynrychioli naill ai cynnydd mewn biogenesis neu leihad mewn diraddiad awtoffagosomaidd (Klionsky et al., 2021; Mizushima et al.,2010). Yn yr un modd, gall gostyngiad yn y nifer o awtoffagosomau dynodi lleihad biogenesis neu gynnydd diraddiad (Klionsky et al., 2021; Mizushima et al.,2010). Dengys yr ansicrwydd yma, pa mor heriol y mae dehongli canlyniadau profion awtoffagi. Er mwyn rheoli am yr ansicrwydd hon, caiff arbrofion eu cynnal ym mhresenoldeb ac absenoldeb crynodiadau dirlawn o atalyddion lysosomaidd fel baffilomycin A1 (Baf), clorocwin (CQ) neu liwpeptin (Ieu) (Klionsky et al., 2021; Mizushima et al.,2010).

Yn dilyn ataliad diraddiad lysosomaidd, mae awtoffagosomau yn cronni yn y gell. O dan yr amodau hyn, fydd triniaeth sy'n ysgogi awtoffagi yn achosi cynnydd bellach o awtoffagosomau (Klionsky et al., 2021; Mizushima et al., 2010). Ar y llaw arall, fydd triniaeth sy'n amharu gydag anwythiad awtoffagi yn lleihau'r nifer o awtoffagosomau yn y gell (Klionsky et al., 2021; Mizushima et al., 2010). Felly, trwy gymharu'r canlyniadau a gafwyd o dan amodau fflwcs cymwys (heb atalyddion) a nam (gydag atalyddion), gellir dod i gasgliad gwell ynghylch effaith triniaeth benodol ar awtoffagi.

Yn ogystal ag asesiadau o drosiad LC3-II neu awtoffagosomau ym mhresenoldeb ac absenoldeb atalyddion lysosomaidd, mae astudiaethau o awtoffagi fel arfer yn asesu throsiad swbstradau awtoffagig hefyd. Yn bennaf, defnyddir WB i asesi lefelau'r protein p62 (Klionsky et al., 2021), sy'n gweithredu fel derbynnydd awtoffagi detholus ac yn rhwymo i LC3 a proteinau sydd wedi'u wbicwtineiddio. (Pankiv et al., 2007) Gan mai p62 yn cael ei diraddio gan awtoffagi, disgwylir ei lefelau i ostwng pan mae awtoffagi yn cael ei ysgogi, a'i lefelau i gynyddu pan mae awtoffagi yn cael ei atal (Klionsky et al., 2021; Mizushima et al., 2010). Ond gallai lefelau p62 hefyd ei effeithio trwy rheoleiddiad trawsgrifiadol, throsiadol, proteasomal neu gan proteasau (Klionsky et al., 2021). Felly nad yw lefelau p62 bob amser yn cyfateb i maint a chyfeiriad fflwcs awtoffagig.





**Ffigur 3.1. Trosolwg o ddeinameg fflwcs awtoffagig a chroniad strwythurau**

**awtoffagig o dan wahanol amodau. A)** Yng nghelloedd sydd â fflwcs awtoffagig

cymwys, mae ffagofforau yn cael eu trawsnewid i awtoffagosomau, sydd yn eu tro

yn cael eu trawsnewid i awtolysosomau yn dilyn ymasiad â'r lysosom. Dylid nodi

bod fflwcs awtoffagig gwaelodol yn amrywio'n sylweddol rhwng gwahanol mathau o

gelloedd, gyda rhai celloedd yn arddangos awtoffagi gwaelodol cyfradd isel iawn, ac

eraill fel niwronau, yn dangos cyfraddau uchel. **B)** Pan ysgogir awtoffagi, megis yn

ystod disbyddiad serwm ac asid amino neu ataliad mTORC1 gyda rapamycin, mae

digonedd yr holl strwythurau awtoffagig yn cynyddu. Fodd bynnag, oherwydd

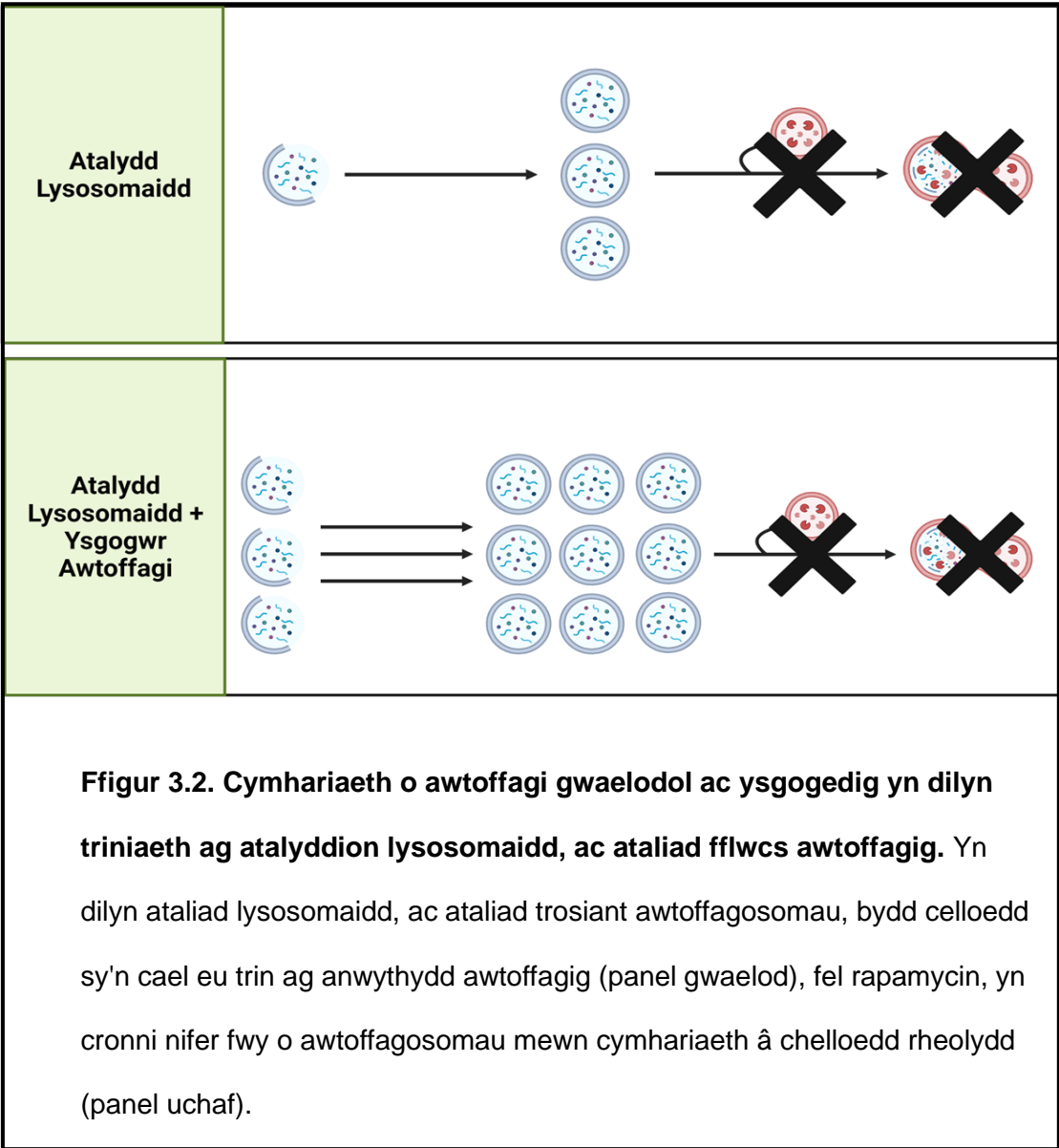
cynnydd cysylltiedig mewn diraddiad awtoffagig, gall fod yn anodd i canfod y

newidiadau hyn yn arbrofol. **C)** Mae ataliad cludiant awtoffagig, ymasiad

awtoffagosom-lysosom, neu ddiraddiad lysosomaidd, yn atal trosiant

awtoffagosomau, gan arwain at eu cronid yn y gell. O dan amodau o'r fath, ni welir

cynnydd cydredol mewn nifer y ffagofforau neu awtolysosomau asidig aeddfed.



### 3.1.2 Ghrelin a awtoffagi niwronaidd: Canfyddiadau o Modelau *in vitro*

Fel nodir ym mhennod 1.6.1, dim ond tair astudiaeth sydd wedi asesu effaith uniongyrchol echel signalu ghrelin ar awtoffagi niwronaidd *in vitro*. Ymhellach, defnyddiwyd bob astudiaeth model cellog gwahanol gan fod eu nodau'n ymwneud a wahanol ffenomenau biolegol.

Dengys Ferreira-Marques et al., (2016) fod cyfyngu maetholion neu weiniad allddarddol 10nM acyl-ghrelin (am 6 awr) yn ysgogi awtoffagi mewn niwronau cortigol cynradd llygod mawr, trwy fecanwaith sy'n ddibynnol ar GHS-R1a a NPY. Yn hanfodol, cynhaliwyd asesiadau blot gorllewinol LC3-II a p62, a ddefnyddir fel marcwr o fflwcs awtoffagi, ym mhresenoldeb ac absenoldeb CQ (Ferreira-Marques et al., 2016).

Canfuwyd Cecarini et al., (2016) fod triniaeth 24 awr acyl-ghrelin yn cynyddu mynegiad proteinau ATG (yn fwy penodol, LC3-II, p62 a Beclin-1), mewn celloedd SH-SY5Y a thrawsffurfiwyd gyda APP mwtagenaid. Ar y llaw arall, welwyd lleihad sylweddol mewn gweithgaredd cathepsin B. Er ni ddefnyddiwyd atalyddion lysosomaidd yn yr astudiaeth hon, mae'r ffaith bod gweithgaredd cathepsin B yn disgyn yn awgrymu lleihad mewn fflwcs awtoffagi.

Nodwyd Chung et al., (2018) fod triniaeth 24 awr acyl-ghrelin (0.1  $\mu$ M) yn gwanhau'r cynnydd mewn awtoffagi a welir mewn bon-gelloedd niwral hipocampaidd llygod mawr ar ôl OGD. Ond, ni ddefnyddir atalyddion lysosomaidd yn yr arbrofion. Bellach, fel esbonnir ym mhennod 1.6.1, ail defnyddiwyd yr awduron yr un blot actin cynrychiadol fel rheolydd llwytho ar gyfer sawl blot/gel gwahanol, sy'n codi cwestiynau am ddilysrwydd y canlyniadau.

Felly, dim ond gwybodaeth brin sydd ar gael am sut mae ysgogiad echel signalu ghrelin yn addasu awtoffagi mewn modelau *in vitro* niwronaidd, tra bod cryfder y data a chyflwynir gan yr astudiaethau yn amrywiol iawn. Ymhellach, nid os

gwybodaeth ar gael am sut mae lleihad mewn echelin signalu ghrelin yn effeithio awtoffagi.

Y tu hwnt i'r canfyddiadau uniongyrchol a ddisgrifir uchod, mae yna nifer o ganfyddiadau anuniongyrchol mewn modelau niwronau *in vitro* sy'n dangos bod ghrelin yn modylu llwybrau signalu sydd uwchben i awtoffagi. Fel yr amlygwyd ym mhennod 1, ac mewn adolygiad gan ein grŵp (Morgan et al., 2017), gall ghrelin naill ai ysgogi signalu pro-awtophagig trwy AMPK neu signalu gwrth-autophagig trwy mTORC1. Welir enghraifft nodedig o hyn yn yr hypothalmws, lle mae echelin signalu ghrelin yn ysgogi AMPK yn y VMH (Andrews et al., 2008; López et al., 2008), ac mTORC1 yn yr ARC (Martins et al., 2012; Stevanovic et al., 2013). Mae ysgogiad AMPK hefyd yn bwysig ar gyfer effeithiau niwro-amddiffynol ghrelin yn yr SN mewn modelau PD (Bayliss et al., 2016), tra bod ysgogiad mTORC1 gan ghrelin wedi' amlygu mewn plastigrwydd synaptig yn yr hipocampws (L. Chen et al., 2011; Chung, Li, Kim, Kim, & Park, 2013; Kanoski, Fortin, Ricks, & Grill, 2013; Ribiero et al., 2014).

I grynhoi, mae asesiadau uniongyrchol ac anuniongyrchol yn awgrymu y gall ghrelin gymell effeithiau pro-awtoffagig a gwrth-awtoffagig mewn modelau niwronau *in vitro*.

### **3.1.3 Nodau ac amcanion**

Nod y bennod hon yw ehangu ar y wybodaeth gyfyngedig sy'n ymwneud â ghrelin ac awtoffagi mewn modelau niwronaidd *in vitro*. Cyflawnir hyn trwy nodweddu effaith echel signalu ghrelin-GHS-R1a ar awtoffagi yn y llinell gell dopaminergig SN4741 a'r llinell gell hipocampaid HT-22. Er bod tystiolaeth o'r llenyddiaeth yn awgrymu fod gan ghrelin y gallu i ysgogi llwybrau pro-awtoffagig neu gwrth-awtoffagig, rhagdybir y bydd ghrelin yn ysgogi awtoffagi oherwydd ein canfyddiadau blaenorol sy'n ymwneud a ghrelin a AMPK yn y celloedd SN4741 a'r SNpc (Bayliss et al., 2016).

## **3.2 Dulliau a Defnyddiau**

### **3.2.1 Defnyddiau**

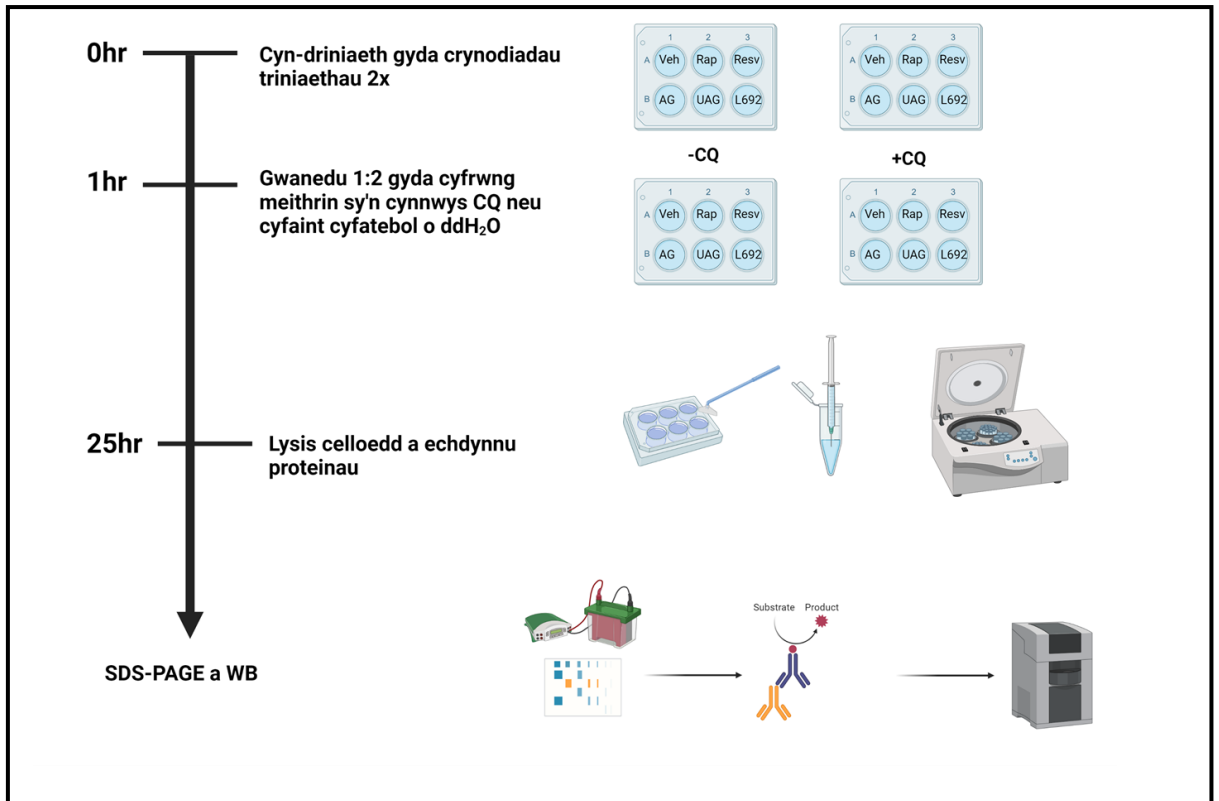
Gellir ffeindio'r holl gwybodaeth am y defnyddiau a ddefnyddir yn y bennod hon yn tabl 2.1 ym mhennod 2.

### **3.2.2 Asesiadau WB**

Ar gyfer arbrofion WB, hadwyd 120,000 o gelloedd SN4741 neu 200,000 o gelloedd HT-22, mewn 2 ml o gyfrwng meithrin, i bob ffynon blat 6-ffynon (fel y disgrifir ym mhennod 2.2.3).

Fel y manylir yn ffigur 3.3, cafodd celloedd eu trin ymlaen llaw am 1awr gyda chrynodeiadau 2x o AG, UAG, y gweithydd GHS-R1a L692, rheolyddion positif Rap a Resv neu gyfaint cyfatebol o reolyddion Veh (cymysgedd o DMSO, ddH<sub>2</sub>O, EtOH), cyn i bob ffynnon gael ei gwanhau 1: 2 gyda chyfrwngau yn cynnwys naill ai 120µM CQ, neu gyfaint cyfatebol o Veh (ddH<sub>2</sub>O), a'i drin am 24 awr arall. Crynodeiadau olaf pob triniaeth oedd 1µM ar gyfer AG, UAG, L692, a Rap, 10µM ar gyfer Resv a 60µM ar gyfer CQ.

Yn dilyn hynny, cafodd celloedd eu lysio ar gyfer echdynnu protein, fel y disgrifir ym mhennod 2.2.3 a phennwyd faint o brotein oedd yn bresennol mewn lysadau celloedd trwy'r prawf BCA, fel y disgrifir ym mhennod 2.2.4. Paratowyd samplau ar gyfer SDS-PAGE fel y disgrifir ym mhennod 2.3.5.1 a gwahanwyd proteinau fel y disgrifir ym mhennod 2.3.5.2. Yna perfformiwyd WB, fel y disgrifir yn adran 2.3.5.3 a 2.3.5.4, gyda gwrthgyrff cynradd yn erbyn LC3 a p62, yn cael eu defnyddio i asesu newidiadau mewn awtoffagi. Defnyddiwyd GAPDH neu α-Twbwlin (mewn achosion lle roedd staenio GAPDH yn wael) fel rheolyddion llwytho. Paratowyd yr holl wrthgyrff cynradd mewn 5% BSA-Tween20, gyda gwrthgyrff awtoffagi yn cael eu gwannedu 1: 1,000 a rheolyddion llwytho yn cael eu gwannedu 1: 100,000.



**Ffigur 3.3. Trosolwg o'r cynllun driniaeth a ddefnyddir ar gyfer nodweddiadau**

**WB o effeithiau triniaethau echelin ghrelin ar awtoffagi.** Hadwyd 120,000 o gelloedd SN4741 neu 200,000 o gelloedd HT-22 mewn 2ml o gyfrwng meithrin fesul ffynnon mewn dau blât 6 ffynnon. 24 awr ar ôl hadu, tynnwyd y gyfrwng ar y ddau blât a'i ddisodli â chyfrwng ffres sy'n cynnwys crynodiadau 2x o acyl-ghrelin (AG) (2 $\mu$ M), unacyl-ghrelin (UAG) (2 $\mu$ M), L692585 (L692), (2 $\mu$ M), rapamycin (Rap) (2 $\mu$ M), resveratrol (Resv) (20 $\mu$ M), neu gyfaint gyfwerth o reolyddion cludiol (Veh) (cymysgedd o DMSO, ddH<sub>2</sub>O ac EtOH mewn crynodiadau o dan 1% v / v). Yn dilyn 1 awr, gwanhawyd un plât 1: 2 gyda chyfrwngau yn cynnwys 120 $\mu$ M clorocwin (+ CQ), a'r llall â chyfrwngau sy'n cynnwys cyfaint cyfatebol o ddH<sub>2</sub>O (-CQ). Rhoddodd hyn grynodiadau terfynol o 1 $\mu$ M ar gyfer AG, UAG, L692 a Rap, 10 $\mu$ M ar gyfer Resv a 60 $\mu$ M ar gyfer CQ. Cafodd celloedd eu trin am 24 awr arall cyn i'r cyfrwngau gael eu lysio ar gyfer echdynnu protein, fel y disgrifiwyd yn flaenorol. Yn dilyn hynny, defnyddiwyd echdynniadau protein ar gyfer nodweddiadau blotio Gorllewinol o mynegiad proteinau ATG.

### 3.2.4. Aseidiadau microsgopeg fflworoleuedd

#### 3.2.4.1. Optimeiddiaeth cychwynnol

Hadwyd 6,000 o gelloedd SN4741 mewn 100  $\mu$ l o gyfrwng meithrin, mewn platiau 96 ffynnon neu sleidiau siambr 12-ffynnon, fel y disgrifir ym mhennod 2.2.6.2.

Trawsddygiadwyd y celloedd gyda'r adeiladwaith BacMam 2.0 LC3B-GFP fel y disgrifir ym mhennod 2.2.6.6, a ceith y prawf Cyto ID ei perfformio fel y disgrifir ym mhennod 2.2.6.4, gan defnyddio crynodiadau 1  $\mu$ l/ml, 2  $\mu$ l/ml, a 3  $\mu$ l/ml o'r llifyn gwyrdd CytID ac amseri magu o 30 munud, 45 munud ac 1 awr. Ar gyfer yr arbrofion hyn, ceith y celloedd eu drin ym mhresenoldeb ac absenoldeb 60  $\mu$ M CQ.

Delweddwyd platiau 96 ffynnon gyda'r system In-cell analyser 2000 (GE Healthcare), tra ceith sleidiau siambr eu delweddu gyda'r system cydffocal LSM 710 (Zeiss).

#### 3.2.4.2. Optimeiddiaeth Baff

Ceith celloedd SN4741 (6,000/100  $\mu$ l/ffynnon) eu trin gyda chrynodiadau gwahanol (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2.5  $\mu$ M) o'r atalydd lysosomaidd Baf am 24 awr. Defnyddiwyd cyfaint cyfatebol o DMSO (wedi'u gwanhau mewn cyfrwng meithrin) fel y rheolydd Veh. Yn dilyn triniaeth, perfformiwyd y prawf Cyto ID (gyda 2  $\mu$ l/ml o'r llifyn a amser magu o 1 awr), cyn i'r gelloedd cael eu sefydlogi. Yna, gosodwyd arwydryn a delweddir y sleidiau gyda'r LSM 710.

#### 3.2.4.3. Optimeiddiaeth rheolyddion positif

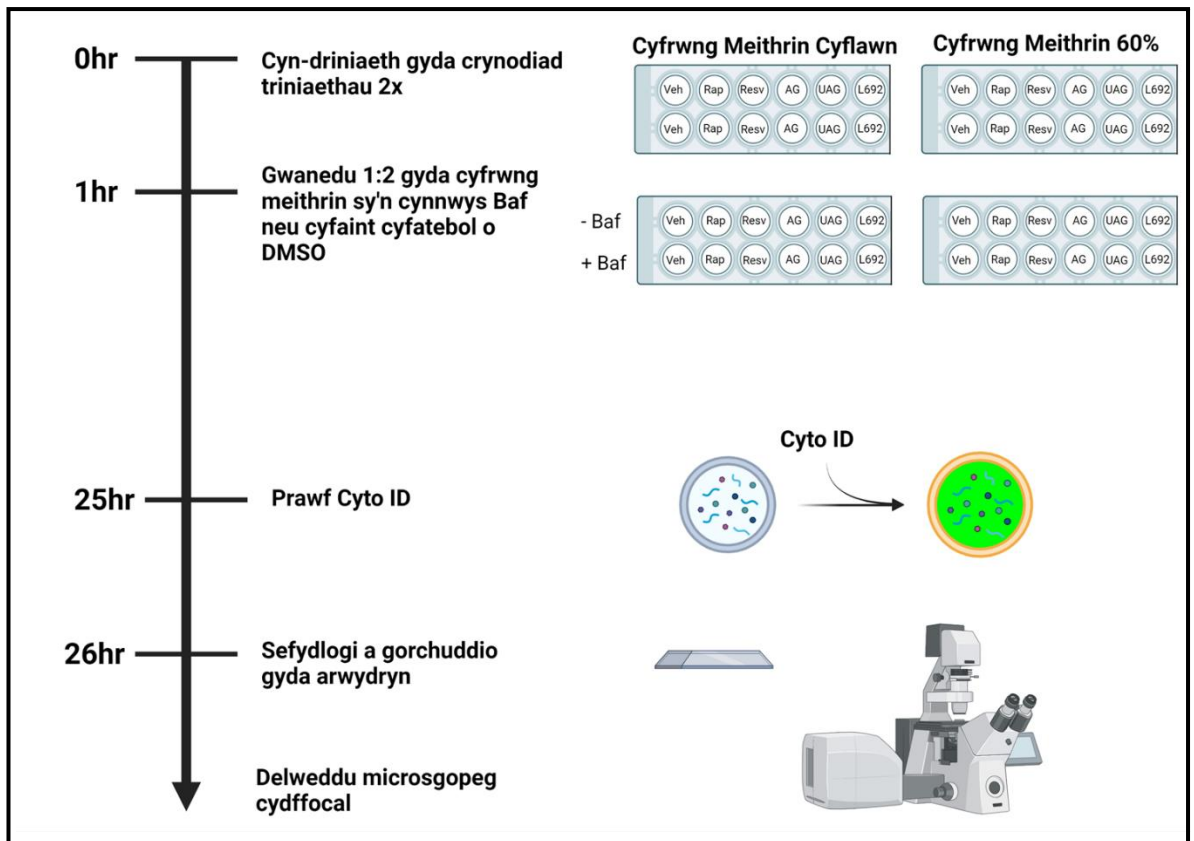
I asesu effeithiolrwydd cyfyngu maetholion fel rheolydd positif awtoffagi, cafodd celloedd SN4741 eu trin am nail ai 1 awr, 4 awr neu 24 awr mewn cyfrwng DMEM heb glwcos, glwtamin a serwm, neu hydoddiant Halen Cytbwys Hanks (HBSS). Perfformiwyd y cyfyngiadau ym mhresenoldeb ac absenoldeb 1  $\mu$ M Baf. Er mwyn pennu'r crynodiad optimaidd am Rap a Resv, cafodd y celloedd eu drin am 24 awr gyda 0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2.5  $\mu$ M a 5  $\mu$ M Rap, neu 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M a 50  $\mu$ M Resv, ym mhresenoldeb 1  $\mu$ M Baf. Cafodd rheolydd Veh (DMSO) ei hychwanegu hefyd, er

mwyn dilysu effeithiolrwydd  $1\mu\text{M}$  Baf. Perfformiwyd y prawf Cyto ID a delweddu LSM 710 fel y disgrifir o blaen.

#### 3.2.4.4 Nodweddiad Cyto ID o effaith triniaethau echelin ghrelin ar awtoffagi

I asesu effaith signalu ghrelin-GHS-R1a ar awtoffagi gyda'r prawf Cyto ID, hadwyd 6,000 o gelloedd SN4741, neu 10,000 o gelloedd HT-22 mewn  $100\mu\text{l}$  cyfrwng meithrin yn slediau siambr. Ar gyfer y triniaethau, defnyddiwyd yr un dull a defnyddir ar gyfer yr arbrofion WB, gan gadw crynodiadau'r triniaethau' cyson ond cywiro'r cyfaint. 24 awr ar ôl hadu, ailosodwyd y cyfrwng meithrin gyda  $50\mu\text{l}$  o gyfrwng newydd gyda 2x crynodiad o bob triniaeth a'r rheolyddion. Ar ôl magu am 1 awr, ychwanegwyd  $50\mu\text{l}$  o gyfrwng meithrin arall, gyda'r ffynhonnau ar rhes gwaelod y sleid yn derbyn 2x crynodiad Baf, a'r rhai ar y rhes top yn derbyn cyfaint cyfatebol o DMSO yn lle. Ychwanegwyd  $2\mu\text{M}$  o Baf i gelloedd SN4741, gyda chrynodiad terfynol o  $1\mu\text{M}$ , ac ychwanegir  $1\mu\text{M}$  o Baf i gelloedd HT-22, gyda chrynodiad terfynol o  $0.5\mu\text{M}$ . Ymhellach, perfformiwyd yr arbrawf o dan amodau maetholion cyflawn ac cyfyngiad maetholion weddol ysgafn (40%). Er mwyn dynwared cyfyngiad maetholion ysgafn, cafodd celloedd eu hadu yn cyfrwng meithrin llawn yn gyntaf, cyn l'r driniaethau gael eu hychwanegu mewn cyfrwng a oedd wedi gwanhau 40% o'r cyfrwng llawn. Gwanhawyd y cyfrwng llawn trwy cymysgu gyda'r cyfaint priodol o gyfrwng heb unrhyw glwcos, glwtamin neu serwm.



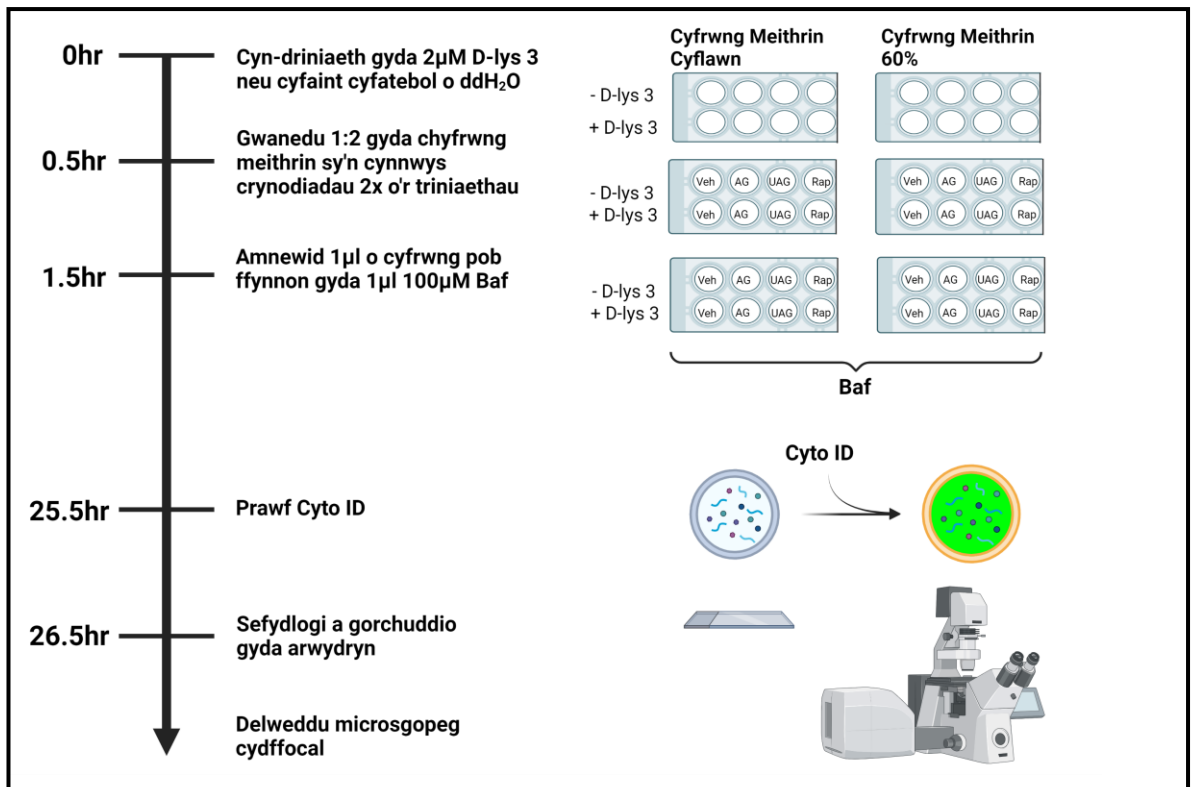


**Ffigur 3.4. Trosolwg o'r cynllun driniaeth a ddefnyddir ar gyfer nodweddiadau**

**prawf Cyto ID o effeithiau triniaethau echelin ghrelin ar awtoffagi.** Hadwyd 6,000 o gelloedd SN4741 neu 10,000 o gelloedd HT-22 cells mewn 100µl o gyfrwng meithrin cyflawn mewn dau sleid siambr. 24 awr ar ôl hadu, tynnwyd y gyfrwng o'r ddau sleid a'i ddisodli â chyfrwng cyflawn neu cyfrwng meithrin 60% (cyfyngiad 40%) ffres sy'n cynnwys crynodiadau 2x o acyl-ghrelin (AG) (2µM), unacyl-ghrelin (UAG) (2µM), L692585 (L692), (2µM), rapamycin (Rap) (2µM), resveratrol (Resv) (20µM), neu gyfaint cyfatebol o reolyddion cludiol (Veh) (cymysgedd o DMSO, ddH<sub>2</sub>O ac EtOH mewn crynodiadau o dan 1% v / v). Yn dilyn 1 awr, gwanhawyd y ffynhonnau yn rhes uchaf pob sleid 1: 2 gyda chyfrwng yn cynnwys DMSO (<1%), a'r rhesi gwaelod 1: 2 gyda chyfrwng yn cynnwys 2µM baffilomycin A1 (Baf). Rhoddodd hyn grynodiadau terfynol o 1µM ar gyfer AG, UAG, L692 a Rap, 10µM ar gyfer Resv ac 1µM ar gyfer Baf. Cafodd celloedd eu trin am 24 awr arall cyn i'r cyfryngau gael eu tynnu o bob ffynnon, a pherfformiwyd assay ID Cyto fel y disgrifiwyd o'r blaen.

#### 3.2.4.5 Asesiad o effaith gwrthweithyddiaeth GHS-R1a ar awtoffagi gyda'r prawf Cyto ID yng nghelloedd SN4741

Hadwyd celloedd SN4741 (6,000 celloedd/100µl/ffynnon) mewn sleidiau siambr, fel y disgrifir o'r blaen. 24 awr or ôl hadu, ailosodwyd y cyfrwng meithrin gyda 50µl o gyfrwng newydd, yn cynnwys naill ai 2µM o [D-lys-3]-GHRP-6 (D-lys-3) (gwrthweithydd GHS-R1a) neu gyfaint gyfwerth o ddH<sub>2</sub>O. Ar ôl 30 munud, ychwanegwyd 50µl arall o gyfrwng meithrin, yn cynnwys crynodiad 2x o Rap, AG, UAG, neu gyfaint gyfwerth o Veh (cymysgedd o DMSO a ddH<sub>2</sub>O). Magwyd y celloedd am awr bellach, cyn i 1µl o gyfrwng meithrin cael ei tynnu allan o bob ffynnon, ac yna ychwanegir 1µl o 100µM Baf. Perfformiwyd y prawf Cyto ID, fel y disgrifir o blaen, ar ôl i'r celloedd gael eu trin am 24 awr pellach. Fel gyda'r arbrawf cynt, perfformiwyd y triniaethau o dan amodau maeth cyflawn a cyfyngedig weddol ysgafn (40%).

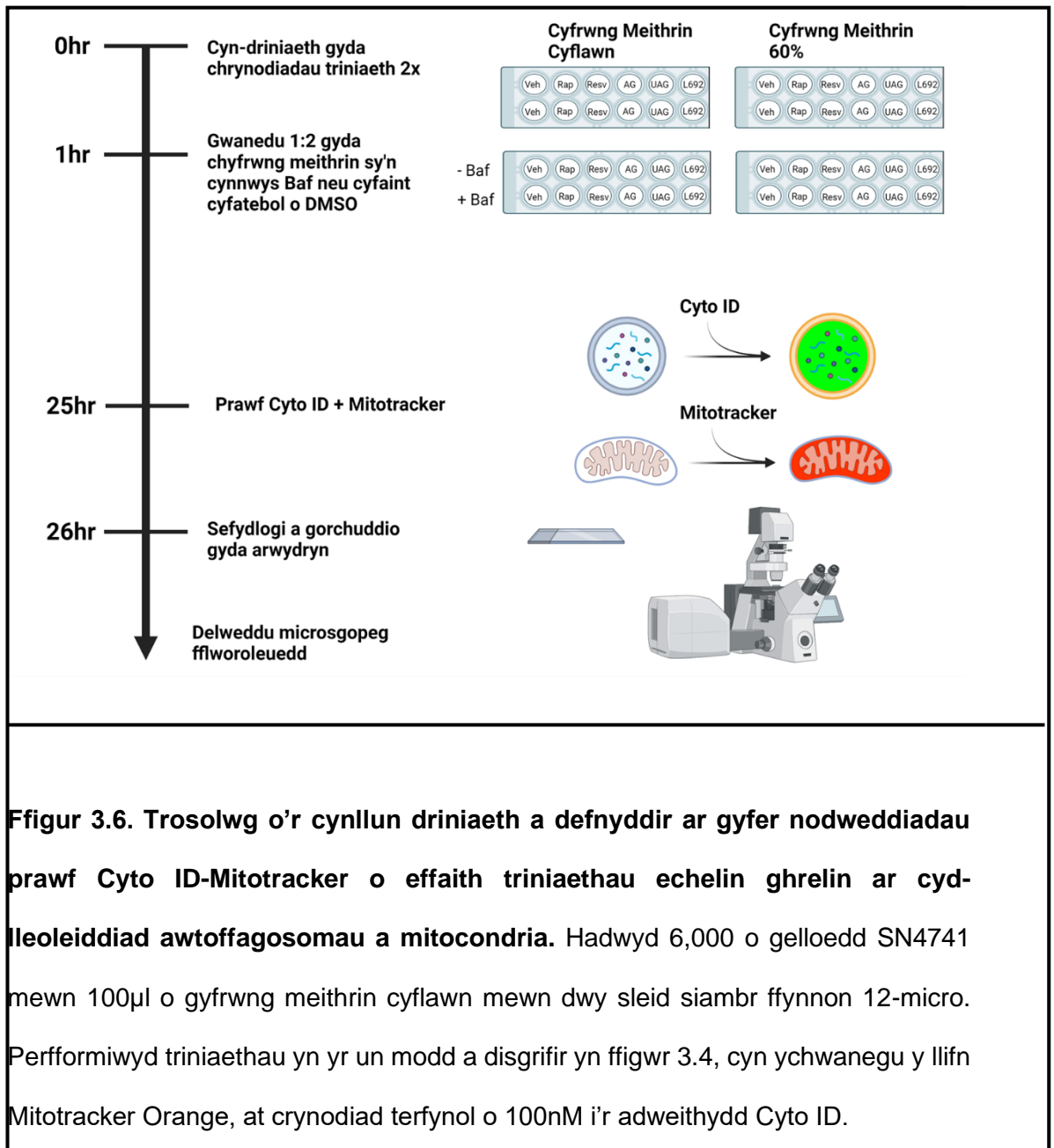


**Ffigur 3.5. Trosolwg o'r cynllun driniaeth a defnyddir ar gyfer nodweddiadau prawf Cyto ID o effaith gwrthweithiant GHS-R1a yng nghelloedd SN4741.**

Hadwyd celloedd SN4741 mewn 100µl o gyfrwng meithrin cyflawn mewn dwy sleid siambr ffynnon 12-micro. 24 awr ar ôl hadu, tynnwyd y gyfrwng o'r ddau sleid a'i ddisodli â chyfrwng cyflawn neu cyfyngedig ysgafn ffres sy'n cynnwys 2µM o'r gwrthweithydd GHS-R1a [D-lys3]-GHRP-6 (D-lys 3) neu cyfaint cyfatebol o ddH<sub>2</sub>O. Yn dilyn cyn-driniaeth 30 munud, gwanhawyd ffynhonnau 1: 2 gyda chyfrwng yn cynnwys 2µM acyl-ghrelin (AG), unacyl-ghrelin (UAG), rapamycin (Rap), neu gyfaint cyfatebol o reolydd cludiol (cymysgedd o DMSO a ddH<sub>2</sub>O), gan rhoi grynodiadau ôl-wanhau o 1µM ar gyfer pob triniaeth (gan gynnwys D-lys 3). Yn dilyn triniaeth 1 awr, ychwanegwyd 1µl o 100µM bafilomycin A1 (Baf) (wedi'i wanhau mewn cyfrwng meithrin fel bod crynodiad DMSO yn is na 1%) at bob ffynnon, a thrinnir y celloedd am 24 awr arall. Perfformiwyd y prawf Cyto ID, sefydlogi, gosod arwydrau, a delweddu microsgopeg cydffocal fel y disgrifir yn blaenorol.

### 3.2.4.6 Aseiad o gyd-lleoleiddiad awtoffagosomau a mitochondria gyda phrawf Cyto ID a Mitotracker

Er mwyn asesu cyd-lleoleiddiad rhwng awtoffagosomau a mitochondria yng nghelloedd SN4741, perfformiwyd meithrinfa celloedd a triniaethau fel y disgrifir yn adran 3.2.4.4, gan ychwanegu llyfn mitotracker oren, at crynodiad terfynol o 0.1µM, i'r adweithydd Cyto ID.



**Ffigur 3.6. Trosolwg o'r cynllun driniaeth a defnyddir ar gyfer nodweddïadau prawf Cyto ID-Mitotracker o effaith triniaethau echelin ghrelin ar cyd-lleoleiddiad awtoffagosomau a mitochondria.** Hadwyd 6,000 o gelloedd SN4741 mewn 100µl o gyfrwng meithrin cyflawn mewn dwy sleid siambr ffynnon 12-micro. Perfformiwyd triniaethau yn yr un modd a disgrifir yn ffigur 3.4, cyn ychwanegu y llyfn Mitotracker Orange, at crynodiad terfynol o 100nM i'r adweithydd Cyto ID.

### 3.2.5 Dadansoddiad ystadegol a chyflwyniad data

#### 3.2.5.1 Dadansoddiadau WB

Ar gyfer arbrofion WB, gwnaed cymariaethau ystadegol rhwng gwerthoedd dwysedd optegol normaleiddedig cymedrig triniaethau a Veh gan ddefnyddio ANOVA Unffordd ac yna prawf cymariaethau lluosog Dunnett. Cyflwynir canlyniadau'r dadansoddiadau ystadegol yn atodiad A, tra bod cymarebau dwysedd optegol normaleiddig bob triniaeth i Veh (h.y. newid gwaith drosodd- fold change) yn cael eu cyflwyno fel graffiau yn yr adran canlyniadau dilynol. Dylid pwysleisio na wnaed cymariaethau ystadegol ar y cymarebau hyn, a'u bod yn cael eu cyflwyno i bwysleisio maint effaith ac atgynrchadwyedd y canlyniadau.

#### 3.2.5.2 Dadansoddiadau Cyto ID

Ar gyfer arbrofion optimeiddiaeth Cyto ID, cyflwynir data fel gwerth cymedrig yr holl gelloedd a samplwyd gyda bariau cyfeiliornad cyfyngau hyder 95% (95% CIs). Yng nghelloedd SN4741, gwnaed cymariaethau ystadegol gan ddefnyddio ANOVA Unffordd ac yna prawf cymariaethau lluosog Tukeys, wrth gymharu effaith dosau gwahanol o'i gymharu â'i gilydd yn ychwanegol at y rheolydd Veh, neu brawf aml cymhariaeth Dunnett, wrth gymharu dosau amrywiol ag y rheolydd Veh yn unig. Mewn celloedd HT-22, lle cafodd effeithiau Rap a Baf ar groniad pwncta Cyto ID eu hasesu ochr yn ochr, gwnaed cymariaethau ystadegol gan ddefnyddio ANOVA Dwyffordd ac yna prawf aml cymhariaeth Tukey.

Ar gyfer prif arbrofion assay Cyto ID, cyflwynir data yn y fformat a ddisgrifir gan (Lord, Velle, Mullins, & Fritz-Laylin, 2020) gyda bariau cyfeiliornad a chymedr tri dyblygiad arbrofol annibynnol yn gorchuddio dosbarthiad cellog cyfan o bob ailadrodd. Gwnaed cymariaethau ystadegol gan ddefnyddio ANOVA Unffordd ac yna prawf cymariaethau lluosog Dunnett. Ar gyfer arbrawf cyn-driniaeth D-lys 3, dadansoddwyd data gan ANOVA Dwyffordd, ac yna cymariaethau lluosog Sidak o brif effeithiau D-lys-3.

### 3.3. Canlyniadau

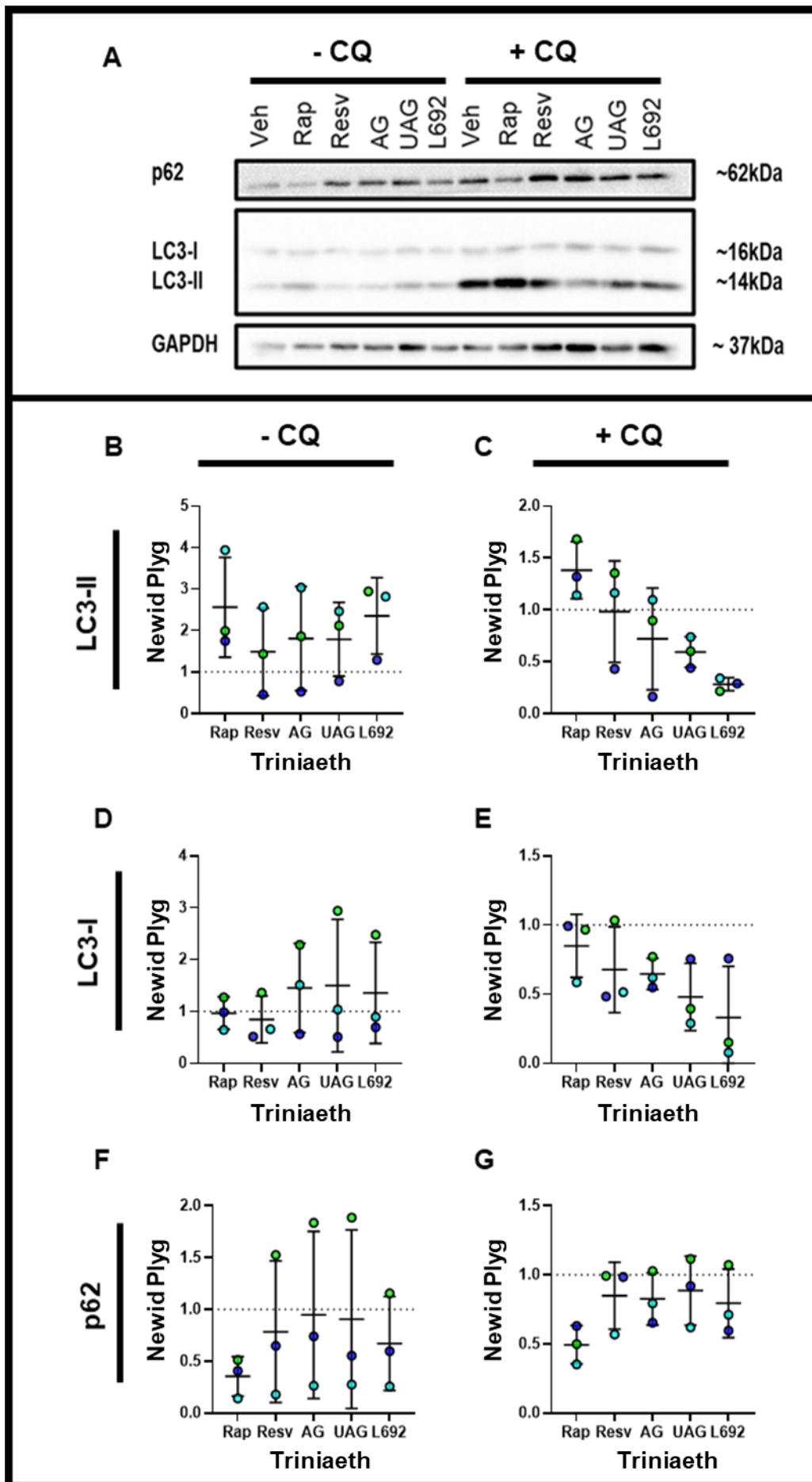
#### 3.3.1. Data WB LC3 a p62 celloedd SN4741

I ddechrau asesu effaith echelin ghrelin ar awtoffagi mewn celloedd SN4741, aseswyd mynegiad LC3-II, LC3-I a p62 gyda WB. Yn unol â chanllawiau ymchwil awtoffagi (Klionsky et al., 2021), cynhaliwyd arbrofion yn absenoldeb a phresenoldeb yr atalydd lysosomaidd CQ.

Pan blotiwyd dwyseddau optegol normaleiddedig LC3-II fel newidiadau gwaith drosodd (fold changes) mewn perthynas â rheolydd Veh (ffigur 3.7), rhoddodd AG, UAG a L692 gynyddiadau cyfartalog yn absenoldeb CQ (ffig 3.7B) a gostyngiadau cyfartalog ym mhresenoldeb CQ (ffigur. 3.7C); arsylwadau sy'n gyson â gostyngiad mewn fflwcs awtoffagig. Mewn cyferbyniad, cynyddwyd mynegiad LC3-II (ar gyfartaledd) ar ôl triniaeth gyda Rap, anwythydd hysbys of awtoffagi, ym mhresenoldeb (ffigur 3.7C) ac absenoldeb CQ (ffigur 3.7B). Fodd bynnag, ni ystyriwyd unrhyw un o effeithiau triniaethau echelin ghrelin (neu reolyddion cadarnhaol) ar fynegiad LC3-II yn arwyddocaol yn dilyn cymariaethau ystadegol o'r OD's normaleiddedig (Atodiad A: ffigur A1; tabl A1).

Roedd y tueddiadau yn y data LC3-I yn debyg i rai data LC3-II, gyda thriniaethau echelin ghrelin yn rhoi cynnydd cyfartalog yn absenoldeb CQ (ffigur 3.7D) a gostyngiadau cyfartalog ym mhresenoldeb CQ (ffigur 3.7E). Ar y llaw arall, gwelwyd gostyngiadau cyfartalog mewn mynegiad p62 yn absenoldeb (ffig 3.7F) a phresenoldeb (ffig 3.7G) CQ. Eto fodd bynnag, ni ystyriwyd unrhyw un o effeithiau triniaethau echelin ghrelin ar fynegiad LC3-I (Atodiad A: ffigur A2; tabl A2) neu p62 (Atodiad A: ffigur A3; tabl A3) yn ystadegol arwyddocaol.

Felly, ni roddodd nodweddiadau WB unrhyw dystiolaeth cadarn bod echelin ghrelin yn ysgogi awtoffagi mewn celloedd SN4741 o dan yr amodau arbrofol a archwiliwyd.



**Ffigur 3.7. Nodweddiad WB o effaith triniaethau echelin ghrelin ar awtoffagi mewn celloedd SN4741.**

**A).** Blotiau gorllewinol cynrychioliadol o fynegiad LC3-II, LC3-I, p62 a GAPDH (rheolydd llwytho) mewn celloedd SN4741 sydd heb (-CQ) neu wedi (+CQ) eu trin gyda clorocwin. Cafodd celloedd eu trin ymlaen llaw am 1 awr gyda naill ai asyl-ghrelin (AG), ghrelin sydd heb ei asyleiddio (UAG), y gweithydd GHS-R1a L692585 (L692), rheolydd cludiol (Veh) neu reolyddion positif rapamycin (Rap) a resferatrol (Resv) , cyn triniaeth am 24 awr arall yn absenoldeb neu bresenoldeb 60µM CQ. Roedd crynodiadau cyn-driniaeth o AG, UAG L692 a Rap yn 2µM yr un, tra bod Resv yn 20µM. Roedd y crynodiadau yn ystod y cwrs triniaeth 24 awr yn 1µM ar gyfer AG, UAG L692 a Rap a 10µM ar gyfer Resv. Defnyddiwyd cymysgedd o dwr dwbl distyll (ddH<sub>2</sub>O), ethanol (EtOH) a dimethyl swlffocsid (DMSO) (i gyd yn llai nag 1%) ar gyfer Veh.

**B-G).** Data dwysedd optegol (OD) normaleiddedig wedi'i gyflwyno fel newid gwaith drosodd o'i gymharu â Veh. Data wedi'i gyflwyno fel cymedr ± SD o dri dyblygiad annibynnol. Mae'r llinell doredig ar Y=1 yn cynrychioli absenoldeb newid gwaith drosodd, gyda data uwchben y llinell yn dangos cynnydd yn y mynegiad o'i gymharu â Veh a data o dan y llinell yn dangos gostyngiad yn y mynegiad o gymharu â Veh. Mesurwyd ODs gan ddefnyddio meddalwedd imageJ, gyda ODs o broteinau targed yn cael eu normaleiddio i GAPDH. Cyflwynir dadansoddiadau ystadegol o werthoedd OD normaleiddedig yn atodiad A.



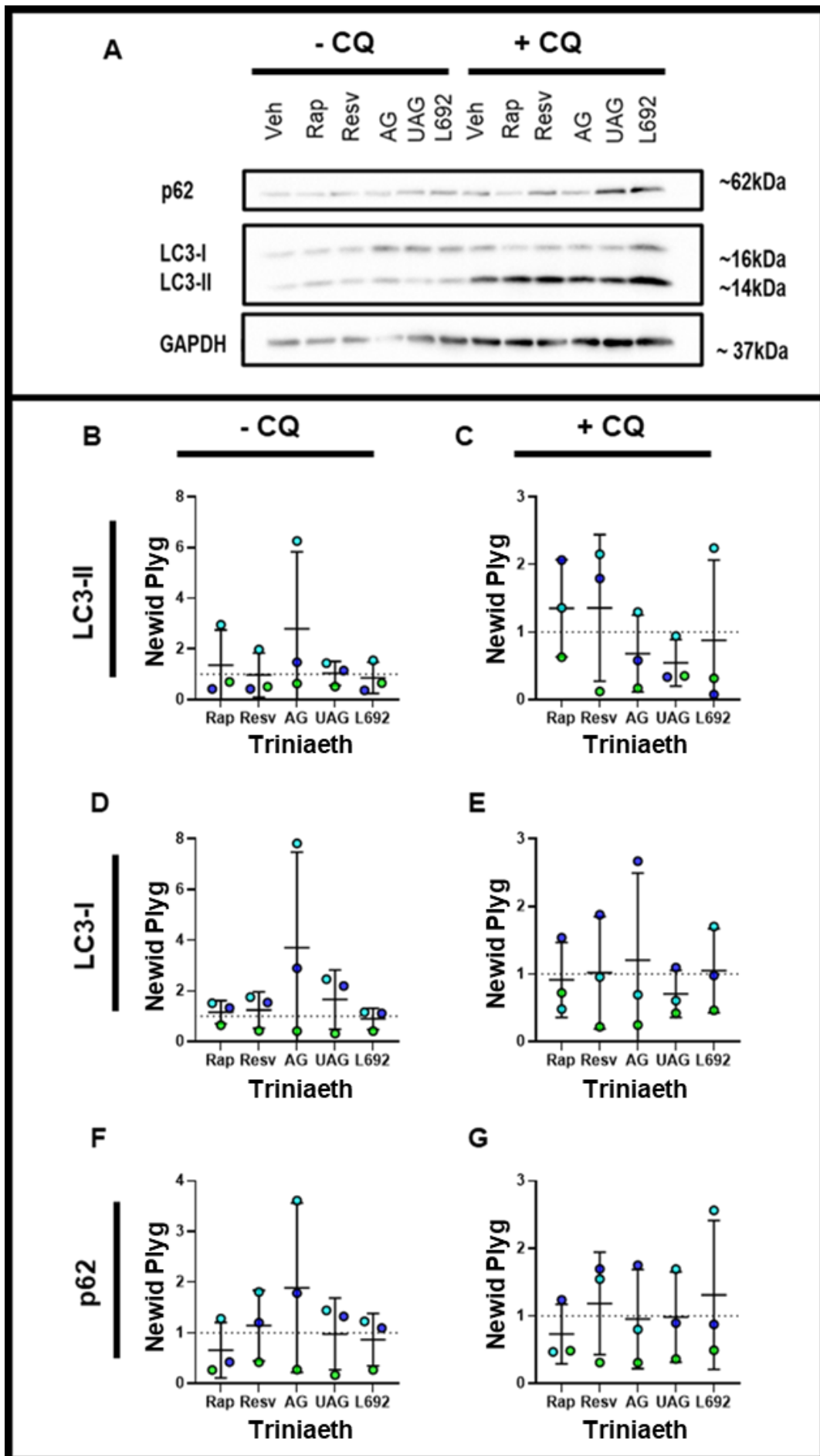
### 3.3.2. Data WB LC3 a p62 celloedd HT-22

Yn dilyn y gwerthusiad o awtoffagi mewn celloedd SN4741, defnyddiwyd WB i nodweddu effaith triniaethau echelin ghrelin ar fynegiad LC3-II, LC3-I a p62 mewn celloedd HT-22. Unwaith eto, perfformiwyd y nodweddiadau hyn ym mhresenoldeb ac absenoldeb CQ.

Yn debyg i'r celloedd SN4741, rhoddodd triniaethau echel ghrelin gostyngiadau cyfartalog mewn mynegiad LC3-II mewn celloedd HT-22 a driniwyd gan CQ (ffigur 3.8C); arwydd posib o is-reoleiddiad awtoffagi. Fodd bynnag, fel gyda data SN4741, nid oedd yr un o'r effeithiau hyn yn ystadegol arwyddocaol (Atodiad A: ffigur A4; tabl A4). Ymhellach, ni achoswyd Rap cynnydd cyson (ar draws tair dyblygiad) mewn mynegiad LC3-II ym mhresenoldeb CQ; gan awgrymu bod yr amodau arbrofol a ddefnyddiwyd yn annigonol ar gyfer canfod anwythiad awtoffagig.

Y roedd y data ar gyfer LC3-II yn absenoldeb CQ (ffigur 3.8B), yn ogystal â LC3-I (ffigur 3.8D, E) a p62 (ffigur 3.8F, G) ym mhresenoldeb ac absenoldeb CQ, yn gyffredinol fwy amrywiol ac yn llai gwybodus na'r data LC3-II ym mhresenoldeb CQ. Yn ddisgwyliedig, ni chanfuwyd effeithiau arwyddocaol ar gyfer triniaethau echelin ghrelin ar fynegiant LC3-I (Atodiad A: ffigur A5; tabl A5) neu p62 (Atodiad A: ffigur A6; tabl A6).

Felly, yn yr un modd â chanfyddiadau blaenorol SN4741, ni roddodd nodweddiadau WB unrhyw dystiolaeth cadarn sy'n awgrymu bod echelin ghrelin yn ysgogi awtoffagi yng nghelloedd HT-22.



**Ffigur 3.8. Nodweddiad WB o effaith triniaethau echelin ghrelin ar awtoffagi mewn celloedd HT-22.**

**A).** Blotiau gorllewinol cynrychioliadol o fynegiad LC3-II, LC3-I, p62 a GAPDH (rheolydd llwytho) mewn celloedd HT-22 sydd heb (-CQ) neu wedi (+CQ) eu trin gyda clorocwin. Cafodd celloedd eu trin ymlaen llaw am 1 awr gyda naill ai asyl-ghrelin (AG), ghrelin sydd heb ei asyleiddio (UAG), y gweithydd GHS-R1a L692585 (L692), rheolydd cludiol (Veh) neu reolyddion positif rapamycin (Rap) a resferatrol (Resv) , cyn triniaeth am 24 awr arall yn absenoldeb neu bresenoldeb 60µM CQ. Roedd crynodiadau cyn-driniaeth o AG, UAG L692 a Rap yn 2µM yr un, tra bod Resv yn 20µM. Roedd y crynodiadau yn ystod y cwrs triniaeth 24 awr yn 1µM ar gyfer AG, UAG L692 a Rap a 10µM ar gyfer Resv. Defnyddiwyd cymysgedd o dwr dwbl distyll (ddH<sub>2</sub>O), ethanol (EtOH) a dimethyl swlffocsid (DMSO) (i gyd yn llai nag 1%) ar gyfer Veh.

**B-G).** Data dwysedd optegol (OD) normaleiddedig wedi'i gyflwyno fel newid gwaith drosodd o'i gymharu â Veh. Data wedi'i gyflwyno fel cymedr ± SD o dri dyblygiad annibynnol. Mae'r llinell doredig ar Y=1 yn cynrychioli absenoldeb newid gwaith drosodd, gyda data uwchben y llinell yn dangos cynnydd yn y mynegiad o'i gymharu â Veh a data o dan y llinell yn dangos gostyngiad yn y mynegiad o gymharu â Veh. Mesurwyd ODs gan ddefnyddio meddalwedd imageJ, gyda ODs o broteinau targed yn cael eu normaleiddio i GAPDH. Cyflwynir dadansoddiadau ystadegol o werthoedd OD normaleiddedig yn atodiad A.

### 3.3.3 Optimeiddiaeth profion microsgopeg fflworoleuedd

#### 3.3.3.1. Optimeiddiaeth prawf Cyto ID gyda chelloedd SN4741

Gan fod rhaid defnyddio sawl dechneg annibynnol i asesu sut mae amodau arbrofol yn effeithio ar awtoffagi (Klionsky et al., 2021), y cam rhesymegol ar ôl cwblhau arbrofion WB oedd perfformio nodweddiadau microsgopeg fflworoleuedd.

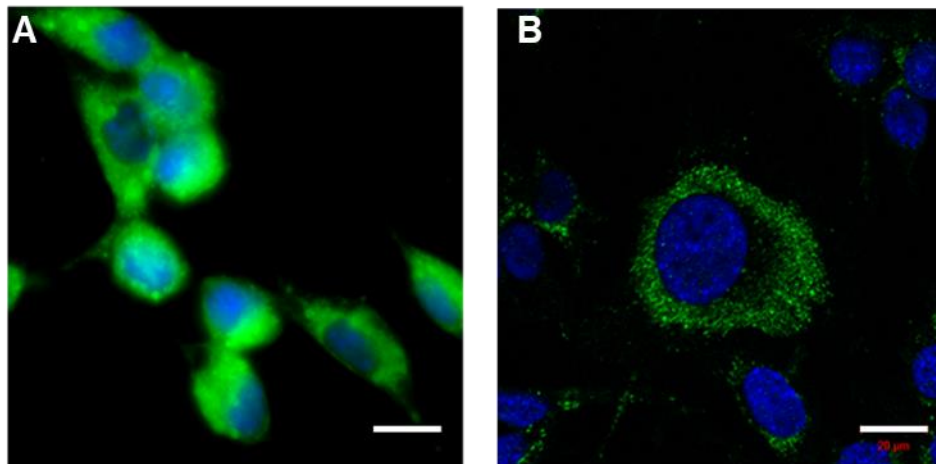
Yn wreiddiol, trawsddygiadwyd celloedd SN4741 gyda'r gohebydd trawsgenynnol fflworoleuol GFP-LC3 ar gyfer delweddu trwybwn uchel gyda'r In-Cell Analyser 2000 (GE). Yn anffodus, nid oedd yr arbrofion hyn yn llwyddiannus, gan nad oedd gwahaniaeth amlwg rhwng y celloedd a cheith eu trawsddygiadu ar rhai oedd heb. Penderfynir felly, i ddefnyddio'r prawf Cyto ID, lle nad oes angen trawsffurfio neu trawsddygiadu celloedd, yn lle. Tra welwn canlyniadau gwell gyda'r prawf hon, nid oedd y prawf yn addas ar gyfer microsgop epi-ffloroleuedd maes llydan yr In-Cell Analyser 2000, gan fod tarth amlwg yn y ffynhonnau rheolydd a cydraniad isel gyda triniaeth CQ.

I goresgyn y problem hon, defnyddiwyd y system gydffocal LSM710 (Zeiss) yn lle. Fel gwelir yn ffigur 3.9, roedd cydraniad yr LSM710 llawer well na'r In-Cell-Analyser 2000, gyda nifer o pwncta amlwg i'w gweld. Ond, o ganlyniad l'r broses sefydlogi, sy'n achosi dirywiad yng nghryfder signal y llyfn Cyto ID, yr oedd rhaid cynyddu magiad gyda'r llyfn Cyto ID o 30 munud i awr. Ymhellach, defnyddir tanbeidrwydd laser 100% er mwyn galluogi delweddu optimaidd. Gyda'r tanbeidrwydd uchel hon, wnaeth y signal Cyto ID dirywio ar ôl caffaeliadau mwy na 15 eiliad. O'r herwydd, roedd rhaid i gyfaddawdu ar gyflawni datrysiad delwedd uwch, ac nad oedd modd caffael pentyrrau Z. Fodd bynnag, yr oedd y gosodiadau terfynol a ddefnyddir ar gyfer delweddu LSM710 yn addas ar gyfer y prawf Cyto ID, ac yn llawer well na gyda'r system IN-Cell-Analyser 2000.

## Cyto ID Gwyrdd 2.0 + Triniaeth 24awr gyda CQ

In-Cell-Analyser 2000

Microsgop cydffocal LSM710



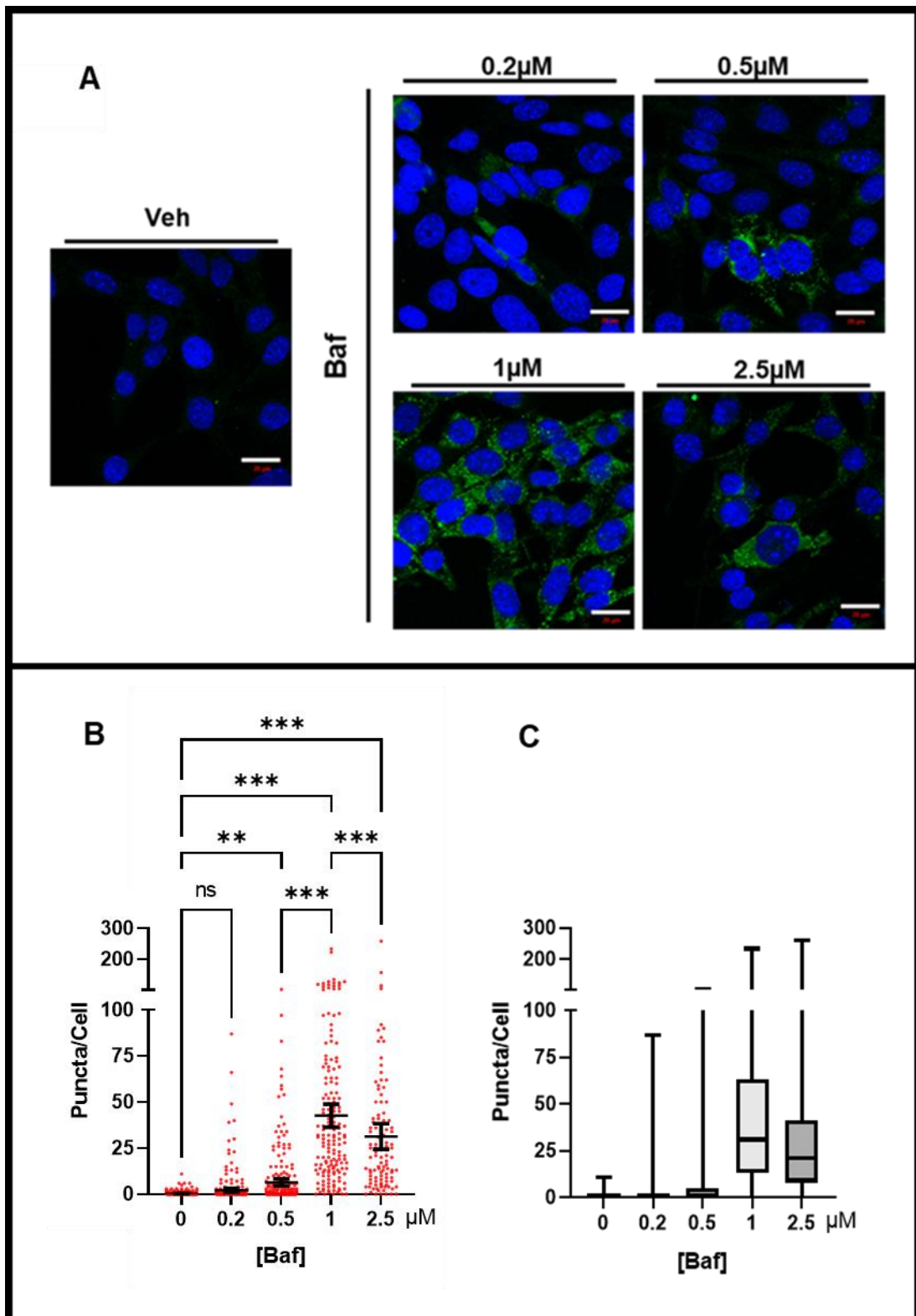
**Ffigur 3.9. Cymhariaeth o staenio ID Cyto mewn celloedd SN4741 wedi'u trin â CQ, a delweddwyd gyda microsgopau maes llydan (A) a cydffocal (B).** Er bod delweddau a gafwyd gyda'r In-Cell-Analyser2000 yn dangos dwyster fflwroleuedd Cyto-ID amlwg, roedd tARTH y system ddelweddu maes eang yn cyfyngu ar ddatrysiad pwncta penodol. Mewn cyferbyniad, roedd system cydffocal LSM710 yn darparu llawer mwy o ddatrysiad delwedd, lle gellid delweddu strwythurau pwnctad penodol.

### 3.3.3.2 Optimeiddiaeth Baf yng nghelloedd SN4741

Er defnyddiwyd CQ fel yr atalydd lysosomaidd ar gyfer yr arbrofion WB a'r arbrofion cychwynnol Cyto ID, ail-aseswyd ei addasrwydd ar gyfer asesiadau o drosiant awtoffagig ar ôl dysgu bod CQ yn cynyddu'r cyfuniad o LC3-II i bilenni an-awtoffagig (Jacquin et al., 2017). Mewn cyferbyniad, nid oedd Baf, atalydd or ATPas lysosomaidd, yn ysgogi cyfuniad LC3-II an-ganonaidd (Jacquin et al., 2017). Gan fod llifyn Cyto-ID yn dangos gorgyffwrdd sylweddol ag adrannau sydd wedi labeli â LC3-II (Oeste, Seco, Patton, Boya, & Perez-Sala, 2013) penderfynwyd mai newid o CQ i Baf fyddai orau ar gyfer pob arbrwf microsgopeg fflworoleuedd dilynol.

Dewiswyd dos 0.1µM o Baf, a ddefnyddir yn rheolaidd mewn ymchwil awtoffagi (Klionsky et al., 2021), fel crynodiad cychwynnol priodol ar gyfer arbrofion optimeiddio. Fodd bynnag, ychydig iawn o pwncta Cyto ID fesul cell a arsylwyd pan gafodd celloedd SN4741 eu trin am 24 awr gyda'r dos hwn. Yn unol â hynny, sefydlwyd cyfres driniaeth (0.2µM, 0.5µM, 1µM, 2.5µM) i bennu'r dos dirlawn o Baf (ffigur 3.10).

Ac eithrio'r dos 0.2µM ( $P = 0.70$ ), roedd gan gelloedd a gafodd eu trin â Baf gyfrifiadau pwncta cyfmedrig arwyddocaol uwch o gymharu â Veh (ffigur 3.10B). Er mai cynnydd bychan yn unig a gynhyrchodd y dos o 0.5µM gwelwyd cynnydd nodedig gyda'r dosau 1µM a 2.5µM (ffigur 3.10B, C). Yn hollbwysig fodd bynnag, barnwyd bod nifer y pwncta a welwyd gyda'r dos 1µM hefyd yn arwyddocaol uwch o gymharu â'r dosau 0.5µM ( $P = <0.001$ ) a 2.5µM ( $P = <0.001$ ) (ffigur 3.10B). Mae'r data hyn felly'n awgrymu bod 1µM Baf yn darparu dos dirlawn sydd ei angen ar gyfer atal diraddiad lysosomaidd yn y celloedd SN4741.



**Ffigur 3.10. Ymateb dos bafilomycin A1 gyda phrawf Cyto ID mewn celloedd SN4741.**

**A).** Delweddau cynrychioliadol o staen Cyto ID mewn celloedd SN4741 wedi'u trin am 24 awr gyda rheolydd cludiol (Veh) neu grynodiadau cynyddol (0.2, 0.5, 1, 2.5 $\mu$ M) o bafilomycin A1 (Baf) . Delweddwyd y celloedd gyda microsgop cydffocal LSM710 (Zeiss), gyda barrau graddfa yn cynrychioli 20 $\mu$ m.

**B).** Dangosodd dadansoddiad ystadegol Tukey, yn dilyn ANOVA Unffordd, gynnydd arwyddocaol gyda'r dosau 0.5 $\mu$ M (P = 0.001), 1 $\mu$ M (P = <0.001) a 2.5 $\mu$ M (P= <0.001) o'i gymharu a Veh. Barnwyd bod y dos 1 $\mu$ M hefyd yn ystadegol arwyddocaol o gymharu â'r dosau 0.5 $\mu$ M (P = < 0.001) a 2.5 $\mu$ M (P = <0.001). Cyflwynir y data fel cymedr  $\pm$  cyfyngau hyder 95% o'r cymedr, gyda plot gwasgariad o'r gwerthoedd ar gyfer pob cell. Mesurwyd y pwncta (gan defnyddio meddalwedd CellProfiler) mewn o leiaf 100 o gelloedd, wedi'u cymryd o gyfanswm o 8 maes golwg, fesul triniaeth.

**C).** Plotiau blwch a wisger yn dangos bod gan y dos 1 $\mu$ M gyfrif pwncta/cell 25ain canradd, canolrif a 75ain canradd uwch o gymharu â gweddill y triniaethau.



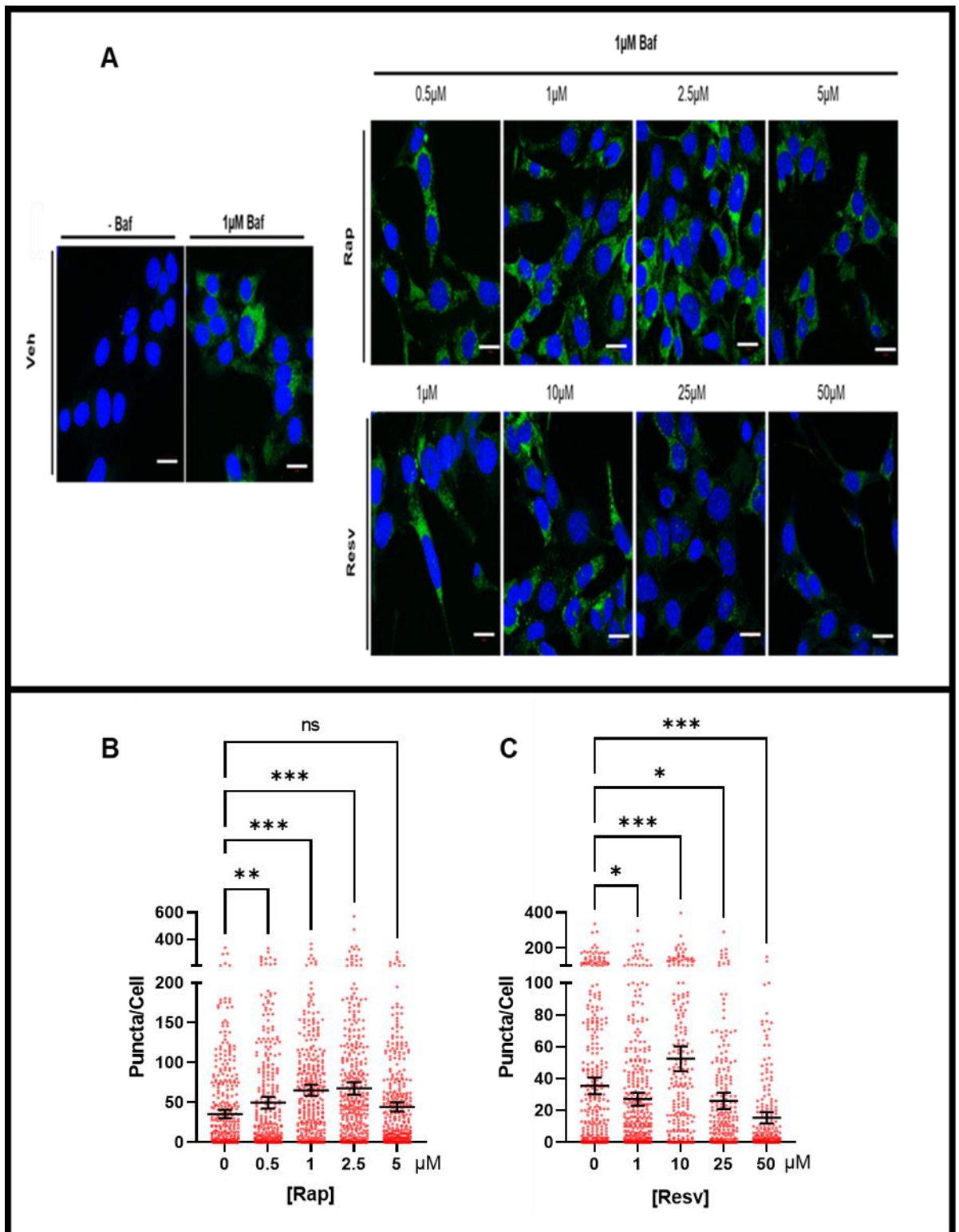
### 3.3.3.3. Optimeiddiaeth rheolyddion positif yng nghelloedd SN4741

Ar ol dewis  $1\mu\text{M}$  Baf fel y crynodiad ar gyfer ataliad lysosomaidd, sefydlwyd arbrofion i ddilysu'r amodau optimaidd ar gyfer rheolyddion positif y prawf Cyto ID. Gan oedd y newidiadau cymharol a welir gyda Rap a Resv yn yr arbrofion WB yn eithaf isel, penderfynwyd i ysgogi awtoffagi gyda cyfyngiad maetholion llym yn lle ar gyfer y prawf Cyto ID. Fodd bynnag, achosodd hyd yn oed amseroedd newyn byr (1awr) ddatgysylltiad sylweddol o gelloedd o sleidiau'r siambr wydr, gan atal mesuriad cywir o ymateb Cyto ID (Atodiad A). Felly, dychwelais at ddefnyddio anwythiad cemegol gyda Rap ac Resv a sefydlu arbrofion ymateb dos i ddilysu eu haddasrwydd fel rheolyddion positif ar gyfer y prawf Cyto ID.

Fel dengys ffigur 3.11B, cynyddodd triniaeth â rap, ar grynodiadau  $0.5\mu\text{M}$  ( $P = 0.009$ ),  $1\mu\text{M}$  ( $P = <0.001$ ) neu  $2.5\mu\text{M}$  ( $P = <0.001$ ), nifer cymedrig pwncta Cyto ID yn arwyddocaol o gymharu â'r rheolydd Baf ( $[\text{Rap}] = 0\mu\text{M}$  yn ffigur 3.11B). Roedd gan y dos  $5\mu\text{M}$  hefyd werth pwncta/cell cymedrig uwch o'i gymharu â'r rheolydd, ond nid oedd y cynnydd hwn yn arwyddocaol ( $P = 0.18$ ). Hefyd, dengys plotiau bocs a wisger o'r data hyn (Atodiad A; ffigur A..) bod gan y dosau  $1\mu\text{M}$  a  $2.5\mu\text{M}$  werthoedd pwncta/cell 25ain canradd, canolrif a 75ain canradd, sylweddol uwch o gymharu â rheolydd Baf.

Mewn cyferbyniad â Rap, dim ond y crynodiad  $10\mu\text{M}$  o Resv a wnaeth achosi cynnydd arwyddocaol yn y nifer o pwncta/cell ( $P = < 0.001$ ) (ffigur 3.11C). Yn wir, arweiniodd y crynodiadau eraill at ostyngiadau arwyddocaol yn y nifer o pwncta mewn cymhariaeth i'r rheolydd Baf (ffigur 3.11C).

Awgrymwyd yr arbrofion hyn felly byddai'r crynodiadau  $1\mu\text{M}$  Rap a  $10\mu\text{M}$  Resv yn gweithredu fel rheolyddion positif addas ar gyfer arbrofion Cyto ID dilynol, gan asesu effaith echelin ghrelin ar awtoffagi.



**Ffigur 3.11. Ymatebion dosau rapamycin (Rap) a resferatrol (Resv) gyda'r prawf Cyto ID mewn celloedd SN4741 wedi'u trin â baffilomycin A1 (Baf).**

**A).** Delweddau cynrychioliadol o staenio Cyto ID mewn celloedd SN4741 wedi'u trin â dosau cynyddol o Rap (0.5, 1, 2.5, 5  $\mu$ M) neu Resv (1, 10, 25, 50  $\mu$ M), ym mhresenoldeb 1 $\mu$ M Baf. Mae delweddau cynrychioliadol o gelloedd wedi'u trin gyda rheolydd cludiol (Veh), yn absenoldeb 1 $\mu$ M Baf, hefyd wedi'u cynnwys. Delweddwyd celloedd gyda microsgop cydffocal LSM710 (Zeiss), gyda barrau graddfa yn cynrychioli 20 $\mu$ m.

**B).** Dangosodd dadansoddiad ystadegol Dunnett o gelloedd wedi'u trin gyda Rap fod y dosau 0.5 $\mu$ M ( $P = 0.009$ ), 1 $\mu$ M ( $P = <0.001$ ) a 2.5 $\mu$ M ( $P = <0.001$ ) yn cynyddu'n arwyddocaol y nifer o pwncta/cell o'i gymharu â rheolydd Baf ([Rap] = 0 $\mu$ M ar y graff), ond nad oedd y dos 5 $\mu$ M ( $P = 0.18$ ).

**C).** Dangosodd dadansoddiad ystadegol Dunnett o gelloedd wedi'u trin gyda Resv fod y dos 10 $\mu$ M ( $P = < 0.001$ ) yn cynyddu'n arwyddocaol y nifer o'i gymharu â rheolydd Baf (Resv] = 0 ar y graff), tra wnaeth y dosau 1 $\mu$ M ( $P = 0.04$ ), 25 $\mu$ M ( $P = <0.05$ ) a 50 $\mu$ M ( $P = <0.001$ ) achosi gostyngiadau arwyddocaol.

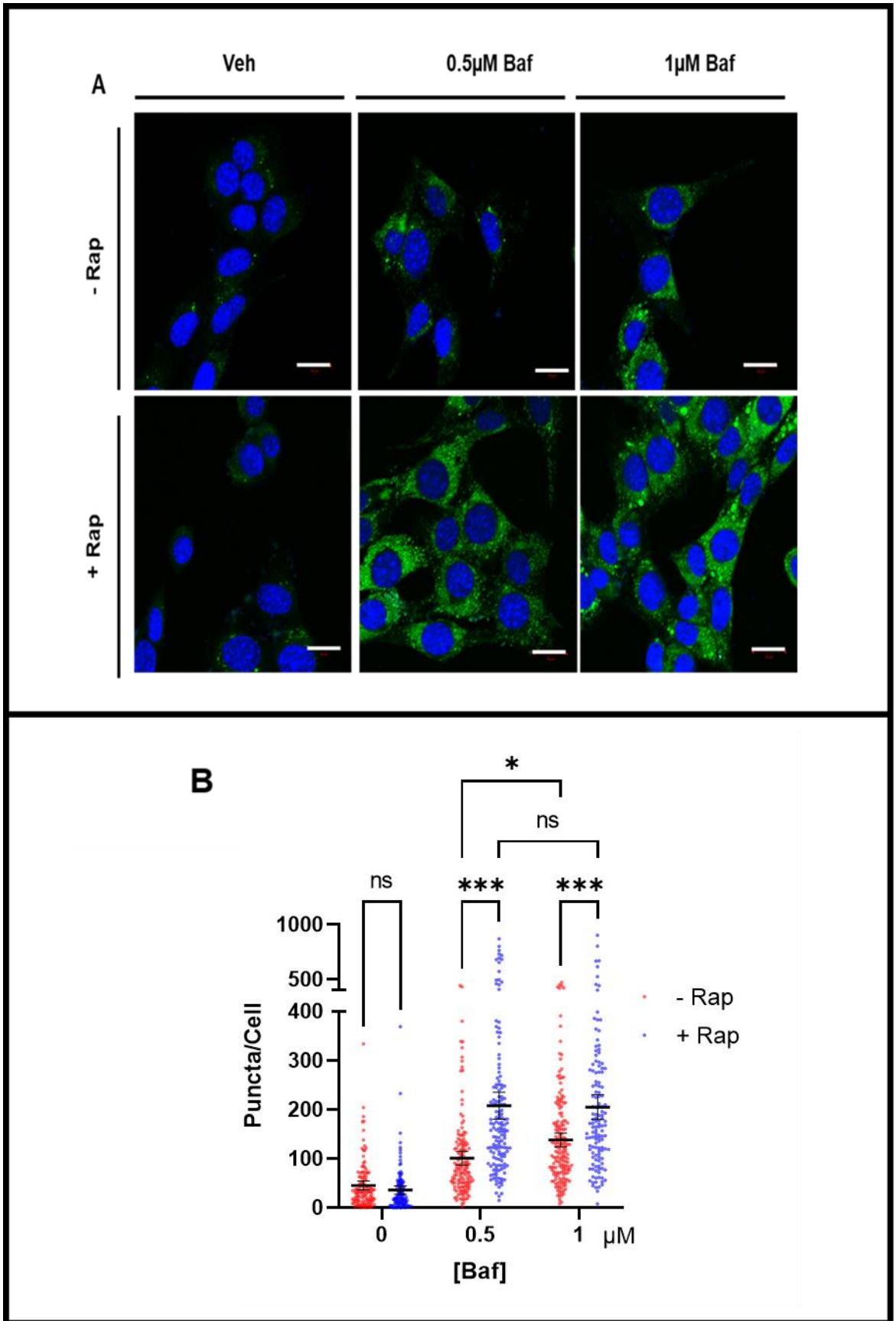
Cyflwynir y data fel cymedr  $\pm$  cyfyngau hyder 95% o'r cymedr, gyda plot gwasgariad o'r gwerthoedd ar gyfer pob cell. Cafodd Puncta eu meintoli (gan ddefnyddio meddalwedd CellProfiler) mewn o leiaf 200 o gelloedd, wedi'u cymryd o gyfanswm o 16 maes gweld, fesul triniaeth. Gwnaethpwyd cymariaethau ystadegol gan ddefnyddio ANOVA Unffordd, ac yna prawf cymariaethau lluosog Dunnett.

#### 3.3.3.4. Optimeiddiaeth amodau rheolaidd yng nghelloedd HT-22

Ar gyfer optimeiddiaeth prawf Cyto ID mewn celloedd HT-22, defnyddiwyd yr un amodau â chelloedd SN4741 (ymweithredydd  $2\mu\text{l/ml}$ , magiad 1awr). Fodd bynnag, yn lle optimeiddio atalyddion lysosomaidd a rheolyddion positif ar wahân, fel y gwnaethpwyd ar gyfer celloedd SN4741, asesir effeithiolrwydd Baf fel atalydd lysosomaidd, a sensitifrwyd y celloedd i ysgogiad awtoffagig gyda Rap, ochr yn ochr, yng nghelloedd HT-22. Felly, cafodd celloedd HT-22 eu trin gyda naill ai Veh,  $0.5\mu\text{M}$  neu  $1\mu\text{M}$  Baf, ym mhresenoldeb ac absenoldeb  $1\mu\text{M}$  Rap.

Yn wahanol i gelloedd SN4741, roedd pyllau o bwncta Cyto ID yn amlwg mewn celloedd HT-22 yn absenoldeb ataliad lysosomaidd (ffigur 3.12A), sy'n awgrymu bod gan y celloedd HT-22 naill ai allu diraddiol is na'r celloedd SN4741, neu ysgogiad awtoffagig gwaelodol mwy amlwg, ar y pwynt terfynol yr arbrawf.

Ymhellach, er achoswyd triniaeth  $1\mu\text{M}$  Baf croniad arwyddocaol uwch o pwncta o'i gymharu â'r dos  $0.5\mu\text{M}$  ( $P = 0.04$ ), nid oedd gwahaniaeth arwyddocaol rhwng celloedd a gafodd eu cyd-trin gyda Rap a Baf ( $P = > 0.99$ ). Yn wir, roedd y gwahaniaeth cymedrig rhwng celloedd heb triniaeth Rap a chelloedd wedi'u trin â Rap yn fwy ar gyfer y dos Baf  $0.5\mu\text{M}$  na'r dos  $1\mu\text{M}$  (ffigur 3.12B). Felly, yn seiliedig ar y canfyddiadau hyn, penderfynwyd defnyddio'r dos  $0.5\mu\text{M}$  o Baf ar gyfer arbrefion dilynol mewn celloedd HT-22.



**Ffigur 3.12. Optimeiddiaeth dos baffilomycin A1 (Baf) ar gyfer prawf Cyto ID mewn celloedd HT-22.**

**A).** Delweddau cynrychioliadol o staen Cyto ID mewn celloedd HT-22 wedi'u trin am 24 awr gyda rheolydd cludiol (veh), 0.5 $\mu$ M Baf, neu 1 $\mu$ M Baf, yn absenoldeb (rhes uchaf) neu bresenoldeb (rhes isaf) 1 $\mu$ M rapamycin (Rap). Delweddwyd celloedd gyda microsgop cydffocal LSM710 (Zeiss), gyda barrau graddfa yn cynrychioli 20 $\mu$ m.

**B).** Yn absenoldeb triniaeth Rap, roedd gan gelloedd HT-22 a gafodd eu trin â 1 $\mu$ M Baf nifer arwyddocaol uwch o pwncta Cyto ID/cell o gymharu â'r rhai a gafodd eu trin â 0.5 $\mu$ M Baf ( $P = 0.04$ ). Yn yr un modd, cynyddodd y nifer o pwncta yn arwyddocaol ar ôl triniaeth gyda Rap ar gyfer y dau dos ( $P = < 0.001$ ). Fodd bynnag, ni welwyd unrhyw wahaniaeth arwyddocaol rhwng y dosau 0.5 $\mu$ M ac 1 $\mu$ M o Baf pan gafodd celloedd eu cyd-drin â Rap ( $P = > 0.99$ ).

Cyflwynir y data fel cymedr  $\pm$  cyfyngau hyder 95% o'r cymedr, gyda plot gwasgariad o'r gwerthoedd ar gyfer pob cell. Cafodd pwncta eu meintoli (gan ddefnyddio meddalwedd CellProfiler) mewn o leiaf 100 o gelloedd, wedi'u cymryd o gyfanswm o 8 maes gweld, fesul triniaeth. Gwnaethpwyd cymariaethau ystadegol gan ddefnyddio ANOVA Dwyffordd, ac yna prawf cymariaethau lluosog Tukey.

### **3.3.4. Data Cyto ID o effeithiau triniaethau echelin ghrelin yng nghelloedd SN4741 o dan amodau maeth cyflawn**

Ar ôl optimeiddio amodau'r prawf Cyto ID, aseswyd effaith triniaethau echelin ghrelin (AG, UAG & L692) ar groniad pwncta Cyto ID mewn celloedd SN4741 o dan amodau maeth cyflawn.

Fel dengys ffigur 3.13A, gwelwyd niferoedd isel iawn o pwncta Cyto ID mewn celloedd SN4741 yn absenoldeb Baf. Roedd hyn yn wir ar gyfer pob triniaeth arbrofol, gan gynnwys rheolyddion positif, ar draws tri dyblygiad arbrofol annibynnol (ffigur 3.13B). Yn ddisgwyliedig, ni welwyd unrhyw effeithiau arwyddocaol o dan yr amodau hyn (ffigur 3.13B).

Mewn cyferbyniad â'r celloedd heb driniaeth Baf, cynhyrchodd AG ( $P = 0.02$ ), UAG ( $P = 0.02$ ) a L692 ( $P = 0.03$ ) ostyngiadau arwyddocaol yn y nifer cymedrig o pwncta Cyto ID mewn celloedd sydd wedi'u trin â Baf (ffigur 3.13B). Ymhellach, roedd cyfrifon pwncta canolrif, a chwartelau, triniaethau echelin ghrelin hefyd yn is na rhai Veh (Atodiad A), tra oedd rhai ar gyfer Rap yn uwch o'i gymharu a Veh (Atodiad A).

Awgrymwyd y data hwn felly, nad yw triniaethau echelin ghrelin yn ysgogi awtoffagi mewn celloedd SN4741 maeth cyflawn o dan yr amodau arbrofol a archwiliwyd, ond yn hytrach yn is-reoleiddio awtoffagi yn lle.





**Ffigur 3.13. Ymateb prawf Cyto ID i driniaethau echel ghrelin mewn celloedd SN4741 maeth cyflawn.**

**A).** *Delweddau cynrychioliadol o staenio Cyto ID.* Cafodd celloedd eu trin ymlaen llaw am 1 awr gydag asyl-ghrelin (AG), ghrelin sydd heb ei asyleiddio (UAG), L692585 (L692), rheolydd cludiol (Veh) neu reolyddion positif (gweler atodiad A), cyn triniaeth am 24 awr bellach yn absenoldeb (rhes uchaf) neu bresenoldeb (rhes isaf) 1 $\mu$ M bafilomycin A1 (Baf). Roedd crynodiadau cyn-driniaeth o AG, UAG a L692 yn 2 $\mu$ M yr un, tra bod y crynodiadau yn ystod y cwrs triniaeth 24 awr yn 1 $\mu$ M yr un. Delweddwyd gydag gwrthrychiadur dan olew 63x 1.4 NA o ficrosgop cydffocal LSM710 (Zeiss). Mae barrau graddfa yn cynrychioli 20 $\mu$ m.

**B-C).** *Meintioli a chymariaethau ystadegol o werthoedd cymedrig pwncta Cyto ID/cell.* Yn absenoldeb Baf (**B**), ni wnaeth AG (P = 0.58), UAG (P = 0.18) neu L692 (P = 0.15) newid yn arwyddocaol cronïad pwncta Cyto ID o'i gymharu â Veh. Ym mhresenoldeb Baf (**C**), Arweiniodd triniaethau AG (P = 0.02), UAG (P = 0.02) a L692 (P = 0.03) at ostyngiad arwyddocaol yn y nifer cymedrig o pwncta/cell o'i gymharu â Veh. Data wedi'i gyflwyno fel cymedr  $\pm$  SD o dri dyblygiad arbrofol annibynnol, gyda dosraniadau cellog cyfun yr holl ddyblygiadau wedi'u harddangos oddi tano fel plot gwasgariad.

Gwnaethpwyd cymariaethau ystadegol gan ddefnyddio ANOVA Unffordd, ac yna prawf cymariaethau lluosog Dunnett, yn Graphpad Prism 9.

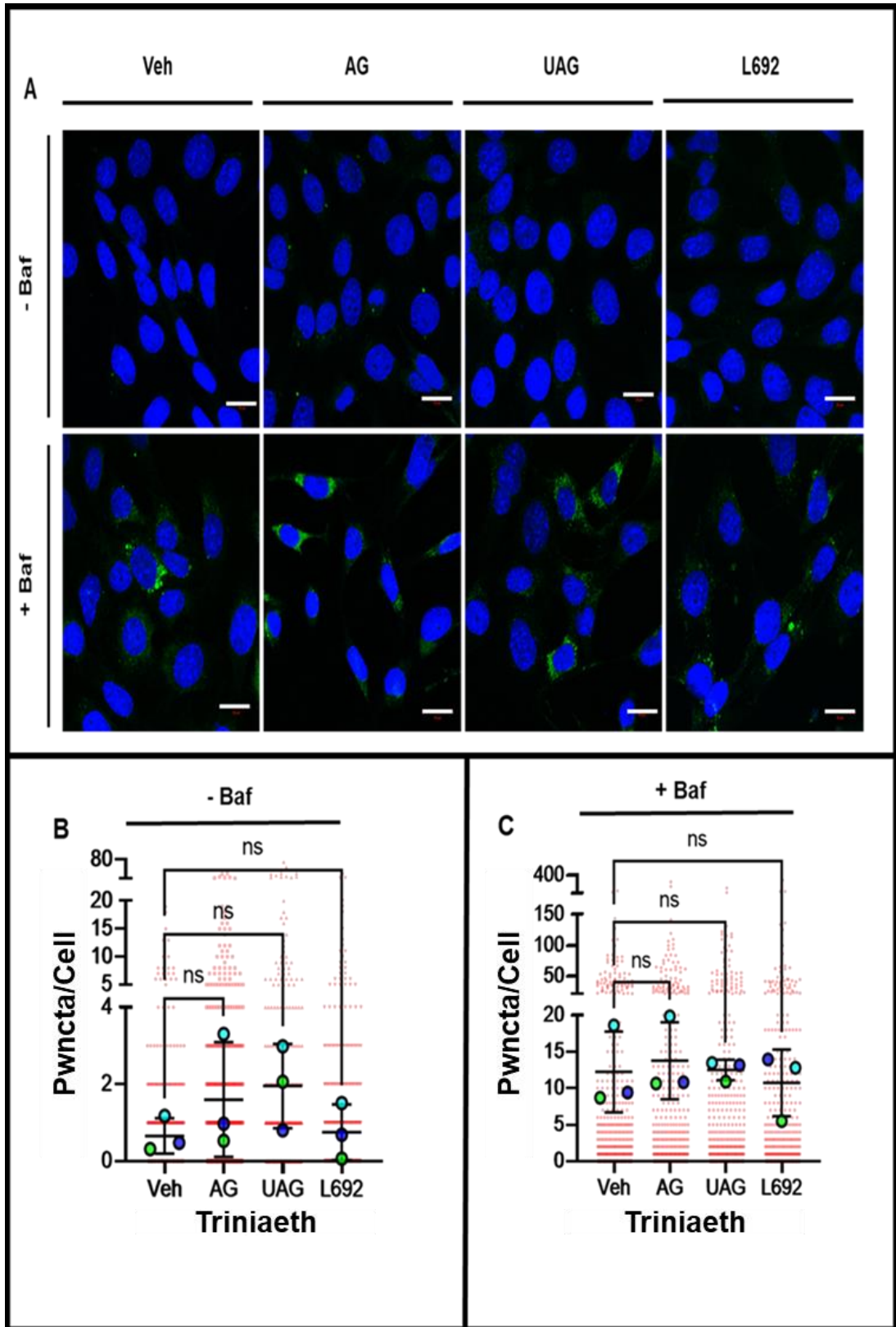
### **3.3.5. Data Cyto ID o effeithiau triniaethau echelin ghrelin yng nghelloedd SN4741 o dan amodau maeth cyfyngedig ysgafn**

Yn ogystal â nodweddu effaith echelin ghrelin ar awtoffagi o dan amodau maeth cyflawn, perfformiwyd nodweddiadau Cyto ID hefyd o dan amodau maeth cyfyngedig. Ar gyfer y nodweddiadau hyn, tyfwyd y celloedd yn arferol mewn cyfrwng meithrin cyflawn, cyn iddynt cael eu drin mewn cyfrwng meithrin sydd wedi'i gwanhau gan 40%, fel y manylir yn adran 3.2.

Yn debyg i'r celloedd maeth cyflawn, ychydig iawn o pwncta Cyto ID oedd yn amlwg pan gafodd celloedd SN4741 â chyfyngiad maethol eu profi yn absenoldeb Baf (ffigur 3.14A, B). Yn yr un modd, nid oedd unrhyw effeithiau arwyddocaol ar croniad pwncta Cyto ID o dan yr amodau hyn (ffigur 3.14B).

Fel disgwylir, arweiniodd triniaeth 24 awr Baf at groniad nodedig o pwncta Cyto ID; gan galluogi cymariaethau ystyrlon rhwng y triniaethau arbrofol ar rheolydd. Yn ddiddorol, er y canfuwyd bod AG, UAG a L692 yn atal croniad pwncta Cyto ID mewn celloedd maeth cyflawn sydd wedi'u trin a Baf, nid oedd unrhyw wahaniaethau arwyddocaol rhwng AG ( $P = 0.95$ ), UAG ( $P = >0.99$ ), L692 ( $P = 0.96$ ) a Veh, pan trinnir celloedd o dan amodau maeth cyfyngedig.

Awgrymwyd y data hyn felly fod triniaethau echelin ghrelin ddim yn ysgogi, neu atal, awtoffagi yng nghelloedd SN4741, pan maint yn cael eu trin o dan amodau maeth cyfyngedig weddol ysgafn.



**Ffigur 3.14. Ymateb prawf Cyto ID i driniaethau echel ghrelin mewn celloedd SN4741 maeth cyfyngedig.**

**A).** *Delweddau cynrychioliadol o staenio Cyto ID.* Cafodd celloedd eu trin ymlaen llaw am 1 awr gydag asyl-ghrelin (AG), ghrelin sydd heb ei asyleiddio (UAG), L692585 (L692), rheolydd cludiol (Veh) neu reolyddion positif (gweler atodiad B), cyn triniaeth am 24 awr bellach yn absenoldeb (rhes uchaf) neu bresenoldeb (rhes isaf) 1 $\mu$ M bafilomycin A1 (Baf). Roedd crynodiadau cyn-driniaeth o AG, UAG a L692 yn 2 $\mu$ M yr un, tra bod y crynodiadau yn ystod y cwrs triniaeth 24 awr yn 1 $\mu$ M yr un. Cyflawnwyd cyfyngiad maeth trwy darparu'r triniaethau mewn cyfrwng meithrin sydd wedi'u gwanhau 40% mewn cymhariaeth i'r cyfrwng llawn. Delweddwyd gydag gwrthrychiadur dan olew 63x 1.4 NA o ficrosgop cydffocal LSM710 (Zeiss). Mae barrau graddfa yn cynrychioli 20 $\mu$ m.

**B-C).** *Meintioli a chymariaethau ystadegol o werthoedd cymedrig pwncta Cyto ID/cell.*

Yn absenoldeb Baf (**B**), ni wnaeth AG ( $P = 0.56$ ), UAG ( $P = 0.34$ ) neu L692 ( $P = >0.99$ ) newid yn arwyddocaol cronid pwncta Cyto ID o'i gymharu â Veh. Ni achoswyd AG ( $P = 0.95$ ), UAG ( $P = >0.99$ ) a L692 ( $P = 0.96$ ) newid arwyddocaol yn nifer o pwncta Cyto ID/cell ym mhresenoldeb Baf (**C**).

Data wedi'i gyflwyno fel cymedr  $\pm$  SD o dri dyblygiad arbrolol annibynnol, gyda dosraniadau cellog cyfun yr holl ddyblygiadau wedi'u harddangos oddi tano fel plot gwasgariad. Gwnaethpwyd cymariaethau ystadegol gan ddefnyddio ANOVA Unffordd, ac yna prawf cymariaethau lluosog Dunnett, yn Graphpad Prism 9.

### 3.3.6. Data Cyto ID o effeithiau triniaethau echelin ghrelin yng nghelloedd HT-22 o dan amodau maeth cyflawn

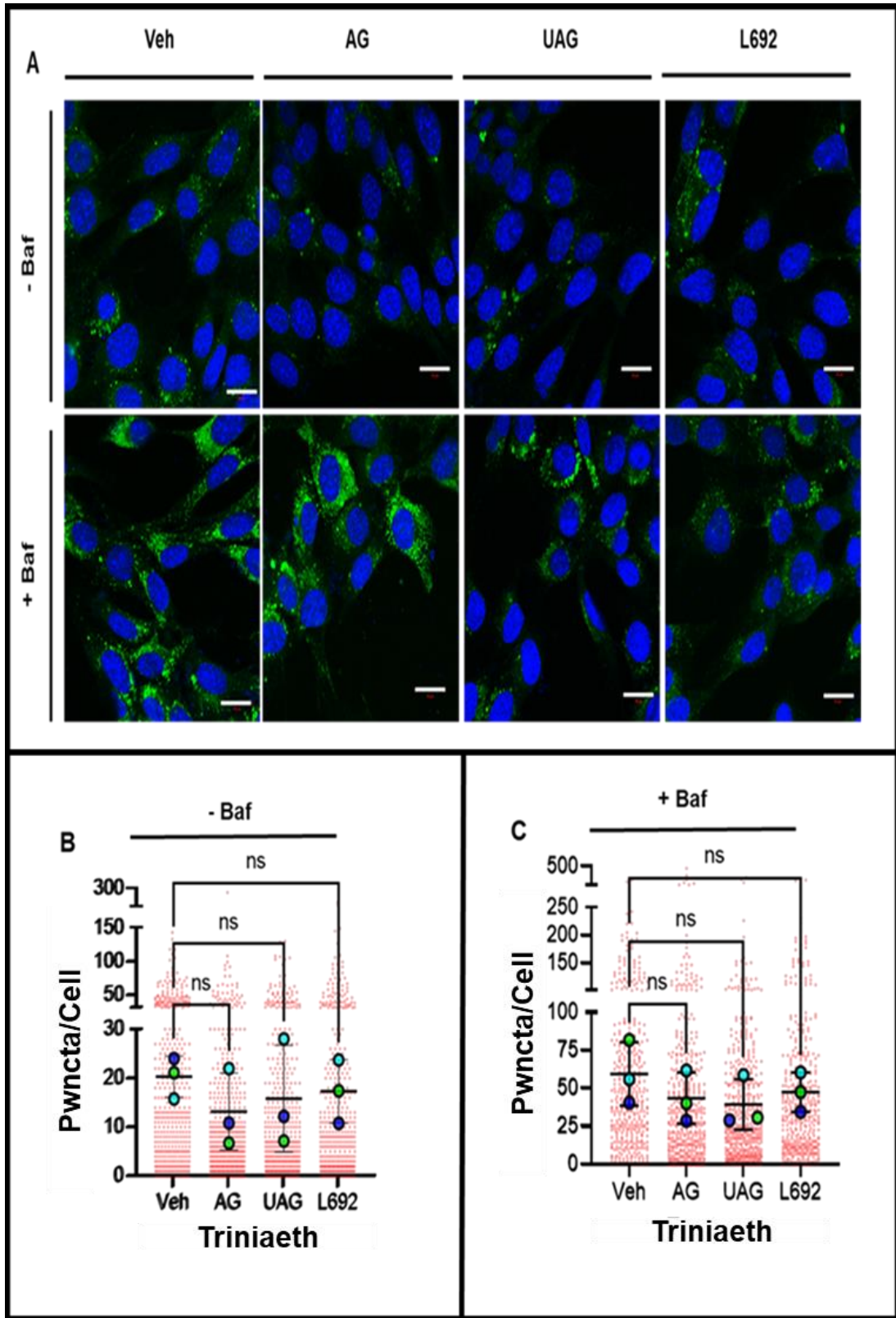
Ar ôl cwblhau nodweddiadau Cyto ID celloedd SN4741, cynhaliwyd arbrofion i asesu effaith echelin ghrelin ar ymateb Cyto ID gelloedd HT-22.

Yn gyson ag arbrofion optimeiddiaeth blaenorol, roedd cronfeydd nodedig o pwncta Cyto ID puncta yn amlwg mewn celloedd HT-22 maeth cyflawn, yn absenoldeb Baf (ffigur 3.15A-rhes uchaf). O'i gymharu â Veh, rhoddodd triniaethau echelin ghrelin ostyngiadau yn y nifer o pwncta/cell ar gyfartaledd (ffig 3.15B). Fodd bynnag, nid oedd effeithiau AG ( $P = 0.57$ ), UAG ( $P = 0.82$ ) neu L692 ( $P = 0.93$ ) yn ystadegol arwyddocaol (ffigur 3.15B).

Yn debyg i'r celloedd heb Baf, arweiniodd triniaethau AG, UAG a L692 at ostyngiadau yn werthoedd pwncta/cell gymedrig (ffigur 3.15C) mewn celloedd wedi'u trin â Baf hefyd. Eto fodd bynnag, ni ystyriwyd y gwahaniaethau cymedrig rhwng triniaethau echelin ghrelin a Veh yn ystadegol arwyddocaol (AG:  $P = 0.56$ ; UAG:  $P = 0.39$ ; L692:  $P = 0.73$ ).

Dylid nodi, ni welwyd effeithiau ysgogol amlwg gyda Rap mewn celloedd HT-22 maeth cyflawn ym mhresenoldeb Baf (Atodiad A); sy'n awgrymu nad oedd yr amodau arbrofol yn ddigonol ar gyfer anwythiad awtoffagi.

I grynhoi, nid yw'r data hwn yn cefnogi'r rhagdybiaeth bod echelin ghrelin yn ysgogi (neu'n atal) awtoffagi mewn celloedd HT-22 o dan amodau maeth cyflawn.



**Ffigur 3.15. Ymateb prawf Cyto ID i driniaethau echel ghrelin mewn celloedd HT-22 maeth cyflawn.**

**A)** *Delweddau cynrychioliadol o staenio Cyto ID.* Cafodd celloedd eu trin ymlaen llaw am 1 awr gydag asyl-ghrelin (AG), ghrelin sydd heb ei asyleiddio (UAG), L692585 (L692), rheolydd cludiol (Veh) neu reolyddion positif (gweler atodiad A), cyn triniaeth am 24 awr bellach yn absenoldeb (rhes uchaf) neu bresenoldeb (rhes isaf) 0.5 $\mu$ M bafilomycin A1 (Baf). Roedd crynodiadau cyn-driniaeth o AG, UAG a L692 yn 2 $\mu$ M yr un, tra bod y crynodiadau yn ystod y cwrs triniaeth 24 awr yn 1 $\mu$ M yr un. Delweddwyd gydag gwrthrychiadur dan olew 63x 1.4 NA o ficrosgop cydffocal LSM710 (Zeiss). Mae barrau graddfa yn cynrychioli 20 $\mu$ m.

**B-C)** *Meintioli a chymariaethau ystadegol o werthoedd cymedrig pwncta Cyto ID/cell.* Ni wnaeth triniaethau echel ghrelin effeithio'n arwyddocaol ar y nifer o pwncta/cell yn absenoldeb (AG: P = 0.57; UAG: P = 0.82; L692: P = 0.93) neu bresenoldeb (AG: P = 0.56; UAG: P = 0.39; L692: P = 0.73) Baf. Data wedi'i gyflwyno fel cymedr  $\pm$  SD o dri dyblygiad arbrolol annibynnol, gyda dosraniadau cellog cyfun yr holl ddyblygiadau wedi'u harddangos oddi tano fel plot gwasgariad. Gwnaethpwyd cymariaethau ystadegol gan ddefnyddio ANOVA Unffordd, ac yna prawf cymariaethau lluosog Dunnett, yn Graphpad Prism 9.

### 3.3.7. Data Cyto ID o effeithiau triniaethau echelin ghrelin yng nghelloedd HT-22 o dan amodau maeth cyfyngedig ysgafn

Yn absenoldeb Baf, nid oedd unrhyw wahaniaethau amlwg rhwng triniaethau echelin ghrelin a Veh pan gafodd celloedd HT-22 eu trin o dan amodau maeth cyfyngedig.

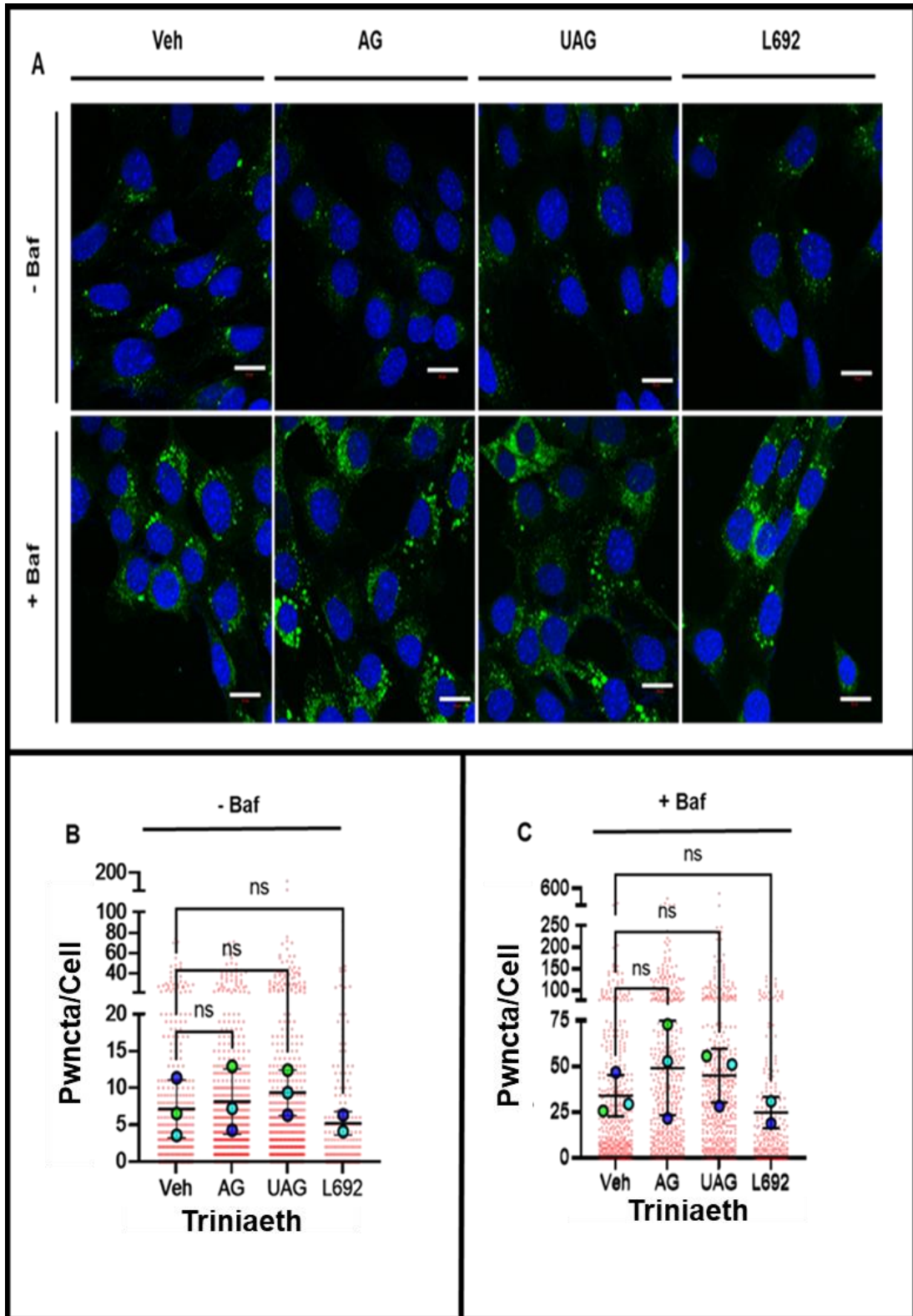
Yn wir, dengys cymhariaeth ystadegol fod effeithiau AG ( $P = 0.98$ ), UAG ( $P = 0.81$ ) a L692 ( $P = 0.88$ ) i gyd yn anarwyddocaol (ffig 3.16B).

Ym mhresenoldeb Baf, cynyddodd AG ac UAG y gwerthoedd pwncta/cell cymedrig (ffigur 3.16C), canolrif a chwartel (Atodiad A). Fodd bynnag, fel dengys ffigur 3.16C, ni chafodd yr effeithiau hyn eu hatgynhyrchu ar draws pob un o'r tri dyblygiad arbrofol ac fe hystyriwyd felly yn anarwyddocaol (AG:  $P = 0.61$ ; UAG:  $P = 0.79$ ). Yn wahanol i AG ac UAG, cynhyrnodd triniaeth L692 ostyngiad bychan yn nifer cymedrig o pwncta Cyto ID. Fodd bynnag, roedd y data hwn yn deillio o ddau ddyblygiad annibynnol yn unig ac nad oeddent yn ystadegol arwyddocaol ( $P = 0.89$ ) (ffigur 3.16C).

Yn wahanol i'r canlyniadau gyda chelloedd maeth cyflawn, gwelwyd ysgogiad amlwg o awtoffagi gyda thriniaeth Rap yng nghelloedd HT-22 sydd wedi'u trin gydag Baf, o dan amodau maeth cyfyngedig (Atodiad B). Hefyd, rhoddodd Resv canlyniadau tebyg i rai AG a UAG, gyda chynnydd yn y nifer o pwncta/cell yn dau allan o'r tri dyblygiad annibynnol (Atodiad B).

Awgrymir yr arsylwadau uchod bod celloedd HT-22 yn fwy sensitif i anwythiad ffarmacolegol awtoffagi o dan amodau maeth cyfyngedig. Fodd bynnag, ni darperir yr arbrofion hyn tystiolaeth ystadegol gadarn sy'n cefnogi rôl pro-awtoffagig ar gyfer echelin ghrelin yng nghelloedd HT-22.





**Ffigur 3.16. Ymateb prawf Cyto ID i driniaethau echel ghrelin mewn celloedd HT-22 maeth cyfyngedig.**

**A).** *Delweddau cynrychioliadol o staenio Cyto ID.* Cafodd celloedd eu trin ymlaen llaw am 1 awr gydag asyl-ghrelin (AG), ghrelin sydd heb ei asyleiddio (UAG), L692585 (L692), rheolydd cludiol (Veh) neu reolyddion positif (gweler atodiad A), cyn triniaeth am 24 awr bellach yn absenoldeb (rhes uchaf) neu bresenoldeb (rhes isaf) 0.5 $\mu$ M bafilomycin A1 (Baf). Roedd crynodiadau cyn-driniaeth o AG, UAG a L692 yn 2 $\mu$ M yr un, tra bod y crynodiadau yn ystod y cwrs triniaeth 24 awr yn 1 $\mu$ M yr un. Cyflawnwyd cyfyngiad maeth trwy ddarparu'r triniaethau mewn cyfrwng meithrin sydd wedi'u gwanhau 40% mewn cymhariaeth i'r cyfrwng llawn. Delweddwyd gydag gwrthrychiadur dan olew 63x 1.4 NA o ficrosgop cydffocal LSM710 (Zeiss). Mae barrau graddfa yn cynrychioli 20 $\mu$ m.

**B-C).** *Meintioli a chymariaethau ystadegol o werthoedd cymedrig pwncta Cyto ID/cell.* Ni wnaeth triniaethau echel ghrelin effeithio'n arwyddocaol ar y nifer o pwncta/cell yn absenoldeb (AG: P = 0.98; UAG: P = 0.80; L692: P = 0.88) neu bresenoldeb (AG: P = 0.61; UAG: P = 0.79; L692: P = 0.89) Baf. Data wedi'i gyflwyno fel cymedr  $\pm$  SD o dri dyblygiad arbrofol annibynnol, gyda dosraniadau cellog cyfun yr holl ddyblygiadau wedi'u harddangos oddi tano fel plot gwasgariad. Gwnaethpwyd cymariaethau ystadegol gan ddefnyddio ANOVA Unffordd, ac yna prawf cymariaethau lluosog Dunnett, yn Graphpad Prism 9.

### 3.3.8. Data Cyto ID o effaith gwrthweithiant GHS-R1a mewn celloedd SN4741 maeth cyflawn

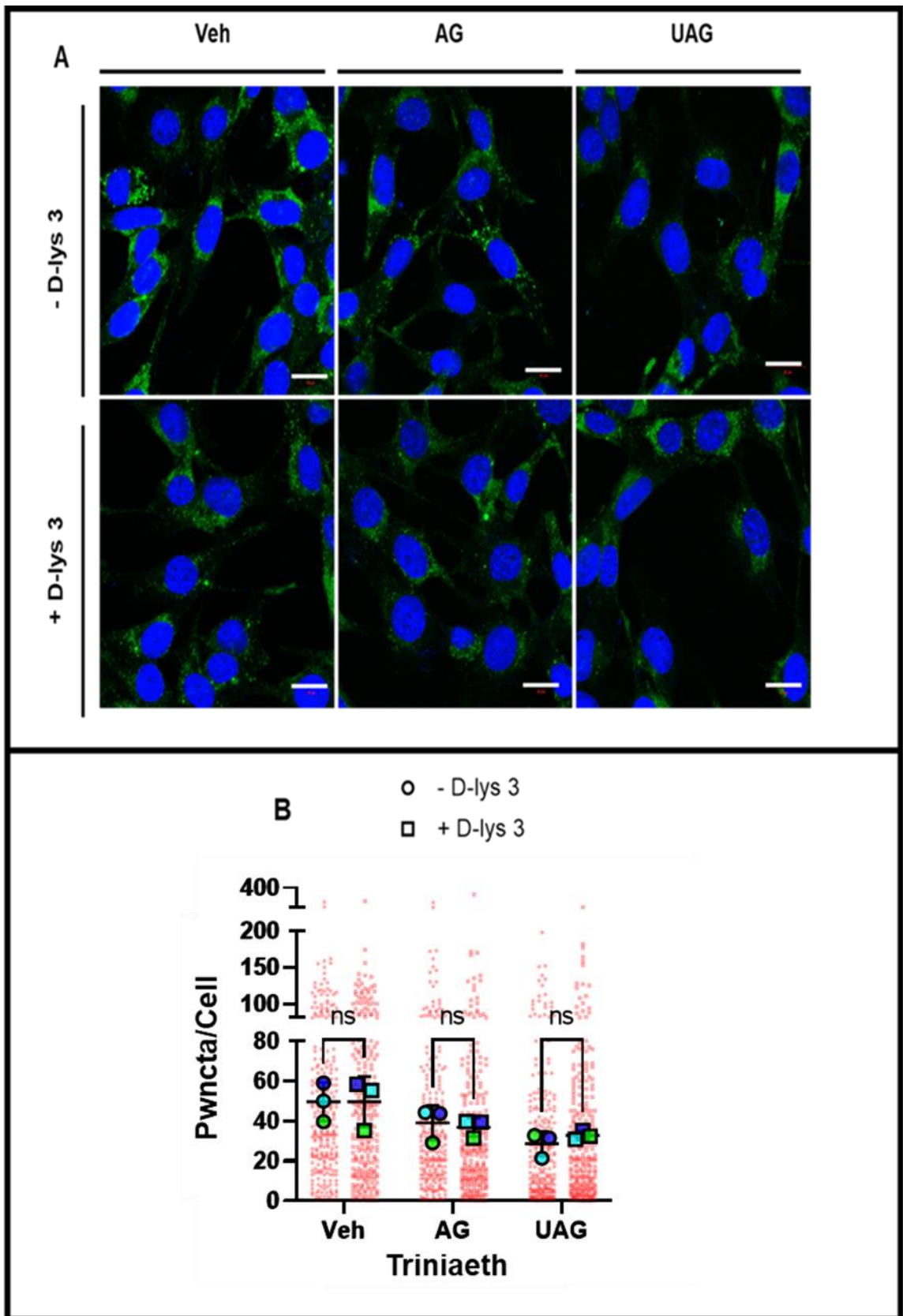
Gan roddwyd arbrofion gyda chelloedd SN4741 canlyniadau mwy addawol a chyson na'r rhai gyda chelloedd HT-22, dewiswyd y celloedd SN4741 fel y model mwyaf addas ar gyfer nodweddiadau microsgopeg fflworoleuedd pellach o awtoffagi. Ymhellach, gan wnaeth AG a UAG ennyn ymatebion Cyto ID tebyg iawn yn yr arbrofion blaenorol, astudiaeth ddilynol resymegol oedd asesu a yw'r ymatebion hyn yn cael eu cyfryngu drwy'r derbynnnydd ghrelin GHS-R1a

I'r perwyl hwnnw, cafodd celloedd SN4741 eu trin ymlaen llaw gyda'r gwrthweithydd GHS-R1a D-lys 3 (neu Veh) am 30 munud, cyn triniaeth 24 awr gydag AG, UAG neu Veh. O ystyried y methiant i ganfod lefelau ystyrion o pwncta awtoffagig mewn celloedd SN4741 heb driniaeth Baf, cyflawnwyd yr arbrofion hyn mewn celloedd sydd wedi'u trin â Baf yn unig. Roedd Rap hefyd wedi'i gynnwys fel rheolydd positif i asesu ymatebion priodol y prawf Cyto ID (Atodiad A).

O'i gymharu â'r arbrofion blaenorol, roedd lefelau pwncta a welwyd ar draws yr holl driniaethau mewn celloedd SN4741 maeth cyflawn yn uwch yn yr arbrofion D-lys 3 (Ffigur 3.17A, B). Er gwaethaf hyn, wnaeth AG ac UAG leihau'n gyson nifer y pwncta/cell ar draws y tri dyblygiad arbrofol, gydag ANOVA Dwyffordd yn cadarnhau prif effaith hynod arwyddocaol ar gyfer triniaethau ghrelin ( $P = 0.005$ ).

Fodd bynnag, fel dengys ffigur 3.17B, ni wnaeth cyn-driniaeth gyda D-lys 3 effeithio ar groniad pwncta Cyto ID ar gyfer unrhyw un o'r amodau triniaeth (Prif effaith:  $P = 0.87$ ; Veh:  $P = 0.99$ ; AG:  $P = 0.98$ ; UAG:  $P = 0.89$ ).

Mae'r data hwn felly'n awgrymu nad yw effeithiau AG ac UAG alldarddol ar awtoffagi mewn celloedd SN4741 yn cael eu cyfryngu gan signalu trwy'r derbynnnydd ghrelin.



**Ffigur 3.17. Ymateb prawf Cyto ID i driniaethau echelin ghrelin mewn celloedd SN4741 maeth cyflawn, sydd wedi'u cyn-drin gyda gwrthweithydd GHS-R1a (D-lys 3)**

**A).** *Delweddau cynrychioliadol o staenio Cyto ID.* Cafodd celloedd eu cyn-drin am 30 munud gyda naill ai D-lys 3 (+ D-lys 3) neu rheolydd cludiol (Veh) (- D-lys 3), cyn triniaeth am 1 awr gydag asyl-ghrelin (AG), ghrelin sydd heb ei asyleiddio (UAG), neu Veh (ddH<sub>2</sub>O). Wedi hynny, ychwanegwyd 1µl o baffilomycin A1 (Baf) i bob ffynnon, a ceith y celloedd ei drin am 24 awr pellach cyn i'r prawf Cyto ID cael ei perfformio. Crynodiadau terfynol pob triniaeth oedd 1µM, gyda crynodiad D-lys 3 o 2µM yn ystod y cyn-driniaeth 30 munud. Delweddwyd gydag gwrthrychiadur dan olew 63x 1.4 NA o ficrosgop cydffocal LSM710 (Zeiss). Mae barrau graddfa yn cynrychioli 20µm.

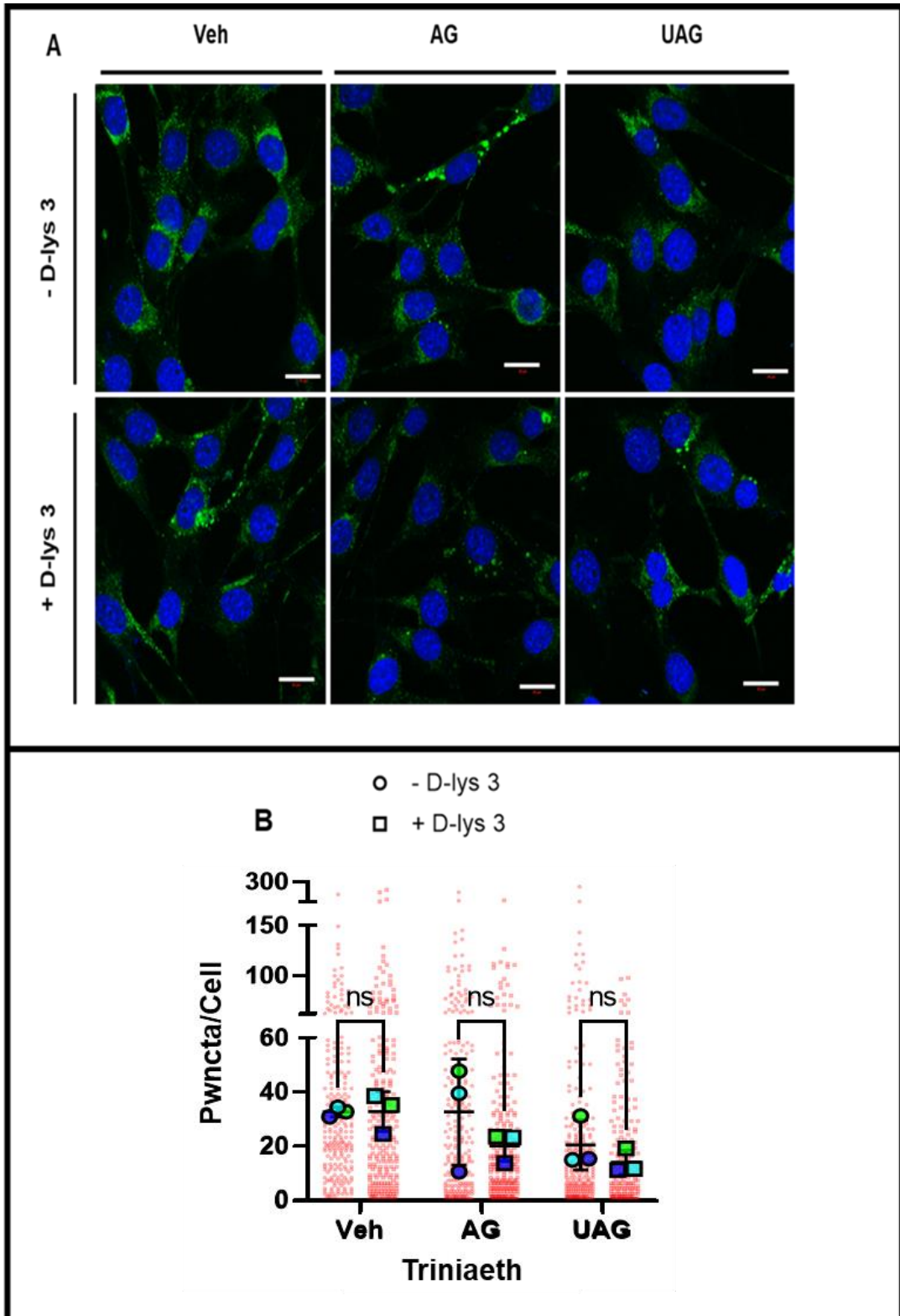
**B).** *Meintioli a chymariaethau ystadegol o werthoedd cymedrig pwncta Cyto ID/cell.* Ni wnaeth cyn-driniaeth gyda D-lys 3 (Prif effaith: P = 0.87) effeithio'n arwyddocaol ar cronid pwncta Cyto ID, yng nghelloedd wedi'u trin gyda Veh (P = >0.99), AG (P = 0.98) neu UAG (P = 0.89). Data wedi'i gyflwyno fel cymedr ± SD o dri dyblygiad arbrofol annibynnol, gyda dosraniadau cellog cyfun yr holl ddyblygiadau wedi'u harddangos oddi tano fel plot gwasgariad. Gwnaethpwyd cymariaethau ystadegol (mewn Graphpad Prism 9) gan ddefnyddio ANOVA Dwyffordd, ac wedyn prawf cymariaethau lluosog Sidak i asesu gwahaniaethau rhwng celloedd sydd wedi'u trin a D-lys 3 a rhai sydd heb.

### 3.3.9. Data Cyto ID o effaith gwrthweithiant GHS-R1a mewn celloedd SN4741 maeth cyfyngedig ysgafn

Mewn cyferbyniad â'r celloedd maeth cyflawn, roedd sawl arsylwad diddorol yn amlwg gyda data D-lys 3 ar gyfer celloedd SN4741 â chyfyngiad maeth. Yn gyntaf, roedd ymatebion cymedrig AG ac UAG mewn celloedd heb cyn-driniaeth D-lys 3 yn dra gwahanol; gyda gwerth cymedrig AG yn debyg i un Veh, a gwerth UAG yn sylweddol is (ffigur 3.18). Mae'r arsylwad hwn yn cyferbynnu â'r canfyddiadau blaenorol mewn celloedd â chyfyngiad maeth, lle nad oedd gwahaniaeth sylweddol rhwng UAG a Veh. Yn ail, gostyngodd y cyfrif pwncta cymedrig AG i werth tebyg i un UAG, pan geith celloedd eu cyn-drin gyda D-lys 3. Awgrymwyd yr arsylwadau uchod fod AG ond nid UAG yn signalu trwy GHS-R1a o dan yr amodau arbrefol dan sylw.

Fodd bynnag, yn yr un modd â chelloedd maeth cyflawn, ni ystyriwyd effeithiau cyn-driniaeth D-lys 3 yn ystadegol arwyddocaol (Prif effaith:  $P = 0.19$ ; Veh:  $P \Rightarrow 0.99$ ; AG:  $P = 0.37$ ; UAG:  $P = 0.82$ ) mewn celloedd SN4741 maeth cyfyngedig.

Felly, er gwaethaf arsylwadau diddorol, ni ddarperir yr arbrefion hyn tystiolaeth ystadegol bod signalu trwy GHS-R1a yn rheoleiddio awtoffagi yng nghelloedd SN4741 o dan amodau maeth cyfyngedig.



**Ffigur 3.18. Ymateb prawf Cyto ID i driniaethau echelin ghrelin mewn celloedd SN4741 maeth cyfyngedig, sydd wedi'u cyn-drin gyda gwrthweithydd GHS-R1a (D-lys 3)**

**A)** *Delweddau cynrychioliadol o staenio Cyto ID.* Cafodd celloedd eu cyn-drin am 30 munud gyda naill ai D-lys 3 (+ D-lys 3) neu rheolydd cludiol (Veh) (- D-lys 3), cyn triniaeth am 1 awr gydag asyl-ghrelin (AG), ghrelin sydd heb ei asyleiddio (UAG), neu Veh (ddH<sub>2</sub>O). Wedi hynny, ychwanegwyd 1µl o baffilomycin A1 (Baf) i bob ffynnon, a ceith y celloedd ei drin am 24 awr pellach cyn i'r prawf Cyto ID cael ei perfformio. Crynodiadau terfynol pob triniaeth oedd 1µM, gyda crynodiad D-lys 3 o 2µM yn ystod y cyn-driniaeth 30 munud. Cyflawnwyd cyfyngiad maeth trwy ddarparu'r triniaethau mewn cyfrwng meithrin sydd wedi'u gwanhau 40% mewn cymhariaeth i'r cyfrwng llawn. Delweddwyd gydag gwrthrychiadur dan olew 63x 1.4 NA o ficrosgop cydffocal LSM710 (Zeiss). Mae barrau graddfa yn cynrychioli 20µm.

**B)** *Meintioli a chymariaethau ystadegol o werthoedd cymedrig pwncta Cyto ID/cell.* Ni wnaeth cyn-driniaeth gyda D-lys 3 (Prif effaith: P = 0.19) effeithio'n arwyddocaol ar cronid pwncta Cyto ID, yng nghelloedd wedi'u trin gyda Veh (P = >0.99), AG (P = 0.37) neu UAG (P = 0.82). Data wedi'i gyflwyno fel cymedr ± SD o dri dyblygiad arbrofol annibynnol, gyda dosraniadau cellog cyfun yr holl ddyblygiadau wedi'u harddangos oddi tano fel plot gwasgariad. Gwnaethpwyd cymariaethau ystadegol (mewn Graphpad Prism 9) gan ddefnyddio ANOVA Dwyffordd, ac wedyn prawf cymariaethau lluosog Sidak i asesu gwahaniaethau rhwng celloedd sydd wedi'u trin a D-lys 3 a rhai sydd heb.

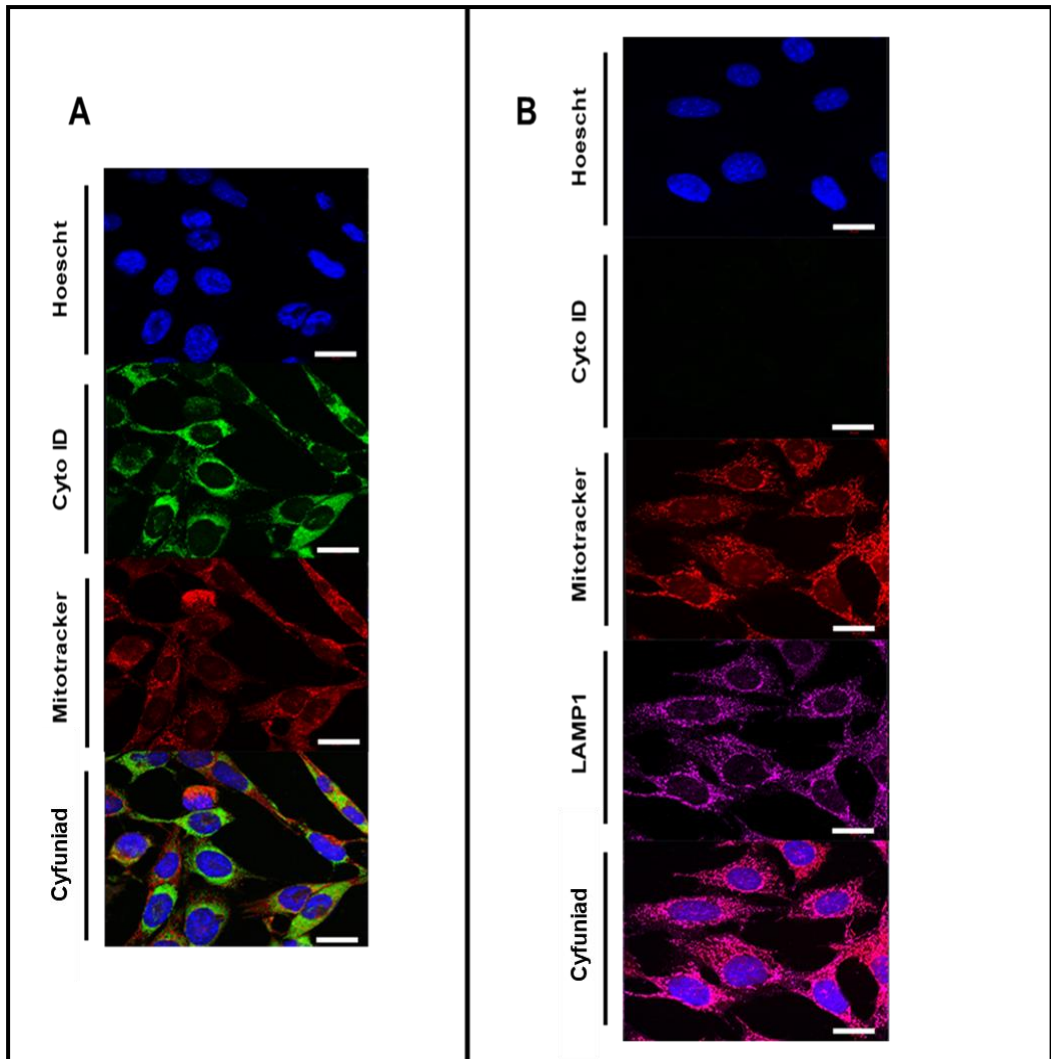


### **3.3.10. Optimeiddiaeth profion microsgopeg fflwroleuedd ar gyfer gwerthuso cyd-lleoleiddiad awtoffagosomau a mitochondria**

Ar ôl nodweddu effeithiau triniaethau echelin ghrelin-GHS-R ar awtoffagi gyda'r prawf Cyto ID, defnyddiwyd microsgopeg fflwroleuedd wedi hynny i asesu effeithiau AG, UAG a L692 ar cyd-lleoleiddiad awtoffagosomau a mitochondria; arwydd posib o mitoffagi.

I ddechrau, bwriadais defnyddio dull ICC dwbl gyda gwrthgyrff gwrth-LC3 a gwrth-TOM20 i labelu awtoffagosomau a mitochondria yn y drefn honno. Fodd bynnag, er gweithiodd yr gwrthgorff LC3 fel y disgwylir, ni chanfuwyd imiwnoadweithedd penodol ar gyfer mitochondria gyda'r gwrthgorff TOM20. Felly, defnyddiwyd dull Cyto ID a Mitotracker, ble mae'r llyfn Mitotracker Orange ei hychwanegu i'r cyfrwng meithrin gyda'r adweithydd canfod Cyto ID, yn lle.

Dengys arborfion optimeiddiaeth fod hwn yn ddull dilys, gan arsylwir pwncta fflworoleuol Cyto ID a puncta fflwroleuol Mitotracker ar ôl triniaeth gyda Baf (ffigur 3.19A). Yn ogystal, ceisiwyd labelu'r celloedd gyda gwrthgorff gwrth LAMP-1, er mwyn asesu lysosomau yn ac awtoffagosomau a mitochondria. Fodd bynnag, er rhoddwyd LAMP1 a Mitotracker ymatebion fflwroleuol cryf, collwyd fflwroleuedd Cyto ID trwy ychwanegu LAMP1 i'r protocol (Ffigur 3.18B). Felly, defnyddiwyd y dull mitotracker Cyto-ID ar gyfer arborfion dilynol gyda thriniaethau echelin ghrelin-GHS-R.



**Ffigur 3.19. Optimeiddiaeth profion microsgopeg fflworoleuedd i ganfod cyd-llaeleiddiad awtoffagosomau, mitochondria a lysosomau.**

**A).** *Delwedd cynrychioladol o staenio Cyto ID a mitoracker.* Ceith celloedd SN4741 eu trin am 24awr gyda  $1\mu\text{M}$  Baf, cyn iddynt eu magu am 1 awr mewn cyfrwng meithrin sy'n cynnwys adweithyddion Cyto ID a mitotracker. Ar ôl sefydlogi, delwedddwyd y celloedd gan defnyddio microsgop cydffocal LSM710, gyda gwrthrychiadur dan olew  $63\times$  N.A 1.4.

**B).** *Delwedd cynrychioladol o staenio Cyto ID, mitotracker a LAMP1.* Ceith celloedd SN4741 eu trin a phrosesi fel y disgrifir yn A, ond ar ôl sefydlogi perfformiwyd imiwnocytocemeg (ICC) gyda gwrthgorff yn erbyn LAMP1 (1:500).

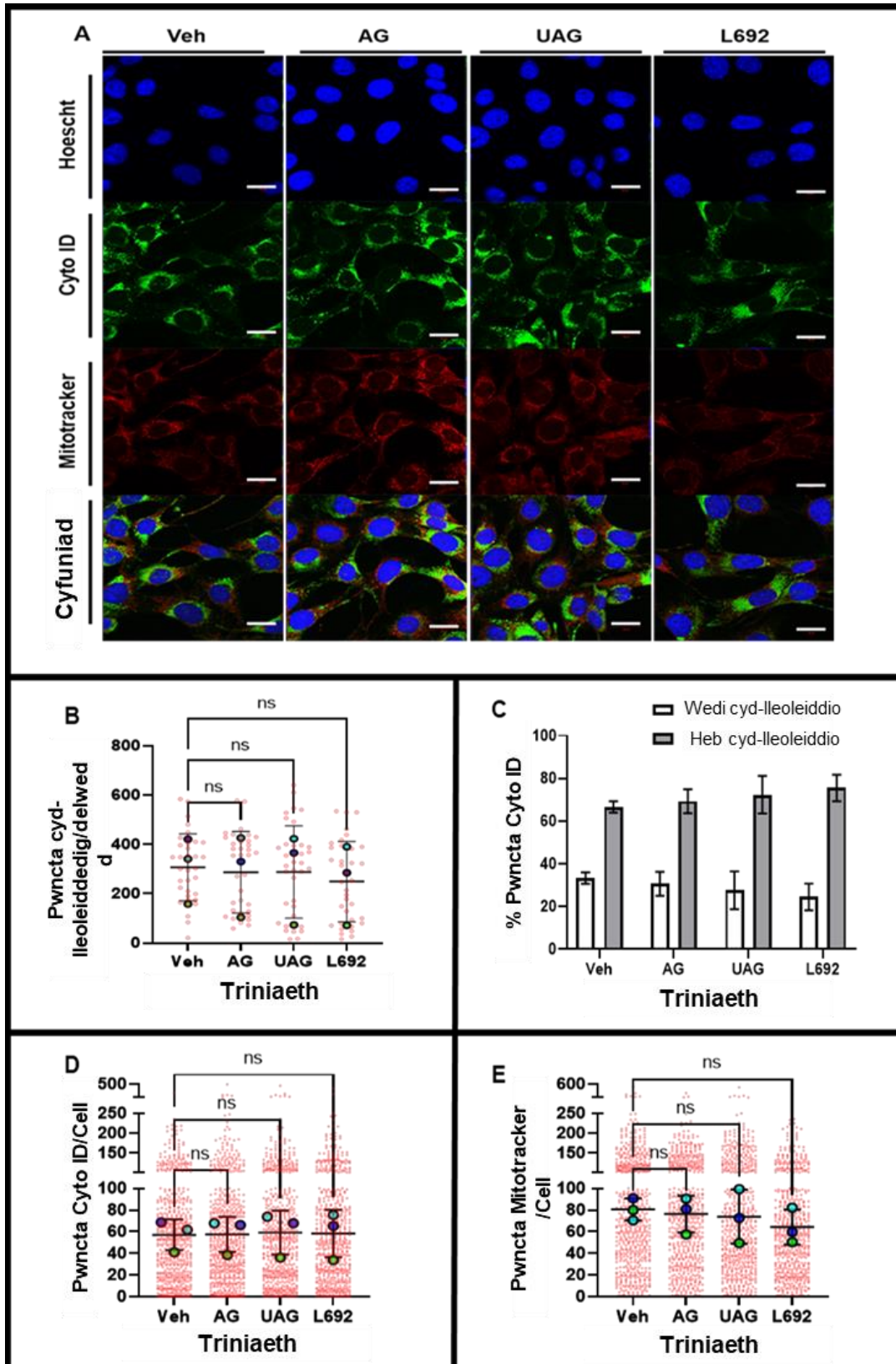
### 3.3.11. Data cyd-llleoleiddiad pwncta Cyto ID a mitotracker yng nghelloedd SN4741 maeth cyflawn

Fel dengys ffigur 3.20B, ni wnaeth triniaeth ag AG ( $P = 0.99$ ), UAG ( $P = 0.95$ ) neu L692 ( $P = 0.95$ ) newid cyd-llleoleiddiad pwncta Cyto ID a Mitotracker yn arwyddocaol o'i gymharu â chelloedd SN4741 wedi'i trin a Veh o dan amodau maeth cyflawn. Yn yr un modd, roedd cyfran y pwncta Cyto ID cyd-llleoleiddedig yn isel ar draws yr holl grwpiau triniaeth (ffigur 3.20C).

Fodd bynnag, yn wahanol i'r arbrofion Cyto ID blaenorol (ffigur 3.13, ffigur 3.17), ni welir gwahaniaethau nodedig neu arwyddocaol yn nifer y pwncta Cyto ID gyda triniaethau echelin ghrelin ( $P = >0.99$  ar gyfer AG, UAG a L692) (ffigur 3.20D).

Yn yr un modd, er gwelir gwerthoedd cymedrig is, ni effeithiwyd y triniaethau'n arwyddocaol ar nifer y pwncta mitotracker y gell (AG:  $P = 0.98$ ; UAG:  $P = 0.94$ ; L692:  $P = 0.57$ ) (ffigur 3.20E).

I grynhoi, ni newidiodd triniaethau echelin ghrelin gyd-llleoleiddiad awtoffagosomau a mitochondria mewn celloedd SN4741 maeth cyflawn, yn yr arbrofion hyn. Fodd bynnag, dylid dehongli'r canlyniadau hyn yn ofalus, gan ystyried colled effeithiau ataliol AG, UAG a L692 ar awtoffagi a sefydlwyd yn yr arbrofion flaenorol.



**Ffigur 3.20. Effaith triniaethau echel ghrelin ar cyd-llleoleiddiad pwncta Cyto-ID a mitotracker yn celloedd SN4741 maeth cyflawn**

**A)** *Delweddau cynrychioliadol o staenio Cyto ID a mitotracker.* Cafodd celloedd eu trin ymlaen llaw am 1 awr gydag asyl-ghrelin (AG), ghrelin sydd heb ei asyleiddio (UAG), L692585 (L692), rheolydd cludiol (Veh) neu rapamycin (gweler atodiad B), cyn triniaeth am 24 awr bellach yn absenoldeb (rhes uchaf) neu bresenoldeb (rhes isaf) 1 $\mu$ M baffilomycin A1 (Baf). Wedi hynny, magwyd y celloedd am 1 awr mewn cyfrwng meithrin sy'n cynnwys adweithyddion Cyto ID gwyrdd, Mitotracker oren a Hoescht. Ar ôl sefydlogi, delweddwyd y celloedd gan defnyddio gwrthrychiadur dan olew 63x 1.4 NA microsgop cydffocal LSM710 (Zeiss). Barrau graddfa yn cynrychioli 20 $\mu$ m.

**B-C)** *Mesuriad a chymariaethau o cyd-llleoleiddiad pwncta Cyto ID a mitotracker.* Ni wnaeth AG (P = 0.99), UAG (P = 0.95), neu L692 (P = 0.99) effeithio ar y nifer o pwncta cyd-llleoleiddedig (**B**), tra roedd canrannau o pwncta cyd-llleoleiddedig yn weddol isel ar gyfer yr holl triniaethau (**C**).

**D-E)** *Mesuriad a chymariaethau o werthoedd cymedrig pwncta Cyto ID/cell a mitotracker/cell.* Ni wnaeth AG, UAG neu L692 effeithio'n arwyddocaol ar y nifer o pwncta Cyto ID (P = >0.99 yr un) neu mitotracker (AG: P = 0.98; UAG: P = 0.94; L692: P = 0.57).

Data wedi'i gyflwyno fel cymedr  $\pm$  SD o dri dyblygiad arbrolol annibynnol.

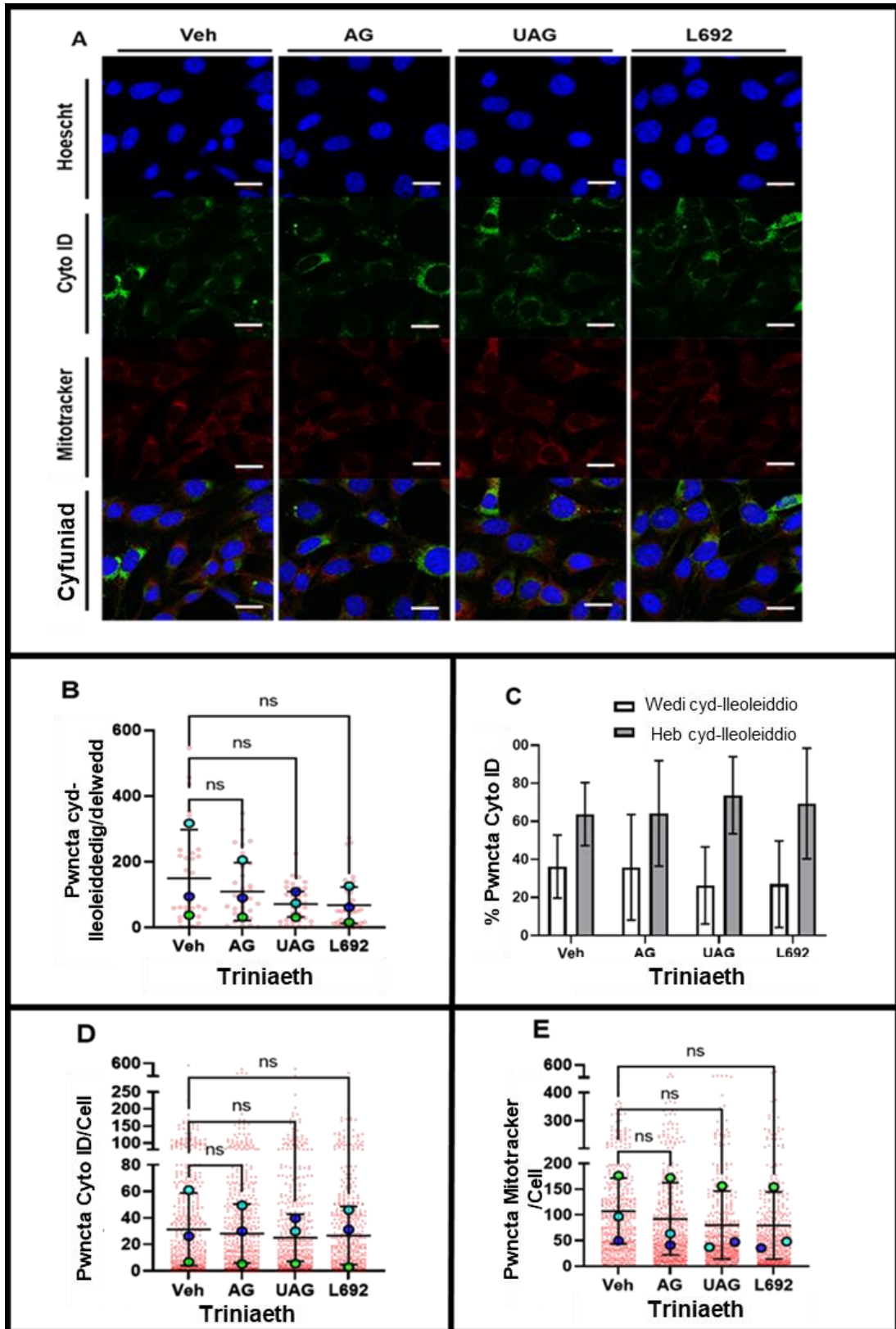
Mesurwyd y data trwy defnyddio meddalwedd CellProfiler, tra gwnaethpwyd cymariaethau ystadegol o'r data yn Graphpad Prism, gan defnyddio ANOVA unffordd a wedyn prawf cymhariaeth lluosog Dunnet.

### 3.3.12. Data cyd-llleoleiddiad pwncta Cyto ID a mitotracker yng nghelloedd SN4741 maeth cyfyngedig ysgafn

Yn yr un modd a'r celloedd maeth cyflawn, ni chafodd AG ( $P = 0.91$ ), UAG ( $P = 0.62$ ) neu L692 ( $P = 0.59$ ) effaith arwyddocaol ar gyd-llleoleiddiad pwncta Cyto ID a Mitotracker o dan amodau maeth cyfyngedig (ffigur 3.21B). Yn yr un modd, er gwaethaf rhediadau arbrofol annibynnol mwy amrywiol, roedd canrannau cymedrig pwncta cyd-llleoleiddedig mewn ystodau debyg i'r rai celloedd maeth cyflawn; gyda canrannau weddol isel ar gyfer pob triniaeth (ffigur 3.21C).

Dylid nodi, fodd bynnag, bod y data hyn wedi'u sgiwio gan gamgymeriad yn yr ail rediad arbrofol, lle roedd yna orlwythiad sylweddol o'r llifyn mitotracker (Atodiad A). Arweiniwyd hyn at ormodedd o staenio mitotracker ond hefyd staenio Cyto ID diffygiol iawn; sy'n dangos bod y llifyn mitoracker yn ymrannu mewn i adrannau a fyddai fel arfer yn cynnwys y llifyn Cyto ID (h.y. awtoffagosomau). Serch hynny, ni wnaeth y triniaethau newid yn arwyddocaol y nifer o pwncta Cyto ID (AG:  $P = 0.99$ ; UAG:  $P = 0.97$ ; L692:  $P = 0.99$ ) (ffigur 3.21D), neu mitotracker (AG:  $P = 0.98$ ; UAG:  $P = 0.92$ ; L692:  $P = 0.91$ ) (ffigur 3.21E) o gymharu â Veh ar draws y dri dyblygiad arbrofol annibynnol.

Felly, ni newidiodd triniaethau echelin ghrelin gyd-llleoleiddiad awtoffagosomau a mitochondria mewn celloedd SN4741 o dan amodau maeth cyfyngedig, yn yr arbrofion hyn.



**Ffigur 3.21. Effaith triniaethau echel ghrelin ar cyd-llaeleiddiad pwncta Cyto-ID a mitotracker yn celloedd SN4741 maeth cyfyngedig**

**A)** *Delweddau cynrychioliadol o staenio Cyto ID a mitotracker.* Cafodd celloedd eu trin ymlaen llaw am 1 awr gydag asyl-ghrelin (AG), ghrelin sydd heb ei asyleiddio (UAG), L692585 (L692), rheolydd cludiol (Veh) neu rapamycin (gweler atodiad B), cyn triniaeth am 24 awr bellach yn absenoldeb (rhes uchaf) neu bresenoldeb (rhes isaf) 1 $\mu$ M bafilomycin A1 (Baf). Wedi hynny, magwyd y celloedd am 1 awr mewn cyfrwng meithrin sy'n cynnwys adweithyddion Cyto ID gwyrdd, Mitotracker oren a Hoescht. Ar ôl sefydlogi, delweddwyd y celloedd gan defnyddio gwrthrychiadur mewn olew 63x 1.4 NA microsgop cydffocal LSM710 (Zeiss). Barrau graddfa yn cynrychioli 20 $\mu$ m. Cyflawnwyd cyfyngiad maeth trwy ddarparu'r triniaethau mewn cyfrwng meithrin sydd wedi'u gwanhau 40% mewn cymhariaeth i'r cyfrwng llawn.

**B-C)** *Mesuriad a chymariaethau o cyd-llaeleiddiad pwncta Cyto ID a mitotracker.* Ni wnaeth AG (P = 0.91), UAG (P = 0.62), neu L692 (P = 0.59) effeithio ar y nifer o pwncta cyd-llaeleiddedig (**B**), tra roedd canrannau o pwncta cyd-llaeleiddedig yn weddol isel ar gyfer yr holl triniaethau (**C**).

**D-E)** *Mesuriad a chymariaethau o werthoedd cymedrig pwncta Cyto ID/cell a mitotracker/cell.* Ni wnaeth AG, UAG neu L692 effeithio'n arwyddocaol ar y nifer o pwncta Cyto ID (AG: P = 0.99; UAG: P = 0.97; L692: P = 0.99 yr un) neu mitotracker (AG: P = 0.98; UAG: P = 0.92; L692: P = 0.91).

Data wedi'i gyflwyno fel cymedr  $\pm$  SD o dri dyblygiad arbrefol annibynnol. Mesurwyd y data trwy defnyddio meddalwedd CellProfiler, tra gwnaethpwyd cymariaethau ystadegol o'r data yn Graphpad Prism, gan defnyddio ANOVA unffordd a wedyn prawf cymhariaeth lluosog Dunnet.



## **3.4 Trafodaeth**

### **3.4.1. Canfyddiadau ac arsylwadau am effeithiau triniaethau echelin ghrelin o dan amodau maeth cyflawn**

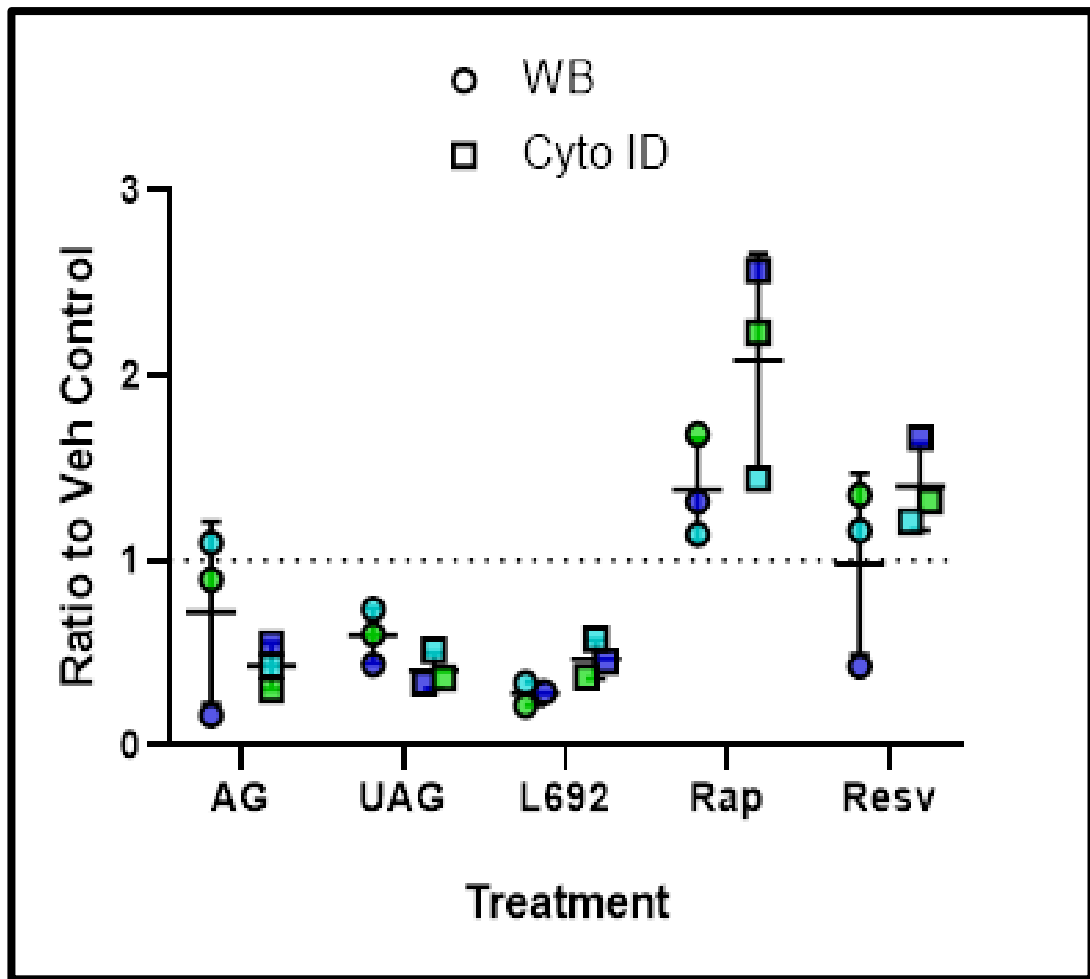
Nid yw canfyddiadau'r pennod hon yn cefnogi'r rhagdybiaeth bod echelin signalu ghrelin-GHS-R yn ysgogi awtoffagi yng nghelloedd SN4741 a HT-22.

#### **3.4.1.1 Canlyniadau WB a Cyto ID celloedd SN4741**

Dengys canlyniadau'r arbrofion WB, a pherfformiwyd ym mhresenoldeb ac absenoldeb CQ, sawl ymatebiad sy'n ymhlygu lleihad mewn awtoffagi. Rhoddwyd triniaeth gyda L692 cynyddiadau cyson (vs Veh) ym mynegiad LC3-II yn absenoldeb CQ (ffigur 3.7B), ond gostyngiadau cyson ac amlwg ym mynegiad LC3-II ym mhresenoldeb CQ (ffigur 3.7C). Gwelir hefyd, gostyngiadau cyson ym mynegiad LC3-II ar ôl triniaeth gyda UAG, ym mhresenoldeb CQ (ffigur 3.7C). Ymhellach, arweiniwyd triniaeth gydag AG, UAG neu L692 lleihad mewn mynegiant LC3-I ym mhresenoldeb CQ (ffigur 3.7E). Mewn cyferbyniad, rhoddwyd y rheolydd positif Rap, cynyddiadau cyson ym mynegiad LC3-II ym mhresenoldeb CQ ac absenoldeb CQ (ffigur 3.7B), yn ogystal a lleihad ym mynegiad y swbstrad awtoffagi p62 (ffigur 3.7F). Yn rhyfeddol, roedd mynegiad p62 dal yn is ar ôl triniaeth gyda Rap mewn cymhariaeth i triniaeth gyda Veh, ym mhresenoldeb CQ (ffigur 3.7G). Wrth ystyried y ffaith bod p62 yn rhwymo i LC3-II, a fod LC3-II yn cronni yn y gel ar ôl triniaeth gyda CQ, byddwch yn disgwyl gweld cronniad yn p62 hefyd o dan yr amodau hyn. Serch hynny, mae yna tystiolaeth bod triniaethau hir gyda CQ, fel y defnyddir yn yr arbrofion hyn, yn effeithio ar mynegiant p62 trwy fecanweithiau adborth. Enghreifftiau penodol yw cynnydd mewn actifedd proteasau sy'n ymrannu p62, fel caspasau a calpainau (Norman, Cohen, & Bampton, 2010) neu rheoleiddiad trawsgrifiad a throsiad (Klionsky et al., 2021; Lu, Sung, Lin, Abraham, & Jessen, 2017))

Rhodddwyd arbrofion dilynol Cyto ID tystiolaeth bellach, a mwy cadarn, bod echelin signalu ghrelin yn lleihau awtoffagi yng nghelloedd SN4741 o dan amodau maeth cyflawn (ffigur 3.13). Dengys y canfyddiadau bod triniaeth gyda AG, UAG neu L692 yn arwain at lleihad cyson ac arwyddocaol yn y nifer o pwncta Cyto ID yng nghelloedd wedi'u drin gyda Baf (ffigur 3.13C).

Mewn termau cymharol (vs Veh), roedd y gostyngiadau a arsylwir ar gyfer AG, UAG a L692 yng nghelloedd wedi'u drin a Baf gyda'r prawf Cyto ID, yn debyg i'r rhai a arsylwyd ar gyfer UAG a L692 mewn celloedd wedi'u trin â CQ yn yr arbrofion WB (ffigur 3.22). Ar y llaw arall, rhoddir Rap a Resv cynyddiadau cyson yn y nifer y pwncta Cyto ID y gell, gyda Rap yn cael effaith amlwg, sy'n wahanol iawn i'r effeithiau a welir ar gyfer triniaethau echelin ghrelin-GHS-R. Mae'r arsylwad hon yn rhoi mwy o dystiolaeth nad yw echelin ghrelin-GHS-R yn ysgogi awtoffagi o dan yr amodau arbrofol a asesir yng nghelloedd SN4741 maeth cyflawn.



Ffigur 3.22. Cymhariaeth o maent effeithiau triniaethau AG, UAG, L692, Rap a Resv, fel cymhareb y rheolydd Veh, yn arbrofion blotio Gorllewinol (WB) ym mhresenoldeb CQ, ac arbrofion Cyto ID ym mhresenoldeb Baf, yng nghelloedd SN4741 maeth cyflawn.

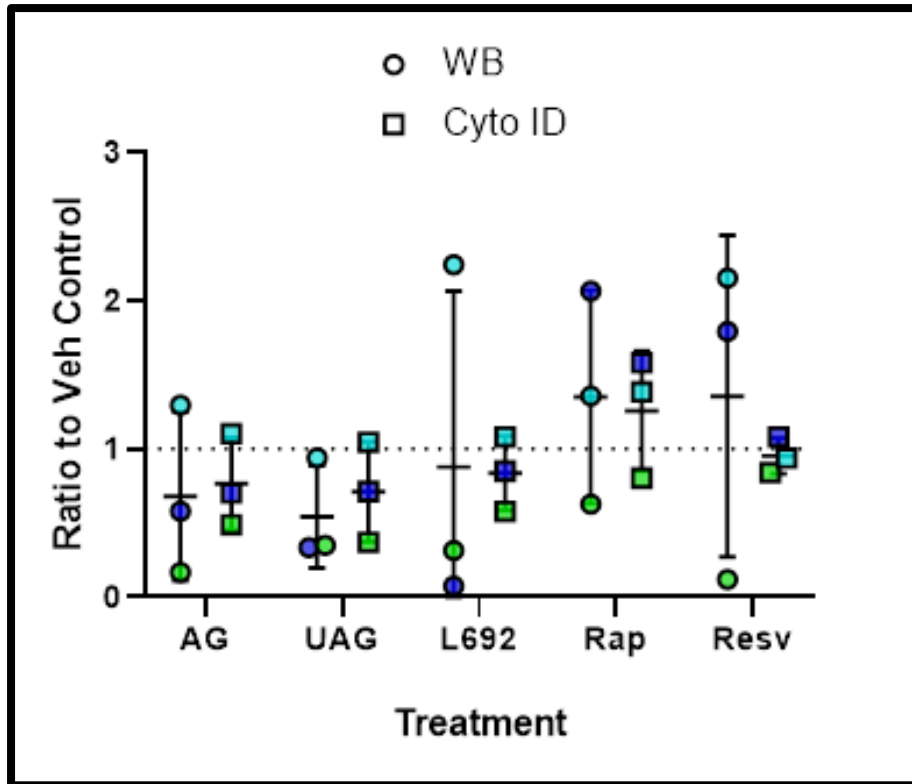
### 3.4.1.2 Canlyniadau WB a Cyto ID celloedd HT-22

Yn debyg i arbrofion SN4741, ni ddatgelodd nodweddiad WB o gelloedd HT-22 unrhyw effeithiau arwyddocaol ar drosiant LC3 neu p62 yn dilyn triniaeth gyda AG, UAG a L692. Fodd bynnag, yn wahanol i gelloedd SN4741, nid oedd newidiadau cymharol cyson a wnaeth awgrymu naill ai ysgogiad neu ataliad awtoffagi.

Fel yn achos arbrofion WB, ni chynhyrchodd arbrofion prawf Cyto ID unrhyw ganfyddiadau arwyddocaol a phendant ar gyfer celloedd HT-22 o dan amodau maeth cyflawn. Er hynny, rhoddir AG, UAG a L692 gostyngiadau yn y nifer o pwncta Cyto ID cymedrig ym mhresenoldeb ac absenoldeb Baf, sy'n awgrymu effaith ataliol posib.

Er gwaethaf y diffyg canfyddiadau sy'n berthnasol i effeithiau echelin ghrelin-GHS-R, datgelodd nodweddiadau Cyto ID y celloedd HT-22 wahaniaethau sylfaenol mewn awtoffagi gwaelodol ac ysgogedig o'i gymharu â chelloedd SN4741.

Yn nodedig, er mai ychydig o pwncta a arsylwyd ar y pwynt arbrofol ar gyfer pob triniaeth yn absenoldeb Baf yng nghelloedd SN4741, roedd pyllau nodedig o awtoffagosomau yn bresennol yn absenoldeb Baf ar y pwynt arbrofol ar gyfer celloedd HT-22. Felly, gellid gwneud cymariaethau ystyrlon mewn celloedd â fflwcs awtoffagig cymwys ar gyfer celloedd HT-22 (h.y yn absenoldeb Baf), yn wahanol i'r celloedd SN4741. Ymhellach, roedd celloedd HT-22 wedi'u trin â Baf yn ymddangos yn gymharol llai sensitif i anwythiad awtoffagig o gymharu â chelloedd SN4741, gan nad oedd unrhyw ysgogiad ystyrlon gyda thriniaeth Resv a gwelwyd canlyniadau anghyson â thriniaeth Rap. Mae'r canfyddiadau hyn yn dangos amrywioldeb awtoffagi sy'n ddibynnol ar gyd-destun, o gofio bod y ddwy linell gell yn deillio o ymennydd llygoden embryonig, er eu bod yn wahanol ranbarthau, a'u bod wedi'u hanfarwoli mewn modd tebyg.



Ffigur 3.23. Cymhariaeth o maent effeithiau triniaethau AG, UAG, L692, Rap a Resv, fel cymhareb y rheolydd Veh, yn arbrofion blotio Gorllewinol (WB) ym mhresenoldeb CQ, ac arbrofion Cyto ID ym mhresenoldeb Baf, yng nghelloedd HT-22 maeth cyflawn.

### 3.4.2. Canfyddiadau ac arsylwadau am effeithiau triniaethau echelin ghrelin o dan amodau maeth cyfyngedig ysgafn

Gan fod dulliau cyfyngu maetholion, megis cyfyngiad llwyr serwm ac asidau amino, yn ysgogwyr clir-difiniedig awtoffagi (Klionsky et al., 2021), gellir rhagdybio y bydd cyfyngiad maeth ysgafn (h.y. 40% CR) yn gwella sensitifedd celloedd i ysgogiad awtoffagi. Yn ôl y rhagdybiaeth hon, fyddant yn disgwyl i 40% CR ychwanegu at effeithiau a welir o dan amodau maeth cyflawn.

#### 3.4.2.1. Canlyniadau SN4741

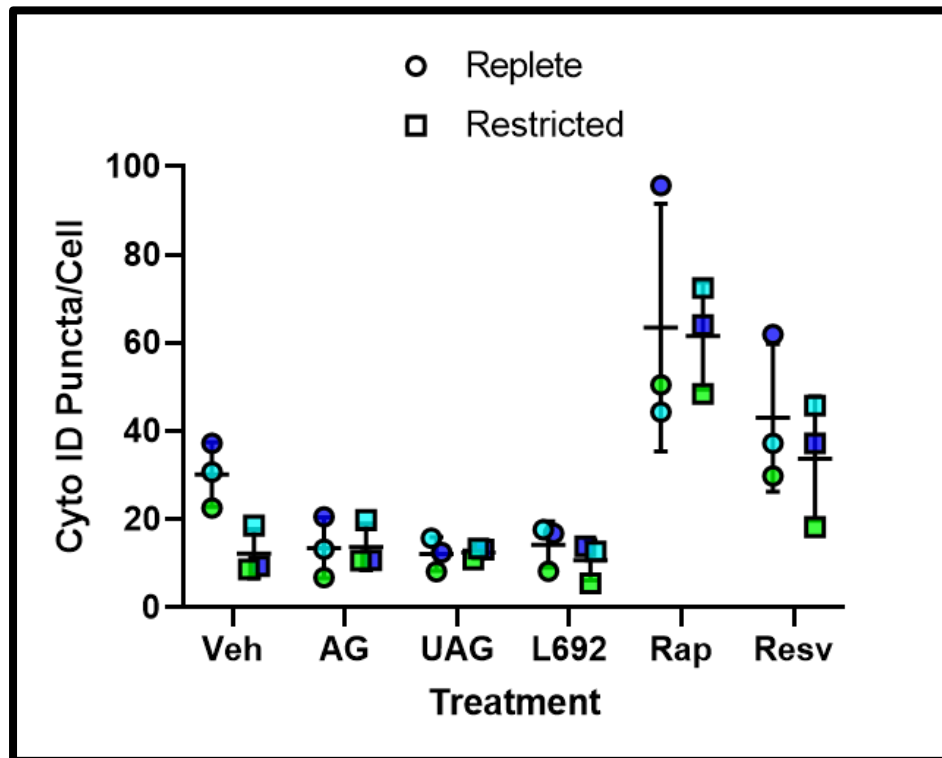
Ymddengys bod y rhagdybiaeth uchod yn wir wrth edrych at ymatebiad y rheolyddion positif, gan rhoddwyd Rap a Resv cynyddiadau uwch mewn cymhariaeth i Veh o dan amodau maeth cyfyngedig ysgafn mewn cymhariaeth i maeth cyflawn (Atodiad A). Ond, yn diddorol ni welir effeithiau ataliol AG, UAG neu L692 ar awtoffagi yng nghelloedd wedi'u drin o dan amodau maeth cyfyngedig.

Yn wir, dim ond newidiadau bach oedd yw gweld wrth cymharu nifer y pwncta yng nghelloedd wedi'u drin gyda AG, UAG, L692 neu Veh (ffigur 3.14).

Fodd bynnag, nid oedd y gwahanol feintiau effaith a welwyd o dan amodau maeth cyflawn a chyfyngedig ysgafn, yn ganlyniad i ymatebion triniaeth gwahanol ond yn hytrach roeddent yn ganlyniad i lleihad yn awtoffagi gwaelodol o dan amodau maeth cyfyngedig. Mae hyn yn arbennig o glir pan mae'r data am y dwy cyflwr maeth yn cael eu hail-blotio ochr yn ochr, fel gwelir yn ffigur 3.24. Yn wir, nid oes bron unrhyw wahaniaeth o ran cronid pwncta yn dilyn triniaeth ag AG, UAG neu L692 rhwng y ddau gyflwr maeth, tra bod y gwerthoedd ar gyfer y rheolyddion positif mewn ystodau tebyg hefyd.

Ar ben hynny, gan ystyried bod effaith cyfyngu maeth ysgafn ar awtoffagi gwaelodol yn hynod debyg i effeithiau AG, UAG a L692 ar awtoffagi o dan amodau maeth

cyflawn mae'n ymddangos yn gredadwy bod modiwlleiddio'r echelin ghrelin-GHS-R1a yn sail i'r effaith hon



Ffigur 3.24. Data arbrofion Cyto ID ar gyfer celloedd SN4741 wedi'u trin gyda Baf o dan amodau maeth cyflawn a chyfyngedig ysgafn, wedi'u ail-blotio er mwyn rhoi cymhariaeth well o maent effeithiau triniaethau AG, UAG, L692, Rap a Resv.

#### 3.4.2.2. Canlyniadau HT-22

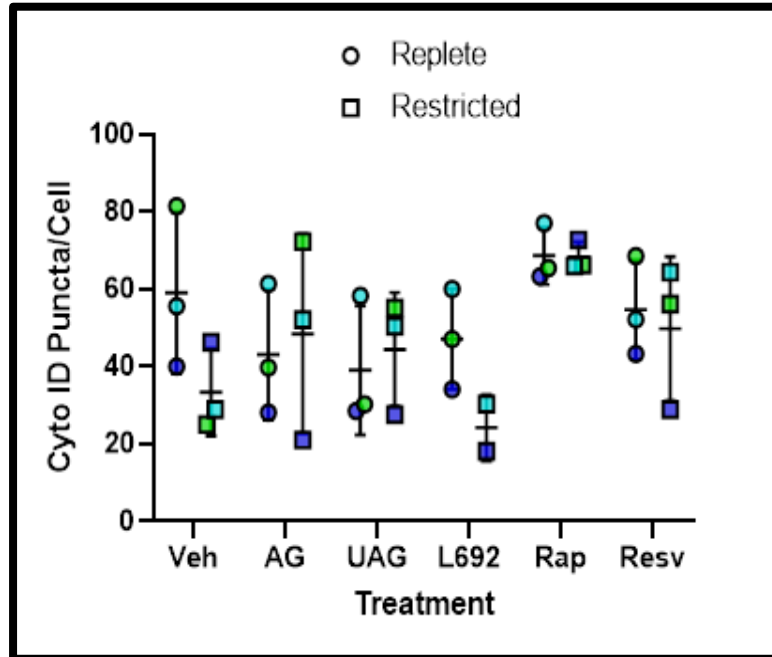
Gwelir darlun mwy cymhleth yng nghelloedd HT-22. Mewn cyferbyniad â chelloedd maeth cyflawn, ysgogwyd awtoffagi yn gyson gyda Rap yn nghelloedd wedi'u drin o dan amodau maeth cyfyngedig ysgafn, yn debyg i beth welir ar gyfer y celloedd SN4741 (Atodiad A).

Yn ddiddorol, er wnaeth AG ac UAG lleihau awtoffagi mewn dau o'r tri dyblygiadau arbrol o dan amodau maeth cyflawn, roedd yn ymddangos bod yr ymatebion hyn yn gwrthdroi o dan gyfyngiad maeth ysgafn. Felly, wnaeth AG ac UAG lleihau'r nifer cymedrig y pwncta mewn celloedd maeth cyflawn, ac fe wnaethant gynyddu nifer cymedrig y pwncta celloedd cyfyngedig ysgafn. Er nad oedd yr un o'r effeithiau hyn yn arwyddocaol, oherwydd amrywioldeb rhwng rhediadau arbrol, mae'r gwahaniaethau cyffredinol mewn ymatebion rhwng cyflyrau maeth yn unol â'r rhagdybiaeth y byddai cyfyngiad maeth ysgafn yn ychwanegu at ymateb awtoffagig yr echelin ghrelin-GHS-R.

Mewn cyferbyniad â AG ac UAG, gostyngodd L692 nifer y pwncta Cyto ID, ar gyfartaledd, mewn celloedd HT-22 wedi'u trin â baf o dan amodau maeth cyfyngedig ysgafn. Gellir, yr arsylwad hwn awgrymu bod peptidau ghrelin a L692 yn cymhell gwahanol ymatebion signalu GHS-R1a o dan yr amodau arbrol hyn yng nghelloedd HT-22. Fodd bynnag, ni chefnogir nodweddiadau blaenorol o'r llenyddiaeth y rhagdybiaeth hon, gan mai AG a L692 (neu analogau synthetig tebyg mewn strwythur) yn rhwymo i'r un safle yn y derbynnydd ac yn ysgogi llwybrau signalu gyda nerth tebyg (Ramirez et al., 2019). Esboniad mwy tebygol am y gwahaniaeth rhwng ymatebion L692 a pheptidau ghrelin yw colled hyfywdra ac datgysylltiad celloedd yn y ffynhonnau wedi'u drin gyda L692. Nid oedd hyn o ganlyniad i'r driniaeth ei hun, gan nad yw fel arfer yn lleihau hyfywdra cellog, ond oherwydd problemau gyda'r sleidiau siambr (h.y anhawster wrth ffurfio sêl cywir rhwng ffynhonnau'r mewnosodiad silicon a'r sleid microsgop gwydr) yn ystod yr



arbrofion. Yn wir, oherwydd y problemau hyn, nad oedd digon o gelloedd i samplu yn y ffynnon L692 mewn un o'r rhediadau arbrofol, a felly, dim ond y dau dyblygiad ceith eu defnyddio ar gyfer cyfri'r cymedr.



Ffigur 3.25. Data arbrofion Cyto ID ar gyfer celloedd HT-22 wedi'u trin gyda Baf o dan amodau maeth cyflawn a chyfyngedig ysgafn, wedi'u ail-blotio er mwyn rhoi cymhariaeth well o maent effeithiau triniaethau AG, UAG, L692, Rap a Resv.

### 3.4.2.3. Esboniadau am lleihad awtoffagi gwaelodol o dan amodau maeth cyfyngedig ysgafn

Mae'r canfyddiadau bod triniaethau echelin ghrelin-GHS-R ddim yn modiweiddio awtoffagi o dan gyfyngiad maeth ysgafn, a bod cyfyngiad maeth ysgafn *in vitro* yn atal awtoffagi gwaelodol yn cyferbynnu'n fawr â chanlyniadau Ferreira-Marques et al., (2016); lle ysgogodd AG awtoffagi mewn niwronau cortigol cynradd llygod fawr o dan amodau cyfyngedig. Fodd bynnag, fel disgrifiais ym mhenod 1.6.1, defnyddiodd eu model cyfyngiad maeth llawer llymach na'r un defnyddir ar gyfer gwaith y traethawd ymchwil hon, ac o ganlyniad mae'n anodd cymharu â CR ysgafn, lle nad yw'r cyfyngiad fel rheol yn fwy na 40% o'r cyflwr gwaelodol (Di Francesco et al., 2018).

Mae ymprydio tymor byr yn ysgogwr clir-difiniedig o awtoffagi *in vivo*, tra bod yr un peth yn wir am amddifadedd maetholion aciwt *in vitro* (klionsky et al., 2021), yn debyg i'r hyn a gyflawnir gan Ferreira-Marques et al. (2016). Dangoswyd bod 40% CR hefyd yn ysgogi awtoffagi *in vivo* (Bagherniya, Butler, Barreto, & Sahebkar, 2018; Mitchell et al., 2016). Fodd bynnag, nid yw effeithiau cyfyngiad maetholion ysgafn aciwt ( $\leq 40\%$ ) ar awtoffagi *in vitro* wedi'u diffinio'n dda.

Yn fecanyddol, cynigir bod modiweiddiad awtoffagi gan CR ysgafn *in vivo* yn digwydd fel addasiad tymor hir i straen ysgafn (h.y, hormesis) (Mattson et al., 2018), gydag ysgogiad rhaglenni trawsgrifio sy'n dyrchafu lefelau mynegiad proteinau ATG yn gwaelodi'r ymatebiad hyn (Pastore et al., 2019). Er hynny, gall canfyddiadau CR mewn modelau cnofilod gael eu gwaradwyddo gan y ffaith bod cnofilod a roddir ar ddietau CR ysgafn yn bwyta eu holl fwyd penodedig o fewn ffrâm amser fer (1-2 awr cyntaf y cyfnod tywyll) ac felly maent yn destun cyfnodau 20-23 awr o ymprydio bob dydd (Acosta-Rodriguez et al., 2017; Di Fransesco et al., 2018; Mitchell et al., 2019). Mae'r TRF dyddiol hyn yn debygol o ysgogi awtoffagi yn yr un modd a

arsylwir ar gyfer modelau ADF IF (Ehrnhoefer et al., 2018; Godar et al., 2015; H. Y. Liu et al., 2017).

Mae'r mecanweithiau uchod yn annhebygol o ddigwydd mewn celloedd sy'n cael eu trin mewn cyfryngau meithrin gwanedig *in vitro* am oddeutu 24awr, fel y perfformiwyd yn y traethawd ymchwil hwn; gan ystyried eu bod naill ai'n addasiadau tymor hir neu'n ymatebion homeostatig i ddisbyddu maetholion. Mae hyn yn arbennig o wir am gelloedd sydd wedi'u magu o dan amodau maetholion uchel, fel celloedd SN4741 a chelloedd HT-22.

Felly, efalla mae'r ataliad awtoffagi gwaelodol a welir o dan amodau cyfyngedig maeth ysgafn yn y traethawd ymchwil hon yn adlewyrchu gwanhad metabolion sy'n ysgogi awtoffagi sy'n bresennol yn y cyfrwng meithrin. Er enghraifft, gall amonia, sy'n cael ei gynhyrchu fel sgil-gynnyrch metabolaeth glwtamin, cymell awtoffagi mewn rhai modelau *in vitro* (Cheong, Lindsten, Wu, Lu, & Thompson, 2011; Eng, Yu, Lucas, White, & Abraham, 2010; Harder, Bunkenborg, & Andersen, 2014; Z. Li et al., 2016). Yn nodedig, dengys astudiaeth Li et al., (2016) bod amonia a cynhyrchir o glwtamin mewn gyfrwng meithrin sydd wedi heneiddio neu storio'n amhriodol yn dynwared effeithiau cymhleth ar awtoffagi. Yn wir, gellir amonia ysgogi awtoffagi trwy ataliad mTORC1 is lawr i'r derbynnnydd dopamin DRD3 ond hefyd amharu gyda fflwcs awtoffagig trwy niwtraleiddio pH y lwmen lysosomaidd (Li et al., 2016); mewn modd debyg i CQ.

Gan ystyried y crynodiadau uchel o glwtamin sy'n bresennol yn y cyfryngau SN4741 (6mM) a HT-22 (4mM), gellir effeithiau amonia ar awtoffagi fod yn esboniad credadwy am sut mae gwanedu cyfrwng meithrin 40% yn lleihau awtoffagi gwaelodol.

### 3.4.3. Canfyddiadau ac arsylwadau am effaith D-lys 3 ar ymatebiad Cyto ID celloedd SN4741 i triniaeth gyda pheptidau ghrelin

Canfyddiad trawiadol o'n nodweddiad Cyto ID yng nghelloedd SN4741 wedi'u drin gyda Baf, oedd yr ymatebion tebyg gyda AG, UAG a L692. Nid yw hon yn syndod o ran AG a L692, gan fod y ddau yn ysgogwyr grymus signalu GHS-R1a (M'Kadmi et al., 2015; Ramirez et al., 2019). Ond nid yw UAG yn cael ei hystyried fel ysgogydd *bona fide* GHS-R1a, er mai hwn yw brif ffurf ghrelin yn y cylchrediad (Kojima et al., 1999; Shiimura et al., 2020). Ymhellach, mae yna dystiolaeth fod UAG yn gwrthweithio neu yn atal effeithiau AG yng nghyd-destunau gwahanol.

Dengys canfyddiadau blaenorol ein grwp fod AG a UAG yn ymdrechu effeithiau gwrthwynebol ar AHN cnofilod a weithrediad cof a dysgu cysylltiedig (Hornsby et al., 2016; Hornsby et al., 2020; Kent et al., 2015). Ymhellach, darganfyddwn fod cydriniaeth AG ac UAG yn achosi colled o effeithiau lluosogiedig a goroesiedig AG yng nghelloedd cynradd hipocampaidd llygod mawr, mewn ffordd tebyg i D-lys 3 (Hornsby et al., 2020). Dengys grwpiau eraill fod UAG yn gwrthweithio effaith AG ar gweithrediad inswlin ac ymlifiad glwcos (Broglia et al., 2004; Gauna et al., 2005; Gauna et al., 2004) effaith orecsigenig AG alldarddol (Inhoff et al., 2008) ac effaith AG ar secretiad polypeptide pancreatig (Kumar et al., 2010).

Gan ystyried y canfyddiadau hyn, byddant yn disgwyl i UAG gwrthwynebu effeithiau AG a L692 ar prosesau biolegol arall sy'n gweithio is-lawr i GHS-R1a, fel awtoffagi. Ond ni welir hyn yn yr arbrofion a chyflwynir yn y bennod hon. Serch hynny, dengys astudiaeth Hopkins et al., (2017) fod UAG yn cael ei asetyleiddio gan GOAT sydd wedi'i lleoli ar bilen plasmaidd celloedd môr y tibia, ac mae'r pwll lleol o AG a cynhyrchir wedyn yn ysgogi GHS-R1a. Felly yng nghelloedd sy'n mynegi GOAT, fel celloedd SN4741 (Beynon et al., 2013), mae yna modd i UAG alldarddol ysgogi signalu AG-GHS-R1a.

Ar y llaw arall, mae UAG wedi'i cynhyrchu effeithiau biolegol yn llygod gyda diffyg ym mynegiant GHS-R1a (Delhanty et al., 2010; Ku et al., 2015; Porporato et al., 2013; Togliatto et al., 2013). Awgrymir hyn fod llwybrau signalu ghrelin sy'n annibynnol i GHS-R1a yn bodoli. Fodd bynnag, nid oes tystiolaeth grymus am derbynnydd UAG priodol, er i ymchwilyr edrych amdani dros y dau degawd diwethaf (Muller et al., 2015; Yanagi et al., 2018).

Felly, er mwyn amlinellu'r mecanwaith tu ôl i sut mae AG ac UAG yn modiweiddio awtoffagi i raddau tebyg yng nghelloedd SN4741, asesais os oedd effeithiau'r peptidau ar y prawf Cyto ID yn dibynnu ar GHS-R1a. Asesir hyn trwy trin celloedd gydag ac hebdo triniaeth gwrthweithydd D-lys 3. Yn diddorol, ni wnaeth D-lys 3 effeithio cronïad pwncta Cyto ID yng nghelloedd wedi'u drin gyda AG neu UAG, ym mhresenoldeb Baf (ffigur 3.17). Awgrymir yr arsylwad hon, fod effeithiau AG ac UAG ar awtoffagi yng nghelloedd SN4741 yn annibynnol i GHS-R1a. Yn tebyg, ni newidiodd D-lys 3 y lleihad mewn awtoffagi gwaelodol a welir gydag cyfyngiad maeth ysgafn (ffigur 3.18), sy'n awgrymu nid yw ysgogiad signalu AG-GHS-R1 yn gweithredu'r effaith hon fel y rhagdybir yn adran cynt y traethawd hon.

Esboniad arall ar gyfer y data hyn, fodd bynnag, yw nad yw'r amodau triniaeth D-lys-3 a ddefnyddir yn gwrthweithio'n effeithiol y llwybrau cypledig GHS-R1a sy'n cyfryngu'r newidiadau a welwyd mewn awtoffagi. Yn cefnogi'r esboniad hwn, datgelodd nodweddiad diweddar o signalu rhagfarnllyd GHS-R1a nad yw D-lys 3 yn gwrthweithio mewnlifiad calsiwm GHS-R1a yn effeithiol, sy'n arwydd o signalu canonaidd trwy Gαq, mewn ymateb i weithiant gyda naill ai AG neu L692 (Ramirez et al., 2019). Yn wir, dengys canfyddiadau'r astudiaeth hon bod gwrthweithiant gyda D-lys 3 yn tueddu tuag at fewnoli GHS-R1a a ffosfforyleiddiad ERK, sydd yn digwydd is lawr i recriwtiad β-arrestin (Ramirez et al., 2019).

Hyd yn oed wedyn, nododd cromliniau ymateb dosau fod nerth gwrthweithiant 1μM D-lys 3 yn lleihau wrth i grynodiad AG neu L692 gynyddu o'r ystod nanomolar i'r

ystod micromolar (Ramirez et al., 2019). Yn wir, roedd weithiant ag 1  $\mu$ M AG neu L692 yn negyddu effeithiau gwrthweithiant 1 $\mu$ M D-lys 3 ar fewnoli GHS-R1a, tra bod 100nM AG yn lleihau gwrthweithiant ERK (Ramirez et al., 2019). Felly, efallai na fydd D-lys 3 yn gweithredu fel gwrthweithydd effeithiol o signalu GHS-R1a pan fydd gweithyddion yn bresennol mewn crynodiadau micromolar, tra gall ymatebion rhagfarnllyd tuag at  $\beta$ -arrestin hyrwyddo'n anfwriadol signalu GHS-R1a trwy G $\alpha$ q. Mae'r uchod yn hynod berthnasol gan ystyried bod AG, UAG a D-lys 3 wedi'u defnyddio mewn crynodiadau micromolar yn arbrofion gwrthweithiant GHS-R1a y traethawd ymchwil hwn. Ond defnyddiwyd y crynodiadau hyn gan rydym wedi'u gweld effeithiau pendant ganddynt mewn arbrofion *in vitro* eraill (Hornsby et al., 2020).

#### **3.4.4. Canfyddiadau ac arsylwadau am effaith triniaethau echelin ghrelin ar cyd-lleoleiddiad awtoffagosomau a mictochondria**

Er bod ein canfyddiadau cychwynnol Cyto ID yn awgrymu y gall yr echelin ghrelin-GHS-R ddadreoleiddio fflwcs fesigwlar awtoffagig (h.y fflwcs awtoffagosomau), nid yw hyn o reidrwydd yn golygu bod ghrelin yn dadreoleiddio dirywiad swbstradau awtoffagig, neu fflwcs cargo awtoffagig. Aseswyd hyn i ddechrau gyda WB yn erbyn p62, ond yr oedd y canfyddiadau yn anghyson (ffigur 3.7, ffigur 3.8). Penderfynwyd felly i asesu mitoffagi, gan defnyddio microsgopeg fflworoleuedd i nodweddu cyd-lleoleiddiad awtoffagosomau a mitochondria.

Dangosodd canfyddiadau arbrofol nad oedd triniaethau echelin ghrelin yn newid cyd-lleoleiddiad awtoffagosomau a mitochondria o dan yr amodau arbrofol a ymchwilir (ffigur 3.20, ffigur 3.21). Gellir casglu o'r data hyn nad yw triniaethau echelin ghrelin felly'n effeithio ar mitoffagi yng nghelloedd SN4741. Fodd bynnag, gan ystyried y gallai cyd-lleoleiddiad mitochondria a awtoffagosomau adlewyrchu synthesis awtoffagosomau mewn safleoedd cyswllt ER-mitochondria (Hamasaki et

al., 2013), yn lle atafaeliad mitochondria gan awtoffagosomau (Allen, Toth, James, & Ganley, 2013; McWilliams et al., 2018), byddai casgliadau o'r fath yn naïf.

Dylid nodi hefyd na welwyd effeithiau gwrth-awtoffagig AG, UAG a L692 a arsylwir yn flaenorol gyda'r prawf Cyto ID mewn celloedd SN4741 wedi'u drin â Baf o dan amodau maeth cyflawn (ffigur 3.20, ffigur 3.26). Er ei bod yn bosibl bod celloedd SN4741 wedi dod yn ansensitif i driniaethau echelin ghrelin dros amser, gan ystyried bod yr arbrofion hyn wedi'u perfformio ddwy flynedd ar ôl y nodweddiadau cychwynnol y prawf Cyto ID, mae'n bosibl bod cyd-magu'r llifyn Cyto ID â mitotracker wedi dylanwadu ar ganlyniad y prawf. Ond nid yw'r canfyddiad bod celloedd SN4741 yn dal i fod yn sensitif i ysgogiad awtoffagi gan rapamycin gyda'r system arbrofol hon yn cefnogi casgliad o'r fath.

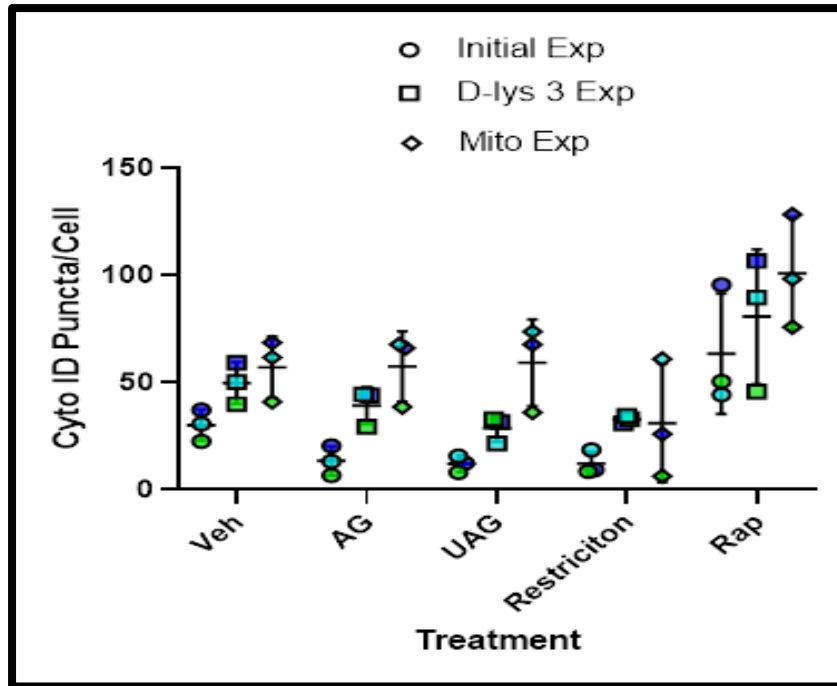
Fodd bynnag, canfuwyd tystiolaeth y gall y llifyn mitotracker ymrannu i'r adrannau awtoffagig sydd wedi'u labelu gan y llifyn Cyto ID, gan ystyried wnaeth gorlwythiad damweiniol mitotracker mewn celloedd maeth cyfyngedig yn un o'r rhediad arbrofol, lleihau'n sylweddol lefelau pwncta Cyto ID a welir yn ystod microsgopeg fflwroleuedd (Atodiad A). Felly, efallai nid yw'r prawf hwn yn addas ar gyfer nodweddu newidiadau mewn awtoffagi.

I gyfrif am y cyfyngiadau uchod, roeddwn i'n bwriadu nodweddu mitoffagi trwy sawl techneg annibynnol. Roedd y rhain yn cynnwys nodweddiadau WB o drosiant TOM20, a nodweddiadau MALDI-TOF-MS o rywogaethau cardiolipin, lipid allweddol o'r bilen fewnol mitochondrial a phartner rhwymol LC3 a amlygir fel derbynydd mitoffagi (Chu et al., 2013).

Fodd bynnag, fel yn achos ICC, rhoddodd gwrthgorff TOM20 gymhareb signal i sŵn wael iawn wrth ei gymhwyso i bilenni WB, gan gyfyngu ar botensial arbrofol y cais hwn (Atodiad A). Perfformiwyd optimeiddiaeth dadansoddiadau cardiolipin o lysadau celloedd SN4741 cyfan, yn ogystal â echdynniadau lipid, yn unol â

phrotocolau a sefydlwyd yn flaenorol (Angelini et al., 2015; Angelini et al., 2012). Fodd bynnag, wnaeth problemau mecanyddol gyda system MALDI-TOF-MS ac ymddangosiad dilynol y pandemig COVID-19 atal cynnydd gyda asesiad effeithiau echelin ghrelin-GHS-R ar drosiant cardiolipin. Serch hynny, mae'r arbrofion hyn o ddiddordeb sylweddol mewn astudiaethau yn y dyfodol, yn enwedig gan ystyried nad yw astudiaethau ar ghrelin a chardiolipin yn bresennol yn y llenyddiaeth gyfredol. Yn ogystal a hynny, fe ellir arbrofion pellach defnyddio cynlluniau arbrofol sydd wedi seilio ar y gohebydd Mito-QC, sy'n wahaniaethu rhwng mitochondria sydd wedi cludio i'r lysosom a rhai sydd heb (Allen et al., 2013; McWilliams et al., 2018), i rhoi asesiad mwy grymus o sut mae echelin ghrelin-GHS-R yn modiweiddio mitoffagi.





**Ffigur 3.26. Gwerthusiad o atgynhyrchedd effaith ar draws y tri phrif arbrawf microsgopeg fflwroleuedd.** Cadwyd effeithiau gwrth-awtophagig AG ac UAG rhwng yr arbrawf cychwynnol ac arbrawf D-lys 3 ond collwyd yn yr arbrawf mitophagi. Roedd effaith cyfyngiad maeth hefyd yn fwy amrywiol yn yr arbrawf mitophagi, er bod hyn yn debygol o fod oherwydd gwallau technegol wrth sefydlu'r triniaethau. Roddwyd Rap anwythiad awtoffagig cyson ar draws y tri arbrawf. Daw'r data ar gyfer Veh, AG, UAG a Rap o gelloedd maeth cyflawn. Data cyfyngiad yw'r rheolaethau Veh o'r celloedd cyfyngedig. Ni chyflwynir data ar gyfer L692 gan na pherfformiwyd triniaethau L692 yn arbrawf D-lys 3.

### 3.4.5. Cyfyngiadau

#### 3.4.5.1. Parhad ataliad lysosomaidd

Un cyfyngiad am y gwaith a gyflwynir yn y bennod hon yw'r triniaethau 24 awr gyda'r atalyddion lysosomaidd CQ (WB) a Baf (Cyto ID). Mae hyn yn wahanol iawn i lawer o astudiaethau awtoffagi, lle perfformir ataliad lysosomaidd am 1-4awr, yn aml fel arbrawf helpa ar ddiwedd ffenestr driniaeth hirach (Klionsky et al., 2021). Yn wir, cynghorir yn gyffredinol i osgoi ataliad lysosomaidd sy'n fwy na 8 awr ar gyfer arbrofion sy'n edrych yn bennodol ar awtoffagi (Klionsky, Elazar, Seglen, & Rubinsztein, 2008; Rubinsztein et al., 2009). Y rheswm yw bod effeithiau ataliad lysosomaidd yn effeithio ar lwybrau cludo a diraddio eraill, megis y system UPS (Korolchuk, Mansilla, Menzies, & Rubinsztein, 2009), CMA, a'r system endosomaidd (Klionsky et al., 2008; Rubinsztein et al., 2009). Ymhellach, gellir ataliad lysosomaidd parhaol effeithio ar rheolyddiaeth awtoffagi drwy adborth negatiff ar actifedd mTORC1 (Lu et al., 2017; Musiwaro, Smith, Manifava, Walker, & Ktistakis, 2013), sydd angen lleolleiddiad endo-lysosomaidd a v-ATPase gweithredol (Zoncu et al., 2011). Felly, gall y newidiadau awtoffagig a welwyd gyda driniaethau echelin ghrelin-GHS-R mewn celloedd wedi eu drin gyda CQ neu Baf, adlewyrchu effeithiau elaidd sy'n codi oherwydd yr ataliad lysosomaidd parhaol, yn hytrach na modiweiddiad awtoffagig *bona fide*.

O ystyried y cyfyngiadau uchod, mae'n rhesymol gofyn pam y cyflawnwyd arbrofion *in vitro* y traethawd ymchwil hwn gyda chyfnodau mor hir o ataliad lysosomaidd. Yn wir, er bod arbrofion WB a microsgopeg fflwroleuedd cychwynnol (gohebydd GFP-LC3) wedi'u cynllunio ar gyfer nodweddu awtoffagi mewn ymateb i ataliad 24 awr o ddiraddiad lysosomaidd, roeddwn wedi bwriadu asesu ymatebion prawf Cyto ID gyda chyfnodau byrrach o ataliad lysosomaidd.

Felly perfformiwyd arbrofion rhagarweiniol prawf Cyto ID gyda chyfnodau triniaeth 1awr a 4awr, ym mhresenoldeb ac absenoldeb CQ, tra cynhaliwyd arbrawf helpa

4awr gyda CQ yn dilyn triniaeth 20 awr gyda naill ai Rap neu Veh. Fodd bynnag, ni welwyd gwahaniaethau amlwg rhwng CQ a Veh ar bwyntiau amser 1awr neu 4awr, mewn cyferbyniad â'r gwahaniaethau nodedig a welwyd ar 24awr, tra gwelwyd canlyniadau anghyson ar gyfer ysgogiad awtoffagig gyda'r arbrawf helfa.

Ymdrechais hefyd i ailadrodd y cynlluniau arbrofol hwn gyda Baf, ar ol newid o CQ fel yr atalydd lysosomaidd. Fodd bynnag, oherwydd diffyg profiad (ar y pryd) gyda canfod pwncta fflwroleuol mewn ymateb i driniaethau Baf byr, bu'r rhain hefyd yn aflwyddiannus. Gan arsylwir croniad pwncta clir gyda triniaeth 24 awr Baf, dewiswyd y hyd driniaeth hon ar gyfer arbrofion *in vitro* y traethawd ymchwil, er gwaethaf y cyfyngiadau.

Ar ôl ennill llawer mwy o brofiad gyda phrofion microsgopeg fflwroleuedd awtoffagi ers yr arbrofion rhagarweiniol, rwyf nawr wedi optimeiddio arbrawf helfa Baf 4awr yng nghelloedd SN4741, gan ddangos ysgogiad awtoffagig arwyddocaol yn dilyn triniaeth rapamycin 20 awr (Atodiad A). Yn anffodus, oherwydd effaith y pandemig COVID-19, ni lwyddais i ailasesu effaith triniaethau echelin ghrelin-GHS-R gyda'r cynllun arbrofol hwn.

#### 3.4.5.2 Dynameg yr ymatebiad awtoffagig

Cyfyngiad arall, sy'n gysylltiedig â'r un a drafodwyd uchod, yw'r ffaith bod y data awtoffagi *in vitro* a gyflwynir yn y bennod hon wedi dod o un pwynt terfyn arbrofol. Er bod y rhesymeg y tu ôl i hyn wedi'i egluro uchod, nid yw hyn yn adlewyrchu yn glir natur deinamig fflwcs awtoffagig, a nodweddir yn gyffredinol yn y llenyddiaeth dros sawl pwynt amser arbrofol. Trafodir fframwaith arbrofol ar gyfer goresgyn y cyfyngiad hwn, gan ddefnyddio delweddu celloedd byw o ddeinameg awtoffagosomau (Loos, Toit, & Hofmeyr, 2014), yn adran arbrofion pellach pennod 5.

Yn ogystal, mae'r gwaith a gyflwynir yn y bennod hon yn asesu digwyddiadau terfynol yn y llwybr awtoffagig yn unig (h.y. trosiant awtoffagosomau). Byddai nodweddu'r ymatebion signalu uchod yn y llwybr awtoffagig (h.y. addasiadau ôl-drosiadol a rhyngweithio rhwng proteinau ATG) yn darparu gwybodaeth hynod ddefnyddiol ar sut mae'r echelin ghrelin-GHS-R yn dylanwadu ar y digwyddiadau sy'n arwain at biosynthesis awtoffagosomau. Unwaith eto, cymerwyd hyn i ystyriaeth ar ddechrau'r prosiect hwn, a chynllunnir arbrofion er mwyn asesu effaith echelin ghrelin ar ffosfforyleiddiad ULK1 ar Serine555. Mae'r addasiad hwn yn bwysig ar gyfer anwytho awtoffagi a mitoffagi mewn ymateb i ddisbyddu ynni a straen mitochondrial a chyfryngir yn uniongyrchol gan AMPK (Egan et al., 2011).

Gan ystyried bod ein grŵp wedi arsylwi actifadu AMPK a ffosfforyleiddiad ei swbstrad canonaidd, carbocsylas asetyl-coA (ACC), yn dilyn triniaeth 5 munud gydag AG neu gweithydd GHS-R1a yng nghelloedd SN4741 (Bayliss et al., 2016), aseswyd ffosfforyleiddiad Ser555 ULK1 ar y pwynt arbrofol hyn hefyd. Fodd bynnag, roedd lefelau ffosfforyleiddiad pULK1 Ser555 yn anhygoel o amrywiol, ac ni chawsant eu heffeithio'n arwyddocaol gan triniaeth L692, naill ai o dan amodau maeth cyflawn neu cyfyngiad maeth ysgafn (Atodiad A).

I gyfrif am effeithiau posibl ar pULK1 Ser555 ar adegau diweddarach, sefydlwyd arbrawf optimeiddiaeth i nodweddu ymateb ffosfforyleiddiad AMPK ac ULK1 yn dilyn triniaethau ag atalyddion mitochondrial (rotenon a oligomycin) am 30 munud. Fodd bynnag, bu'r arbrofion hyn yn aflwyddiannus, gydag ymatebion amrywiol ar draws tri rhediad arbrofol annibynnol (Atodiad A). Felly, nid oedd modd cyflawni data defnyddiol ar sut mae echelin ghrelin-GHS-R yn effeithio ar signalu AMPK-ULK1 yn y traethawd hir hon. Gallai arbrofion *in vitro* yn y dyfodol asesu ymatebion echelin ghrelin-GHS-R mewn celloedd sy'n mynegi ffurfiau negyddol amlwg (dominant negative) naill ai AMPK neu ULK1, sy'n atal activedd yr ensymau heb newid eu

mynegiad (Bach, Larance, James, & Ramm, 2011; Chan, Longatti, McKnight, & Tooze, 2009; Laker et al., 2017; Woods et al., 2000).

#### 3.4.5.2 Trosglwyddadwyedd llinachau celloedd anfarwol heb eu gwahaniaethu

Yn olaf, mae angen ystyried addasrwydd y llinellau celloedd anfarwol SN4741 a HT22 fel modelau o awtophagy niwronau. Er bod gan y ddwy linell gell y gallu i wahaniaethu i ffenoteip niwronau, perfformiwyd arbrofion y bennod hon ar gelloedd sydd heb eu gwahaniaethu (h.y. rhai lluosiedig). Yn y cyflwr hwn, mae'r celloedd yn dal i fynegi proteinau perthnasol echelin ghrelin (GHSR, GOAT, APT1) yn ogystal â marcwyr niwronau (GIRK2, ALDH1A1 (SN4741), Prox1 (HT22), BDNF, PSD95), sy'n dilysu ei defnydd fel modelau perthnasol ar gyfer asesu effeithiau echelin ghrelin-GHS-R ar awtoffagi yng nghyd destyn niwronal. Fodd bynnag, nid ydynt yn adlewyrchu morffoleg arbenigol a phriodweddau electroffisegol niwronau aeddfed, ac gellid dadlau felly bod y newidiadau a adroddir yn y bennod hon yn fwy cynrychioliadol o awtoffagi mewn celloedd anfarwol lluosiedig. Serch hynny, mae canfyddiadau'r pennod hon yn darparu fframwaith ar gyfer arbrofion dilynol mewn modelau *in vitro* mwy soffistigedig sydd a mwy o berthnasedd trosglwyddadwy. Un model o'r fath yw'r model niwronau dopaminergig fentrol canolraddol sy'n delio o bôn-gelloedd plwri-potent ysgowgwyd dynol (human induced pluripotent stem cells- hiPSC) a disgrifir yn diweddar gan (Stathakos et al., 2021), a sefydlwyd ar gyfer nodweddiadau awtoffagi a mitoffagi.

### 3.5. Crynodeb o ganfyddiadau'r pennod

Prif canfyddiadau'r pennod hon yw:

1. Nid yw triniaeth 24 awr gyda AG, UAG neu L692 yn anwytho awtoffagi yng nghelloedd SN4741 neu HT-22; gyda rhai tystiolaeth ystadegol bod y triniaethau hyn yn atal awtoffagi yng nghelloedd SN4741 yn lle.
2. Mae cyfyngiad maeth ysgafn (40%) *in vitro* yn dynwared effeithiau tebyg i driniaethau AG, UAG a L692 ar croniad pwncta Cyto ID yng nghelloedd SN4741.
3. Ni effeithiwyd cyn-driniaeth gyda D-lys 3 ar effeithiau Cyto ID AG a UAG yng nghelloedd SN4741; sy'n awgrymu bod yr effeithiau yn annibynnol o GHS-R1a
4. Ni effeithiwyd triniaethau echelin ghrelin ar cyd-llleoleiddiad awtoffagosomau and mitochondria.

## **Pennod 4: Nodweddu rheoleiddiad awtoffagi niwronal gan echelin signalu ghrelin-GHS-R *in vivo***

### **4.1 Cyflwyniad**

#### **4.1.1 Heriau asesiadau awtoffagi *in vivo***

Asesir awtoffagi *in vivo* yn yr un modd ag *in vitro*, gyda WB LC3-II a chanfod microsgopig fflworoleuedd o awtoffagosomau ac awtolysosomau y profion a ddefnyddir amlaf (Klionsky et al., 2021). Fodd bynnag, mae profion autophagy *in vivo* yn hynod heriol o gymharu â'u cymheiriaid *in vitro* (Klionsky et al., 2021).

Yn gyntaf, mae mynegiad proteinau ATG, fflwcs awtoffagig gwaelodol, a sensitifrwydd ysgogiad awtoffagig yn wahanol mewn meinweoedd gwahanol (Klionsky et al., 2021; Mizushima et al., 2004). O ran yr ymennydd, mae mynegiad LC3-I llawer mwy uwch na hynny LC3-II (Bordi et al., 2016; Hernandez et al., 2012; Nikolettoulou et al., 2017; Pickford et al., 2008). O ganlyniad, gall canfod LC3-II mewndarddol drwy WB neu pwncta LC3 sy'n cynrychioli awtoffagosomau drwy microsgopeg fflworoleuedd bod yn heriol iawn. Yn wir, defnyddir modelau trawsgenynnol sy'n mynegi LC3 wedi'u tagio i gohebydd fflworoleuol fel GFP neu mCherry yn aml mewn ymchwil awtoffagi er mwyn oresgyn y cyfyngiadau sy'n ymwneud â chanfod LC3 mewndarddol *in vivo* (J. H. Lee et al., 2019; Klionsky et al., 2021; Mizushima et al., 2004)

Yn ail, gall fflwcs awtoffagig gwaelodol a sensitifrwydd ysgogiad awtoffagig hefyd amrywio yn ôl oedran, rhyw neu straen yr anifail modelig (Klionsky et al., 2021). Er enghraifft, dengys canfyddiadau Mitchell et al. (2016) bod CR 20% yn cynyddu mynegiad cyflwr cyson LC3-II yn yr afu yn llygod DBA2/J ond nid yn llygod C57BL/6J, lle mae rhaid defnyddio CR 40% i gynyddu lefelau hepatic LC3-II.

Fodd bynnag, prif gyfyngiad profion awtoffagi *in vivo* yw bod defnyddio atalyddion lysosomaidd fel Baf, CQ a leu, sy'n ofynnol i wirio bod newidiadau mewn mynegiad LC3-II neu nifer awtoffagosomau yn adlewyrchu ysgogiad fflwcs awtoffagig, yn hynod heriol (Klionsky et al., 2021). Yn y bôn, rhaid i weiniad atalydd lysosomaidd *in vivo* achosi cynnydd digon grymus yn mynegiad LC3-II neu nifer awtoffagosomau yn y meinwe sy'n cael ei hastudio, heb achosi canlyniadau iechyd niweidiol yn yr anifail modelig (Klionsky et al., 2021). Ond, cymhlethir hyn gan y ffaith nad yw union ddeinameg a chineteg fflwcs awtoffagig gwaelodol mewn meinweoedd yn hysbys (Klionsky et al., 2021). Felly, efallai na fydd cwrs triniaeth fer, (1-4awr) yn ddigonol ar gyfer achosi'r crynhoad gofynnol o awtoffagosomau, tra gall cyrsiau triniaeth hirach (8-12awr) roi'r crynhoad gofynnol ond maent hefyd yn debygol o achosi canlyniadau iechyd negyddol (Klionsky et al., 2021).

Ar ben hynny, er bod triniaeth berifferol aciwt (1-4awr) (ip, neu icv) gydag atalyddion lysosomaidd yn ddigonol i asesu trosiant LC3-II gwaelodol ac mewn ymateb i newyn mewn meinweoedd fel y galon, yr afu a'r cyhyrau ysgerbydol, nid yw hynny'n wir am yr ymennydd (Klionsky et al., 2021). Mae hyn yn debygol oherwydd treiddiad gwael trwyr BBB, er fel y nodwyd uchod efallai nad yw hyd a chrynodiad y driniaethau yn ddigonol ar gyfer achosi'r crynhoad gofynnol o LC3-II. Mae gweiniad canolog (i.c.v) atalyddion lysosomaidd yn opsiwn ymarferol, fel dengys sawl astudiaeth diweddar (Glatigny et al., 2019; Lee et al., 2019). Fodd bynnag, mae'r dull hwn yn gofyn am weinyddu atalyddion lysosomaidd yn gronig dros gyfnod o ddyddiau.

Mae'n werth nodi hefyd y gal defnydd atalyddion lysosomaidd *in vivo* fod yn annymunol mewn llawer o gynlluniau arbrofol, yn enwedig pan fydd ffenomenau fiolegol heblaw awtoffagi yn cael ei hasesu ochr yn ochr. Felly, oni bai mai awtoffagi yw unig ganolbwynt neu brif canolbwynt yr arbrawf, mae'n debygol y bydd defnyddio atalyddion lysosomaidd *in vivo* yn annichonadwy.



### 4.1.2 Ghrelin ac awtoffagi niwronal: Canfyddiadau o modelau *in vivo*

Fel y trafodwyd ym mhennod 1.6.1, nid yw effaith echel ghrelin ar awtoffagi niwronaidd *in vivo* wedi'i hastudio'n drylwyr. Dengys Wang et al., (2020) fod gweiniad cronig AG yn gwanhau newidiadau ym mynegiad proteinau ATG nigrostriataidd a achosir gan MPTP, tra fod ein cydweithredwyr wedi dangos bod newidiadau ym mynegiad LC3-II, ar ôl niwed MPTP, wedi'i gwrthdroi rhwng llygod ghrelin KO a llygod WT (Bayliss et al., 2016). Felly, mae'r ddwy astudiaeth yn awgrymu awtoffagi fel un o'r mecanweithiau moleciwlaidd sy'n sail i niwroamddiffyniad niwronau dopaminergig nigrostriataidd gan ghrelin. Yn debyg, dengys astudiaeth Zhu et al., (2017) tystiolaeth bod AG yn gwanhau newidadau awtoffagig yng nghyd-destun COH yn llygod mawr gwrywod Sprague Dawley.

### 4.1.3 Nodau ac amcanion

Brif nodau y bennod hon yw:

1. Nodweddu sut mae modiweiddiad echelin ghrelin *in vivo* yn effeithio ar fynegiad proteinau awtoffagi allweddol yn hipocampau cnofilod llawn-dwf.
2. Nodweddu sut mae patrymau bwydo amserol penodol yn effeithio ar awtoffagi *in vivo*, a darganfod os yw'r effeithiau yn dibynnu ar signalu ghrelin-GHS-R.

I gyflawni'r nod cyntaf, bydd IHC yn cael eu defnyddio ar feinwe ymennydd o fodolau llygod sydd a'r addasiadau o brif genynnau echelin ghrelin (h.y Ghrelin<sup>-/-</sup>(KO), GOAT<sup>-/-</sup> (KO), GHS-R<sup>-/-</sup> (LoxTB-GHS-R). Byddaf yn hefyd asesu sut mae driniaeth AG alldarddol yn effeithio ar awtoffagi yng nghyd destun AHN trwy IHC. I gyflawni'r ail nod, bydd WB yn cael eu defnyddio i asesu mynegiad LC3 yn homogenedau ymennydd (ac afu) cnofilod sydd wedi'u bwydo ad libitum, sy'n pori (Gr) neu sydd wedi'u bwydo mewn prydau (MF); gan gynnwys llygod GHS-R<sup>-/-</sup>.

## 4.2 Dulliau a Defnyddiau

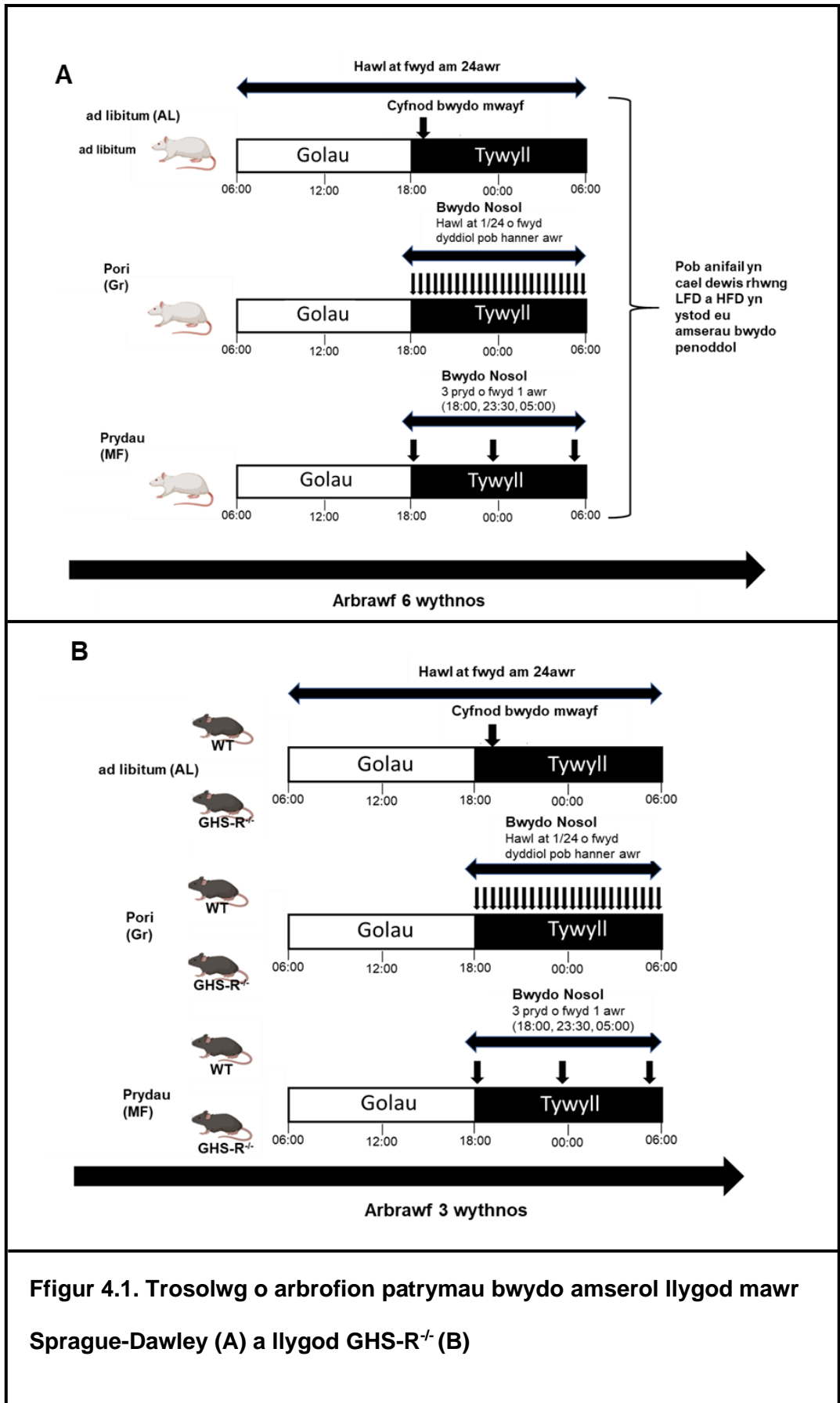
### 4.2.1. Modelau Cnofilod

Gwelir trosolwg o'r modelau cnofilod a ddefnyddir yn yr astudiaeth hon yn nhabl 4.1 isod. Mae manylion pellach am y modelau hyn ym mhennod 2, tra welir trosolwg o'r arbrofion patrymau bwydo ar gyfer arbrofion nod 2 yn ffigurau 4.1

Tabl 4.1. Crynodeb o modelau cnofilod a defnyddir i asesu awtoffagi niwral/niwronal *in vivo*

Model	Cyfeiriad (am fanylion arbrofol)	Dull a defnyddir yn y bennod hon
<b>Nod 1</b>		
Llygod Ghrelin-/- (KO)	Ratcliff et al., 2019	Ni-DAB IHC
Llygod GOAT-/- (KO)	Hornsby et al., 2020	Ni-DAB IHC
Llygod GHS-R-/- (LoxTB-GHS-R)	Hornsby et al., 2016	Ni-DAB IHC
Llygod mawr cfwfwr Listr	Kent et al., 2015	IFHC
<b>Nod 2</b>		
Llygod mawr Sprague-Dawley	Tilston et al., 2019	WB
Llygod GHS-R-/- (LoxTB-GHS-R)	Heb ei cyhoeddi	WB

Dylid pwysleisio na chymerais ran mewn rhediad neu cynlluniad yr arbrofion anifeiliaid hyn. Ddigwyddodd yn labordai ein cydweithwyr mewn sawl prifysgol wahanol, fel y disgrifir yn bennod 2. Fy rhan i oedd defnyddio meinwe sefydlog bio-fanc ar gyfer prosesu IHC, ac i echdynnu proteinau o feinwe wedi'i rewi ar gyfer dadansoddiad WB dilynol.



#### 4.2.2 IHC Ni-DAB

Perfformiwyd IHC Ni-DAB fel y disgrifir ym mhennod 2.3.1.1.2. Ar gyfer optimeiddiaeth gwrthgyrff cynradd gwrth-Beclin-1 cwningen a gwrth p62/SQSTM1 cwningen, gwanedwyd y gwrthgyrff 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:2400 a 1:3200. Ar gyfer arbrofion dilynol a defnyddir meinwe o lygod Ghrelin<sup>-/-</sup>, GOAT<sup>-/-</sup> a GHS-R<sup>-/-</sup>, defnyddiwyd gwanhad 1:2400 am gwrthgyrff Beclin-1, tra defnyddir gwanhad 1:200 am gwrthgyrff p62. Dadansoddwyd delweddau fformat Tif, a delweddir gyda microsgop golau Nikon gyda gwrthrychedd 10x, gyda meddalwedd ImageJ, fel y disgrifir ym mhennod 2.3.1.1.3.

#### 4.2.3 IFHC

Perfformiwyd IFHC fel y disgrifir ym mhennod 2.3.1.2.2. Ar gyfer arbrofion optimeiddiaeth, gwanedwyd gwrthgyrff Beclin-1 a p62, 1:200, 1:400 a 1:800. Ar gyfer IHC fflworoleuedd dwbl Beclin-1 a BrdU, magwyd toriadau dros nos ar 4°C gyda gwrthgyrff cynradd gwrth-BrdU llygod mawr, wedi'i gwanhau 1:400. Y diwrnod wedyn, magwyd y toriadau gyda'r gwrthgyrff cynradd yn erbyn Beclin-1, wedi'i gwanhau 1:200, am 1 awr ar dymheredd ystafell. Defnyddiwyd gwrthgyrff eilaidd gwrth-llygoden fawr AF-488 ar gyfer BrdU a gwrthgyrff eilaidd gwrth-gwningen AF-568 ar gyfer Beclin-1. Codwyd y ddwy gwrthgyrff yn gafr. Ar gyfer IHC fflworoleuedd dwbl Beclin-1 a NeuN, magwyd toriadau dros nos ar 4°C gyda'r gwrthgyrff Beclin-1 (1:200) cyn magu am 1awr gyda'r gwrthgyrff cynradd gwrth-NeuN llygoden (1:1000), ar dymheredd ystafell y diwrnod ar ol hynny. Defnyddiwyd gwrthgyrff eilaidd gwrth -cwningen AF-488 ar gyfer Beclin-1, a gwrth-llygoden AF568 ar gyfer NeuN. Am IHC fflworoleuedd trifflyg Beclin-1, BrdU, NeuN, magwyd toriadau dros nos ar 4°C gyda coctel gwrthgyrff cynradd gwrth-Beclin-1 (1:200), gwrth-BrdU (1:400) a gwrth-NeuN (1:1000). Dilynwyd hyn gan magu gyda gyda choctel gwrthgyrff eilaidd, gwrth-llygoden gafr AF-405 (NeuN), gwrth-llygoden gafr AF-488 (BrdU) ac gwrth-gwningen gafr AF-568 (Beclin-1). Casglwyd delweddau gyda naill

ai microsgop-epi-ffloroleuedd Zeiss axio-vision neu ficrosgop cydfocal Zeiss LSM710. Dadansoddwyd y delweddau a chesglir gyda meddalwedd CellProfiler fel y disgrifir ym mhennod 2.3.1.2.3

#### **4.2.4 Echdynnu protein o feinwe wedi'u rhewi**

Echdynnwyd protein o ymennydd a'r afu cnofilod trwy homogoneiddio talpiau meinwe wedi'u rhewi mewn byffer lysis QIAzol, a gwahanir RNA, DNA a phrotein gyda'r dull ffenol-clorofform wedi hynny. Perfformiwyd y dull hwn gyntaf gyda meinwe o lygod mawr Sprague-Dawley gwrywaidd (a ddisgrifir ym mhennod 2.3.2.1.2), gyda sawl addasiad yn cael ei wneud i'r protocol ar gyfer arbrofion dilynol gyda meinwe o lygod GHS-R<sup>-/-</sup> a llygod WT o'r un torllwyth (disgrifir yn pennod 2.3.2.2.2).

#### **4.2.5 Nodweddiadau WB o echdyniadau protein**

Ar ôl canfod crynodiadau protein gyda'r prawf BCA, gwahanwyd proteinau gan SDS-PAGE, ac ar ôl eu trosglwyddo i bilen PVDF, perfformir imiwnoblotio â gwrthgyrff gwrth-LC3A / B (1: 1000) a naill ai gwrth-GAPDH (1: 50,000) neu gwrth- $\alpha$ -Twbwlin (1: 50,000) fel rheolyddion lwytho. Gwanedwyd yr holl wrthgyrff cynradd mewn 5% BSA yn TBSTween20. Ar gyfer darnau meinwe llygod mawr, gwahanwyd samplau ar geliau 12%. Ar gyfer y darnau llygoden, addaswyd hwn i 15% gel i wella'r gwahaniad rhwng LC3-I a LC3-II.

#### **4.2.6 Meintioli crynodiad AG plasma llygod mawr**

Canfuwyd crynodiad AG ym mhlasma llygod mawr Sprague Dawley gwrywaidd gan ddefnyddio ELISA Active ghrelin fel y disgrifir ym mhennod 2.3.3.

## 4.2.7 Cyflwyniad data a dadansoddiadau ystadegol

### 4.2.7.1 Dadansoddiadau IHC

Ar gyfer cymariaethau o fynegiad Beclin-1 rhwng hipocampau llygod WT a naill ai llygod Ghrelin<sup>-/-</sup> (ffigur 4.2) neu GOAT<sup>-/-</sup> (ffigur 4.3), dadansoddwyd data gan ddefnyddio prawf-t heb bâr. Defnyddiwyd prawf-t heb bâr hefyd i asesu gwahaniaethau mewn cyd-llleoleiddiad BrdU-Beclin-1 rhwng llygod mawr gwfl Lister wedi'u trin ag AG neu Veh (ffigur 4.7). Ar gyfer cymariaethau o fynegiad Beclin-1 rhwng hipocampau llygod GHS-R<sup>-/-</sup> gwrywaidd a benywaidd a llygod WT o'r un dorllwyth, dadansoddwyd data gan ddefnyddio ANOVA Dwyffordd, ac yna prawf cymhariaethau lluosog Tukey i asesu gwahaniaethau genoteip a rhyw benodol.

### 4.2.7.2 Dadansoddiadau WB

Er mwyn cymharu gwahaniaethau mewn mynegiad LC3 a lefelau AG plasma mewn llygod mawr Sprague-Dawley wedi'u bwydo AL, Gr neu MF, dadansoddwyd data gan ddefnyddio ANOVA Unffordd ac yna prawf cymhariaeth lluosog Tukey o'r gwahaniaethau rhwng pob un o'r tri phatrwm bwydo. Aseswyd y cysylltiad rhwng mynegiad LC3 meinweoedd ac AG cylchredol yn ogystal â'r cysylltiadau rhwng LC3 neu AG â chymeriant dietegol, trwy ddadansoddiadau cydberthynas Pearsons.

Ar gyfer yr arbrawf patrwm bwydo gyda llygod GHS-R<sup>-/-</sup>, aseswyd prif effeithiau genoteip a phatrwm bwydo, yn ogystal a'r rhyngweithiad rhwng y dwy ffactor, gyda ANOVA Dwy-ffordd. Defnyddiwyd prawf cymhariaeth lluosog Tukey i asesu gwahaniaethau rhwng y tri patrwm bwydo ar gyfer y dwy genoteip.

## 4.3 Canlyniadau

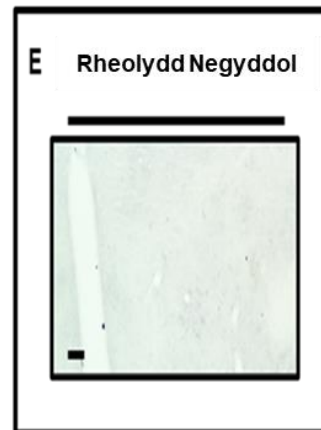
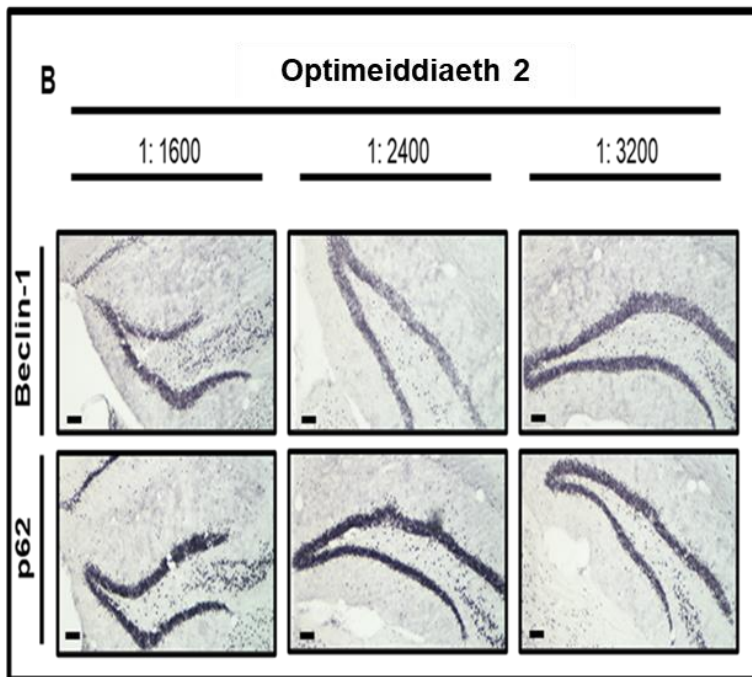
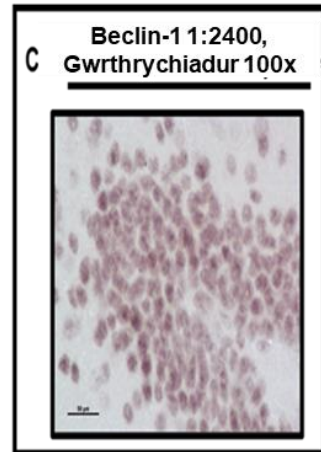
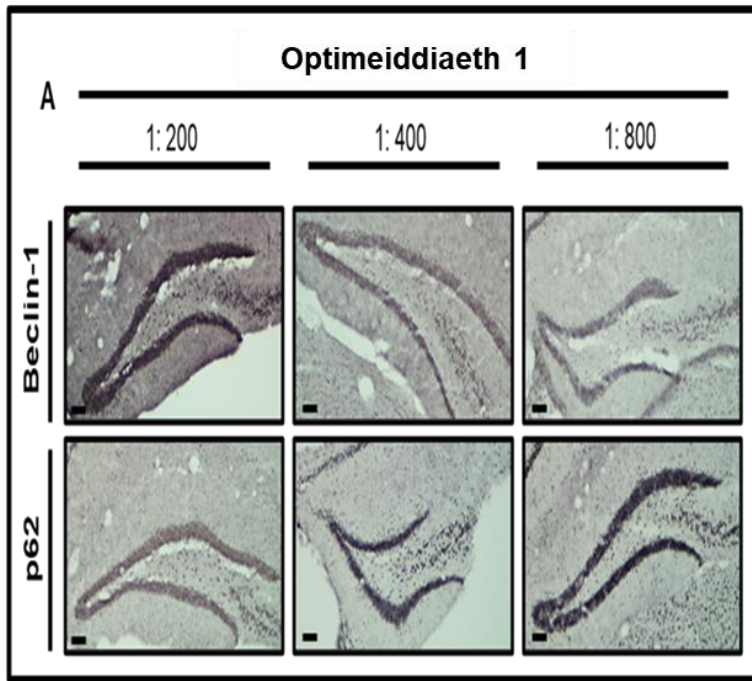
### 4.3.1 Optimeiddiaeth protocolau IHC ar gyfer Beclin-1 a p62

Gan mai IHC ar gyfer LC3 mewndarddol yn heriol (Martinet, Roth, & De Meyer, 2017), a nad oedd modelau trawsgennynol LC3 ar gael, penderfynwyd asesu awtoffagi niwronaidd *in situ* gyda protocolau IHC yn erbyn Beclin-1 a p62.

Fel dengys ffigur 4.2A, rhoddwyd gwrthgyrff gwrth-Beclin-1 a gwrth-p62 imiwoadweithedd, hollbresennol, cryf, a ymddangosir yn gnewyllol neu'n perignewyllol yn bennaf, heb staenio amlwg o brosesau niwronau, gyda gwanediadau 1:200, 1:400 a 1:800. Ni welir imiwoadweithedd tebyg yn toriadau rheolaidd negyddol, a cheith eu drin yn yr un ffordd heb law am y gwrthgyrff cynradd (ffigur 4.2E). Rhoddwyd gwanediadau dilynol o 1:1600, 1:2400 a 1:3200, canlyniadau tebyg i beth welir yn yr optimeiddiaeth gwreiddiol, sy'n dangos bod sensitifrwydd da gan y gwrthgyrff ar gyfer canfod eu thargedau yn meinweoedd llygod llawn dwf, gyda'n protocol IHC-DAB. Gan rhoddwyd gwanediadau 1:2400 ac 1:3200 y canlyniadau mwyaf cyson ar gyfer Beclin-1 a p62, yn ôl eu threfn, dewisir rhain fel y gwanediadau ar gyfer arbrofion IHC-DAB dilynol.

Yn ogystal â Beclin-1 a p62, defnyddiwyd NI-DAB IHC i asesu mynegiad hipocampaid y protein lysosomaidd LAMP1 hefyd, gan ddefnyddio gwrthgorff gwrth-LAMP1 ar gwanediadau o 1: 200, 1: 400 ac 1: 800. Fodd bynnag, ni welwyd imiwoadweithedd positif, ar wahân i'r hyn a welwyd mewn adrannau rheolydd negyddol a magir heb wrthgorff cynradd, gyda'r gwrthgorff hwn (Atodiad B, ffigur B1).

Aseswyd hefyd imiwoadweithedd Beclin-1 a p62 gyda protocol IHC fflworoleuedd. Ond, ni welwyd imiwoadweithedd nodedig wrth i'r gwanediad cynyddu dros 1:400 (Atodiad B, ffigur B2). Felly, o ganlyniad i'r sensitifrwydd gwell, ac hefyd sadrwydd y imiwoadweithedd, defnyddiwyd protocol IHC-DAB er mwyn asesu mynegiad Beclin-1 a p62 yn arbrofion dilynol.





**Ffigur 4.2. Optimeiddiaeth IHC Ni-DAB o wrthgyrff gwrth-Beclin-1 a gwrth-SQSTM-1/p62.** Proseswyd toriadau coronal 30µm o drwch o ymennydd llygod C57BL/6J gyda dull IHC arnofio rhydd, gan defnyddio gwrthgyrff gwrth-Beclin-1 a gwrth-SQSTM1/p62 (wedi'u codi mewn cwningen) at gwanediadau 1:200, 1:400 a 1:800 i ddechrau **(A)** a wedyn 1:1600, 1:2400 a 1:3200 **(B)**. Dengys delweddau cynrychioladol, a chymerwyd gyda wrthrychiadur 10x, bod y dwy gwrthgyrff yn rhoi imiwnoadweithedd cryf ac hollbresennol yn haen celloedd gronigyn (GCL) y DG **(A, B)**. Awrgymwyd delwedd cynrychioladol o imiwnoadweithedd Beclin-1 (1:2400) yn y DG, a chymerwyd gyda wrthrychiadur olew 100x, bod staenio Beclin-1 yn nail ai cnewyllog neu'n peri-nuclear **(C)**, tra gellir weld o'r o'r delwedd cynrychioladol a chymerwyd gyda'r gwrthrychiadur 4x, bod staenio Beclin-1 heb eu gyfyngu i'r DG **(D)**. Ni welir yr imiwnoadweithedd penodol a oedd yn gysylltiedig a wrthgyrff Beclin-1 a p62 yn y rheolydd negyddol, lle magwyd toriadau gyda PBS-T heb unrhyw gwrthgorff cynradd **(E)**. Bariau graddfa yn cynrychioli 100µm am 4x a 10x, ac 50µm am 100x.

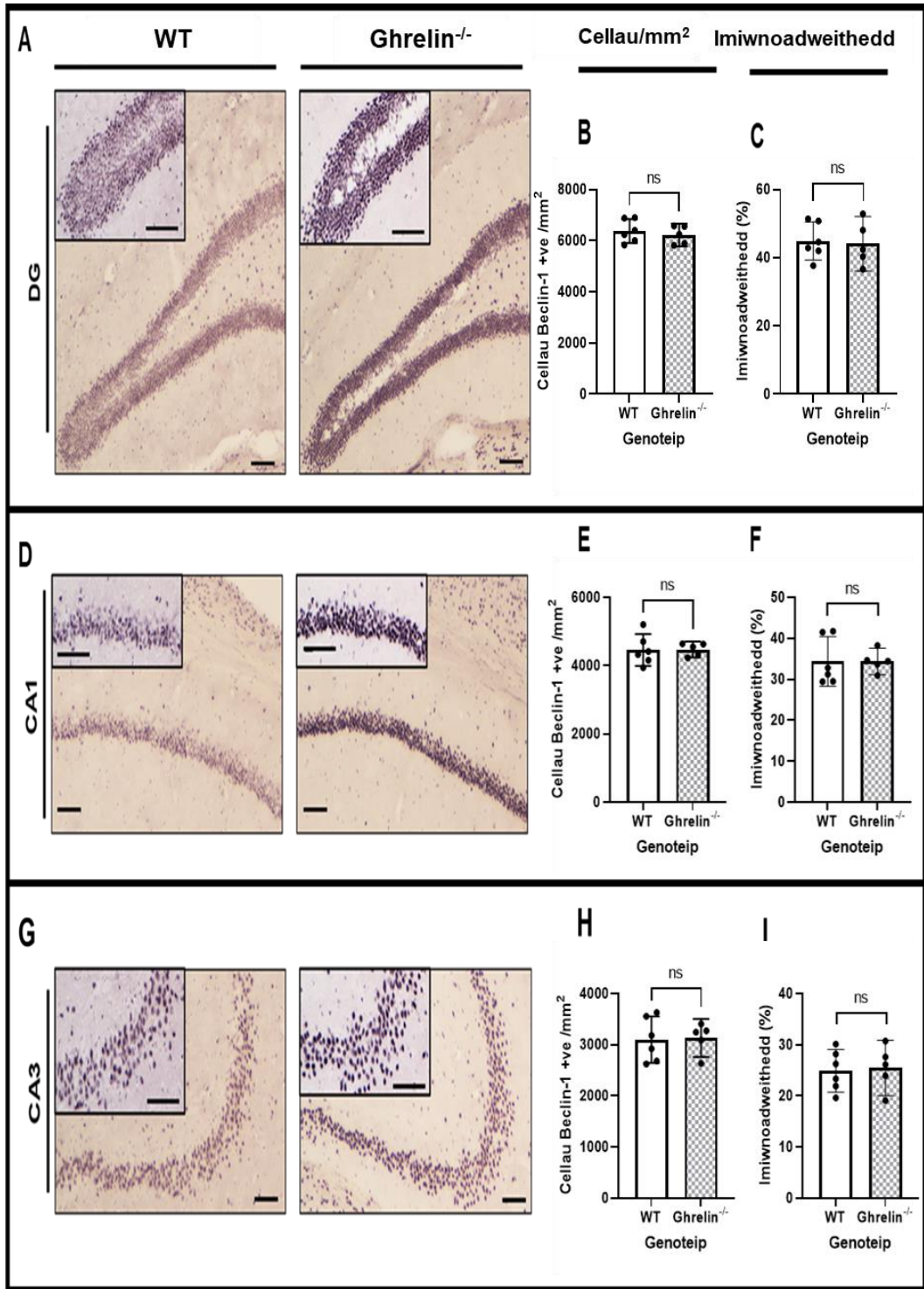
### 4.3.2. Nodwediadau IHC o fynegiad hipocampaidd Beclin-1 yn llygod ghrelin<sup>-/-</sup>, GOAT<sup>-/-</sup> a GHS-R<sup>-/-</sup>

#### 4.3.2.1. Llygod ghrelin<sup>-/-</sup>

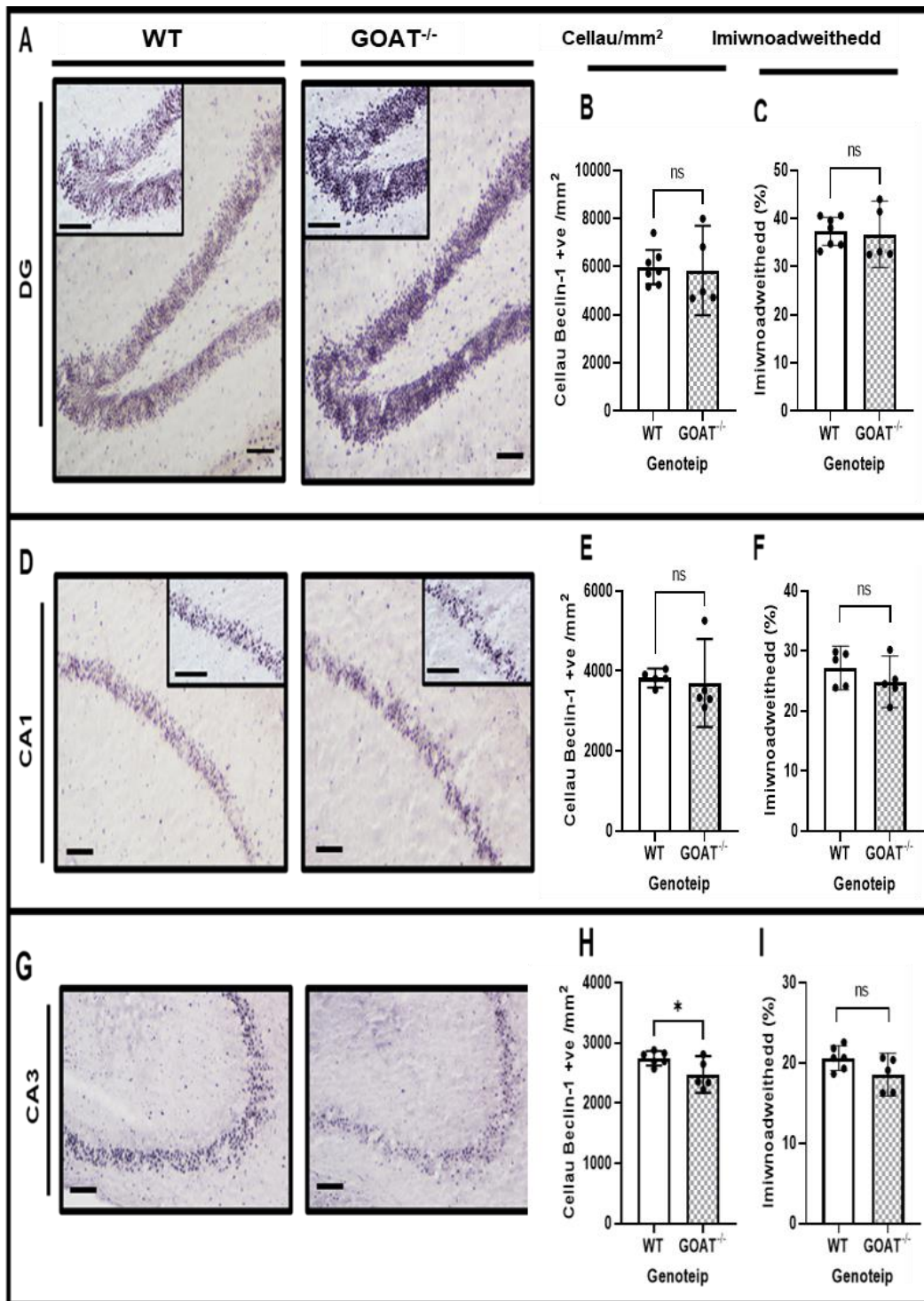
Fel dengys ffigur 4.3, ni welwyd newidiadau amlwg yn fynegiad hipocampaidd Beclin-1 rhwng llygod ghrelin<sup>-/-</sup> a llygod WT o'r un dorllwyth. Yn wir, nid oedd gwahaniaethau arwyddocaol yn y nifer o gelloedd positif (+ve) Beclin-1/mm<sup>2</sup> (DG: P = 0.53; CA1: P = 0.95; CA3: P = 0.89) na imiwnoadweithedd Beclin-1 (DG: P = 0.82; CA1: P = 0.99; CA3: P = 0.82), rhwng llygod ghrelin<sup>-/-</sup> a llygod WT yn unrhyw un o'r rhanbarthau hipocampaidd o dan sylw. Awgrymir y data hwn felly, fod colled mynegiad systemig ghrelin (AG + UAG) ddim yn effeithio ar fynegiad Beclin-1 yn y hipocampws.

#### 4.3.2.2. Llygod GOAT<sup>-/-</sup>

Fel dengys ffigur 4.4, ni wnaeth abladiad genynnol GOAT newid yn arwyddocaol y nifer o gelloedd +ve Beclin-1/mm<sup>2</sup> (DG: P = 0.83; CA1: P = 0.77) neu imiwnoadweithedd Beclin-1 (DG: P = 0.82; CA1: P = 0.29) yn naill ai'r DG neu'r CA1. Ar y llaw arall, gwelwyd lleihad arwyddocaol yn y nifer o gelloedd +ve Beclin-1/mm<sup>2</sup> yn CA3 llygod GOAT<sup>-/-</sup>, mewn cymhariaeth i llygod WT (P = 0.04). Gwelwyd hefyd lleihad cymedrig yn imiwnoadweithedd Beclin-1 yn y CA3, ond nid oedd y lleihad hwn yn arwyddocaol (P = 0.09). Awgrymir y data hwn felly, fod colled mynegiad systemig GOAT, ac felly colled o AG systemig, yn lleihau mynegiad Beclin-1 yn rhanbarth CA3, ond nid rhanbarthau CA1 neu DG y hipocampws.



**Ffigur 4.3. Mynegiad Beclin-1 yn hipocampau llygod ghrelin<sup>-/-</sup> a WT o'r un dorllwyth.** Defnyddiwyd IHC Ni-DAB is asesu mynegiad Beclin-1 yn hipocampau llygod benywol sydd a'r gennyn ghrelin wedi'i ddileu (Ghrelin<sup>-/-</sup>) a llygod math gwyllt (WT) o'r un dorllwyth. Casglwyd delweddau fformat TIF or DG **(A)**, CA1 **(B)**, a CA3 **(G)**, gyda microsgop golau (Nikon) ac wedi hynny, canfuwyd y nifer o gelloedd sy'n bositif am Beclin-1/mm<sup>2</sup> **(B, E, H)** a'r canran o imiwnoadweithedd Beclin-1 **(C, F, I)** gyda ImageJ. Bariau graddfa yn cynrichioli 100 µm. Ni welir unrhyw gwahaniaethau arwyddocaol neu ystyrion rhwng llygod ghrelin KO a WT yn y nifer o gelloedd Beclin-1/mm<sup>2</sup> (DG:P = 0.54; CA1: P = 0.95; CA3: P = 0.89), neu imiwnoadweithedd Beclin-1 (DG: P = 0.82; CA1: P = 0.99; CA3: P = 0.82). Cyflwynir y data fel cymedr gyda 95% CIs, a phlot gwasgariad o'r gwerthoedd ar gyfer pob anifial. Defnyddiwyd praw-t heb bar (yn graphpad Prism) ar gyfer cymhariaethau ystadegol, gyda P = < 0.05 yn cael ei hystyried yn arwyddocaol.



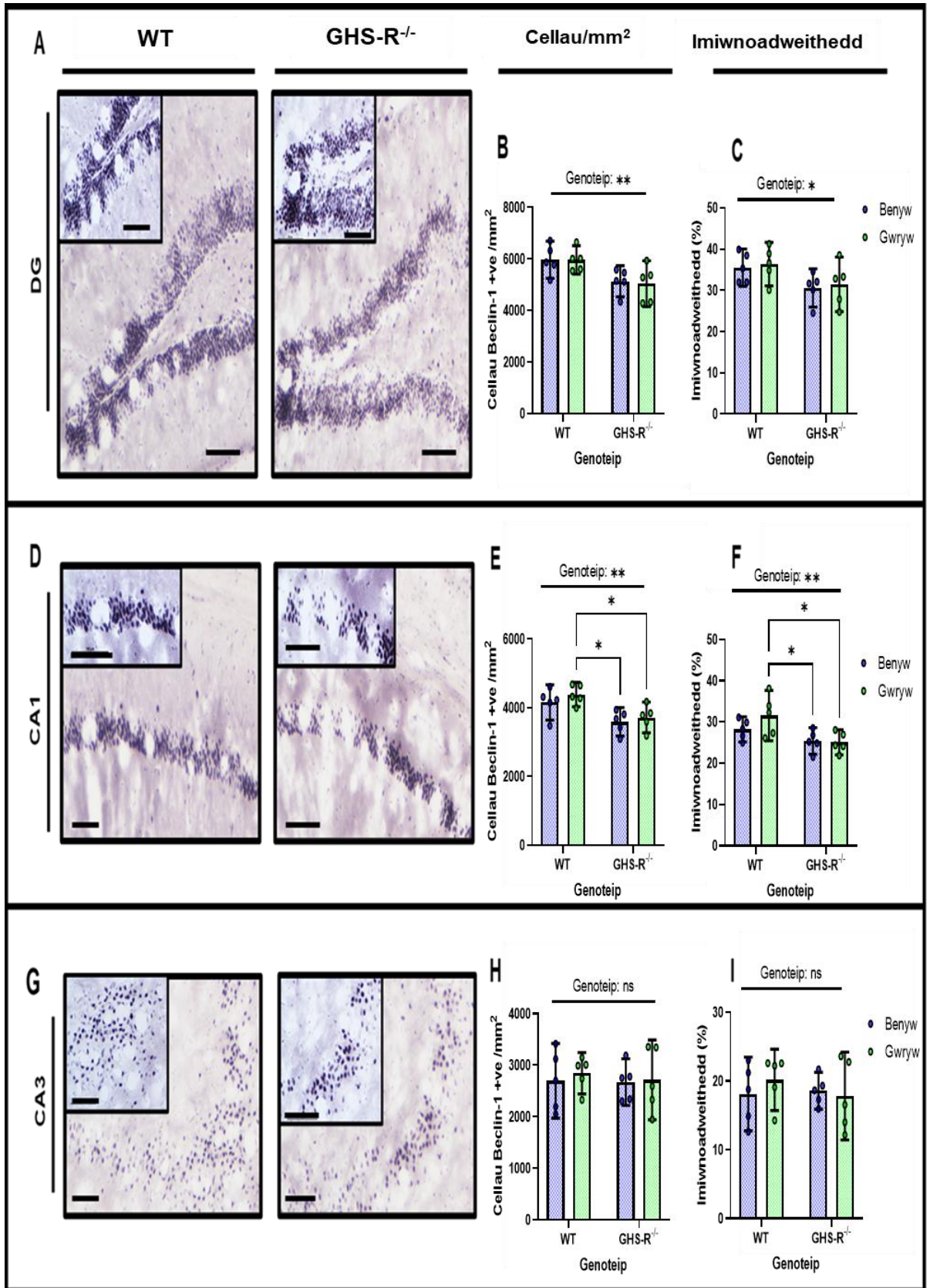
**Ffigur 4.4. Mynegiad Beclin-1 yn hipocampau llygod GOAT<sup>-/-</sup> a WT o'r un dorllwyth.** Defnyddiwyd IHC Ni-DAB is asesu mynegiad Beclin-1 yn hipocampau llygod gwrywol sydd a'r gennyn GOAT wedi'i ddileu (GOAT KO) a llygod math gwyllt (WT) o'r un dorllwyth. Casgwlyd delweddau fformat TIF or DG **(A)**, CA1 **(B)**, a CA3 **(G)**, gyda microsgop golau (Nikon) ac wedi hynny, canfuwyd y nifer o gelloedd sy'n bositif am Beclin-1/mm<sup>2</sup> **(B, E, H)** a'r canran o imiwnoadweithedd Beclin-1 **(C, F, I)** gyda ImageJ. Bariau graddfa yn cynrichioli 100 µm. Er ni welir gwahaniaethau arwyddocoal yn y nifer o gelloedd Beclin-1 +ve/mm<sup>2</sup> rhwng llygod GOAT KO a WT yn y DG (P = 0.82) neu'r CA1 (P = 0.77), yr roedd yna lleihad arwyddocoal yn y nifer o gelloedd Beclin-1 +ve/mm<sup>2</sup> yn CA3 llygod GOAT KO (P = 0.04). Nid oedd gwahaniaethau arwyddocoal rhwng imiwnoadweithedd Beclin-1 yn y DG (P = 0.82), CA1 (P = 0.29) neu'r CA3 (P = 0.09). Cyflwynir y data fel cymedr gyda 95% CIs, a phlot gwasgariad o'r gwerthoedd ar gyfer pob anifial. Defnyddiwyd praw-t heb bar (yn graphpad Prism) ar gyfer cymhariaethau ystadegol, gyda P = < 0.05 yn cael ei hystyried yn arwyddocoal.

#### 4.3.5. Llygod GHS-R<sup>-/-</sup>

Fel dengys ffigur 4.5, gwelwyd lleihad arwyddocaol yn fynegiad Beclin-1 y rhanbarthau DG a CA1 y hipocampws yn llygod GHS-R<sup>-/-</sup>, mewn cymhariaeth i llygod WT o'r un torllwyth. Yr roedd hyn yn amlwg ar gyfer y nifer o gelloedd +ve Beclin-1/mm<sup>2</sup> (DG: P = 0.003; CA1: P = 0.001) ac imwinoadweithedd Beclin-1 (DG: P = 0.02; CA1: P = 0.006). Ar ben hynny, ni dylanwadwyd rhyw y llygod ar y gwahaniaethau a welir ym mynegiad Beclin-1 rhwng anifeiliaid GHS-R<sup>-/-</sup> a WT, gan yr oedd newidiadau tebyg rhwng llygod gwrywol a benywol. Cadarnhawyd dadansoddiad ANOVA Dwyffordd nad oedd prif effaith rhyw, na'r rhyngweithiad rhwng rhyw a genotypeip, yn arwyddocaol neu'n ystyrlon.

Dangosodd gwerthusiad pellach o wahaniaethau genotypeip â phrofion cymariaethau lluosog Tukey fod y gwahaniaethau cymedrig yng nghelloedd Beclin-1 + ve / mm<sup>2</sup> (P = 0.04) ac imiwnoadweithedd Beclin-1 (P = 0.03) rhwng gwrywod WT a GHS-R<sup>-/-</sup> yn ystadegol arwyddocaol yn y CA1. Fodd bynnag, ni welwyd gwahaniaethau arwyddocaol yn y CA1 rhwng menywod WT a GHS-R<sup>-/-</sup>. Ni ddarganfuwyd unrhyw wahaniaethau arwyddocaol rhwng naill ai gwrywod WT a GHS-R<sup>-/-</sup> na menywod WT a nwl GHS-R<sup>-/-</sup> yn y DG chwaith.

Mewn cyferbyniad â'r DG a CA1, nid oedd mynegiad Beclin-1 yn arwyddocaol wahanol rhwng llygod WT a nwl GHS-R yn y CA3 (celloedd / mm<sup>2</sup>: P = 0.73; imiwnoadweithedd: P = 0.61). Yn yr un modd, ni wnaeth rhyw na'r rhyngweithiad rhwng rhyw a genotypeip ddylanwadu'n arwyddocaol ar y data chwaith. Awgrymir y data hyn felly, bod blocâd systemig trawsgrifiad GHS-R, yn lleihau mynegiant hippocampaid Beclin-1 yn y DG a CA1 ond nid yn y CA3.

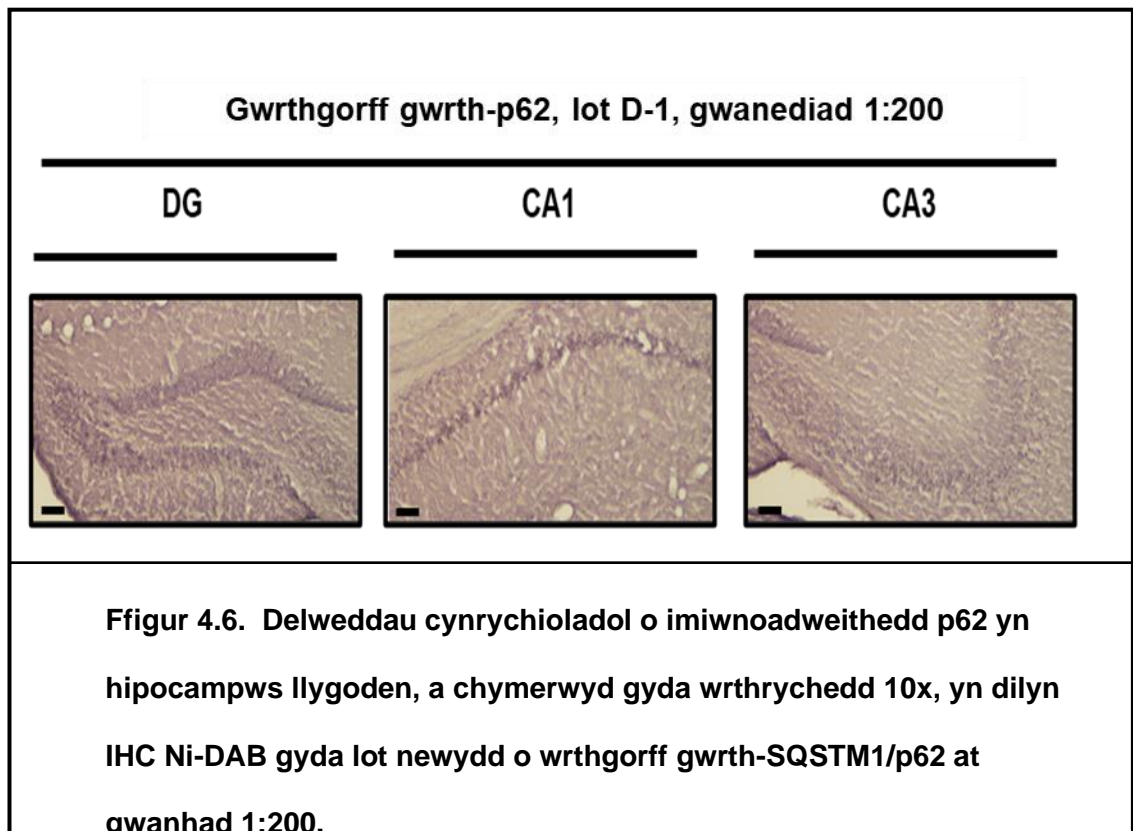




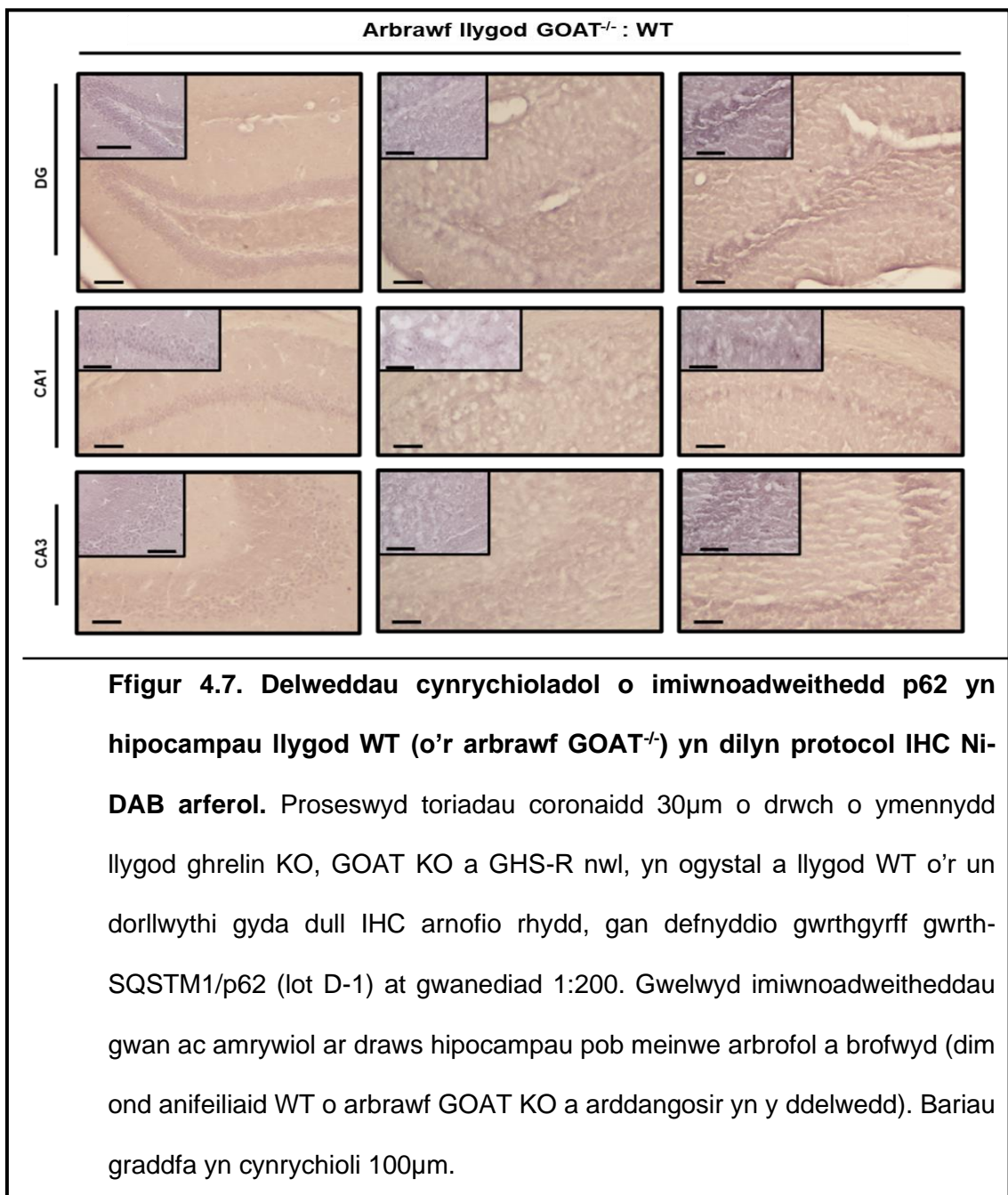
**Ffigur 4.5. Mynegiad Beclin-1 yn hipocampau llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a WT o'r un dorllwyth.** Defnyddiwyd IHC Ni-DAB is asesu mynegiad Beclin-1 yn hipocampau llygod benywol a gwrywol sydd a' blocâd mewn trawsgrifiad y gennyn GHS-R (nwl GHS-R) a llygod math gwyllt (WT) o'r un dorllwyth. Casglwyd delweddau fformat TIF or DG **(A)**, CA1 **(D)**, a CA3 **(G)**, gyda microsgop golau (Nikon) ac wedi hynny, canfuwyd y nifer o gelloedd sy'n positif am Beclin-1/mm<sup>2</sup> **(B, E, H)** a'r canran o imiwnoadweithedd Beclin-1 **(C, F, I)** gyda ImageJ. Bariau graddfa yn cynrychioli 100 µm. Mae'r delweddau cynrychioladol yn dod o anifeiliaid benywol. Yr oedd yna brif effaith arwyddocaol ar gyfer genoteip yn y nifer o gelloedd Beclin-1 positif/mm<sup>2</sup> ac imiwnoadweithedd Beclin-1 yn y DG (**B**: P = 0.003; **C**: P = 0.02) a'r CA1 (**E**: P = 0.001; **F**: P = 0.006), tra hefyd welir gwahaniaethau arwyddocaol rhwng llygod gwrywol WT a llygod gwrywol GHS-R nwl (**E**: P = 0.03; **F**: P = 0.03), ac hefyd llygod benywol GHS-R nwl (**E**: P = 0.01; **F**: P = 0.04) yn y CA1. Ni effeithiwyd genoteip yn arwyddocaol ar mynegiad Beclin-1 yn y CA3). Cyflwynir y data fel cymedr gyda 95% CIs, a phlot gwasgariad o'r gwerthoedd ar gyfer pob anifail. Defnyddiwyd prawf ANOVA dwyffordd gyda phrawf cymhariaeth lluosog Tukey (yn graphpad Prism) ar gyfer cymariaethau ystadegol, gyda P = < 0.05 yn cael ei hystyried yn arwyddocaol.

### 4.3.3. Nodweddu fynegiad p62 yn hipocampau llygod ghrelin<sup>-/-</sup>, GOAT<sup>-/-</sup> a GHS-R<sup>-/-</sup>

Ar ôl cwblhau nodweddiadau Beclin-1 DAB-IHC a disgrifir uchod, symudwyd ymlaen i nodweddu mynegiad p62 yn yr un llygod ghrelin<sup>-/-</sup>, GOAT<sup>-/-</sup> a GHS-R<sup>-/-</sup>. Yn anffodus, ni welwyd yr imiwnoadweithedd cryf ac amlwg a welir yn y arbrofion optimeiddiaeth gyda lot newydd o'r gwrthgorff gwrth p62/SQSTM1 cwningen. Welir hyn yn eglur yn ffigurau 4.6 a 4.2, wrth cymharu imiwnoadweithedd p62 o'r lot wreiddiol (C-1) a'r lot newydd (D-1). Serch hynny, roedd celloedd p62 positif dal i'w weld yn y DG a'r CA1 gyda lot newydd y gwrthgorff, pan gwanedwyd 1:200 (er bod cymhareb signal i sŵn lawer is o gymharu â'r lot gychwynnol). Ymhellach, canfuwyd band ~62kDa, fel y disgwyllir, gyda arbrofion blotio Gorllewinol *in vitro* (gwelir pennod 3).



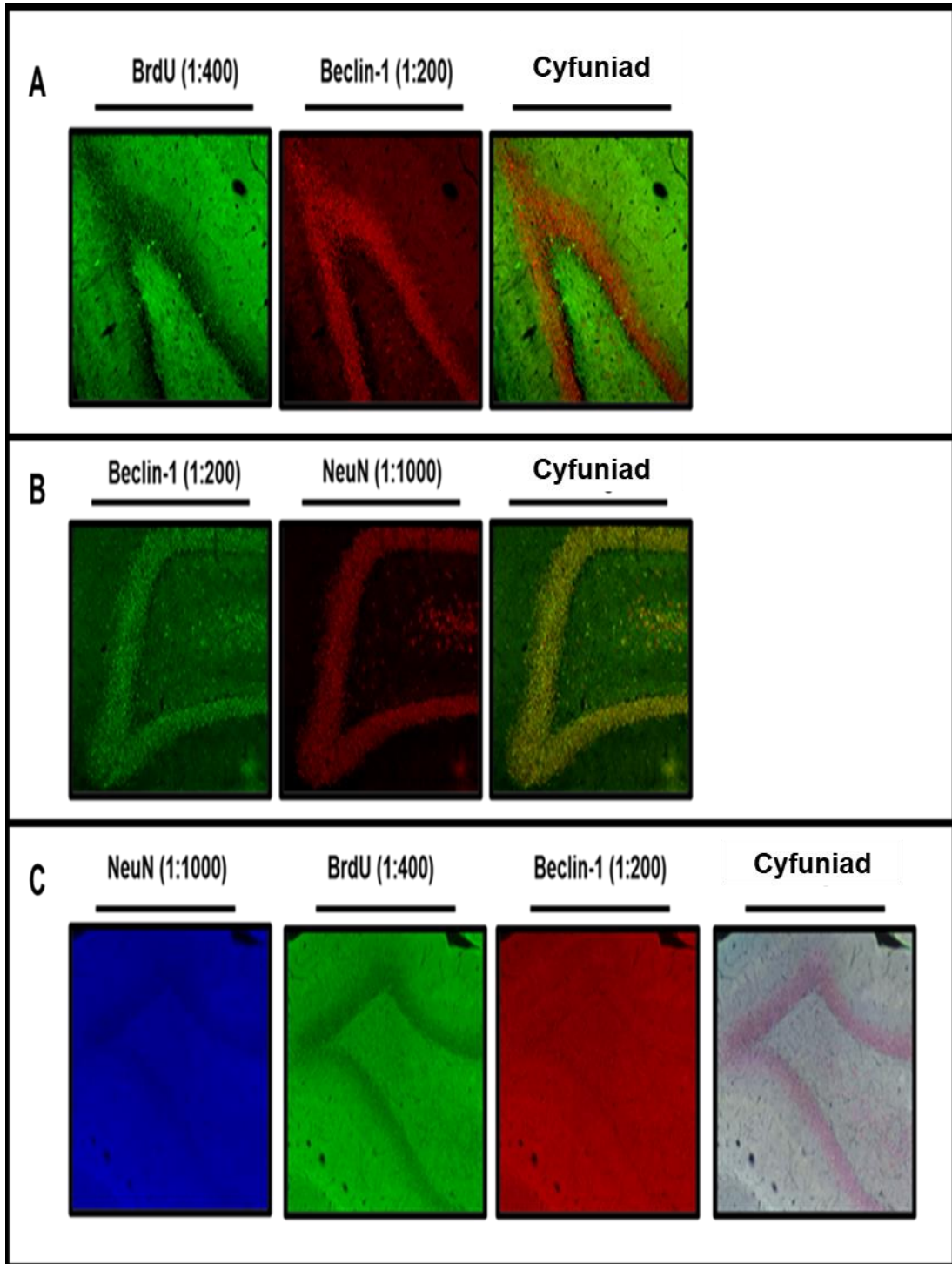
Gan ystyried y ffactorau hyn, penderfynwyd symud ymlaen gyda nodweddiad DAB y meinweoedd  $ghrelin^{-/-}$ ,  $GOAT^{-/-}$  a  $GHS-R^{-/-}$ , er gwaethaf y gwahaniaethau amlwg rhwng lotiau gwrthgorff cychwynol a dilynol. Fodd bynnag, nid oedd yr arbrofion hyn yn llwyddiannus, gan welwyd imiwnoadweithedd hipocampaidd p62 amrywiol ac anghyson ar draws yr holl meinweoedd ag asesir (ffigur 4.7). Ni chasglwyd felly, unrhyw arsylwadau ynglŷn a sut mae echelin signalu ghrelin yn rheoleiddio mynegiad p62 yn y hipocampws.



### **4.3.4 Ymchwiliad i gyd-ileoleiddiad Beclin-1-BrdU yn DG llygod mawr llawn dwf**

#### **4.3.4.1 Optimeiddiaeth protocol IFHC**

Ar ôl defnyddio DAB-IHC i nodweddu effaith abladiad genynnau echelin ghrelin ar fynegiad hipocampaidd Beclin-1, defnyddiwyd IFHC i asesu a yw triniaeth AG yn rheoleiddio Beclin-1 yng nghyd-destun AHN. I'r perwyl hwnnw, sefydlwyd protocol IF triphlyg i asesu mynegiad Beclin-1 mewn celloedd BrdU-NeuN positif (sy'n arwydd o niwronau newydd-anedig) yn y DG. Defnyddiwyd toriadau o llygod mawr gwfl-Lister a geith eu trin gyda naill ai AG neu veh (hydoddiant halwynog), a'i chwistrellu â BrdU fel rhan o'r arbrofion a disgrifir yn Kent et al., (2015). Ond, fel dengys ffigur 4.8, ni ildiwyd y protocol triphlyg IF hwn yr imiwnoadweitheddau a welir pan defnyddir unrhyw ddau o'r gwrthgyrff gyda'i gilydd (IF dwbl). Aseswyd imiwnoadweithedd Beclin-1 felly, mewn celloedd BrdU positif heb gyd-labelu NeuN, gyda'r cafeat na all y dull hwn wahaniaethu rhwng niwronau newydd-anedig a chelloedd newydd-anedig arall.



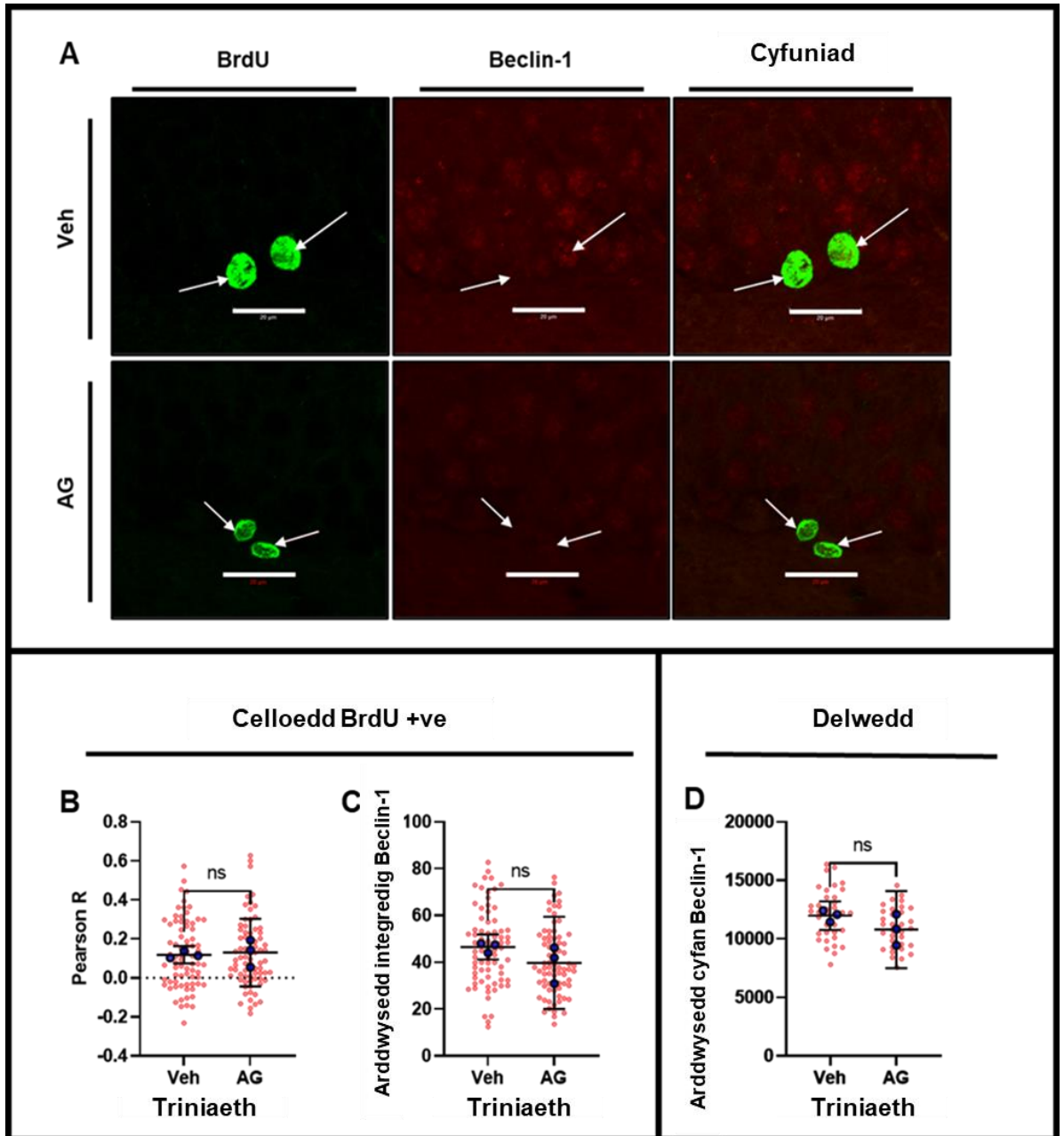
**Ffigur 4.8. Optimeiddiaeth o brotocol imiwnoffloroleuedd lluosog ar gyfer canfod mynegiad Beclin-1 yn niwronau newydd anedig yn DG llygod mawr.** Proseswyd toriadau coronal ymennydd llygod mawr gwfwllister gyda protocol IHC imiwnoffloroleuedd (IF) dilyniannol dwbl gan defnyddio gwrthgyrff gwrth-BrdU (wedi'i codi mewn llygod mawr; gwanhad 1:400), a gwrth-Beclin-1 (wedi'i codi mewn cwningen; gwanhad 1:20) **(A)** neu gwrth Beclin-1 (1:200) ac gwrth NeuN (wedi'i codi mewn llygoden; gwanhad 1:1000). I asesu imiwnoadweithedd BrdU, Beclin-1 a NeuN yn yr un doriadau, defnyddiwyd protocol IF triphlyg gyda coctel o'r holl gwrthgyrff cynradd (BrdU: 1:400; Beclin-1: 1:200; NeuN: 1:1000), yn lle protocol dilyniannol **(C)**. Gwelwyd imiwnoffloroleuedd penodol ar gyfer yr antigenau dan sylw gyda'r protocolau dilyniannol dwbl, ond ni welir unrhyw imiwnoadweithedd penodol gyda'r protocol coctel triphlyg.

#### 4.3.7.2. Nodweddu effaith AG ar cyd-lleoleiddiad Beclin-1-BrdU yn y DG

Yn dilyn optimeiddiaeth, aseswyd cyd-lleoleiddiad Beclin-1-BrdU yn DG rostral adrannau coronaidd yr ymennydd o dri llygod mawr gwfl Lister a chafodd eu trin gyda AG a tri a chafodd eu trin gyda Veh.

Fel dengys ffigur 4.9, yr roedd cydberthynas gwan rhwng arddwysedd Beclin-1 ac arddwysedd BrdU yng nghelloedd BrdU, ar gyfer thriniaethau AG ac Veh. Fel disgwylir, nid oedd y gwahaniaeth rhwng y driniaethau yn arwyddocaol ( $P = 0.80$ ). Gwelwyd gostyngiad bach yn yr arddwysedd integredig (swm yr holl bicseli mewn gwrthrych) cymedrig Beclin-1 tu fewn i celloedd BrdU positif, gyda thriniaeth AG. Serch hynny, nid oedd y gostyngiad hon yn arwyddocaol ( $P = 0.22$ ). Ymhellach, roedd arddwysedd cyfan (swm yr holl bicseli yn y delwedd) Beclin-1 hefyd yn is ar gyfer triniaeth AG o'i gymharu â Veh. Ond eto nid oedd yr effaith hyn yn arwyddocaol ( $P = 0.22$ ).

Awgrymir y data hwn felly, fod AG ddim yn rheoleiddio mynegiad Beclin-1 yng nghelloedd newydd-anedig yn DG llygod mawr llawn-dwf.





**Ffigur 4.9. Mynegiad Beclin-1 a BrdU yn DG llygod mawr cwfwl-Lister**

**sydd wedi'u trin gyda AG neu Veh.** Proseswyd toriadau ymennydd coronal o dri llygod mawr gwfwl Lister a cheith eu drin gyda AG a dri llygod mawr a cheith eu drin gyda Veh (saline) (pob anifail hefyd wedi'u gweini gyda BrdU), gyda protocol IF dilynol dwbl a gwrthgyrff gwrth-BrdU (1:400) a gwrth-Beclin-1 (1:200). Aseswyd imiwnoffloroleuedd BrdU a Beclin-1 wedi hynny, yn y DG rostral, gan defnyddio microsgop cydffocal LSM710 (Zeiss) gyda gwrthrychedd olew 63x. Cymerwyd staciau-Z o gelloedd BrdU positif, a'r holl gelloedd Beclin-1 positif yn yr un meysydd gweld, a'u trosi i tafluniadau arddwysedd uchaf (MIPs) **(A)**. Bariau graddfa yn cynrychioli 20µm, gyda saethau yn dynodi celloedd BrdU positif. Mesurwyd arddwyseddau BrdU, Beclin-1 a'r cyd-lleoleiddiad rhyngddynt, yn y MIPs gan defnyddio piblinell CellProfiler lled-awtomataidd. Dengys canlyniadau'r dadansoddiad ni wnaeth AG effeithio'n arwyddocaol ar cyd-lleoleiddiad picseli BrdU-Beclin-1 ( $P = 0.80$ ) **(B)**, arddwysedd integredig Beclin-1 yng nghelloedd BrdU positif ( $P = 0.22$ ) **(C)**, neu arddwysedd cyfan Beclin-1 ar draws yr holl delweddau ( $P = 0.22$ ) **(D)**. Cyflwynir y data fel cymedr gyda 95% CIs o dri dyblygiad annibynnol gyda'r dosbarthiadau cyfan o gelloedd BrdU positif **(B, C)** neu delweddau **(D)**, wedi'u ddangos oddi tano. Defnyddiwyd praw-t heb bar (yn graphpad Prism) ar gyfer cymariaethau ystadegol, gyda  $P = < 0.05$  yn cael ei hystyried yn arwyddocaol.

#### 4.3.5. Nodweddïadau WB o awtoffagi niwral a hepatig yn cnofilod sydd ar patrymau bwydo amserol

Ar ôl cwblhau'r dadansoddiadau IHC, defnyddiwyd blotio Gorllewinol i asesu mynegiad protein LC3 (LC3-II, LC3-I, LC3-II / LC3-I) mewn homogenadau ymennydd cnofilod wedi'u rhewi. Yn anffodus, ni chasglwyd meinwe ymennydd wedi'i rewi o'r modelau cnofilod a nodweddir yn flaenorol (adrannau 4.3.1 i 4.3.4) fel rhan o'r arbrofion hynny, ac o ganlyniad nid oedd modd cadarnhau'n uniongyrchol ganfyddiadau IHC.

Fodd bynnag, darparodd arbrofion cyfredol gyda'n cydweithiwr Dr Tim Wells o Brifysgol Caerdydd, cyfle i ymchwilio ymhellach i'r berthynas rhwng echelin ghrelin ac awtoffagi yng nghyd-destun *in vivo* perthnasol. Roedd yr arbrofion hyn, a darlunnir ar dechrau'r pennod yn ffigur 4.1, yn asesu effeithiau niwroendocrin a metabolaid patrymau bwydo amserol penodol, sef pori (grazing-Gr) a bwydo gyda phrydau (Meal-feeding) (Tilston et al., 2019).

Yn yr arbrawf cyntaf, cafodd llygod mawr Sprague Dawley gwrywaidd eu bwydo'n ad libitum (AL), Gr neu MF am 6 wythnos (42 diwrnod). Yn ogystal a effaith y patrymau bwydo, roedd yr arbrawf hyn hefyd yn asesu dewisiad dietegol rhwng diet braster isel (LFD) a diet braster uchel (HFD). Roedd yr anifeiliaid felly yn cael hawl i bwyta LFD a HFD yn ystod eu amserau bwydo penodol ar bob dydd o'r arbrawf.

Yn yr ail arbrawf, a chafodd eu cyflawni ar ôl i ni ennill grant o'r 'British Society for Neuroendocrinology' (BSN), cafodd llygod GHS-R<sup>-/-</sup> (loxTB-GHS-R) a lygod WT (C57BL/6) eu bwydo AL, Gr neu MF am dair wythnos (21 diwrnod). Yn gwahanol i'r arbrawf cynt, nid oedd dewis dyddiol rhwng LFD a HFD yn yr arbrawf hyn; ond darparwyd dewis LFD a HFD ar diwrnod 13. Hefyd, o ganlyniad i'r pandemig COVID 19, roedd rhaid newid y protocolau ar gyfer casglu meinweoedd ar gyfer yr

arbrawf hyn. Felly, tra oedd modd dyrannu'r blaen-ymennydd i rhanbarthau cortigol a hipocampaidd yn yr arbrawf cyntaf, nid oedd modd gwneud hyn yn yr arbrawf dilynol.

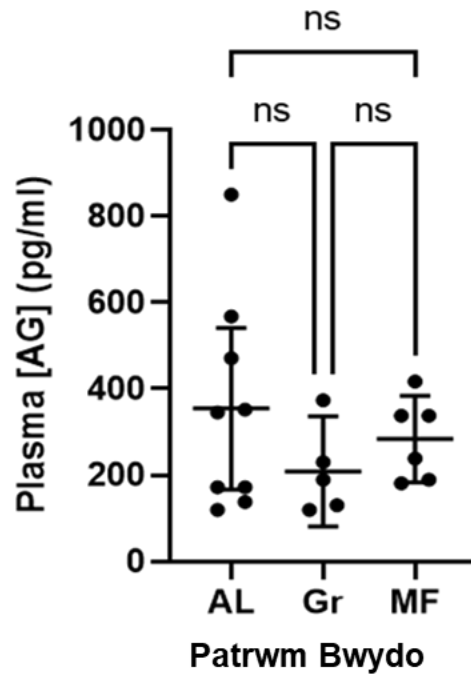
Dylid nodi cafodd samplau afu o'r arbrofion uchod eu prosesu ar gyfer LC3 WB, yn ogystal a samplau'r ymennydd. Y rheswm yw bod gan yr afu a'r ymennydd wahaniaethau sefydledig yn eu cymarebau LC3-II/LC3-I gwaelodol; gyda mynegiad LC3-I sydd lawer mwy na LC3-II yn yr ymennydd, a mynegiad mwy cyfartal o'r ddwy ffurf yn yr afu (Klionsky et al., 2021). Felly, pe bai mynegiad LC3-II homogenedau meinwe'r ymennydd yn isel neu'n rhy wael i'w feintio'n ddibynadwy, yna byddai'r samplau afu yn darparu dull amgen o feintio mynegiad *in vivo* LC3-II a chysylltu hyn â modiweiddiad echelin ghrelin.

#### 4.3.5.1. Arbrawf llygod mawr Sprague Dawley

##### 4.3.5.1.1. Data ELISA o grynodiad plasma terfynol asyl-ghrelin

Gan nad oedd modwleiddiad ffarmacolegol neu genynnol o'r echelin ghrelin yn yr arbrawf llygod mawr, roedd rhaid asesu'r cydberthynas rhwng mynegiad LC3 y meinweoedd a lefelau AG cylchredol ar y pwynt terfyn arbrofol, er mwyn gysylltu newidiadau *in vivo* yn awtoffagi i echelin ghrelin. Defnyddiwyd felly, prawf ELISA active-ghrelin i meintio crynodiadau AG yn plasma'r llygod mawr.

Dengys canlyniadau'r ELISA bod gan anifeiliaid Gr lleihad ar gyfartaledd yn lefelau AG cylchredol mewn cymhariaeth i anifeiliaid sy'n bwyta'n AL neu MF (ffigur 4.10). Fodd bynnag, nid oedd y gwahaniaethau hyn yn ystadegol arwyddocaol (AL vs Gr:  $P = 0.34$ ; AL vs MF:  $P = 0.74$ ; Gr vs MF:  $P = 0.78$ ). Felly, ni wnaeth patrwm bwydo ddyllanwadu'n sylweddol ar lefelau asyl-ghrelin cylchredol ar pwynt terfynol yr arbrawf.



**Ffigur 4.10. Crynodiad plasma AG terfynol llygod mawr Sprague**

**Dawley.** Canfuwyd crynodiadau AG yn samplau plasma, wedi'u rhewi, o llygod mawr Sprague-Dawley, a bwydir ad libitum (AL), pori (Gr) neu gyda phrydiau (MF), gan defnyddio ELISA active-ghrelin rat/mouse. Dengys canlyniadau'r ELISA bod crynodiadau plasma AG ar diwedd yr arbrawf heb wedi'u newid yn arwyddocaol rhwng y tri patrwm bwydo (AL vs Gr:  $P = 0.34$ ; AL vs MF:  $P = 0.74$ ; Gr vs MF:  $P = 0.77$ ). Cyflwynir y data fel cymedr gyda 95% CIs a phlot gwasgariad o gwerthoedd pob anifail. Defnyddiwyd prawf ANOVA unffordd gyda phrawf lluosog Tukey (yn graphpad Prism) ar gyfer cymariaethau ystadegol, gyda  $P = < 0.05$  yn cael ei hystyried yn arwyddocaol.

#### 4.3.5.1.2. Data WB LC3 cortigol a'i cydberthyniad ag AG cylchredol

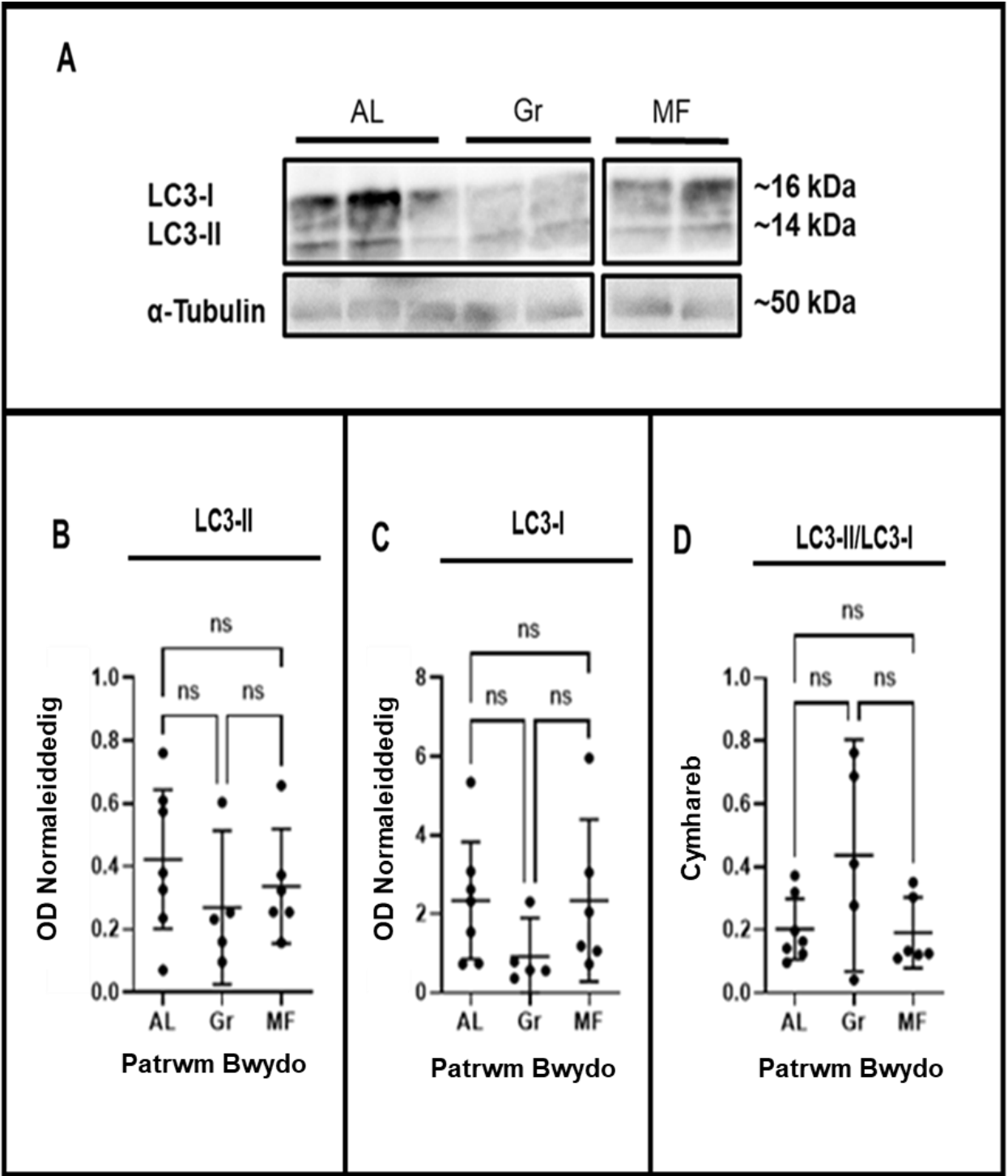
Dengys nodweddiad WB o fynegiad LC3 cortigol bod gan anifeiliaid Gr mynegiad LC3-II (ffigur 4.11B) ac LC3-I (ffigur 4.11C) is ar gyfartaledd nag anifeiliaid AL ac MF. Ar y llaw arall, roedd cymhareb LC3-II/LC3-I (ffigur 4.11D) yn uwch mewn anifeiliaid Gr na rhai AL ac MF. Fodd bynnag, nid oedd unrhyw un o'r gwahaniaethau uchod yn arwyddocaol (ffigur 4.11; Atodiad B).

Ymhellach, ni welir unrhyw gydberthyniadau arwyddocaol rhwng mynegiad LC3 cortigol a lefelau AG cylchredol (Atodiad B).

#### 4.3.5.1.3. Data WB LC3 hypothalamig a'i cydberthyniad ag AG cylchredol

Dengys nodweddiad WB o fynegiad LC3 hypothalamig bod gan anifeiliaid MF mynegiad LC3-II (ffigur 4.12B) cymedrig is mewn cymhariaeth ac anifeiliaid AL a Gr. Ar y llaw arall, nid oedd gwahaniaeth nodedig ym mynegiad cymedrig LC3-I (ffigur 4.12C) rhwng y tri grŵp. Roedd cymhareb LC3-II/LC3-I (ffigur 4.12D) hefyd yn is ar gyfartaledd ar gyfer anifeiliaid MF na rhai AL ac Gr. Ond, fel gyda'r data cortigol, nid oedd y gwahaniaethau cymedrig ym mynegiad LC3 rhwng y grwpiau yn arwyddocaol (ffigur 4.12; Atodiad B).

Yn debyg, nid oedd unrhyw gydberthyniadau arwyddocaol rhwng lefelau AG cylchredol a mynegiad LC3 hypothalamig (Atodiad B).



**Ffigur 4.11. Effaith patrymau bwydo amserol ar mynegiad LC3 cortigol llygod mawr Sprague-Dawley.**

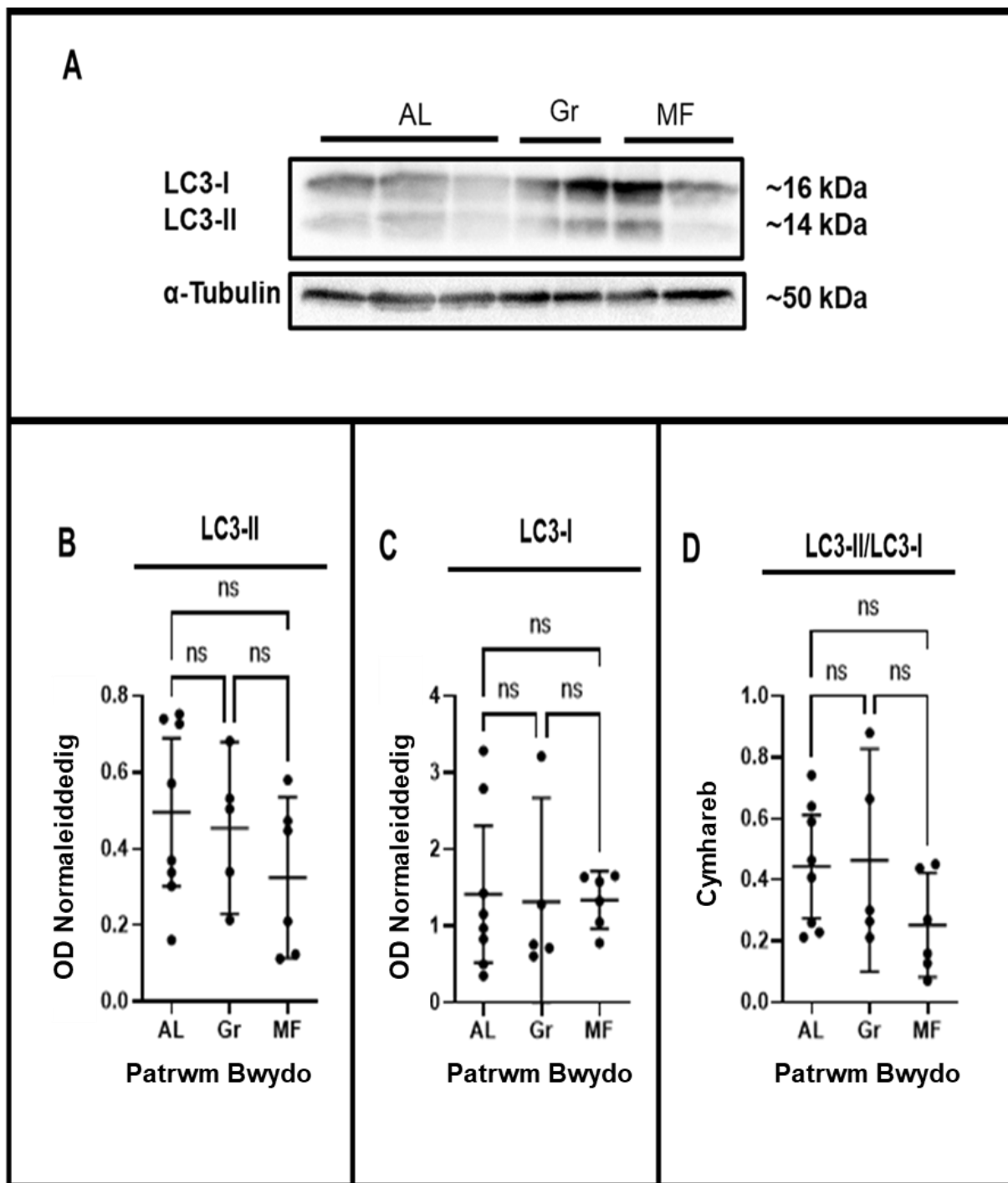
**A).** *Blot gorllewinol cynrychioladol o imiwnoadweithedd LC3 ac  $\alpha$ -Twbwlin.*

Bwydodd llygod mawr gwrywaidd Sprague-Dawley ar patrymau bwydo ad libitum (AL), pori (Gr) a phrydau (MF) am 6-wythnos, gyda dewis dyddiol o diet braster isel (LFD) a diet braster uchel (HFD). Echdynnwyd protein o homogenadau cortigol y llygod mawr trwy dull ffenol-clorofform, gan defnyddio byffer lysis 5% SDS (w/v) i hydoddi'r protein. Gwahanwyd y protein a echdynnir ar gel SDS-PAGE 12%, cyn canfod LC3-II a LC3-I gyda gwrthgorff gwrth LC3A/B (wedi'i codi mewn cwningen). Defnyddiwyd  $\alpha$ -twbwlin fel rheolydd llwytho.

**(B-D).** *Cymariaethau ystadegol o dwyseddau optegol normaleiddedig LC3-II*

*a LC3-I, a chymhareb LC3-II/LC3-I.* Ni canfuwyd unrhyw gwahaniaethau arwyddocaol rhwng dwyseddau optegol normaleiddedig LC3-II (AL vs Gr:  $P = 0.43$ ; AL vs MF:  $P = 0.74$ ; Gr vs MF:  $P = 0.85$ ), LC3-I (AL vs Gr:  $P = 0.3$ ; AL vs MF:  $P = >0.99$ ; Gr vs MF:  $P = 0.33$ ) neu cymhareb LC3-II/LC3-I (AL vs Gr:  $P = 0.1$ ; AL vs MF:  $P = 0.99$ ; Gr vs MF:  $P = 0.09$ ). Cyflwynir y data fel cymedr gyda 95% CIs a phlot gwasgariad o gwerthoedd pob anifail.

Defnyddiwyd prawf ANOVA unffordd gyda phrawf cymariaethau lluosog Tukey (yn graphpad Prism) ar gyfer cymariaethau ystadegol, gyda  $P = < 0.05$  yn cael ei hystyried yn arwyddocaol.





**Ffigur 4.12. Effaith patrymau bwydo amserol ar mynegiad LC3 hypothalamig llygod mawr Sprague-Dawley.**

**A).** *Blot gorllewinol cynrychioladol o imiwnoadweithedd LC3 ac  $\alpha$ -Twbwlin.*

Bwydodd llygod mawr gwrywaidd Sprague-Dawley ar patrymau bwydo ad libitum (AL), pori (Gr) a phrydau (MF) am 6-wythnos, gyda dewis dyddiol o diet braster isel (LFD) a diet braster uchel (HFD). Echdynnwyd protein o homogenadau hypothalamig y llygod mawr trwy dull ffenol-clorofform, gan defnyddio byffer lysis 5% SDS (w/v) i hydoddi'r protein. Gwahanwyd y protein a echdynnir ar gel SDS-PAGE 12%, cyn canfod LC3-II a LC3-I gyda gwrthgorff gwrth LC3A/B (wedi'i codi mewn cwningen). Defnyddiwyd  $\alpha$ -twbwlin fel rheolydd llwytho.

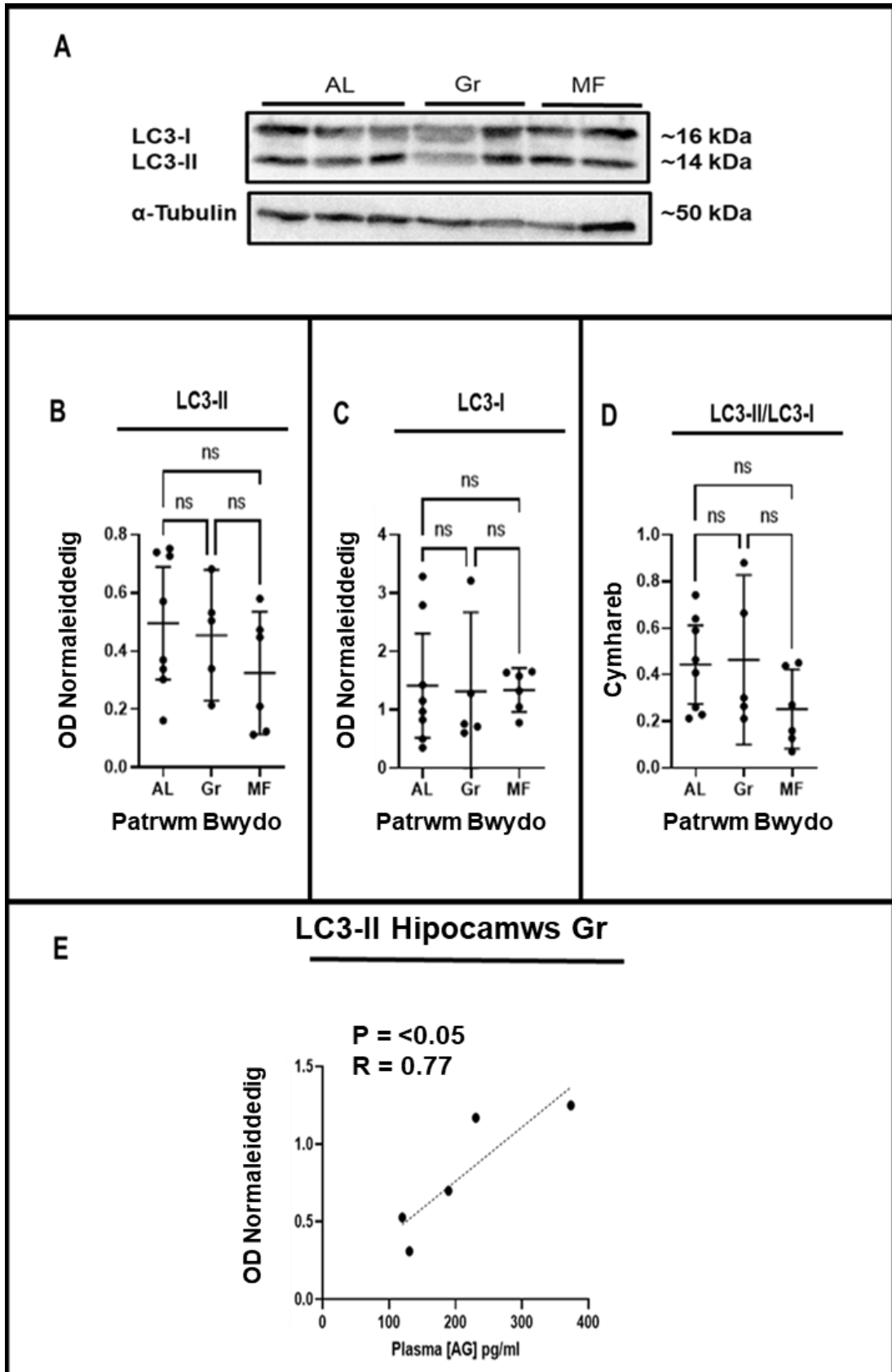
**(B-D).** *Cymariaethau ystadegol o dwyseddau optegol normaleiddedig LC3-II*

*a LC3-I, a chymhareb LC3-II/LC3-I.* Ni canfuwyd unrhyw gwahaniaethau arwyddocaol rhwng dwyseddau optegol normaleiddedig LC3-II (AL vs Gr:  $P = 0.93$ ; AL vs MF:  $P = 0.32$ ; Gr vs MF:  $P = 0.58$ ), LC3-I (AL vs Gr:  $P = 0.98$ ; AL vs MF:  $P = 0.99$ ; Gr vs MF:  $P = >0.99$ ) neu cymhareb LC3-II/LC3-I (AL vs Gr:  $P = 0.98$ ; AL vs MF:  $P = 0.27$ ; Gr vs MF:  $P = 0.27$ ). Cyflwynir y data fel cymedr gyda 95% CIs a phlot gwasgariad o gwerthoedd pob anifail. Defnyddiwyd prawf ANOVA unffordd gyda phrawf cymariaethau lluosog Tukey (yn graphpad Prism) ar gyfer cymariaethau ystadegol, gyda  $P = < 0.05$  yn cael ei hystyried yn arwyddocaol.

#### 4.3.5.1.4. Data WB LC3 hipocampaidd a'i cydberthyniad ag AG cylchredol

Dengys nodweddiad WB o fynegiad LC3 hipocampaidd fod gan anifeiliaid Gr mynegiad LC3-II (ffigur 4.13B) a mynegiad LC3-I (ffigur 4.13C), uwch ar gyfartaledd, o gymharu ag anifeiliaid AL ac MF. Ar y llaw arall, roedd cymhareb LC3-II/LC3-I cymedrig (ffigur 4.13D), yn is ar gyfer anifeiliaid Gr o gymharu ag rhai AL ac MF. Yn yr un modd a rhanbarthau eraill yr ymennydd a asesir, nid oedd yr un o'r gwahaniaethau am fynegiad LC3 rhwng y tri grŵp yn arwyddocaol (ffigur 4.13; Atodiad B).

Er hynny, welir cydberthyniad arwyddocaol rhwng mynegiad LC3-II hipocampaidd a lefelau AG cylchredol ar gyfer anifeiliaid Gr (ffigur 4.12E;  $P = <0.05$ ). Ni welir unrhyw gydberthnasau arwyddocaol eraill rhwng mynegiad LC3 hipocampaidd a lefelau AG cylchredol. Gallai'r data hyn awgrymu fod AG mewndarddol yn dylanwadu ar awtoffagi hipocampaidd o dan amodau dietegol penodol (pori). Fodd bynnag, o gofio bod y dadansoddiad yn gydberthynol, ac yn cynnwys dim ond pump dyblygiad annibynnol, dylid dehonglir canfyddiad hwn yn ofalus.



**Ffigur 4.13. Effaith patrymau bwydo amserol ar mynegiad LC3**

**hipocampaidd llygod mawr Sprague-Dawley.**

**A).** *Blot gorllewinol cynrychioladol o imiwnoadweithedd LC3 ac  $\alpha$ -Twbwlin.*

Bwydodd llygod mawr gwrywaidd Sprague-Dawley ar patrymau bwydo ad libitum (AL), pori (Gr) a phrydau (MF) am 6-wythnos, gyda dewis dyddiol o diet braster isel (LFD) a diet braster uchel (HFD). Echdynnwyd protein o homogenadau hipocampaidd y llygod mawr trwy dull ffenol-clorofform, gan defnyddio byffer lysis 5% SDS (w/v) i hydoddi'r protein. Gwahanwyd y protein a echdynnir ar gel SDS-PAGE 12%, cyn canfod LC3-II a LC3-I gyda gwrthgorff gwrth LC3A/B (wedi'i codi mewn cwningen). Defnyddiwyd  $\alpha$ -twbwlin fel rheolydd llwytho.

**(B-D).** *Cymariaethau ystadegol o dwyseddau optegol normaleiddedig LC3-II*

*a LC3-I, a chymhareb LC3-II/LC3-I.* Ni canfuwyd unrhyw gwahaniaethau arwyddocaol rhwng dwyseddau optegol normaleiddedig LC3-II (AL vs Gr:  $P = 0.76$ ; AL vs MF:  $P = >0.99$ ; Gr vs MF:  $P = 0.77$ ), LC3-I (AL vs Gr:  $P = 0.62$ ; AL vs MF:  $P = 0.98$ ; Gr vs MF:  $P = 0.55$ ), neu cymhareb LC3-II/LC3-I (AL vs Gr:  $P = 0.83$ ; AL vs MF:  $P = >0.99$ ; Gr vs MF:  $P = 0.82$ ). Cyflwynir y data fel cymedr gyda 95% CIs a phlot gwasgariad o gwerthoedd pob anifail.

Defnyddiwyd prawf ANOVA unffordd gyda phrawf cymariaethau lluosog Tukey (yn graphpad Prism) ar gyfer cymariaethau ystadegol, gyda  $P = < 0.05$  yn cael ei hystyried yn arwyddocaol.

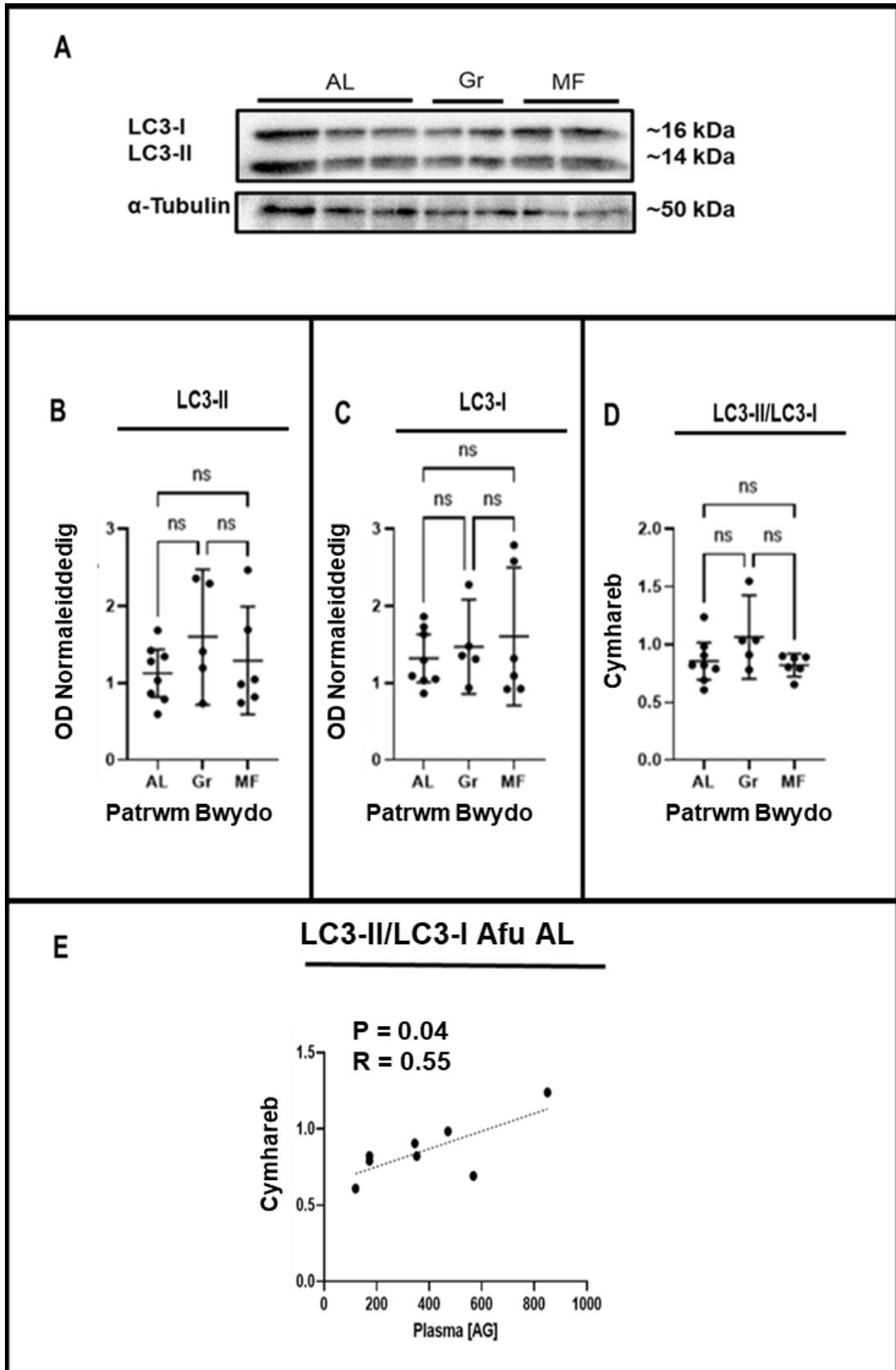
**E).** *Dadansoddiad Pearson o'r cydberthyniad rhwng mynegiad LC3-II*

*hipocampaidd a crynodiad AG plasma llygod mawr sy'n pori.* Canfuwyd cydberthyniad positif ( $R = 0.77$ ) ac ystadegol arwyddocaol ( $P = <0.05$ ). Mae'r data wedi ei ffitio â llinell ffit orau o ddadansoddiad atchweliad llinol i ddangos y berthynas linellol rhwng y ddau newidyn.

#### 4.3.5.1.4. Data WB LC3 hepatic a'i cydberthyniad ag AG cylchredol

Dengys nodweddiad WB o fynegiad LC3 hepatic fod gan anifeiliaid Gr fynegiad LC3-II uwch ar gyfartaledd o gymharu ag anifeiliaid AL ac anifeiliaid MF (ffigur 4.14B). Ar y llaw arall, roedd gan anifeiliaid MF mynegiad LC3-I uwch ar gyfartaledd, i anifeiliaid Gr a AL (ffigur 4.14C). Yr roedd canlyniadau ar gyfer cymhareb LC3-II i LC3-I yn debyg i'r rhai ar gyfer LC3-II, gyda cymedr uwch gan anifeiliaid Gr mewn cymhariaeth i rhai AL neu MF (ffigur 4.14D). Fel gyda'r meinweoedd niwral, ni welir unrhyw effeithiau arwyddocaol ym mynegiad hepatic LC3 rhwng y tair patrwm bwydo (ffigur 4.14; Atodiad B).

Er hynny, welir cydberthyniad arwyddocaol rhwng lefelau AG cylchredol a chymhareb LC3-II i LC3-I hepatic (ffigur 4.14E;  $P = 0.04$ ). Ni welir unrhyw cydberthyniadau arwyddocaol arall ar gyfer lefelau AG cylchredol a LC3 hepatic. Fodd bynnag, fel gyda'r data hipocampaid, dylid dehongli'r canfyddiad hwn yn ofalus, oherwydd natur gydberthynol y data a maint weddol fach y sampl.



**Ffigur 4.14. Effaith patrymau bwydo amserol ar mynegiad LC3 hepatic llygod mawr Sprague-Dawley.**

**A).** *Blot gorllewinol cynrychioladol o imiwnoadweithedd LC3 ac  $\alpha$ -Twbwlin.*

Bwydodd llygod mawr gwrywaidd Sprague-Dawley ar patrymau bwydo ad libitum (AL), pori (Gr) a phrydau (MF) am 6-wythnos, gyda dewis dyddiol o diet braster isel (LFD) a diet braster uchel (HFD). Echdynwyd protein o homogenadau hipocampaidd y llygod mawr trwy dull ffenol-clorofform, gan defnyddio byffer lysis 5% SDS (w/v) i hydoddi'r protein. Gwahanwyd y protein a echdynnir ar gel SDS-PAGE 12%, cyn canfod LC3-II a LC3-I gyda gwrthgorff gwrth LC3A/B (wedi'i codi mewn cwningen). Defnyddiwyd  $\alpha$ -twbwlin fel rheolydd llwytho.

**(B-D).** *Cymariaethau ystadegol o dwyseddau optegol normaleiddedig LC3-II*

*a LC3-I, a chymhareb LC3-II/LC3-I.* Ni canfuwyd unrhyw gwahaniaethau arwyddocaol rhwng dwyseddau optegol normaleiddedig LC3-II (AL vs Gr:  $P = 0.34$ ; AL vs MF:  $P = 0.85$ ; Gr vs MF:  $P = 0.65$ ), LC3-I (AL vs Gr:  $P = 0.89$ ; AL vs MF:  $P = 0.65$ ; Gr vs MF:  $P = 0.93$ ) neu cymhareb LC3-II/LC3-I (AL vs Gr:  $P = 0.2$ ; AL vs MF:  $P = 0.94$ ; Gr vs MF:  $P = 0.15$ ). Cyflwynir y data fel cymedr gyda 95% CIs a phlot gwasgariad o gwerthoedd pob anifail.

Defnyddiwyd prawf ANOVA unffordd gyda phrawf cymariaethau lluosog Tukey (yn graphpad Prism) ar gyfer cymariaethau ystadegol, gyda  $P < 0.05$  yn cael ei hystyried yn arwyddocaol.

**E).** *Dadansoddiad Pearson o'r cydberthyniad rhwng cymhareb LC3-II/LC3-I*

*hepatic a chrynodiad AG plasma llygod mawr ad libitum.* Canfuwyd cydberthyniad positif ( $R = 0.55$ ) ac ystadegol arwyddocaol ( $P = 0.04$ ). Mae'r data wedi ei ffitio â llinell ffit orau o ddadansoddiad atchweliad llinol i ddangos y berthynas linellol rhwng y ddau newidyn.

#### 4.3.5.1.5. Cydberthyniadau gyda chymeriant dietegol

Gan ystyried bod secretiad AG, a fflwcs awtoffagig yn sensitif i statws maeth, cynhaliwyd dadansoddiadau cydberthyniad i asesu a oedd cymeriant bwyd diwrnod olaf (diwrnod 42) neu gymeriant bwyd cronnus (dros yr arbrawf 42 diwrnod) yn gysylltiedig yn arwyddocaol â naill ai lefelau AG cylchredol neu fynegiant LC3 meinweoedd. Gan oedd dewis rhwng LFD a HFD ar gyfer holl anifeiliaid yr astudiaeth, ac felly cymeriant braster amrywiol ar gyfer pob anifail a asesir, perfformiwyd y dadansoddiadau cydberthynas yn erbyn cymeriant LFD, cymeriant HFD, ar chyfanswm o'r ddau (h.y cymeriant dietegol cyfan)

Cyflwynir canfyddiadau'r dadansoddiadau cydberthynol hyn yn atodiad B. Dylid nodi bod cydberthyniad wael rhwng lefelau AG plasma â'r holl paramedrau cymeriant bwyd ar draws yr holl ddadansoddiadau, ond mewn cyferbyniad nodwyd nifer o gysylltiadau arwyddocaol ar gyfer mynegiad LC3. Roedd y rhain yn fwyaf nodedig yn y cortecs ac afu anifeiliaid AL. Yn ddiddorol, nid oedd mynegiad hipocampaidd LC3-II anifeiliaid Gr, na chymhareb hepatig LC3-II / LC3-I o anifeiliaid AL, y ddau mesuriad a oedd yn gysylltiedig yn arwyddocaol gyda lefelau cylchredol AG, yn gysylltiedig arwyddocaol â chymeriant bwyd.



#### 4.3.5.2. Arbrawf llygod GHS-R<sup>-/-</sup>

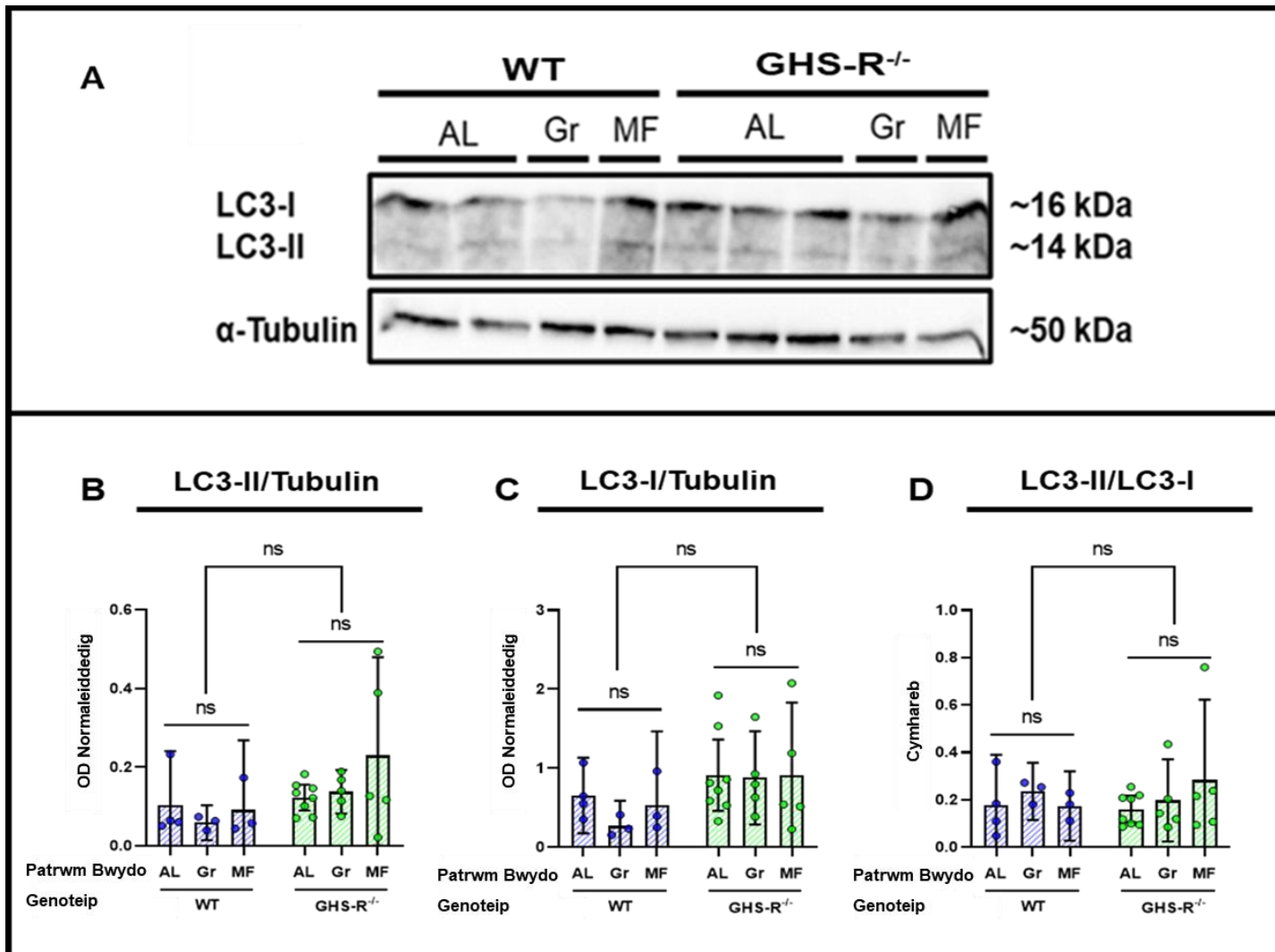
##### 4.3.5.2.1. Data WB LC3 blaen-ymennydd

Fel dengys ffigur 4.15A, roedd gan anifeiliaid GHS-R<sup>-/-</sup> fynegiad LC3-II uwch yn gyffredinol o gymharu â'u cymheiriaid WT (ffigur 4.15B). Fodd bynnag, nid oedd prif effaith genoteip yn ystadegol arwyddocaol yn ôl prawf ANOVA dwyffordd ( $P = 0.06$ ). Ymhellach, ni chafodd y patrwm bwydo effaith arwyddocaol ar mynegiad LC3-II (Prif effaith:  $P = 0.44$ ), a nad oedd rhyngweithiad arwyddocaol rhwng genoteip a'r patrwm bwydo ( $P = 0.47$ ) (Gweler atodiad B am cymariaethau post hoc).

Yn debyg i LC3-II, roedd gan anifeiliaid GHS-R<sup>-/-</sup> hefyd fynegiad LC3-I cyfartalog uwch nag anifeiliaid WT ar gyfer pob un o'r tri phatrwm bwydo (ffigur 4.15C). Fodd bynnag, unwaith eto, ni ystyriwyd prif effeithiau genoteip ( $P = 0.05$ ), patrwm bwydo ( $P = 0.69$ ), a'r rhyngweithiad rhwng y dau newidyn ( $P = 0.77$ ) yn ystadegol arwyddocaol (Gweler atodiad B am cymariaethau post hoc).

Mewn cyferbyniad â'r lefelau unigol o LC3-II a LC3-I, nid oedd y cymarebau LC3-II/LC3-I y flaen-ymennydd yn nodedig o wahanol rhwng llygod WT a GHS-R null, ar gyfer unrhyw un o'r patrymau bwydo (ffigur 4.15D). Yn disgwylidig, nid oedd effeithiau genoteip ( $P = 0.76$ ), patrwm bwydo ( $P = 0.65$ ) na'r rhyngweithiad rhwng y dau newidyn ( $P = 0.58$ ) yn ystadegol arwyddocaol (Gweler atodiad B am cymariaethau post hoc)

I grynhoi, er bod gan lygod GHS-R<sup>-/-</sup> fynegiad LC3-II a LC3-I uwch na llygod WT yn y blaen-ymennydd, ni ddarparodd dadansoddiadau ystadegol ddigon o dystiolaeth bod y gwahaniaethau hyn oherwydd colled mynegiad GHS-R ac nid samplu ar hap ac amrywiad arbrofol.



**Ffigur 4.15. Effaith patrymau bwydo amserol ar mynegiad LC3 blaen-ymennydd llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a WT**

**A).** *Blot gorllewinol cynrychioladol o imiwnoadweithedd LC3 ac  $\alpha$ -Twbwlin.*

Bwydodd llygod gwrywaidd GHS-R<sup>-/-</sup> a WT (C57BL/6 ar patrymau bwydo ad libitum (AL), pori (Gr) a phrydau (MF) am 3-wythnos. Echdynnwyd protein o homogenadau blaen-ymennydd y llygod trwy dull ffenol-clorofform, gan defnyddio byffer lysis 5% SDS (w/v) i hydoddi'r protein. Gwahanwyd y protein a echdynnir ar gel SDS-PAGE 15%, cyn canfod LC3-II a LC3-I gyda gwrthgorff gwrth LC3A/B (wedi'i codi mewn cwningen). Defnyddiwyd  $\alpha$ -twbwlin fel rheolydd llwytho.

**(B-D).** *Cymariaethau ystadegol o dwyseddau optegol normaleiddedig LC3-II a LC3-I, a chymhareb LC3-II/LC3-I.* Ni chanfuwyd unrhyw brif effeithiau arwyddocaol ar mynegiad LC3-II (Genoteip: P = 0.06; Patrwm bwydo: P = 0.44; Rhyngweithiad: P = 0.47), LC3-I (Genoteip: P = 0.05; Patrwm bwydo: P = 0.69; Rhyngweithiad: P = 0.77) neu cymhareb LC3-II/LC3-I (Genoteip: P = 0.76; Patrwm bwydo: P = 0.65; Rhyngweithiad: P = 0.58). Ni chanfuwyd unrhyw effeithiau arwyddocaol gyda cymariaethau post-hoc rhwng y patrymau bwydo ar gyfer y dwy genoteip chwaith (gweler atodiad B am y gwerthoedd P). Cyflwynir y data fel cymedr gyda 95% CIs a phlot gwasgariad o gwerthoedd pob anifail. Defnyddiwyd prawf ANOVA Dwyffordd gyda phrawf cymariaethau lluosog Tukey (yn graphpad Prism) ar gyfer cymariaethau ystadegol, gyda P = < 0.05 yn cael ei hystyried yn arwyddocaol.

#### 4.3.5.2.2. Data WB LC3 hypothalamig

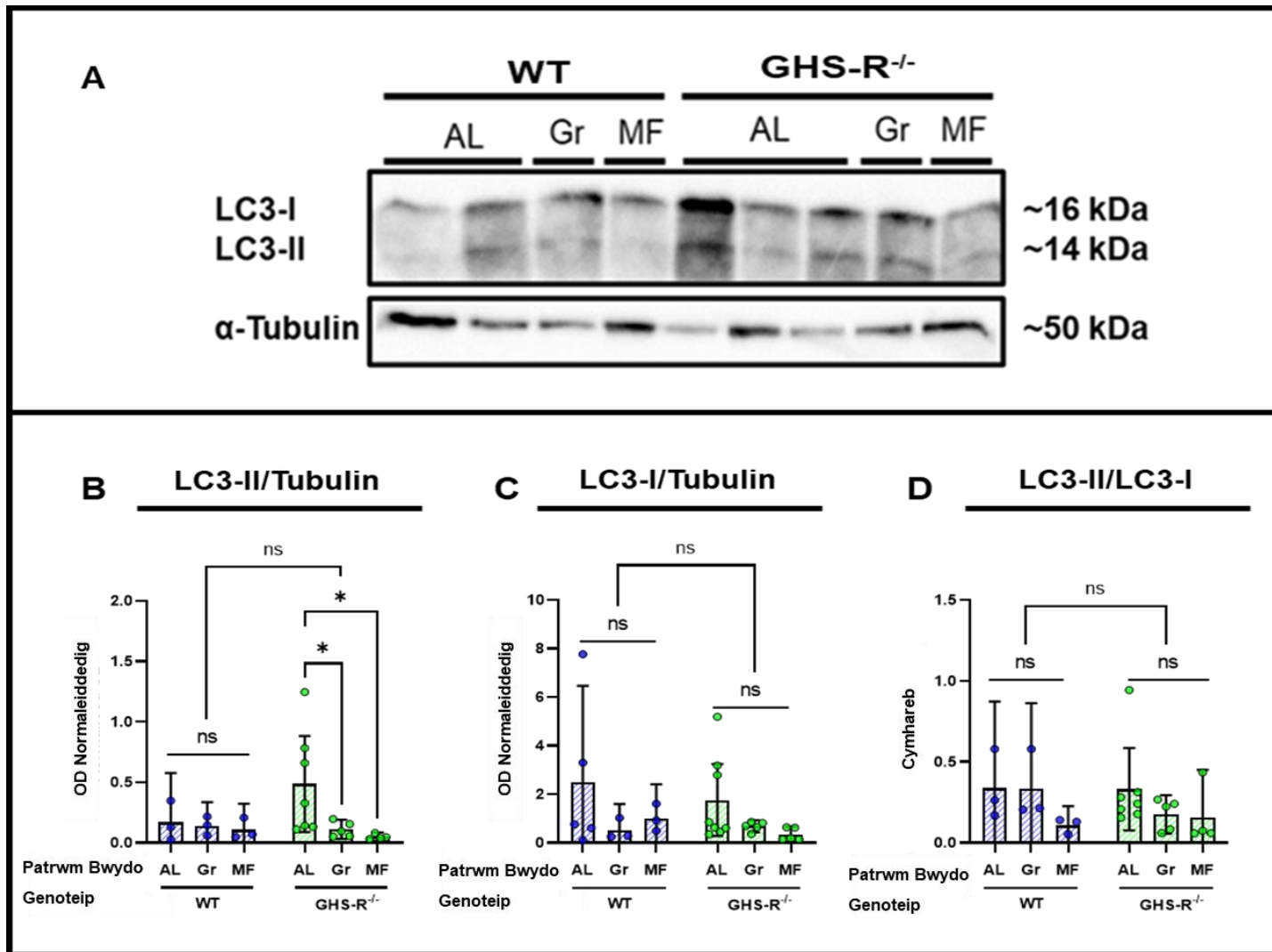
Yn yr un modd â'r blaen-ymennydd, roedd imiwnoadweithedd hypothalamig LC3-II yn gyffredinol lawer gwannach o'i gymharu â LC3-I. Yn wir, nad oedd yn bosibl meintioli mynegiad LC3-II hypothalamig ar gyfer sawl sampl (2 sampl WT AL; 1 GHS-R<sup>-/-</sup> AL; 1 GHS-R<sup>-/-</sup> MF), gan na ellid gwahaniaethu rhwng y signal gwan a'r cefndir yn ystod dadansoddiad densitometreg .

Dengys cymariaethau o'r samplau weddill bod gan lygod GHS-R<sup>-/-</sup> a fwydir AL mynegiad LC3-II llawer uwch ar gyfartaledd o gymharu a â phob un o'r grwpiau eraill (ffigur 4.15B). Ar ben hynny, er nad oedd unrhyw prif effeithiau arwyddocaol ar gyfer genoteip ( $P = 0.48$ ), patrwm bwydo ( $P = 0.14$ ) neu rhyngweithiad rhwng y dau newidyn ffactor ( $P = 0.28$ ), ystyriwyd mynegiad LC3-II lygod GHS-R<sup>-/-</sup> a bwydir AL yn arwyddocaol uwch i rhai a bwydir Gr ( $P = <0.05$ ) neu MF ( $P = 0.03$ ). Ni welwyd canfyddiadau arwyddocaol tebyg rhwng y patrymau bwydo ar gyfer llygod WT.

Mewn cyferbyniad â LC3-II, ni ymddengys bod mynegiad LC3-I hypothalamig o dan fwydo AL yn cael ei ddylanwadu gan signalu echelin ghrelin (ffigur 4.15C). Yn wir roedd gan y grwpiau AL fynegiad LC3-I uwch mewn cymhariaeth a grwpiau Gr a MF ar gyfer y dwy genoteip; sy'n awgrymu bod mynegiad hypothalamig LC3-I yn fwy sensitif i effaith patrwm bwydo na effaith genoteip. Fodd bynnag, ni chanfuwyd prif effaith arwyddocaol ar gyfer patrwm bwydo ( $P = 0.09$ ), yn ogystal a genoteip ( $P = 0.53$ ) a'r rhyngweithiad ( $P = 0.83$ ), na unrhyw effeithiau arwyddocaol gyda cymariaethau lluosog Tukey (Atodiad B).

Yn debyg i LC3-I, ni chanfuwyd unrhyw effeithiau ystadegol (Genoteip:  $P = 0.66$ ; Patrwm bwydo: 0.18; Rhyngweithiad:  $P = 0.66$ ; Atodiad B am cymariaethau post hoc) ar gyfer y cymhareb LC3-II/LC3-I hypothalamig (ffigur 4.15D).

I grynhoi, awgrymwyd y data hyn y gall echelin ghrelin reoleiddio lefelau LC3-II hypothalamig yn ystod bwydo AL, ond nid GR neu MF.



**Ffigur 4.16. Effaith patrymau bwydo amserol ar mynegiad LC3 hypothalamig llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a WT**

**A).** *Blot gorllewinol cynrychioladol o imiwnoadweithedd LC3 ac  $\alpha$ -Twbwlin.*

Bwydodd llygod gwrywaidd GHS-R<sup>-/-</sup> a WT (C57BL/6 ar patrymau bwydo ad libitum (AL), pori (Gr) a phrydau (MF) am 3-wythnos. Echdynnwyd protein o homogenadau hypothalamig y llygod trwy dull ffenol-clorofform, gan defnyddio byffer lysis 5% SDS (w/v) i hydoddi'r protein. Gwahanwyd y protein a echdynnir ar gel SDS-PAGE 15%, cyn canfod LC3-II a LC3-I gyda gwrthgorff gwrth LC3A/B (wedi'i codi mewn cwningen). Defnyddiwyd  $\alpha$ -twbwlin fel rheolydd llwytho.

**(B-D).** *Cymariaethau ystadegol o dwyseddau optegol normaleiddedig LC3-II a LC3-I, a chymhareb LC3-II/LC3-I.* Canfuwyd gwahaniaethau ystadegol rhwng mynegiad LC3-II llygod GHS-R<sup>-/-</sup> AL a rhai Gr (P = < 0.05) ac MF (P = 0.03), er nad oedd brif effeithiau genoteip (P = 0.48) patrwm bwydo (P = 0.14) a'r rhyngweithiad (P = 0.28) yn arwyddocaol. Ni chanfuwyd unrhyw effeithiau arwyddocaol ar mynegiad LC3-I (Genoteip: P = 0.53; Patrwm bwydo: P = 0.09; Rhyngweithiad: P = 0.83; Atodiad B am cymariaethau post-hoc) na cymhareb LC3-II/LC3-I (Genoteip: P = 0.66; Patrwm bwydo: P = 0.18; Rhyngweithiad: P = 0.61; Atodiad B am cymariaethau post-hoc). Cyflwynir y data fel cymedr gyda 95% CIs a phlot gwasgariad o gwerthoedd pob anifail. Defnyddiwyd prawf ANOVA Dwyffordd gyda phrawf cymariaethau lluosog Tukey (yn graphpad Prism) ar gyfer cymariaethau ystadegol, gyda P = < 0.05 yn cael ei hystyried yn arwyddocaol.

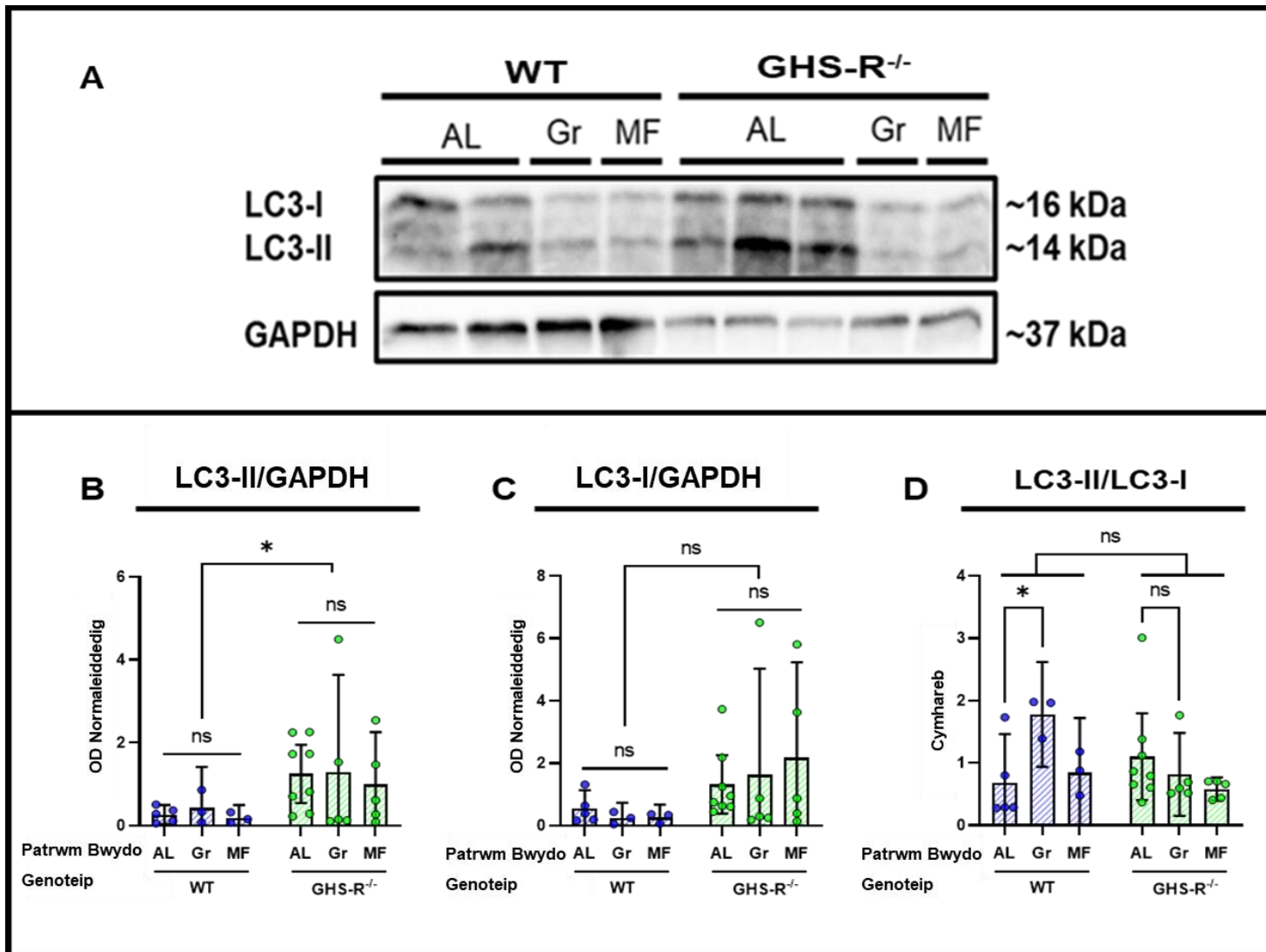
#### 4.3.5.2.3. Data WB LC3 hepatic

Fel dengys ffigur 4.17B, roedd mynegiad LC3-II hepatic yn uwch ar y cyfan mewn llygod GHS-R<sup>-/-</sup> na llygod WT o'r un dorllwyth. Ymhellach, canfuwyd dadansoddiad ANOVA dwyffordd bod prif effaith genoteip ar mynegiad LC3-II yn arwyddocaol ( $P = 0.04$ ). Ond ni chanfuwyd unrhyw effeithiau arwyddocaol ar gyfer patrwm bwydo ( $P = 0.88$ ), y rhyngweithiad rhwng patrwm bwydo a genoteip ( $P = 0.98$ ), na unrhyw o'r cymariaethau post-hoc (Atodiad B).

Yn debyg i LC3-II, gwelwyd lefelau LC3-I hepatic gyffredinol uwch ar gyfer llygod GHS-R<sup>-/-</sup> mewn cymhariaeth i llygod WT (ffigur 4.17C). Ond, yn wahanol i LC3-II, ni ystyriwyd prif effaith genoteip ar LC3-I i fod yn ystadegol arwyddocaol; gyda'r gwerth  $P$  (0.05) yn disgyn ychydig yn fyr o'r drothwy critigol. Eto, nid oedd effeithiau patrwm bwydo ( $P = 0.93$ ), rhyngweithiad ( $P = 0.76$ ), neu'r cymariaethau post-hoc yn arwyddocaol (Atodiad B).

Mewn cyferbyniad i lefelau unigol LC3-II a LC3-I, nid oedd gwahaniaeth gyffredinol nodedig rhwng y dau genoteip ar gyfer cymhareb LC3-II/LC3-I (ffigur 4.17D); gyda ANOVA dwyffordd yn cadarnhau nad oedd prif effaith genoteip yn arwyddocaol ( $P = 0.26$ ). Serch hynny, roedd cymhareb LC3-II/LC3-I llygod WT Gr yn uwch ar cyfartaledd i'r grwpiau eraill, gyda'r gwahaniaeth rhwng llygod WT Gr a AL yn cael ei hystyried yn arwyddocaol ( $P = <0.05$ ) gan cymariaethau lluosog. Yn diddorol, ni welwyd yr un effaith gyda llygod GHS-R<sup>-/-</sup> AL a Gr ( $P = 0.69$ ).

Awgrymwyd y data hyn felly, bod colled GHS-R systemig yn effeithio ar mynegiad LC3 gwaelodol yr afu yn annibynnol o'r patrwm bwydo (ffigur 4.17B), tra fod pori yn effeithio ar fflwcs awtoffagig trwy mecanwaith sy'n dibynnu ar GHS-R (ffigur 4.17D).





**Ffigur 4.17. Effaith patrymau bwydo amserol ar mynegiad LC3 hepatic llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a WT**

**A).** *Blot gorllewinol cynrychioladol o imiwnoadweithedd LC3 a GAPDH.*

Bwydodd llygod gwrywaidd GHS-R<sup>-/-</sup> a WT (C57BL/6 ar patrymau bwydo ad libitum (AL), pori (Gr) a phrydau (MF) am 3-wythnos. Echdynnwyd protein o homogenadau hepatic y llygod trwy dull ffenol-clorofform, gan defnyddio byffer lysis 5% SDS (w/v) i hydoddi'r protein. Gwahanwyd y protein a echdynnir ar gel SDS-PAGE 15%, cyn canfod LC3-II a LC3-I gyda gwrthgorff gwrth LC3A/B (wedi'i codi mewn cwningen). Defnyddiwyd GAPDH fel rheolydd llwytho.

**(B-D).** *Cymariaethau ystadegol o dwyseddau optegol normaleiddedig LC3-II a LC3-I, a chymhareb LC3-II/LC3-I.*

Canfuwyd prif effaith genoteip arwyddocaol ( $P = 0.04$ ) ar mynegiad LC3-II, ond nid oedd effeithiau patrwm bwydo ( $P = 0.88$ ), rhyngweithiad ( $P = 0.98$ ) na'r cymariaethau post-hoc yn ystadegol (Atodiad C). Ni chanfuwyd unrhyw effeithiau arwyddocaol ar gyfer mynegiad LC3-I (Genoteip:  $P = 0.05$ ; Patrwm bwydo:  $P = 0.93$ ; Rhyngweithiad:  $P = 0.76$ ; Atodiad C am cymariaethau post-hoc). Er nad oedd prif effeithiau arwyddocaol am genoteip ( $P = 0.26$ ), patrwm bwydo ( $P = 0.17$ ) na'r rhyngweithiad rhwng y dau newidyn ( $P = 0.06$ ) ar cymhareb LC3-II/LC3-I, canfuwyd gwahaniaeth arwyddocaol rhwng llygod WT AL a llygod WT Gr ( $P = < 0.05$ ). Cyflwynir y data fel cymedr gyda 95% CIs a phlot gwasgariad o gwerthoedd pob anifail. Defnyddiwyd prawf ANOVA Dwyffordd gyda phrawf cymariaethau lluosog Tukey (yn graphpad Prism) ar gyfer cymariaethau ystadegol, gyda  $P = < 0.05$  yn cael ei hystyried yn arwyddocaol.

## **4.4 Trafodaeth**

### **4.4.1. Amcan 1: Arbrofion IHC**

#### **4.4.1.1 Canfyddiadau arbrofion llygod ghrelin<sup>-/-</sup>, GOAT<sup>-/-</sup> a GHS-R<sup>-/-</sup>**

Datgelodd nodweddiad Ni-DAB IHC o fynegiad hipocampaidd y protein pro-awtoffagig allweddol Beclin-1, ostyngiadau arwyddocaol yn nifer y celloedd positif Beclin-1 / mm<sup>2</sup> ac imiwnoadweithedd Beclin-1 cyffredinol, yn y DG a CA1 o lygod GHS-R<sup>-/-</sup> (ffigur 4.5); sydd a blocâd systemig o drawsgrifiad GHS-R. Yn ddiddorol, ni arweiniwyd abladiad genynnau ghrelin neu GOAT at ostyngiadau tebyg mewn mynegiad Beclin-1 yn y DG neu CA1, gyda llygod ghrelin<sup>-/-</sup> (ffigur 4.3) a GOAT<sup>-/-</sup> (ffigur 4.4) yn arddangos nifer y celloedd positif Beclin-1 / mm<sup>2</sup> ac imiwnoadweithedd Beclin-1 cyffredinol tebyg i lygod WT o'r un torllwythi.

Ar y llaw arall, welir lleihad arwyddocaol yn y nifer y celloedd positif Beclin-1 / mm<sup>2</sup> yn CA3 llygod GOAT<sup>-/-</sup> (ffigur 4.4); effaith na welir yn llygod GHS-R<sup>-/-</sup>. Fodd bynnag, nid oedd y canfyddiad hwn yn cyd-fynd â gostyngiad arwyddocaol mewn imiwnoadweithedd Beclin-1. Felly mae'n bosibl y gallai'r gostyngiad arwyddocaol yn y nifer y celloedd positif Beclin-1 / mm<sup>2</sup> fod wedi codi oherwydd gwallau wrth segmentu celloedd yn ystod dadansoddiad ImageJ. Hynny yw, mae'n bosibl bod ardaloedd o imiwnoadweithedd trwchus wedi'u canfod fel un gell fawr, yn hytrach na nifer o gelloedd ar wahân.

Yn fyr, awgrymir y data hwn bod GHS-R yn ennyn swyddogaethau pro-awtoffagig sy'n annibynnol o'i ligand cytras mewndarddol yn y DG a CA1, gan fod colled mynegiad, ac felly signalu GHS-R, ond nid colled holl ghrelin systemig (ghrelin<sup>-/-</sup>) neu AG systemig (GOAT<sup>-/-</sup>), yn lleihau mynegiad Beclin-1 yn arwyddocaol yn y rhanbarthau hyn.

#### 4.4.1.1.1. Sut gallai colled derbynydd ghrelin ond nid ghrelin, neu asyl-ghrelin fodiwleiddio awtoffagi hipocampaidd?

Cynigir y llenyddiaeth fod signalu AG-GHS-R yn ysgogi awtoffagi trwy'r llwybr canonaidd  $G\alpha_q$ -PLC-IP3- $Ca^{2+}$  GHS-R1a, sy'n actifadu'r rheolydd pro-awtoffagig allweddol AMPK trwy CaMKK $\beta$  (Andrews et al., 2008; Bayliss et al., 2016; Morgan et al., 2017). Fodd bynnag, fe gall AG -GHS-R1a hefyd signalu trwy  $G\alpha_{i/o}$ -PI3K-Akt, sy'n actifadu'r rheolydd gwrth-awtoffagig mTORC1, yn y hipocampws (Chen et al., 2011; Chung et al., 2013; Kanoski et al., 2013; Ribeiro et al., 2014). Byddant yn disgwyl felly i golled signalu AG-GHS-R1a yn llygod ghrelin<sup>-/-</sup> a GOAT<sup>-/-</sup> effeithio ar signalu pro-awtoffagig a gwrth-awtoffagig. Fodd bynnag, gall GHS-R1a ysgogi llwybrau signalu, yn cynnwys llwybr  $G\alpha_q$ -PLC-IP3- $Ca^{2+}$  yn absenoldeb AG, nail ai drwy modd cyfansoddol (Holst et al., 2003; M'Kadmi et al., 2015; Mustafa et al., 2017), neu drwy heterodimereiddio gyda derbynydd GPCR arall sydd wedi rhwymo i'w ligand cytras (Damian et al., 2018; Kern et al., 2012; Kern et al., 2015).

Mae actifedd cyfansoddol signalau cypledig  $G\alpha_q$  gan GHS-R1a yn ffenomen sefydledig *in vitro* (Holst et al., 2003; M'Kadmi et al., 2015). Fodd bynnag, mae ymatebion GHS-R1a  $G\alpha_q$  sy'n annibynnol i ligand, ynghyd â phroffion gohebydd  $Ca^{2+}$ , yn sylweddol llai grymus na'r rhai a welwyd yn dilyn ysgogiad ag AG neu gweithyddion synthetig megis L692 (M'Kadmi et al., 2015). Ar ben hynny, ni ddarganfuwyd tystiolaeth gref o weithgaredd cyfansoddol GHS-R1a *in vivo* (fel derbynydd monomerig heb ligand), sy'n gwestiynu ei berthnasedd ffisiolegol (Hedegard & Holst. (2020).

Ar y llaw arall, dengys Kern et al., (2015) bod heteromereiddiad GHS-R1a gyda derbynyddion dopamin DRD1 yn DG llygod *in vivo* yn bwysig ar gyfer nerfogaeth dopaminergig o gof gweithio. Yn wir, ataliwyd cyd-gweiniad yr gwrthweithydd GHS-R1a JMV2959 y cynnydd yn y cof gweithio a welir ar ôl triniaeth gyda'r gweithydd DRD1 SKF81927 (Kern et al., 2015). Yn nodedig, datgelodd nodweddiad y

mecanweithiau moleciwlaidd gwaelodol mewn niwronau hippocampaidd cynradd ynysig, a chelloedd perifferol a drawsffurfiwyd GHS-R1a-DRD1, fod rhwymo GHS-R1a yn dadgyplu signalau DRD1 o'i lwybr signalau canonaidd Gas-cAMP-PKA ac yn lle hynny mae'n hyrwyddo signalau drwy'r llwybr  $G\alpha q$ -PLC-IP3-Ca<sup>2+</sup>-CaMKK $\beta$ . (Kern et al., 2015). Felly mae'r canfyddiadau hyn yn dangos ffordd arall y gall signalau GHS-R1a gymell signalau  $G\alpha q$ -PLC-IP3-Ca<sup>2+</sup>-CaMKK $\beta$ -AMPK, ac o bosibl arwain at anwythiad awtoffagig, yn absenoldeb ligand AG yn yr hipocampws. Byddai colli'r signalu hyn mewn llygod GHS-R<sup>-/-</sup> yn rhoi esboniad ar gyfer y gostyngiadau a welwyd yn y mynegiant Beclin-1.

#### 4.4.1.2 Canfyddiadau cyd-llaeoleiddiad Beclin-1-BrdU

Dengys nodweddiad dwbl IFHC o gyd-llaeoleiddiad Beclin-1-BrdU yn DG rostral llygod mawr cfwl Lister bod dim gwahaniaeth nodedig rhwng anifeiliaid sydd wedi trin gyda AG neu Veh (ffigur 4.9).

Yn seiliedig ar y canfyddiad hwn, mae'n temtasiwn casglu nad yw AG yn rheoleiddio awtoffagi yng nghyd-destun AHN. Fodd bynnag, oherwydd diffyg marciwr penodol ar gyfer niwronau (NeuN), nid yw'r data hyn yn egluro a yw AG yn newid imiwnoadweithedd Beclin-1 yn niwronau newydd-anedig yr anifeiliaid hyn. Ceisiwyd optimeiddio protocol IFHC triphlyg Beclin-1-BrdU-NeuN er mwyn osgoi'r cyfyngiad hwn, ond roedd y rhain yn aflwyddiannus (ffigur 4.8). Cyfyngiad ychwanegol yw pŵer ystadegol isel y dadansoddiad, gan mai dim ond tri dyblygiad biolegol (anifeiliaid) a gafodd eu cynnwys ym mhob grŵp, tra dylid nodi oedd imiwno-fflworoleuedd Beclin-1 yn gyffredinol is na'r hyn a welwyd mewn optimeiddiaethau blaenorol (Atodiad B, ffigur B2).

Byddai astudiaethau yn y dyfodol sy'n defnyddio nifer uwch o dyblygiadau biolegol, yn ogystal â marcwyr llinach penodol i wahaniaethu rhwng bôn-gelloedd niwral, niwronau anaeddfed a niwronau aeddfed, yn ein galluogi i fynd i'r afael yn well â'r

cwestiwn a yw AG yn modylu awtoffagi yng nghyd-destun AHN. Trafodir enghreifftiau o arbrofion o'r fath yn adran arbrofion pennod 5 yn y dyfodol.

#### 4.4.1.3. Addasrwydd Beclin-1 fel marciwr IHC

Yn ogystal ar cyfyngiadau a nodir yn yr adran uchod, cyfyngiad nodedig o data IHC y bennod hon yw'r ffaith bod dim ond Beclin-1 sydd wedi'u defnyddio fel marciwr o awtoffagi. Wrth gwrs, nid dyna oedd fy mwriad ar dechrau'r prosiect, a chafodd gwrthgyrff yn erbyn p62 (ffigur 4.2, 4.6, 4.7) a LAMP1 (Atodiad B: ffigur B1) eu profi hefyd yn ystod arbrofion optimeiddiaeth. Ond yn anffodus, ni atgynhychwyd imiwnoadweithedd gwreiddiol p62 (ffigur 4.2) mewn arbrofion dilynol gyda lot newydd o'r gwrthgyrff (ffigur 4.6, 4.7), tra nad oedd imiwnoadweithedd penodol gyda'r gwrthgyrff LAMP1 (Atodiad B: ffigur B1).

Er defnyddir Beclin-1 yn gyffredinol mewn cymwysiadau IHC yn y llenyddiaeth, yn enwedig mewn gwerthusiadau o awtoffagi mewn biopsïau canser (Havaki et al., 2017), mae Beclin-1 yn brotein a fynegir yn hollbresennol sydd hefyd yn cyfryngu swyddogaethau an-awtoffagig (Klionsky et al., 2021). Felly, efallai nad yw'r newidiadau yn fynegiad Beclin-1 a adroddir yn y bennod hon o reidrwydd yn dynodi newidiadau mewn fflwcs awtoffagig. Ymhellach, roedd yr imiwnoadweithedd Beclin-1 a welir yn arbrofion y bennod hon yn ymddangos yn bennaf fel cnewyllog. Yn wir, er na chyflawnwyd nodweddiad lleoleiddiad isgellog manwl o Beclin-1 yn yr astudiaeth bresennol, roedd morffoleg adrannau imiwneidd Beclin-1 yn debyg i'r rhai a staeniwyd â marcwyr cnewyllog hysbys (NeuN, BrdU) yn ystod microsgopeg fflwroleuedd.

Pryder arall gyda'r defnydd o Beclin-1, oherwydd ei fynegiad hollbresennol, yw y gallai lleihad yn y nifer o gelloedd positif Beclin-1 mewn llygod GHS-R<sup>-/-</sup> (a'r CA3 o llygod GOAT<sup>-/-</sup>) adlewyrchu cynnydd mewn marwolaeth celloedd yn lle modiweiddiad dymameg signalu mewngellol sy'n rheoleiddio awtoffagi.

Felly, i wirio a yw colled signalu GHS-R yn effeithio ar swyddogaethau awtoffagig Beclin-1, bydd rhaid i arbrofion yn y dyfodol nodweddu Beclin-1 mewn perthynas â'r cymhlygyn PI3KC3C1. Gellid cyflawni hyn trwy ddadansoddi cyd-llleoleiddiad Beclin-1 ac ATG14 *in vivo*, naill ai trwy ficrosgopeg fflwroleuedd gyda thoriadau'r ymennydd neu imiwnodyddodiad gyda homogenadau meinwe, neu trwy fodelu effeithiau gweithyddion gwrthdrol (inverse agonists) GHS-R1a (Holst et al., 2003) ar ryngweithiad ac addasiadau ôl-drosiadol Beclin-1-ATG14-VPS34 *in vitro*. Ond fydd canolbwyntio ar ddulliau sy'n seiliedig ar LC3 yn fwy buddiol o ran casglu canfyddiadau am sut mae echelin signalu ghrelin yn modiwlleiddio fflwcs awtoffagig yn y hipocampws ac yn rhanbarthau arall yr ymennydd, yn y dyfodol.

## 4.4.2. Amcan 2: Arbrofion WB

### 4.4.2.1. Cydberthyniadau rhwng mynegiad LC3 a AG cylchredol yn llygod mawr Sprague Dawley

Methodd nodweddiadau o grynodiad plasma AG (ffigur 4.10) a mynegiad LC3 (LC3-II, LC3-I, LC3-II / LC3-I) yn ymennydd (ffigur 4.11, 4.12, 4.13) ac afu (ffigur 4.14) llygod mawr Sprague-Dawley gwrywaidd, i ganfod unrhyw wahaniaethau arwyddocaol rhwng patrymau bwydo (AL, Gr, MF).

Serch hynny, datgelodd dadansoddiadau cydberthyniad rhwng mynegiad LC3 meinwe a chrynodiad AG, gysylltiad arwyddocaol positif rhwng AG a mynegiad LC3-II hipocampaidd yn anifeiliaid Gr (ffigur 4.13). Er na ddarganfuwyd unrhyw gydberthyniadau bellach rhwng LC3 niwral neu AG cylchredol, gwelwyd cydberthyniad arwyddocaol positif rhwng y gymhareb LC3-II i LC3-I hepatic a AG mewn anifeiliaid AL (ffigur 4.14).

Gellir canfyddiadau hyn awgrymu bod y rhyngweithiad rhwng signalu AG-GHS-R1a ac awtoffagi yn y hipocampws a'r afu yn sensitif i amledd cymeriad bwyd. Fodd bynnag, o ystyried natur gydberthynol y dadansoddiadau hyn, nid yw'r data hwn yn darparu tystiolaeth ddigonol bod AG yn rheoleiddio awtoffagi niwronaidd neu hepatic o dan amodau bwydo amserol gwahanol. Yn wir, gallai'r data adlewyrchu fod lefelau AG cylchredol a mynegiad LC3'r hipocampws ac afu cyn cael eu cyd-reoleiddio o dan yr amodau dietegol hyn, a nad oes cyswllt achosol rhyngddynt.

Mae'r dewis dyddiol rhwng LFD a HFD hefyd yn gyfyngiad mawr ar yr astudiaeth hon mewn perthynas â dehongli awtoffagi; gan fod cymeriant braster dyddiol amrywiol gyda'r holl anifeiliaid ar draws 6 wythnos yr arbrawf ac fod HFD yn ennyn effeithiau cymhleth ar awtoffagi yn yr afu (Park et al., 2014; Singh et al., 2009; L. Yang, Li, Fu, Calay, & Hotamisligil, 2010) ar ymennydd (Meng & Cai, 2011; S. M. Son et al., 2012).

#### 4.4.2.2. Effaith colled GHS-R ar mynegiad LC3 niwral a hepatic mewn llygod sydd ar patrymau bwydo amserol

Er mai dim ond data anuniongyrchol a chynhyrchwyd yr arbrawf llygod mawr Sprague Dawley, fe wnaeth yr arbrawf dilynol gyda llygod null GHS-R alluogi gwerthusiad uniongyrchol o sut mae colled signalau ghrelin yn effeithio ar awtophagi niwral a hepatic *in vivo*. Ymhellach trwy cymharu mynegiad LC3 rhwng llygod AL, Gr a MF ar gyfer y ddau genotypeip, gellir asesu a yw effeithiau'r patrymau bwydo amserol ar awtoffagi yn dibynnu ar signalu ghrelin-GHS-R.

O ran y prif effaith genotypeip, dengys llygod GHS-R<sup>-/-</sup> mynegiad LC3-II ac LC3-I uchel yn y blaen-ymennydd (ffigur 4.15) a'r afu (ffigur 4.17), sy'n awgrymu bod colled GHS-R yn effeithio ar lefelau awtoffagi gwaelodol mewn modd systemig. Fodd bynnag, yr unig effaith a ystyriwyd yn ystadegol arwyddocaol oedd yr un ar gyfer hepatic LC3-II (P = 0.04) (ffigur 4.17B); gyda phob un o LC3-I hepatic (P = 0.05) (ffigur 4.16C), LC3-II blaen-ymennydd (P = 0.06) (ffigur 4.15B) a LC3-I blaen-ymennydd (P = 0.05) (ffigur 4.15C) yn disgyn yn fyr iawn o'r trothwy arwyddocâd.

Er methodd dadansoddiadau ANOVA Dwyffordd i ganfod unrhyw brif effeithiau arwyddocaol ar gyfer patrwm bwydo, na'r rhyngweithio rhwng genotypeip a phatrwm bwydo, canfuwyd prawf post hoc Tukey o effeithiau patrwm bwydo o fewn y ddau genotypeip sawl canfyddiad arwyddocaol.

Yn yr hypothalamws, roedd gan lygod GHS-R<sup>-/-</sup> AL fynegiad LC3-II arwyddocaol uwch o gymharu â lygod GHS-R<sup>-/-</sup> Gr a MF (ffigur 4.16B). Ni welwyd canlyniadau o'r fath mewn anifeiliaid WT, a oedd yn dangos mynegiad hypothalamig LC3-II cyfartalog tebyg waeth beth fo'r patrwm bwydo (ffigur 4.16B). Awgrymir yr arsylwadau hyn bod colled signalau GHS-R yn fodiweiddio awtoffagi gwaelodol yn y hypothalamws o dan amodau bwydo arferol, ond nid pan mae cymeriant bwyd yn cael eu cyfyngu i'r cyfnod tywyll yn unig. Fodd bynnag, cafeat nodedig gyda'r canfyddiad hwn yw'r ffaith oedd mynegiad LC3-II yr hypothalamws yn gyffredinol



wan iawn, ac yn anodd i'w wahaniaethu oddi wrth staenio amhenodol yn imagej. Mae'n bosibl felly nad yw'r gwerthoedd dwysedd optegol a ddefnyddiwyd yn y dadansoddiad ystadegol yn adlewyrchu'n gywir fynegiad LC3-II normaleiddedig y samplau dan sylw.

Gwelwyd canfyddiad arwyddocaol arall gyda'r samplau afu, gydag anifeiliaid WT Gr yn dangos cymhareb LC3-II/LC3-I arwyddocaol uwch na'r rhai a gafodd eu bwydo ad libitum (ffigur 4.16D). Yn ddiddorol, ni welwyd cynnydd yn cymhareb LC3-II/LC3-I mewn anifeiliaid GHS-R<sup>-/-</sup> Gr (ffigur 4.17D), sy'n awgrymu bod effaith pori ar awtoffagi hepatic yn dibynnu ar bresenoldeb y derbynnydd ghrelin.

#### 4.4.2.2.1. Esboniadau am canfyddiad LC3-II/LC3-I hepatic

Wrth ystyried y canfyddiad uchod, gallwn meddwl am sawl ffordd lle gall signalu ghrelin effeithio ar fflwcs LC3 yn yr afu. Yn gyntaf, sefydlwyd canfyddiadau Zhang et al., (2015) a Fang et al., (2019) bod signalu ghrelin yn ysgogi awtoffagi hepatic mewn modd niwroendocrin trwy signalu hormon twf, is lawr i effeithiau AG-GHS-R1a yn y chwarren bitwidiol ar hypothalamws. Ond, cynhyrchwyd y canfyddiadau hyn o dan amodau maeth cyfyngedig llym, lle nad oes cronfeydd egni triglyseridau gan y llygod, ac maent yn dibynnu ar diraddiad awtoffagig o broteinau'r afu er mwyn cynhyrchu asidau amino glwcojenig. Felly mae'n annhebygol fydd y llwybr hyn yn ysgogi fflwcs LC3-II hepatic o dan amodau pori, lle nad oes cyfyngiad calorïau neu lleihad yn cronfeydd egni perifferol.

Gan fod hormon twf yn ysgogi llwybrau signalu mitogenig sy'n cydgyfeirio ar mTORC1 (Sharp & Bartke, 2005), mae'n dal bosib fod gweithrediad hormon twf yn yr afu, sy'n hyrwyddo'r effaith ar cymhareb LC3-II/LC3-I; ond fod y canlyniad yn cynrychioli lleihad yn y fflwcs awtoffagig a nid cynyddiad. Fodd bynnag, ni datgelwyd mesuriadau ffenoteipaidd (Atodiad B) unrhyw canfyddiadau sy'n awgrymu fod yna cynnydd yn signalu hormon twf o dan amodau pori. Ar y llaw arall, roedd yna lleihad arwyddocaol yn maint y chwarren bitwidiol mewn ymateb i'r

patrwm MF; sy'n awgrymu bydd effeithiau signalu hormon twf yn fwy perthnasol yn yr anifeiliaid hon.

Esboniad mwy debygol am y canlyniadau LC3-II/LC3-I yw ei fod yn cael eu hyrwyddo gan cynnydd yn blonegrwydd perifferol. Yn yr un modd ar newid yn cymhareb LC3-II/LC3-I hepatic, gwelwyd cynyddiad arwyddocaol yn mas adipos gwyn perifferol (inguinal + retroperitoneal + epididymal) mewn ymateb i pori yn llygod WT, ond nid yn llygod GHS-R<sup>-/-</sup> (Atodiad B). Ond, mae effeithiau blonegrwydd ar awtoffagi yn cymhleth; gyda rhai astudiaethau yn cysylltu blonegrwydd gyda cynnydd ym mynegiad proteinau ATG (Kovsan et al., 2011) a biosynthesis awtoffagosomau (Son et al., 2012) ac astudiaethau eraill yn dangos ataliad yn fflwcs awtoffagig (Park et al., 2014; Singh et al., 2009; Yang et al., 2010). Un rhagdybiaeth yw fod ataliad awtoffagi gan mTORC1 yn cael eu colli gan datblygiad ymwrthedd i inswlin (Son et al., 2012), ond wedyn fod cronriad lefelau uchel o calsiwm mewngellol yn atal ymasiad lysosom-awtoffagosom (Park et al., 2014). Ond mae'r datblygiadau hyn yn codi o achos effeithiau tymor hir, ac ni fyddant yn disgwyl i'w weld mewn ymateb i ymyrraeth tair wythnos.

Serch hynny mae'n debygol fod cymeriant cyson o dognau bach o fwyd gyda'r patrwm Gr yn amharu gyda rheoleiddiad circadaidd metabolaid lipidau a glwcos, mewn modd tebyg i beth welir gyda anifeiliaid ad libitum sy'n bwyta'n mwy aml yn ystod y dydd ar HFD (Hatori et al., 2012). Yn ôl y ragdybiaeth hon, fydd camweithrediad rhythm circadaidd AMPK, mTORC1 a CREB yn gwaelodi'r newidiadau ar metaboledd systemig, gan gynnwys awtoffagi.

#### 4.4.2.3. Cyfyngiadau

##### 4.4.2.3.1. Ni all LC3-II gweithredu fel marciwr dibynadwy o fflwcs awtoffagig heb ddilyn ei trosiant

Fel yr amlygwyd ar ddechrau'r bennod hon, mae'r heriau sy'n gysylltiedig ag ataliad lysosomaidd mewn modelau cnofilod yn cyfyngu'n fawr ar yr asesiad o fflwcs awtoffagig *in vivo*. Yn wir, heb ddilyn y trosiant lysosomaidd o LC3-II ni all un benderfynu'n derfynol sut mae ymyriad dan astudiaeth yn modiwlleiddio fflwcs awtoffagig (Klionsky et al., 2021).

Defnyddir y gymhareb LC3-II/LC3-I yn aml fel amcangyfrif bras o fflwcs awtoffagig yn lle profion trosiant *in vivo* cadarn gydag atalyddion lysosomaidd; gyda'r rhagdybiaeth bod cymhareb uwch yn arwydd o drosiad uwch LC3-I i LC3-II, ac felly cynnydd yn ffurfiad awtoffagosomau (Klionsky et al., 2021). Fodd bynnag, dyw hyn dal ddim hyn yn ystyried trosiant lysosomaidd LC3-II, sy'n dilyn lipideiddiad LC3-I ac yn angenrheidiol ar gyfer fflwcs awtoffagig cyflawn (Klionsky et al., 2021). Yn wir, gellir lleihad cymhareb LC3-II/LC3-I adlewyrchu trosiad lysosomaidd uchel o LC3-II, yn hytrach na chyfradd is o lipideiddiad LC3-I, tra gellir cymhareb LC3-II/LC3-I uchel digwydd mewn sefyllfa lle mae lipideiddiad LC3-I, yn gymwys ond mae nam gyda diraddiad LC3-II.

Gellir casglu felly o'r data LC3-II yr arbrawf patrwm bwydo, bod colled GHS-R yn modiwlleiddio awtoffagi yn yr afu ac hypothalamws, ond nid oes modd dweud os mae colled GHS-R yn cynyddu neu atal fflwcs awtoffagig yn yr arbrawf hyn.

Er mwyn cael gwell casgliadau am sut mae newidiadau yn lefelau protein LC3 yn cynrychioli newidiadau mewn rheoleiddiad awtoffagi, bwriadais nodweddu newidiadau mewn mynegiad genynnau LC3 yn gyfochrog, a dyna pam y defnyddiwyd y dull echdynnu Qiazol i echdynnu RNA a phrotein o'r un meinweoedd. Fodd bynnag, er asesir purdeb a chynnyrch echdynniadau RNA, nid oedd digon o amser i gynnal dadansoddiad RT-qPCR o newidiadau yn lefelau trawsgrifiad LC3.

O ystyried bod digonedd o brotein ac RNA ar ôl o'r meinweoedd a gyflwynir ar gyfer y dadansoddiadau LC3 hyn, byddai fe'n hawdd perfformio nodweddion pellach blotio Gorllewinol neu a RT-qPCR o awtoffagi mewn llygod nwl GHS-R yn y dyfodol.

Wrth edrych yn ôl, byddai hefyd wedi bod yn synhwyrol i nodweddu mynegiad protein ATG7 yn ogystal ag LC3-II/LC3-I, gan ei fod yn hyrwyddo cam cyntaf lipideiddiad LC3-I i LC3-II ac yn sensitif i modiweiddiad gan ymyraethau dietegol fel HFD (Meng & Cai, 2011; Yang et al., 2010).

Ond er mwyn mynd i'r afael tuag at y canfyddiad hyn, mae'n allweddol bod arbrofion yn y dyfodol yn integreiddio dulliau grymus i asesu trosiad LC3-II neu pwncta awtoffagig *in vivo*. Gellir wneud hyn yn hawdd gyda dadansoddiadau WB o LC3-II yn yr afu, gan rhoi gweiniad i.p leu ar crynodiad 40mg/kg 1-2 awr cyn aberthiad yr anifeiliaid (Martinez-Lopez et al., 2017; Toledo et al., 2018; Zhang et al., 2015). Ond ar gyfer nodweddiadau yn yr ymennydd bydd rhaid defnyddio gweiniad i.c.v, gan nad yw atalyddion a gweinir i.p yn croesi'r BBB. Fodd bynnag, dengys Lee et al., (2019) bod gweiniad i.c.v liwpeptin ar ddos o 4mg/kg am 7 diwrnod neu CQ ar ddos o 5mg/kg am 5 diwrnod, trwy mini-pwmp osmotig, yn achosi cronid awtoffagosomau arwyddocaol a gostyngiad cydredol mewn awtolysosomau asidig aeddfed yn ymennydd llygod.

#### 4.4.2.3.2. Nid yw'r cynllun arbrofol yn ystyried rheoleiddiad circadaidd fflwcs awtoffagig

Cyfyngiad arall y ddata LC3 or arbrawf patrwm bwydo GHS-R<sup>-/-</sup> yw'r ffaith fod y cynllun arbrofol ddim yn digonol i gyfrif am amrywiadau circadaidd mewn fflwcs awtiffagig. Mae hyn yn arbennig o berthnasol ar gyfer awtoffagi hepatic, gyda sawl papur yn y blynyddoedd diwethaf yn sefydlu bod fflwcs awtoffagig hepatic nid yn unig yn cyd-fynd â'r cylch dydd/nos a chymeriant bwyd (Martinez-Lopez et al., 2017; Toledo et al., 2018), ond fod diraddiad awtoffagig detholus o broteinau circadaidd yn cyfrannu tuag at gwlconeogenesis a proteostasis hepatic (Juste et al., 2021; Toledo et al., 2018).

Pan cartrefwyd o dan gylchoedd golau/tywyll 12 awr safonol, mae llygod gwrywaidd C57BL/6 (4-6 mis oed) sy'n bwydo ad libitum yn dangos cynnydd amlwg mewn trosiant hepatic LC3-II yn oriau olaf y cyfnod golau (3-7pm), cyn gostyngiad sydyn yn dilyn dechrau bwydo nosol (7pm-11pm) (Martinez-Lopez et al., 2017; Toledo et al., 2018). Yn nodedig, mae diraddiad awtoffagig cryptochrome1 (Cry1), ar ddiwedd y cyfnod golau (3-7pm) yn gweithredu i atal effeithiau ataliol Cry1 ar gynhyrchiad glwcos hepatic; a thrwy hynny hyrwyddo glwconeogenesis yn ystod cyfnod o argaeledd maetholion isel (Toledo et al., 2018).

Wrth plotio mynegiad LC3 yn erbyn amseroedd marw y llygod WT a GHS-R<sup>-/-</sup> (Atodiad B), mae'n ymddangos bod yna gwahaniaethau nodedig rhwng patrymau mynegiad y dwy genoteip; sy'n awgrymu fod colled GHS-R yn effeithio ar rheoleiddiad circadaidd awtoffagi.

Fodd bynnag, roedd yna hefyd gwahaniaethau amlwg rhwng amseroedd marw llygod yn y grwpiau patrymau bwydo gwahanol. Hynny yw, ni chafodd y llygod eu aberthu mewn modd digon rheolaidd, lle mae anifeiliaid AL, Gr a MF y dwy genoteip yn cael ei ladd ar yr un pwyntiau amser (Atodiad B). Er enghraifft, cafodd yr holl anifeiliaid WT MF eu aberthu cyn 2pm, tra roedd amseroedd marw y grwpiau eraill

wedi ymestyn i cyfnod mwy. Wrth gwrs mae yna cyfyngiadau ymarferol i hyn, gan taw dim ond dwy aelod o staff oedd ar gael i gweithio gyda'r anifeiliaid ym mhrifysgol Caerdydd o achos rheolau'r pandemig COVID-19. Serch hynny, mae'r ffaith bod yna gwahaniaethau nodedig yn dosraniadau amser marw y grwpiau yn golygu bod cymariaethau yn cael eu wneud rhwng anifeiliaid sydd efalla ar cyfnod gwahanol o'i cyfradd awtoffagig *in vivo*; sy'n cymhlethu'r dehongliad o'r data.

#### 4.4.2.3.3. Nid yw WB yn galluogi dilysu cyfraniad poblogaethau niwronaidd penodol yn y homogenedau blaen-ymennydd a hypothalamig

Er bod blotio Gorllewinol yn dechneg ddefnyddiol ar gyfer nodweddu mynegiad LC3-II *in vivo*, cyfyngiad ar y dull hwn yw bod y echdyniadau protein a defnyddir ar gyfer blotio yn deillio o gymysgedd o holl celloedd amrywiol y feinwe o dan sylw. Felly, mae'r newidiadau yn LC3-II y blaen-ymennydd ar hypothalamws ddim yn penodol ar gyfer newidiadau mewn niwronau.

Ymhellach yr roedd homogenedau'r blaen-ymennydd yn deillio o ddarnau sagittal mawr sy'n gwmpasu sawl rhanbarthau penodol (gweler y ffigur isod) sy'n cynnwys lluo o boblogaethau niwronau heterogenaidd iawn, yn ogystal ar celloedd anniwronaidd. Dylid pwysleisio nad fy mwriad oedd defnyddio homogenedau blaen-ymennydd yn y modd hwn. Yn wir, roeddwn i wedi gobeithio defnyddio talpiau cortigal a hipocampaidd penodol, fel yn achos yr arbrawf WB gyda llygod mawr Sprague Dawley. Yn anffodus, gan perfformiwyd yr arbrofion gyda llygod nwl GHS-R wedi'u yn ystod y pandemig COVID-19, nid oedd modd i aelodau o'n labordy cyfrannu i broses casglu meinweoedd yn y cyfleusterau cadw anifeiliaid ym Mhrifysgol Caerdydd. Felly, danfonwyd hemisfferau ymennydd wedi'u rhewi i Brifysgol Abertawe yn dilyn casglu cychwynnol a rhewi ar rew sych gan y tîm ym Mhrifysgol Caerdydd, yn hytrach na dyraniad ffres o ranbarthau diddordeb yr ymennydd cyn rhewi (fel digwyddodd gyda arbrawf llygod mawr Sprague-Dawley). Er y gwnaed ymdrechion i ddyrannu'r hipocampau o'r hemisfferau wedi'u rhewi hyn,

ni ellid cyflawni hyn heb yn gyntaf ganiatáu i'r meinwe doddi'n llwyr, a thrwy hynny gyfaddawdu ar gyfanrwydd protein ac RNA. Yn wir, yr unig rhanbarth a gwahanir yn llwyddiannus o gweddill y blaen-ymennydd oedd yr hypothalamws, sydd yn esbonio pam asesir awtoffagi yn yr hypothalamws ac mewn homogenedau blaen-ymennydd cyffredinol yn yr astudiaethau hon.

Wrth gwrs, hyd yn oed pe bai'r blaen-ymennydd yn cael eu dyrannu'n llwyddiannus i ranbarthau hippocampaidd a cortigol, ni fyddai hyn yn goresgyn y cyfyngiad bod WB yn ansensitif i wahaniaethau sy'n benodol i gelloedd. Yn wir, gyda'r homogenedau hypothalamig, nid oes modd dilysu sut mae colled GHS-R<sup>-/-</sup> yn niwronau AgRP/NPY yn yr Arc, neu niwronau yn VMH, yn cyfrannu tuag at fflwcs awtoffagi.

Felly bydyn buddiol iawn i defnyddio technegau IFHC yn y dyfodol i cyd-labelu marcwyr niwronau penodol, fel NPY a POMC, gyda gohebwyrr fflworoleuol LC3.

#### **4.5 Crynodeb o ganfyddiadau'r pennod**

Prif canfyddiadau'r pennod hon yw:

1. Mae colled mynegiad systemig GHS-R (lygod GHS-R<sup>-/-</sup>) yn arwain at lleihad mynegiad hipocampaidd Beclin-1, ond nad yw colled systemig o ghrelin (llygod ghrelin<sup>-/-</sup>) neu AG (llygod GOAT<sup>-/-</sup>)
2. Mae colled mynegiad systemig GHS-R yn cynyddu lefelau hypothalamig LC3-II o dan amodau bwydo ad libitum
3. Mae colled mynegiad systemig GHS-R yn cynyddu lefelau hepatic LC3-II, yn annibynnol o patrwm bwydo.
4. Mae patrwm bwydo pori nosol (Gr) yn cynyddu cymhareb LC3-II/LC3-I hepatic yn llygod WT, ond nid yn llygod GHS-R<sup>-/-</sup>

## Pennod 5: Trafodaeth

### 5.1 Y brif canfyddiadau a'i perthnasedd

Brif nod y traethawd ymchwil hwn oedd nodweddu effaith echelin ghrelin ar awtoffagi niwronaidd, trwy asesu sut mae triniaethau echelin ghrelin yn modiweiddio fflwcs awtoffagig *in vitro* (celloedd SN4741 a HT-22) a gwerthuso mynegiad proteinau ATG yn ymennydd llygod â diffygion mewn mynegiad genynnau echelin ghrelin (ghrelin<sup>-/-</sup>, GOAT<sup>-/-</sup>, GHS-R<sup>-/-</sup>). Cynhaliwyd asesiad i rôl echelin ghrelin yn modiweiddiad fflwcs awtoffagig niwral ac hepatic mewn ymateb i patrymau bwydo amserol hefyd.

#### **5.1.1. Arbrofion *in vitro***

Yn seiliedig ar ganfyddiadau blaenorol gan ein grŵp bod signalu AG-GHS-R1a yn ysgogi'r rheolydd pro-awtoffagig allweddol AMPK yng nghelloedd SN4741 (Bayliss et al., 2016), rhagdybiwyd y byddai'r echelin ghrelin yn ennyn effeithiau pro-awtoffagig yn modelau *in vitro*. Fodd bynnag, ni chefnogir y canfyddiadau *in vitro* y rhagdybiaeth hon. Yn wir, ni arweiniwyd triniaethau AG, UAG neu L692 at cynnydd ym mynegiad LC3-II neu pwncta Cyto ID yng nghelloedd SN4741 neu HT-22. Ymhellach, datgelwyd arbrofion Cyto ID cychwynnol yng nghelloedd SN4741 dystiolaeth ystadegol bod triniaethau echelin ghrelin yn is-reoleiddio awtoffagi, gan oedd lleihad arwyddocaol yn y nifer o pwncta ym mhresenoldeb Baf.

Er ni welwyd y canlyniadau disgwyliedig yn yr arbrofion *in vitro* roedd yna sawl arsylwad diddorol iawn yn y celloedd SN4741. Yn gyntaf, arweiniwyd cyfyngiad maeth 40% at lleihad pwncta Cyto ID mewn modd tebyg i driniaethau echelin ghrelin. Yn ail, rhoddwyd AG ac UAG effeithiau tebyg ar awtoffagi, a ni effeithiwyd rhain gan cyn-driniaeth gyda'r gwrthwiethydd GHS-R1a D-lys3. Gellir arsylwadau hon awgrymu fod triniaethau ghrelin ac cyfyngiad maeth yn gweithio drwy llwybr sy'n annibynnol i GHS-R i leihau awtoffagi yn y celloedd SN4741 o dan yr amodau



arbrofol a arsylwir. Fodd bynnag, esboniad arall am yr arsylwadau cyfyngiad maeth yw fod gwanedu'r cyfrwng meithrin yn lleihau lefelau o metabolion sy'n ysgogi awtoffagi gwaelodol, megis amonia a cynhyrchir o glwtamin naill ai trwy glwtaminolysis mewngelloi (Eng et al., 2011) neu trwy diraddiad yn y cyfrwng (Li et al., 2016). Ymhellach, dengys astudiaethau gan grwpiau eraill bod D-lys 3 ddim yn gwrthweithio signalu AG trwy y llwybr GHS-R1a canonaidd ar y crynodiadau micromolar a defnyddiais i yn fy arbrofion i (Ramirez et al., 2019), tra fod lefelau micromolar UAG hefyd gallu rhwymo ac ysgogi signalu GHS-R1a *in vitro*; er nad ydynt yn gweithredu fel ligand ar lefelau ffisiolegol.

Trafodir dull mwy grymus ar gyfer mynd i'r afael ag a yw triniaethau echelin ghrelin yn effeithio ar fflwcs awtoffagig *in vitro*, y gellid ei ddefnyddio mewn arbrofion yn y dyfodol, yn adran 5.2.1 yn ddiweddarach yn y bennod hon.

### **5.1.2. Arbrofion *in vivo* IHC: Awtffagi hipocampaidd**

O ystyried bod echelin ghrelin ac awtoffagi yn rheoleiddio plastigrwydd hipocampaidd a phrosesau dysgu a chof cysylltiedig (Buntwal et al., 2019; Glatingy et al., 2019), a bod abladiad systemig GOAT yn amharu ar awtoffagi hepatic (Zhang et al., 2015) rhagdybiwyd y byddai abladiad systemig mynegiad ghrelin, GOAT neu GHS-R yn amharu ar awtoffagi hipocampaidd.

Yn ddiddorol, dengys nodweddiadau IHC Ni-DAB bod colled holl ghrelin systemig (ghrelin<sup>-/-</sup>) neu AG systemig (GOAT<sup>-/-</sup>) ddim yn effeithio ar fynegiad Beclin-1 yn y DG neu'r CA1 ond bod blocâd systemig o drawsgrifiad GHS-R (GHS-R<sup>-/-</sup>) yn. Ar y llaw arall, gwelwyd gostyngiad arwyddocaol yn nifer y celloedd positif Beclin-1/mm<sup>2</sup> yn CA3 llygod GOAT KO ond nid yn y llygod ghrelin KO na nwl GHS-R. Ond, yn wahanol i effeithiau ar Beclin-1 yn y DG a CA1 llygod nwl GHS-R, ni chyfatebwyd y newidiadau yn nifer y celloedd Beclin-1 yn y CA3 o lygod GOAT KO gyda gostyngiad arwyddocaol cysylltiedig mewn imiwnoadweithedd Beclin-1.

Ar lefel arwynebol, mae'r canfyddiad bod colled presenoldeb ligand GHS-R ddim yn effeithio ar mynegiad Beclin-1 yn y DG a CA1, tra fod colled mynegiad y derbynydd eu hunain yn edrych yn rhyfedd. Fodd bynnag, fe gall GHS-R1a modiwlleiddio signalu celloedd mewn modd sy'n annibynnol i AG, trwy heterodimereiddio gyda derbynyddion eraill. Yn nodedig, sefydlodd astudiaeth Kern et al., (2015) bod GHS-R1a yn heterodimereiddio gyda derbynydd DRD1 yn y hipocampws *in vivo*. Ymhellach, dengys fod heterodimeriad GHS-R1a-DRD1 yn dadgyplu niwronau hipocampaidd oddi wrth signalau Gas is lawr i nerfogaeth dopaminergig, gan ysgogi yn hytrach signalau cypledig Gαq; sydd gellir ysgogi awtoffagi drwy actifedd AMPK trwy Ca<sup>2+</sup>-CaMKKB (Andrews et al., 2008; Bayliss et al., 2016).

Maen bosib felly bod colled heterodimereiddiad GHS-R1a gyda derbynydd DRD1 (Kern et al., 2015), neu actifedd cyfansoddol GHS-R1a (Holst et al., 2003) yn gwaelodi'r lleihad ym mynegiad Beclin-1 a welir gyda'r llygod GHS-R<sup>-/-</sup> yn fy arbrofion i. Fodd bynnag, gan fod mynegiad Beclin-1 yn hollbresennol, maen rhaid cwestiynu os yw colled Beclin-1 yn adlewyrchu lleihad mewn awtoffagi, neu marwolaeth celloedd niwronaidd. Yn wir, er fod is-reoleiddiad mynegiad hipocampaidd Beclin-1 gyda shRNA *in vivo* yn amharu gyda fflwcs awtoffagig ac yn gwaethygu perfformiad cof gofodol (Glatigny et al., 2019) nid yw newidiadau yn lefelau protein Beclin-1 wastad yn adlewyrchu newidiadau yn actifedd awtoffagi (Klionsky et al., 2021).

Felly, er mae fy nghanlyniadau ynghylch mynegiad Beclin-1 yn llygod GHS-R<sup>-/-</sup> yn perthnasol i awtoffagi hipocampaidd a pherfformiad cof cysylltiedig, nid ydynt yn digonol i ddangos bod colled GHS-R1a yn amharu gyda fflwcs awtoffagig yn yr hipocampws *in vivo*. Fodd bynnag, hyd y gwn i, darperir y canfyddiad hon y dystiolaeth cyntaf bod colled GHS-R yn rheoleiddio mynegiad protein sy'n gysylltiedig a awtoffagi yn y hipocampws *in vivo*.

### 5.1.3. Arbrofion *in vivo* WB: Effaith pori ar fflwcs awtoffagig hepatic

Gellir dadlau mai canfyddiad mwyaf perthnasol a diddorol y traethawd ymchwil hwn yw'r rhai sy'n ymwneud a'r arbrawf patrymau bwydo amserol gyda llygod GHS-R<sup>-/-</sup>, ac yn arbennig yr oblygiad bod pori yn rheoleiddio fflwcs awtoffagig hepatic trwy GHS-R.

Wrth gwrs, mae'r meintiau sampl bach a ddefnyddiwyd i gynhyrchu'r data hyn yn golygu bod angen ailadrodd y canfyddiad gyda cynllun arbrofol mwy grymus . Serch hynny, nid yw effeithiau patrymau bwydo amserol ar awtoffagi wedi'u hastudio'n dda a, hyd y gwn i, y data a gyflwynir yn y traethawd ymchwil hwn yw'r rhai cyntaf sy'n ymwneud ag effaith pori nosol a bwydo â phrydau ar awtoffagi mewn cnofilod.

Astudiaeth nodedig sydd wedi asesu rôl awtoffagi mewn arbrawf patrwm bwydo amserol yw un Martinez-Lopez et al., (2017). Yn yr astudiaeth hon, dangosodd yr awduron fod patrwm bwydo isocalorig dyddiol (iTAD) ddwywaith y dydd (gyda ffenestri bwydo rhwng 8-10am a 5-7pm), yn newid rhythm circadaidd awtoffagi systemig yn ddramatig; gydag anwythiad o fflwcs awtoffagig ar diwedd y ffenestr fwydo gyntaf. Yn ddiddorol, er gwaethaf y ffaith bod bwydo yn digwydd y tu allan i'r cyfnod naturiol ar gyfer cnofilod nosol, roedd iTAD yn gysylltiedig â nifer o welliannau rhychwant iechyd. Roedd rhain yn cynnwys cynnydd yn gwariant egni, lleihad gwlconeogenesis hepatic, gwell sensitifrwydd inswlin, brownio meinwe adipos gwyn, a llai o gynnwys triglyserid hepatic (Martinez-Lopez et al., 2017) . Ar ben hynny, ymddengys bod effeithiau iTAD ar blonegrwydd perifferol yn dibynnu ar awtoffagi mewn niwronau POMC hypothalamig, gan fod colled detholus ATG7 yn y niwronau hyn yn atal colled pwysau, gostyngiad WAT a gostyngiadau mewn cynnwys triglyserid hepatic a serwm mewn ymateb i iTAD (Martinez-Lopez et al., 2017). Ond yn diddorol ni effeithiwyd colled ATG7 yn niwronau POMC ar effeithiau iTAD ar metabolaid glwcos.

Mae canfyddiadau Martinez-Lopez et al., (2017) felly yn dangos yn eglir perthynas rhwng patrwm bwydo amserol a modiweiddiad rhythm circadaidd fflwcs awtoffagig yr afu. Yn ogystal mae'n codi cyswllt rhwng gweithrediad awtoffagi yn niwronau anorecsigenig POMC yr hypothalamws ac newidadau yn blonegrwydd perifferol mewn ymateb i patrwm bwydo amserol. Mae'r canfyddiadau hon felly yn perthnasol iawn i fy canfyddiadau i, gan welais newidiadau yn fflwcs awtoffagig yr afu (er ni allai dweud mewn pa cyfeiriad) ac blonegrwydd perifferol mewn llygod sy'n pori.

Wrth gwrs, mae nodweddiadau awtoffagig Martinez-Lopez et al., (2017) yn llawer mwy cynhwysfawr na fy rhai i yn y traethawd ymchwil hwn, gan ei fod yn defnyddio arbrofion cwrs amser trosiant LC3-II ac yn asesu perthnasedd ffisiolegol awtoffagi yn y patrwm bwydo iTAD trwy nodweddu newidiadau swyddogaethol mewn llygod gyda cholled ddetholus o ATG7 yn y gwahanol feinweoedd o ddi-ddordeb.

Ymhellach, fel trafodir ym mhennod 4, nad oedd ein arbrawf wedi cynllunio'n digon addas ar gyfer asesiadau trosiant LC3-II dros amser, ac effaith newidiadau circadaidd ar cyfradd fflwcs LC3-II.

Fodd bynnag, mae'n ddiddorol mai dim ond 3 wythnos o bori nosol sy'n ymddangos yn ddigonol i fodiweiddio fflwcs awtoffagig hepatic, ac yn ogystal, hybu blonegrwydd perifferol; yn enwedig gan nad yw'r llygod sy'n pori yn cymryd mwy o calorïau na'r llygod ad libitum (Atodiad B).

## 5.2 Arbrofion pellach

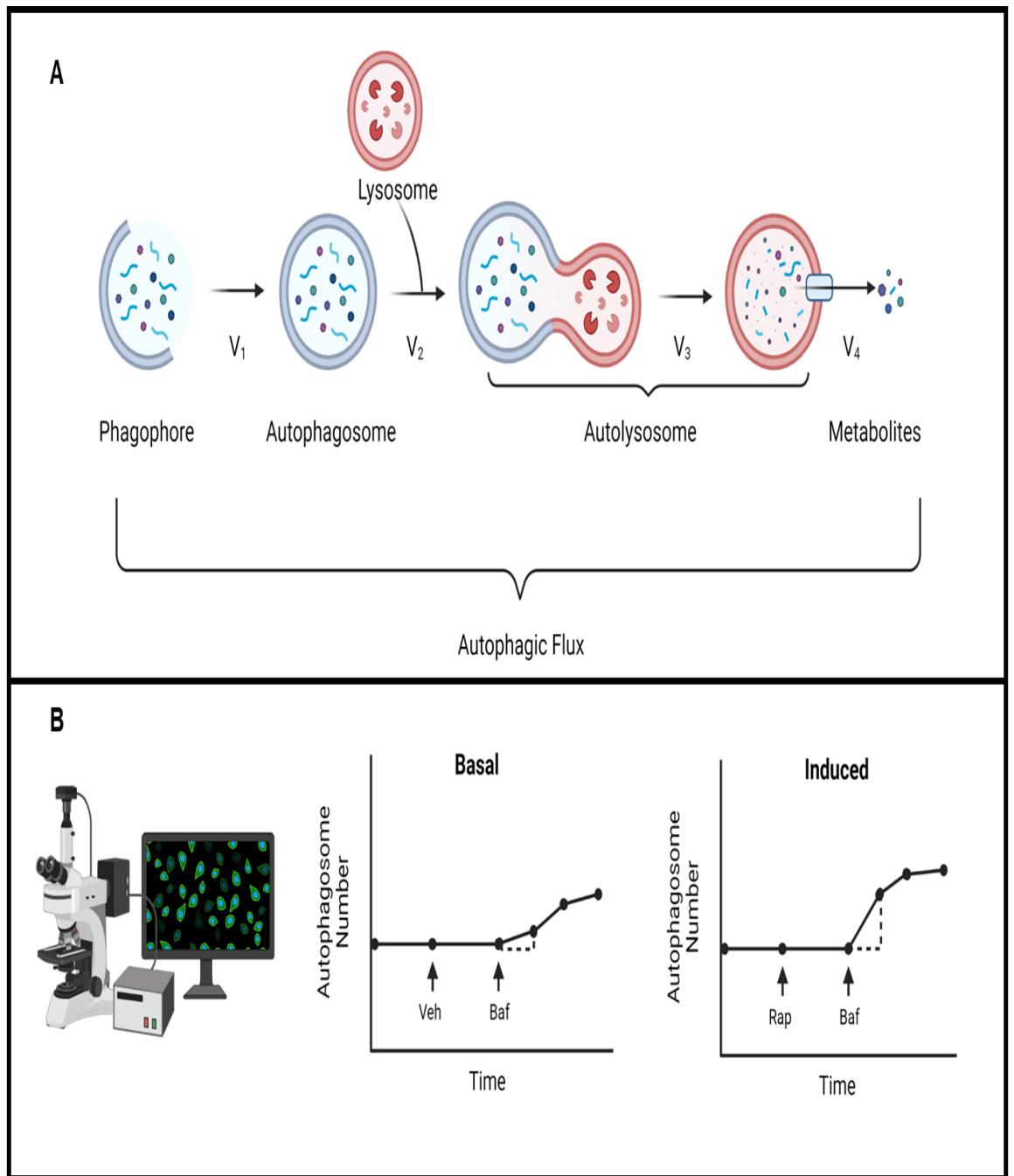
### 5.2.1 Delweddu fflwcs awtoffagig gyda dull microsgopeg fflwroleuedd fyw

Fel yr amlygwyd ym mhennod 3, mae canfyddiadau *in vitro* y traethawd ymchwil hwn sy'n ymwneud â fflwcs awtoffagig, wedi'u cyfyngu gan y ffaith bod trosiant autoffagosomaidd wedi'i nodweddu ar un pwynt arbrofol yn unig, tra perfformir ataliad lysosomaidd am 24awr.

Er perfformiwyd arbrofion optimeiddiaeth Baf ôl-redol er mwyn goresgyn y cyfyngiad hwn, byddai'r cynllun arbrofol delweddu celloedd byw a sefydlir gan Loos a chydweithwyr (Loos et al., 2014) yn darparu strategaeth gwell ar gyfer nodweddu fflwcs awtoffagig gwaelodol ac ymateb fflwcs awtoffagig i driniaethau echelin ghrelin.

Fel nodir yr awduron, nid yw nodweddiadau blot Gorllewinol o drosiant LC3-II, nodweddiadau TEM o awtoffagosomau ac awtolysosomau, neu nodweddiadau ficrosgopeg fflwroleuedd pwncta awtoffagig mewn celloedd sydd wedi sefydlogu, er eu bod yn addysgiadol, yn adlewyrchu cyfradd y newid mewn awtoffagi dros amser yn gywir (Loos et al., 2014). Yn wir, er defnyddir y term fflwcs awtoffagig yn gyffredin yn y llenyddiaeth awtoffagi, ychydig o astudiaethau sy'n mesur fflwcs awtoffagig fel cyfradd wirioneddol, fel sy'n wir gyda phrofion fflwcs metabolig a chineteg ensymau mewn biocemeg glasurol (Loos et al., 2014; Meijer, 2009). Er mwyn mynd i'r afael â hyn, cynigiodd Loos et al., (2014) fframwaith arbrofol lle defnyddir microsgopeg fflwroleuedd celloedd byw i bennu cyfradd fflwcs awtoffagosomau gwaelodol ac ysgogedig o gromliniau cynnydd, ar ôl sefydlu system awtoffagig sefydlog gyson (ffigur 5.1). Ymhellach, cyhoeddwyd papur protocol dilynol sy'n manylu ar sut i ddefnyddio'r fframwaith arbrofol hwn mewn ffibroblastau embryonig llygoden sydd wedi eu trawsffurfio gyda GFP-LC3 a'u staenio gyda llyfn lysotracker (du Toit, Hofmeyr, Gniadek, & Loos, 2018).

I ganfod yn gyntaf a yw system awtophagig y celloedd mewn cyflwr cyson, delweddir celloedd bob awr am o leiaf 2awr (gan ddechrau ar bwynt amser 0, felly 3 phwynt amser) yn absenoldeb atalyddion lysosomaidd, gyda'r newidiadau yn pyllau awtoffagosomau, awtolysosomau a lysosomau yn cael eu fesur dros amser. Ar ol dilysu cyflwr cyson (h.y. mae nifer cyfartalog yr awtoffagosomau yn sefydlog dros y cyfnod amser a aseswyd), ceith celloedd eu drin gyda crynodiadau amrywiol o Baf, er mwyn canfod y crynodiad dirlawn sydd angen i atal trosiad awtoffagosomau. Yn yr enghraifft a rhoddir yr awduron, ychwanegwyd nail ai 10nM, 50nM, 100nM, 200nM, 400nM neu 800nM Baf, ar pwynt amser 2 awr, gan iddynt delweddu bod 30 munud am 2 awr pellach. Wedi hynny, cyfrifwyd cyfradd fflwcs awtoffagig gwaelodol o o lethr cychwynol y cynnydd yn nifer yr awtoffagosomau ar adeg triniaeth Baf. Ar ôl penderfynu crynodiad Baf dirlawn, gellir cymharu fflwcs awtoffagosomau gwaelodol ac ysgogedig trwy drin celloedd â Rap neu Veh. Yn enghraifft du Toit et al. (2018), ychwanegwyd 25nM Rap ar pwynt amser 2 awr, gyda ychwanegiad 400nM Baf i'r system yn dilyn 4 awr ar ol hynny, ac delweddu am 2 awr pellach. Yn nodedig, amcangyfrifodd y cromliniau cynnydd a gynhyrchwyd bod Rap wedi achosi trosiant cyfartalog o 105.4 awtoffagosomau / awr / cell, o'i gymharu â 25.4 awtoffagosomau / awr / cell o dan amodau gwaelodol (du Toit et al., 2018). Felly byddai addasu protocolau microsgop cydffocal a defnyddir gyda'r prawf Cyto ID a ddefnyddir yn y traethawd hir hwn i gyd-fynd â'r patrwm arbrofol a amlinellir uchod yn darparu dull mwy grymus o amcangyfrif fflwcs awtoffagig mewn ymateb i triniaethau echel ghrelin *in vitro*. O ystyried bod y prawf Cyto ID yn cael ei ddefnyddio'n ffafriol fel prawf celloedd byw (Oeste et al., 2013), dylai addasiadau o'r fath fod yn addas.



**Ffigur 5.1. Trosolwg o gynllun arbrofol ar gyfer mesur fflwcs awtoffagig *in vitro*, yn seiliedig ar protocol du Toit e tal., 2018.**

### 5.2.2. Nodweddiadau *in vivo* gyda gohebwyrr LC3 sy'n sensitif i pH

Amlinellwyd sawl dull arbrofol ar gyfer nodweddu ymhellach effaith echelin ghrelin-GHS-R ar awtoffagi niwronau *in vivo* yn drafodaeth pennod 4. Mae'r rhain yn cynnwys, nodweddu cydleoli Beclin-1-ATG14 trwy IFHC yng nghelloedd niwrogenig y DG, a WB o drosiant LC3-II mewn llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a llygod WT o'r un torllwyth yn dilyn gweiniad ganolog (i.c.v) atalyddion lysosomaidd. Er y byddai'r dulliau hyn yn goresgyn cyfyngiadau mwyaf yr arbrofion IHC Beclin-1 a WB LC3 *in vivo* y traethawd hir hon, bydda cynllun arbrofol sy'n defnyddio gohebwyrr LC3 sy'n sensitif i pH, fel mRFP-eGFP-LC3 (Kimura, Noda a Yoshimori (2007) neu mCherry-GFP-LC3 (Pankiv et al., (2007), yn darparu nodweddiad llawer mwy grymus o effeithiau echelin ghrelin-GHS-R ar awtoffagi niwronau *in vivo*.

Gall y adeileddau trawsennynol hyn ganfod rhwng awtoffagosomau ac awtolysosomau oherwydd gwahanol sensitifrwydd GFP a RFP / mCherry i ddiffodd fflwroleuol o dan pH asidig (Kimura et al., 2007; Pankiv et al., 2007), yn yr un modd ar gohebydd Mito QC a trafodir yn fyr ym mhennod 3.4. Mae'r gallu i wahaniaethu rhwng awtoffagosomau ac awtolysosomau yn caniatáu ar gyfer nodweddu aeddfedu ac asideiddio awtoffagosomau, sy'n dangosyddion gwell o fflwcs awtoffagig na nifer yr awtoffagosomau yn unig (Klionsky et al., 2021).

Yn hanfodol, mae nifer o astudiaethau wedi defnyddio dosbarthiad firol y gohebwyrr hyn i nodweddu fflwcs awtoffagig niwronaidd *in vivo* (Castillo et al., 2013; Castillo, Valenzuela, Onate, & Hetz, 2017), gan gynnwys yng nghyd-destun AHN (Xi et al., 2016) a dysgu a chof sy'n dibynnu ar y hipocampws (Pandey et al., 2021).

Ymhellach, sefydlodd Lee et al., (2019) fodel llygoden ar cefndir C57BL/6 gyda mynegiad sefydlog niwronaidd y gohebydd mRFP-GFP-LC3, a elwir yn llygod TRGL6.



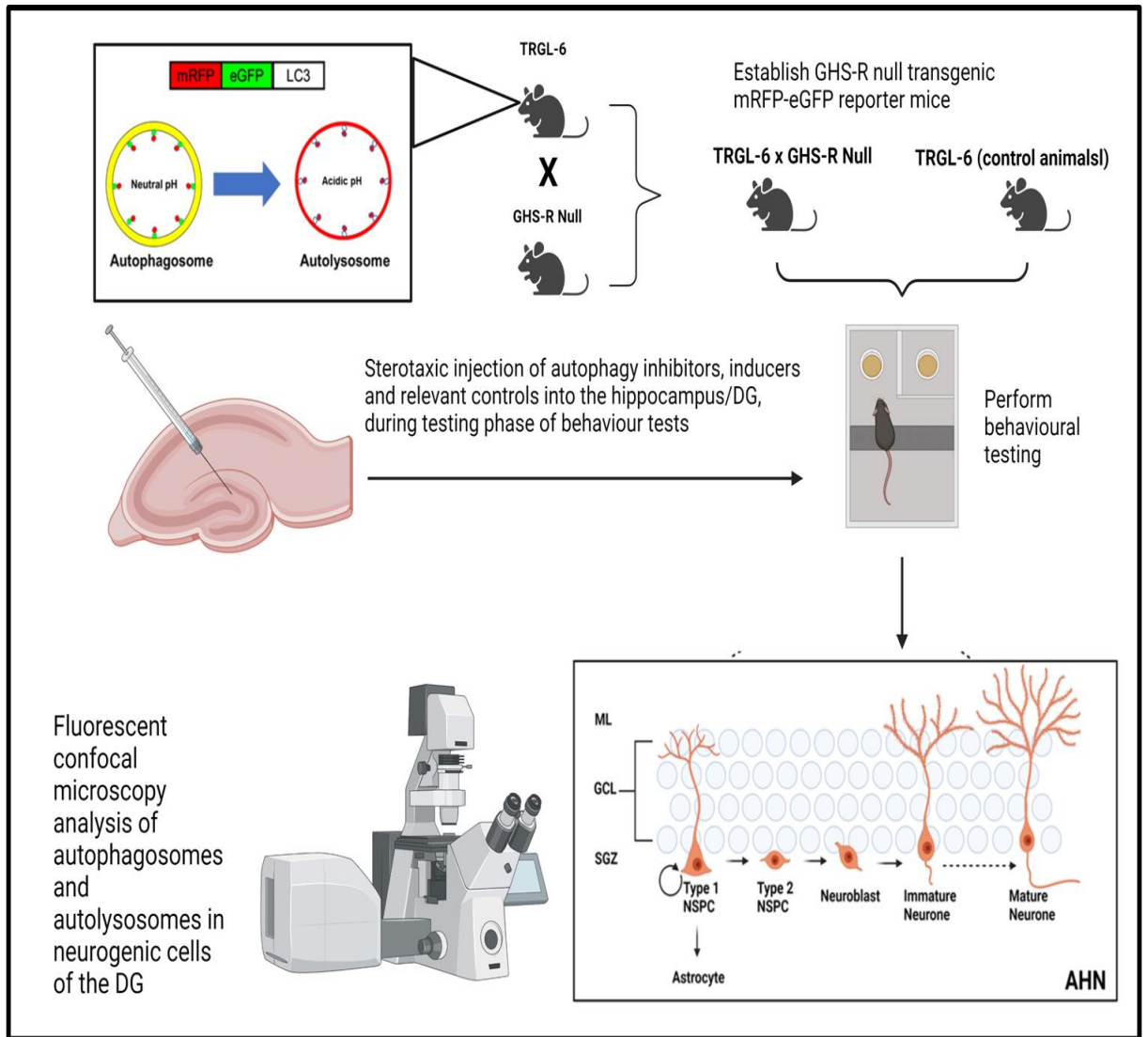
Pe bai un yn llwyddo i sefydlu llygod gohebydd GHS-R null-mRFP-GFP-LC3, trwy groesi llygod GHS-R<sup>-/-</sup> gyda llygod TRGL6, yna byddai'n darparu model *in vivo* anhygoel o bwerus ar gyfer asesu sut mae colled signalu AG-GHS-R1a yn effeithio ar fflwcs awtoffagig niwronaidd *in vivo*. Yn wir, gallai un asesu'r nifer o awtoffagosomau ac awtolysosomau yng nghelloedd niwrogenig y DG, trwy labelu cyd-IHC â marcwyr perthnasol NSPCs, niwronau anaeddfed a niwronau aeddfed newydd-anedig, a chymharu'r gwahaniaeth rhwng llygod GHS-R null-TRGL6 a llygod TRGL6 fel rheolyddion. Gellid cymhwyso'r un patrwm arbrol i ranbarthau ymennydd eraill fel yr hypothalamws, lle gellid asesu fflwcs awtoffagig yn niwronau NPY/AgRP neu POMC.

Yn bwysig, byddai'r potensial ar gyfer ailgyflwyno mynegiad a gweithgaredd GHS-R yn safleoedd penodol, trwy gael gwared ar y casét blocio trawsgrifiadol trwy gweithgaredd ailgyfunas-Cre (Zigman et al., 2005) yn caniatáu ar gyfer gwahaniaethu rhwng effeithiau uniongyrchol ac anuniongyrchol AG-GHS -R1a yn rhanbarthau o ddiddordeb yr ymennydd. Er enghraifft, awgrymir Kern et al., (2015) nad yw gweithredoedd hipocampaidd AG yn cael eu cyfryngu gan rhwymo uniongyrchol i GHS-R1a yn yr hipocampws, ond yn hytrach trwy signalu hypothalamig AG-GHS-R1a sy'n arwain at nerfogaeth yr hipocampws. Trwy ailgyflwyno mynegiad GHS-R yn ddetholus i gnewyllyn hypothalamig perthnasol y llygod GHS-R null-mRFP-GFP-LC3, gallai un asesu rôl yr echelin hypothalamig-hipocampaidd hon yn rheoleiddiad awtoffagi gan signalau AG-GHS-R1a *in vivo*.

Yn ogystal, trwy ymgorffori profion dysgu a chof sy'n dibynnu ar y hipocampws ac triniaethau sy'n modiweiddio awtoffagi, i'r cynllun arbrol yr astudiaeth llygoden gohebydd GHS-R null-mRFP-GFP-LC3, byddai'n bosibl nid yn unig nodweddu effaith echelin ghrelin-GHS-R ar awtoffagi hipocampaidd *in vivo* ond hefyd pennu ei berthnasedd swyddogaethol. Mae cyhoeddiad diweddar Glatigny et al., (2019) yn darparu fframwaith arbrol ar gyfer cynnal arbrolion o'r fath. Yn wir, canfu'r

awduron fod gweiniad atalyddion awtoffagi leupeptin neu spautin-1, neu shRNA yn erbyn FIP200, Beclin-1, neu ATG5, yn achosi nam sylweddol yn perfformiad tasg adnabod gwrthrych newydd (novel object recognition task NOR) pan weinyddwyd 12awr cyn y cyfnod hyfforddi ond nid pan weinyddir 12awr cyn y cyfnod profi; sy'n awgrymu bod ataliad awtoffagi yn amharu ar gof gofodol hipocampaidd tymor hir (Glatigny et al., 2019). Gan ystyried bod ein grŵp wedi dangos o'r blaen bod yr echelin ghrelin-GHS-R yn rheoleiddio cof gofodol hipocampaidd (Hornsby et al, 2020; Kent et al., 2015) ac yn cyfryngu effeithiau buddiol CR ysgafn ar gof hipocampaidd (Hornsby et al., 2016), bydd amlinellu cyfranogiad awtoffagi yng nghof hipocampaidd cyfryngol ghrelin-GHS-R trwy strategaeth arbrofol debyg i un Glatigny et al. (2019) yn amhrisiadwy.

Wrth gwrs, mae'r patrwm arbrofol a amlinellir uchod yn hynod uchelgeisiol a byddai angen cyllid sylweddol (yn ogystal ag amlinelliad logisteg arbrofol) i wireddu. Serch hynny, credaf y byddai'n ddull hynod ddefnyddiol o gynhyrchu gwybodaeth newydd yn ymwneud â rheoleiddiad awtoffagy niwronaidd gan echelin ghrelin-GHS-R yn ogystal â pherthnasedd swyddogaethol y broses hon.



**Ffigur 5.2. Cynllun arbrofol ar gyfer asesu rol awtoffagy yn gweithredau hippocampaid ghrelin**

### **5.2.3. Asesu effaith patrymau bwydo amserol ar rhythm circadaidd awtoffagi hepatic**

Er mwyn adeiladu ar y canfyddiadau addawol o'r arbrawf patrwm bwydo amserol GHS-R<sup>-/-</sup> y traethawd ymchwil hwn, bydd asesiad o effaith patrymau bwydo Gr a MF ar rhythm circadaidd awtoffagi hepatic, defnyddio cynllun arbrol sydd wedi seilio ar rhai grŵp Rajat Singh (Martinez-Lopez et al., 2017; Toledo et al., 2018) yn synhwyrol iawn.

Ar diwrnod olaf yr ymyrraeth dietegol, fyddai'r anifeiliaid penodol yn cael eu trin gyda gweiniad i.p leu (40mg/kg) neu Veh ar gwahanol amseroedd trwy'r dydd, ac wedyn yn cael eu aberthu 2 awr ar ôl hynny. Er enghraifft, gellir trin y llygod am 6am, 9am, 12pm, 3pm, 6pm, ac 9pm, a wedyn eu aberthu a casglu'r meinweoedd am 8am, 11am, 2pm, 5pm, 8pm, ac 11pm. Gellir wedyn asesu trosiad LC3-II trwy homogoneiddio'r afu a perfformio WB, yn yr un modd a disgrifir yn y traethawd ymchwil hwn.

## **5.3. Cydnabyddiaethau ehangach**

### **5.3.1. Pwysigrwydd ystyried patrymau bwydo amserol i astudiaethau DR**

Fel trafodir ym mhennod 1.3, mae cynlluniau DR, fel CR ysgafn, IF a TRF yn ymddangos fel ymyraethau addawol ar gyfer gwella rychwant iechyd, colli pwysau ac oedi datblygiad camweithrediad sy'n gysylltiedig ag oed (Di Francesco et al., 2018) .

Fodd bynnag mae pwysigrwydd amllder prydau bwyd, hyd prydau bwyd a'r egwyl rhwng prydau fwyd (yn ystod y ffenestr bwydo priodol) yn aml yn cael eu anwybyddu mewn astudiaethau DR (Tilston et al., 2019); sy'n cymhlethu'r dehongliadau o'r canfyddiadau.

Yn wir, cyn i canfyddiad Acosta-Rodriguez et al., (2017) bod llygod sydd ar diet CR, yn bwyta'i holl cymeriad bwyd dietegol o fewn 2 awr, ac felly yn destun i cyfnod ymprydio o dros 22 awr pob dydd, cymerwyd yn ganiataol bod effeithiau CR yn cael eu cyfryngu trwy lleihad egni. Ond codau'r canfyddiad hyn y bosibilrwydd bod effeithiau patrymau bwydo CR hefyd wedi'u gyfryngu gan yr amser bwydo cyfyngedig. Yn wir dengys astudiaeth diweddar gan yr un grŵp, fod effaith CR yn unig ar rychwant bywyd (cynnydd 10%) yn llai na effaith CR gyda ffenestr ymprydio a chywiriad camweithrediad rhythm circadaidd (cynnydd 35%) , yn llygod gwrywaidd C57BL/6 (Acosta-Rodríguez et al., 2022).

Ymhellach pwysigrwydd patrymau bwydo amserol hefyd yn cael eu amlygu gan canlyniadau treialon clinigol nodedig diweddar ynglŷn a effaith TRF ar pwysau corff. Adroddodd Lowe et al., (2020) nad oedd 16:8 TRF, gyda bwydo ad libitum rhwng 12pm ac 8pm, yn fwy effeithiol ar gyfer colli pwysau, mewn RCT o wrywod a benywod ordew a dros bwysau, nag patrwm bwydo amseru prydau cyson (CMT). Fodd bynnag, er yr adroddir bod protocol CMT yn cynnwys tri phryd strwythuredig, ni ddarperir amseriad pob pryd, tra bod byrbryd rhwng prydau hefyd yn cael ei ganiatáu (Lowe et al., 2020). Felly, mae'n ymddangos mai'r cyfranogwr sy'n penderfynu ar amseriad cymeriant bwyd yn y protocol CMT. At hynny, amcangyfrifwyd cymeriant a gwariant ynni o fodel mathemategol llinol o fesuriadau pwysau'r corff, yn lle adroddiadau cyfranogwyr (Lowe et al., 2020); sy'n golygu bod diffyg data ansoddol yn ymwneud â phatrymau bwydo dyddiol ar gyfer y ddau grŵp. Felly, er y gellir tybio bod y grŵp CMT wedi bwyta mwy o galoriau cyn 12pm na'r grŵp TRF, nid yw'n glir i ba raddau yr oedd patrymau cymeriant bwyd a bwydo yn amrywio rhwng 12pm ac 8pm ar gyfer y ddau grŵp.

### **5.3.2. Potensial therapiwtig ghrelin**

Ganolbwyntiwyd nifer o astudiaethau cynnar ar potensial echelin ghrelin fel therapiwtig grwth-gordewdra, oherwydd swyddogaethau orecsigenig AG alldarddol

(Peris-Sampedro, Le May, Stoltenborg, Schele, & Dickson, 2021). Fodd bynnag, cynhaliwyd arbrofion gyda modelau llygod gyda abladiad o brif genynnau echelin ghrelin canlyniadau anghyson ar cymeriant bwyd a phwysau corff (Mani & Zigman 2017; Peris-Sampedro et al., 2021; Uchida, Zigman & Perello, 2013), tra fod gordewdra yn arwain at ymwrthedd ghrelin yn niwronau NPY/AgRP yr Arc (Briggs, Enriori, Lemus, Cowley, & Andrews, 2010; Zigman, Bouret, & Andrews, 2016). Felly mae yna ansicrwydd dros cyfaddasrwydd ghrelin fel therapiwtig gwrth-gordewdra. Er hyn, mae ein canlyniadau ni fod pori yn hyrwyddo blonegrwydd trwy signalu GHS-R, a canlyniadau grwpiau eraill bod colled signalu AG-GHS-R yn amharu gyda amllder prydau bwyd (Lin et al., 2014), a bwydo hedonig (Zigman et al., 2005) yn awgrymu fod echelin ghrelin mewndarddol yn hybu effeithiau sy'n perthnasol i gymeriad bwyd.

Fodd bynnag mae'n bwysig cyd-destunoli effeithiau orecsigenig echelin ghrelin. Er enghraifft nid yw patrwm bwydo pori yn ymyrraeth fyddwch yn cynnig i bobl, ac mae'n debygol fydd patrymau bwydo sy'n arwain at cyfyngiad calorïau, colled pwysau, neu cywiriad camweithrediad rhythm circadaidd yn fwy buddiol i rychwant iechyd. Ar y llaw arall mewn pobl bregus neu sydd a cahecsia, mae gan ghrelin neu GHSs synthetig potensial i atal colled pwysau, trwy ei effeithiau ar signalu hormon twf a flonegrwydd (Peris-Sampedro et al., 2021).

Yn ogystal a'i effeithiau ar pwysau corff a hormon twf, mae canfyddiadau o modelau cnofilod hefyd yn awgrymu fod gan ghrelin y potensial i ysgogi plastigrwydd hipocampaid, AHN, ac amddiffyn niwronau bregus rhag marwolaeth (Buntwal et al., 2019; Morgan, Davies, & Andrews, 2017).

Mae'r darganfyddiad fod LEAP2 yn gweithredu fel gwrthweithydd GHS-R1a mewndarddol, nid yn unig yn ychwanegu cymhlethdod pellach at ddeinameg signalu echelin ghrelin ond hefyd yn darparu targed therapiwtig newydd ar gyfer modiwlleiddio effeithiau ffisiolegol AG (X. C. Ge et al., 2018) . Yn wir, mae

canfyddiadau diweddar o lygoden LEAP2 KO sydd newydd ei gynhyrchu yn dangos bod colled LEAP2 yn cynyddu sensitifrwydd secretiad GH a swyddogaeth orecsigenig AG, tra hefyd yn lleddfu ymwrthedd ghrelin mewn gordewdra a achosir gan ddiät (Shankar et al., 2021).

### 5.3.3. Cydnabyddiaeth am awtoffagi

Mae awtoffagi yn amlwg yn bwysig i iechyd systemau organau amrywiol, gan gynnwys yr ymennydd a'r afu (Mizushima & Komatsu, 2011). Mae modiweiddio therapiwtig awtoffagi felly yn cael ei ystyried yn strategaeth ymarferol ar gyfer brwydro yn erbyn clefydau niwroddirywiol sy'n gysylltiedig ag oedran (Djajadikerta et al., 2020) yn ogystal â llu o batholegau afu gan gynnwys clefyd yr afu brasterog di-alcohol, hepatitis firaol, a diffyg  $\alpha$ 1-Antitrypsin (Ueno & Komatsu, 2017).

Fodd bynnag, er bod modiweiddiad ffarmacolegol a gennynol o awtophagi yn arwain at ganlyniadau buddiol ar batholegau sy'n gysylltiedig ag oedran mewn systemau model, mae bwlch trosiadol sylweddol o ran defnyddioldeb modiweiddiad awtophagi mewn cleifion dynol (Loos et al., 2020). Yn wir, dau rwystr i ddefnydd llwyddiannus o fodiweiddiad awtoffagi mewn bodau dynol yw diffyg dealltwriaeth o cineteg *in vivo* o fflwcs awtoffagig yn ogystal â phryderon yn ymwneud â sgîl-ffeithiau andwyol.

Mewn clefydau niwroddirywiol er enghraifft, lle mae camweithrediad sylweddol o allu diraddiol lysosomaidd, byddai ysgogi biogenesis awtoffagosomau heb gywiriad cydredol o fflwcs camweithredol yn debygol o waethygu patholeg afiechyd, trwy gronni deunydd cellog camweithredol ymhellach (Bordi et al., 2016). Ychwanegwyd cymhlethdod pellach gan y ffaith bod gan niwronau unigol gwahanol cyfraddau fflwcs awtoffagig, a felly galluedd amrywiol i clirio agregau proteinaidd (Tsvetkov et al., 2013). Ymhellach, mewn rhai achosion, megis clefyd clefyd Huntington's, gwelir nam mewn adnabyddiaeth cargo awtoffagig gan niwronau, er fod yna ffurfiad a throsiad cyflawn o awtoffagosomau (Martinez-Vicente et al., 2010). Felly, er mwyn

trin camweithrediadau awtoffagig yn cyd-destun niwroddirwydiad, mae'n hanfodol fod y triniaeth yn galluogi ffurfiad a throsiad effeithiol awtoffagosomau, ond hefyd adnabyddiaeth a diraddiad swbstradau awtoffagig.

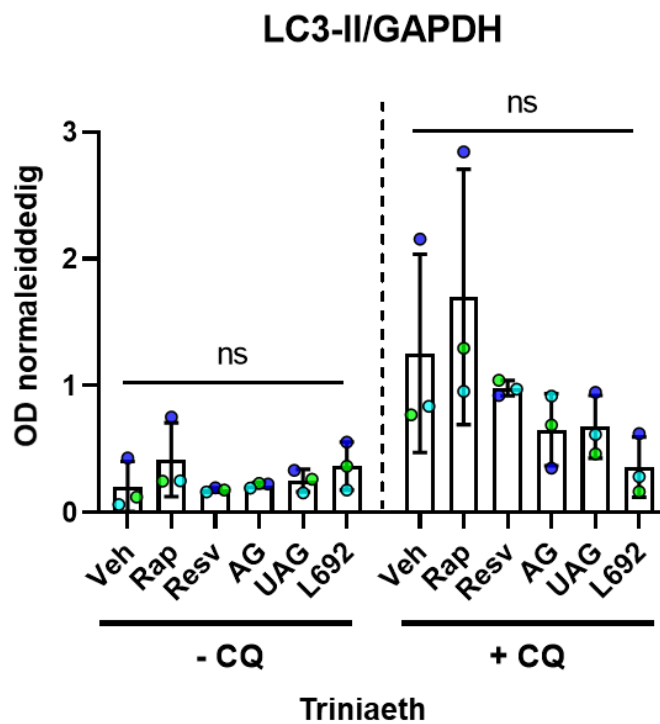
Mae hefyd yn hanfodol gwerthfawrogi nad yw ysgogiad awtoffagig wastad yn buddiol mewn sefyllfa clinigol. Yn wir, mae dadreoleiddio fflwcs awtoffagig yn fanteisiol i oroesiad tiwmorau malaen (Degenhardt et al., 2006), tra gall anwythiad gormodol o fflwcs awtoffagig arwain at farwolaeth celloedd (Galluzzi et al., 2018).

## **5.4 Datganiad i gloi**

I gloi, ni ddengys y traethawd hir hwn bod echelin ghrelin-GHS-R yn ysgogi fflwcs awtoffagig yng nghelloedd SN4741 neu HT-22 o dan yr amodau in vitro a ymchwilir, ond mae blocâd trawsgrifiad systemig GHS-R *in vivo* yn modiweiddio awtoffagi yn hipocampws ac afu llygod. Ymhellach, canfuwyd tystiolaeth bod patrwm bwydo prori nosol yn modiweiddio fflwcs awtoffagi hepatic mewn modd sy'n dibynnu ar GHS-R. Y canfyddiadau diweddarach hyn yw'r mwyaf nodedig o'r traethawd hir ac maent yn gosod llwyfan ar gyfer ymchwiliadau pellach i sut mae colled signalu ghrelin-GHS-R yn effeithio ar awtoffagi o dan amodau bwydo gwahanol, yn ogystal â rôl awtoffagi yng ngweithredoedd ffisiolegol echelin ghrelin-GHS-R.



## Atodiad A: Data Atodol Pennod 3

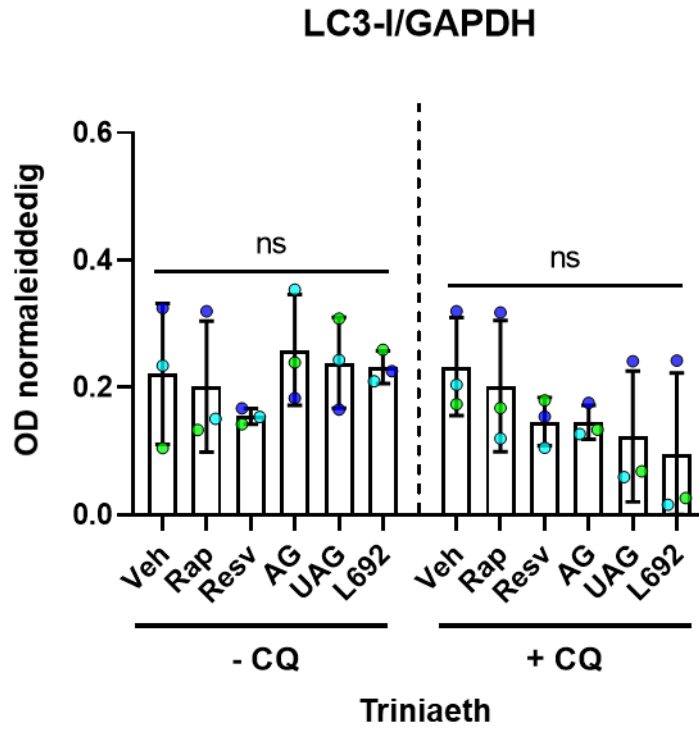


Ffigur A1. Dwyseddau optegol (ODs) normaleiddedig LC3-II celloedd SN4741 a defnyddir i cynhyrchu'r data newid gwaith drosodd yn ffigur 3.7.

Tabl A1. Crynodeb o gymariaethau lluosog Dunnett's o dwyseddau optegol

normaleiddedig LC3-II celloedd SN4741

LC3-II/GAPDH					
-CQ					
Cymariaethau	Gwahaniaeth	95.00% CI	O dan y trothwy?	Crynodeb	P
Rap vs. Veh	0.21	-0.18 to 0.61	No	ns	0.43
Resv vs. Veh	-0.027	-0.42 to 0.37	No	ns	>0.99
AG vs. Veh	0.011	-0.38 to 0.41	No	ns	>0.99
UAG vs. Veh	0.046	-0.35 to 0.44	No	ns	>0.99
L692 vs. Veh	0.16	-0.23 to 0.56	No	ns	0.66
+CQ					
Cymariaethau	Gwahaniaeth	95.00% CI	O dan y trothwy?	Crynodeb	P
Rap vs. Veh	0.44	-0.86 to 1.8	No	ns	0.78
Resv vs. Veh	-0.27	-1.6 to 1.0	No	ns	0.96
AG vs. Veh	-0.6	-1.9 to 0.71	No	ns	0.56
UAG vs. Veh	-0.58	-1.9 to 0.73	No	ns	0.59
L692 vs. Veh	-0.9	-2.2 to 0.41	No	ns	0.23

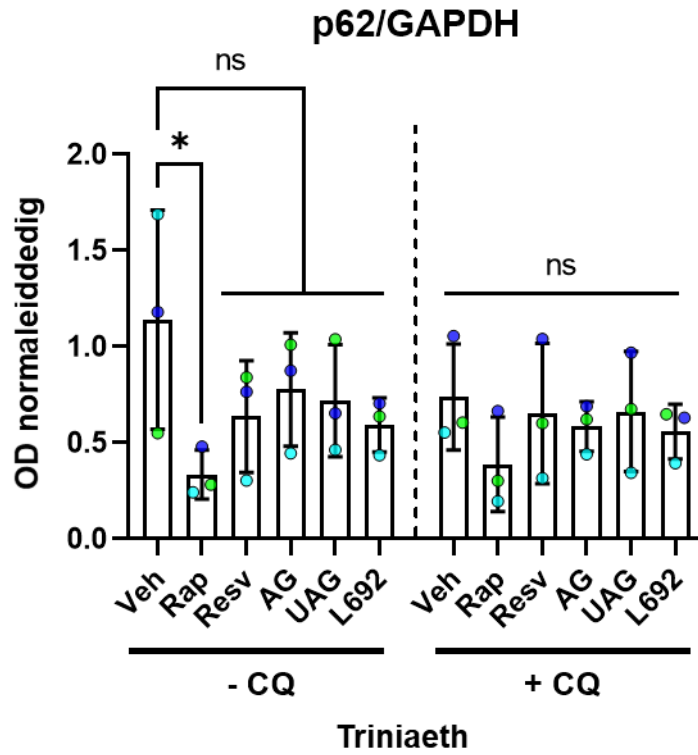


Ffigur A2. Dwyseddau optegol (ODs) normaleiddedig LC3-I celloedd SN4741 a defnyddir i cynhyrchu'r data newid gwaith drosodd yn ffigur 3.7.

Tabl A2. Crynodeb o gymariaethau lluosog Dunnett's o dwyseddau optegol

normaleiddedig LC3-I celloedd SN4741

<b>LC3-I/GAPDH</b>					
<b>-CQ</b>					
<b>Cymariaethau</b>	<b>Gwahaniaeth</b>	<b>95.00% CI</b>	<b>O dan y trothwy?</b>	<b>Crynodeb</b>	<b>P</b>
Rap vs. Veh	-0.02	-0.20 to 0.16	No	ns	>0.99
Resv vs. Veh	-0.067	-0.25 to 0.12	No	ns	0.74
AG vs. Veh	0.037	-0.15 to 0.22	No	ns	0.96
UAG vs. Veh	0.018	-0.17 to 0.20	No	ns	>0.99
L692 vs. Veh	0.01	-0.17 to 0.19	No	ns	>0.99
<b>+CQ</b>					
<b>Cymariaethau</b>	<b>Gwahaniaeth</b>	<b>95.00% CI</b>	<b>O dan y trothwy?</b>	<b>Crynodeb</b>	<b>P</b>
Rap vs. Veh	-0.031	-0.24 to 0.18	No	ns	0.99
Resv vs. Veh	-0.086	-0.29 to 0.12	No	ns	0.64
AG vs. Veh	-0.087	-0.29 to 0.12	No	ns	0.63
UAG vs. Veh	-0.11	-0.32 to 0.097	No	ns	0.44
L692 vs. Veh	-0.14	-0.34 to 0.069	No	ns	0.25

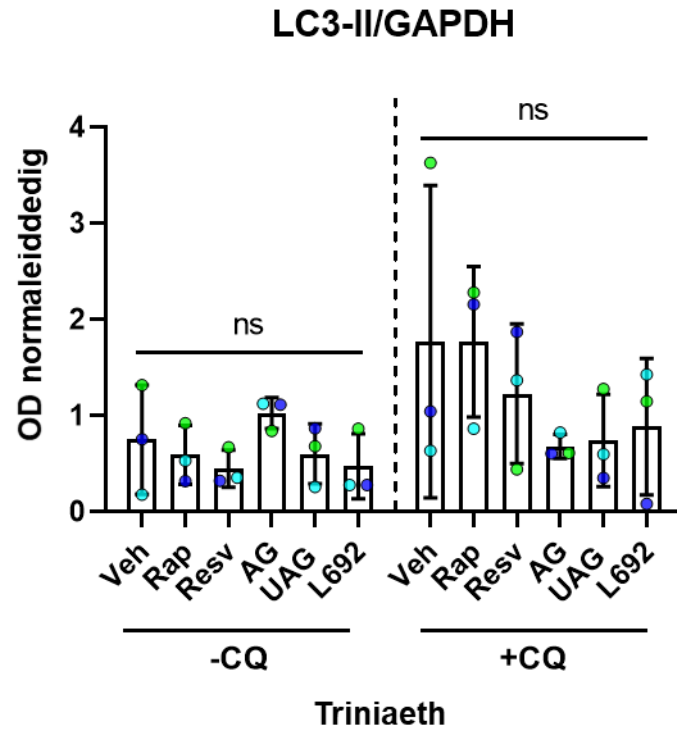


Ffigur A3. Dwyseddau optegol (ODs) normaleiddedig p62 celloedd SN4741 a defnyddir i cynhyrchu'r data newid gwaith drosodd yn ffigur 3.7.

Tabl A3. Crynodeb o gymariaethau lluosog Dunnett's o dwyseddau optegol

normaleiddedig p62 celloedd SN4741

<b>p62/GAPDH</b>					
<b>-CQ</b>					
<b>Cymariaethau</b>	<b>Gwahaniaeth</b>	<b>95.00% CI</b>	<b>O dan y trothwy?</b>	<b>Crynodeb</b>	<b>P</b>
Rap vs. Veh	-0.81	-1.6 to -0.045	Yes	*	0.04
Res vs. Veh	-0.5	-1.3 to 0.26	No	ns	0.25
AG vs. Veh	-0.36	-1.1 to 0.40	No	ns	0.53
UAG vs. Veh	-0.42	-1.2 to 0.34	No	ns	0.4
L692 vs. Veh	-0.55	-1.3 to 0.21	No	ns	0.2
<b>+CQ</b>					
<b>Cymariaethau</b>	<b>Gwahaniaeth</b>	<b>95.00% CI</b>	<b>O dan y trothwy?</b>	<b>Crynodeb</b>	<b>P</b>
Rap vs. Veh	-0.35	-0.97 to 0.27	No	ns	0.38
Res vs. Veh	-0.086	-0.70 to 0.53	No	ns	>0.99
AG vs. Veh	-0.15	-0.77 to 0.46	No	ns	0.92
UAG vs. Veh	-0.075	-0.69 to 0.54	No	ns	>0.99
L692 vs. Veh	-0.18	-0.80 to 0.44	No	ns	0.86



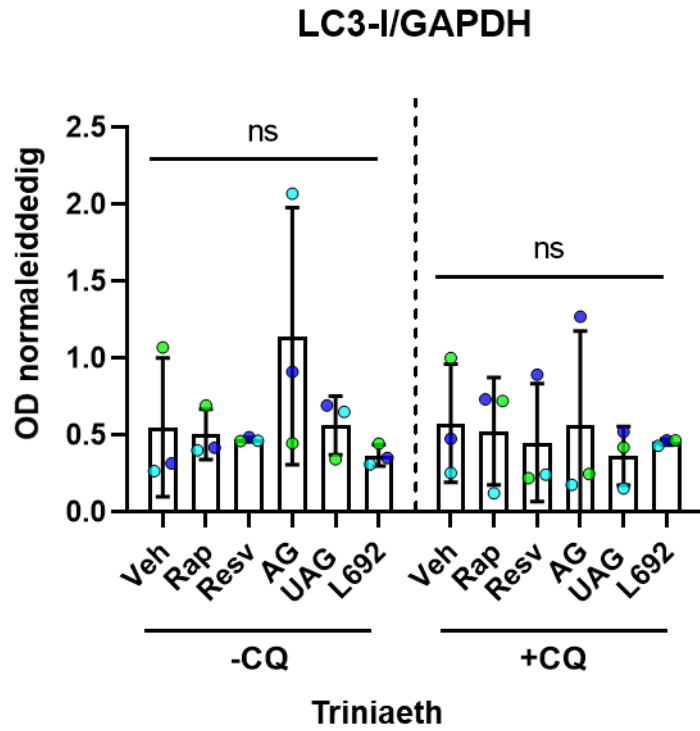
Ffigur A4. Dwyseddau optegol (ODs) normaleiddedig LC3-II celloedd HT-22 a defnyddir i cynhyrchu'r data newid gwaith drosodd yn ffigur 3.8.

Tabl A4. Crynodeb o gymariaethau lluosog Dunnett's o dwyseddau optegol

normaleiddedig LC3-II celloedd HT-22

<b>LC3-II/GAPDH</b>					
<b>-CQ</b>					
<b>Cymariaethau</b>	<b>Gwahaniaeth</b>	<b>95.00% CI</b>	<b>O dan y trothwy?</b>	<b>Crynodeb</b>	<b>P</b>
Rap vs. Veh	-0.16	-0.96 to 0.65	No	ns	0.97
Resv vs. Veh	-0.3	-1.1 to 0.50	No	ns	0.72
AG vs. Veh	0.28	-0.53 to 1.1	No	ns	0.78
UAG vs. Veh	-0.15	-0.95 to 0.66	No	ns	0.97
L692 vs. Veh	-0.28	-1.1 to 0.53	No	ns	0.78
<b>+CQ</b>					
<b>Cymariaethau</b>	<b>Gwahaniaeth</b>	<b>95.00% CI</b>	<b>O dan y trothwy?</b>	<b>Crynodeb</b>	<b>P</b>
Rap vs. Veh	-0.003	-2.1 to 2.1	No	ns	>0.99
Resv vs. Veh	-0.54	-2.6 to 1.5	No	ns	0.9
AG vs. Veh	-1.1	-3.1 to 0.97	No	ns	0.44
UAG vs. Veh	-1	-3.1 to 1.0	No	ns	0.49
L692 vs. Veh	-0.89	-2.9 to 1.2	No	ns	0.61

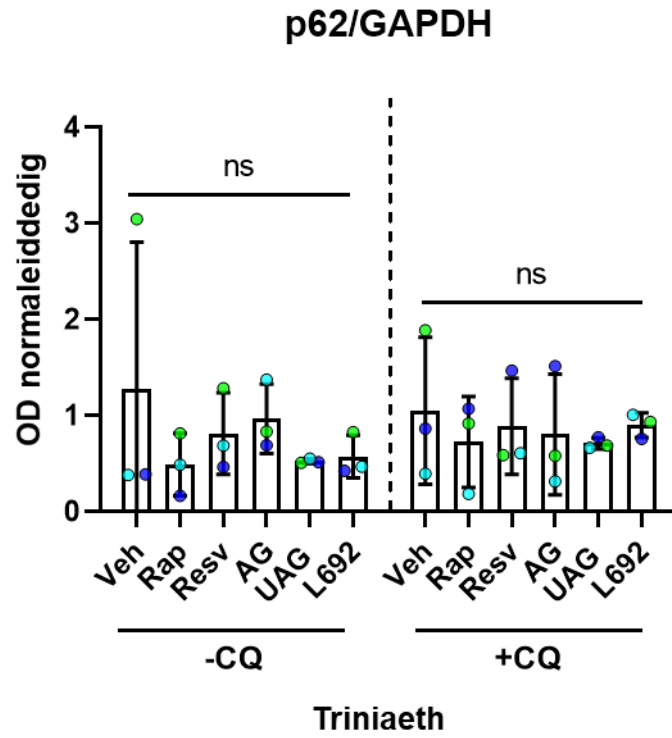




Ffigur A5. Dwyseddau optegol (ODs) normaleiddedig LC3-I celloedd HT-22 a defnyddir i cynhyrchu'r data newid gwaith drosodd yn ffigur 3.8.

Tabl A5. Crynodeb o gymariaethau lluosog Dunnett's o dwyseddau optegol normaleiddedig LC3-I celloedd HT-22

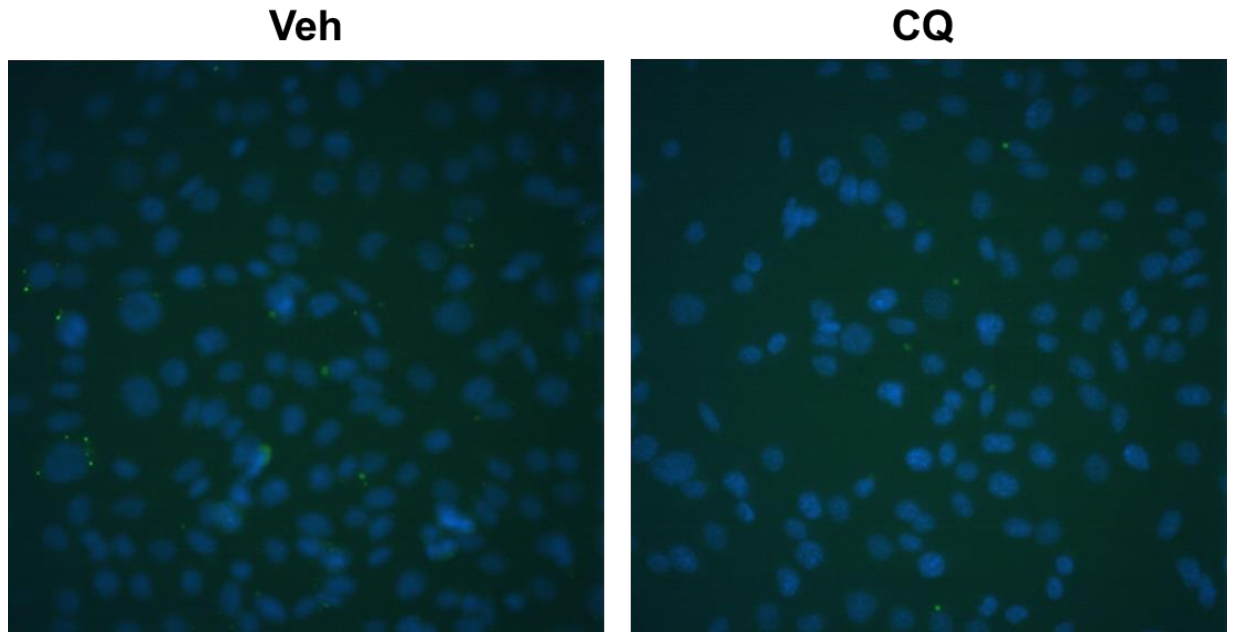
<b>LC3-I/GAPDH</b>					
<b>-CQ</b>					
<b>Cymariaethau</b>	<b>Gwahaniaeth</b>	<b>95.00% CI</b>	<b>O dan y trothwy?</b>	<b>Crynodeb</b>	<b>P</b>
Rap vs. Veh	-0.046	-1.0 to 0.91	No	ns	>0.99
Resv vs. Veh	-0.079	-1.0 to 0.87	No	ns	>0.99
AG vs. Veh	0.59	-0.36 to 1.5	No	ns	0.3
UAG vs. Veh	0.012	-0.94 to 0.97	No	ns	>0.99
L692 vs. Veh	-0.18	-1.1 to 0.77	No	ns	0.97
<b>+CQ</b>					
<b>Cymariaethau</b>	<b>Gwahaniaeth</b>	<b>95.00% CI</b>	<b>O dan y trothwy?</b>	<b>Crynodeb</b>	<b>P</b>
Rap vs. Veh	-0.052	-0.93 to 0.83	No	ns	>0.99
Resv vs. Veh	-0.13	-1.0 to 0.75	No	ns	>0.99
AG vs. Veh	-0.012	-0.89 to 0.87	No	ns	>0.99
UAG vs. Veh	-0.21	-1.1 to 0.67	No	ns	0.93
L692 vs. Veh	-0.12	-1.0 to 0.76	No	ns	>0.99



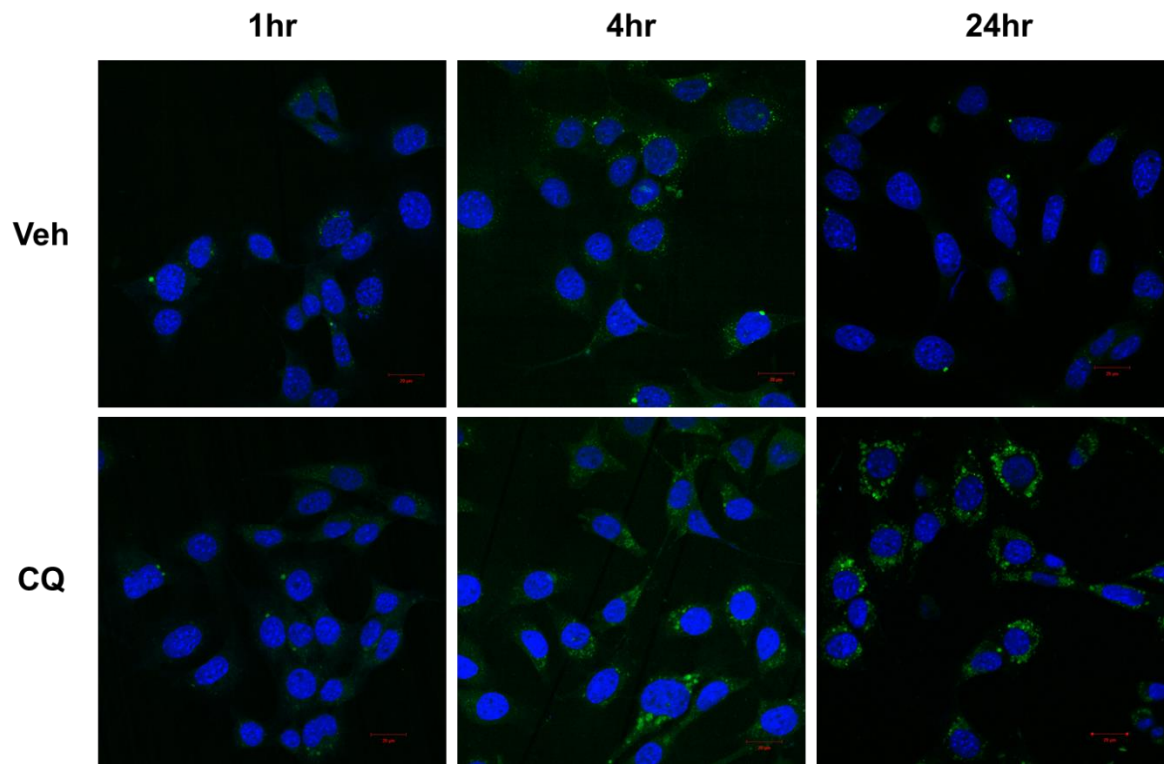
Ffigur A6. Dwyseddau optegol (ODs) normaleiddedig p62 celloedd HT-22 a defnyddir i cynhyrchu'r data newid gwaith drosodd yn ffigur 3.8.

Tabl A6. Crynodeb o gymariaethau lluosog Dunnett's o dwyseddau optegol normaleiddedig p62 celloedd HT-22

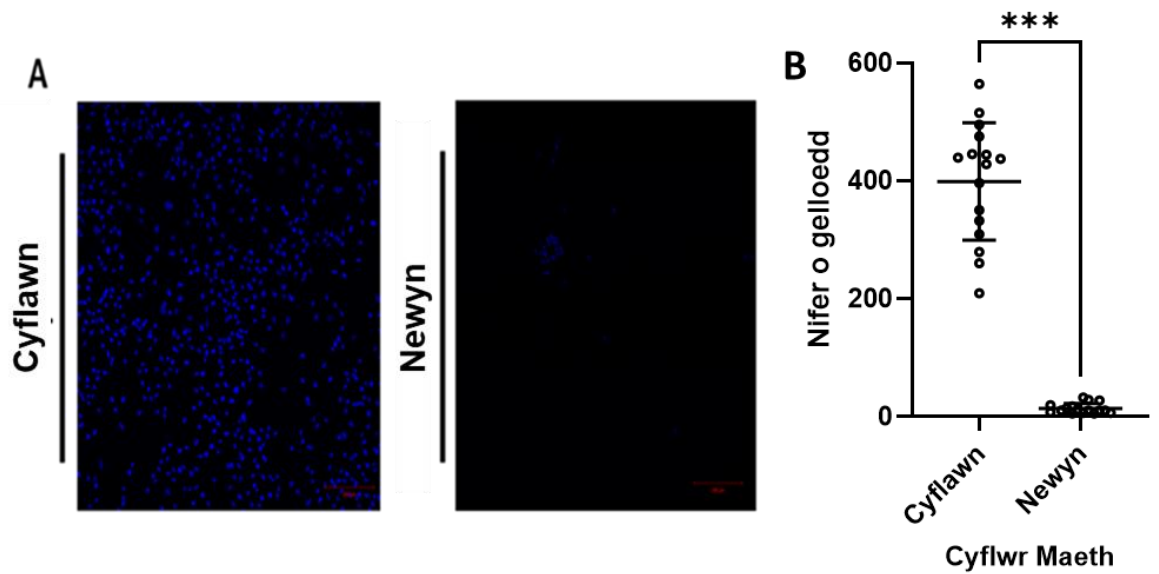
<b>p62/GAPDH</b>					
<b>-CQ</b>					
<b>Cymariaethau</b>	<b>Gwahaniaeth</b>	<b>95.00% CI</b>	<b>O dan y trothwy?</b>	<b>Crynodeb</b>	<b>P</b>
Rap vs. Veh	-0.78	-2.4 to 0.84	No	ns	0.52
Resv vs. Veh	-0.46	-2.1 to 1.2	No	ns	0.88
AG vs. Veh	-0.3	-1.9 to 1.3	No	ns	0.97
UAG vs. Veh	-0.75	-2.4 to 0.88	No	ns	0.56
L692 vs. Veh	-0.7	-2.3 to 0.93	No	ns	0.62
<b>+CQ</b>					
<b>Cymariaethau</b>	<b>Gwahaniaeth</b>	<b>95.00% CI</b>	<b>O dan y trothwy?</b>	<b>Crynodeb</b>	<b>P</b>
Rap vs. Veh	-0.32	-1.5 to 0.85	No	ns	0.88
Resv vs. Veh	-0.16	-1.3 to 1.0	No	ns	>0.99
AG vs. Veh	-0.25	-1.4 to 0.93	No	ns	0.96
UAG vs. Veh	-0.34	-1.5 to 0.84	No	ns	0.87
L692 vs. Veh	-0.15	-1.3 to 1.0	No	ns	>0.99



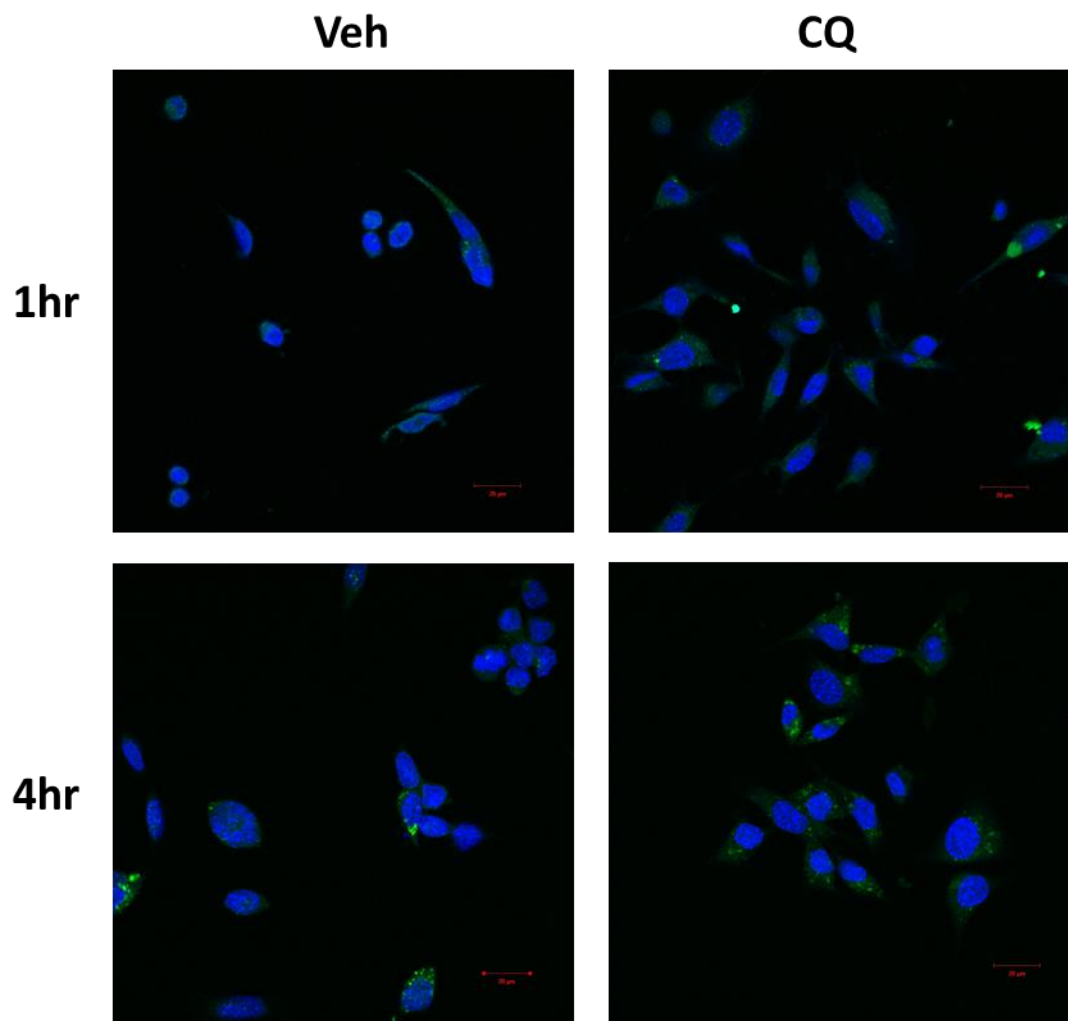
**Ffigur A7. Delweddau cynrychioladol o staenio GFP-LC3 celloedd SN4741, o'r optimeiddiaethau cynnar (aflwyddiannus). Delweddwyd gyda gwrthrychiadur 40x y system In-Cell-Analyzer.**



**Ffigur A8. Delweddau cynrychioladol o staenio Cyto ID yng nghelloedd SN4741 ar ôl triniaeth gyda clorocwin neu rheolydd am 1, 4 ac 24 awr.**

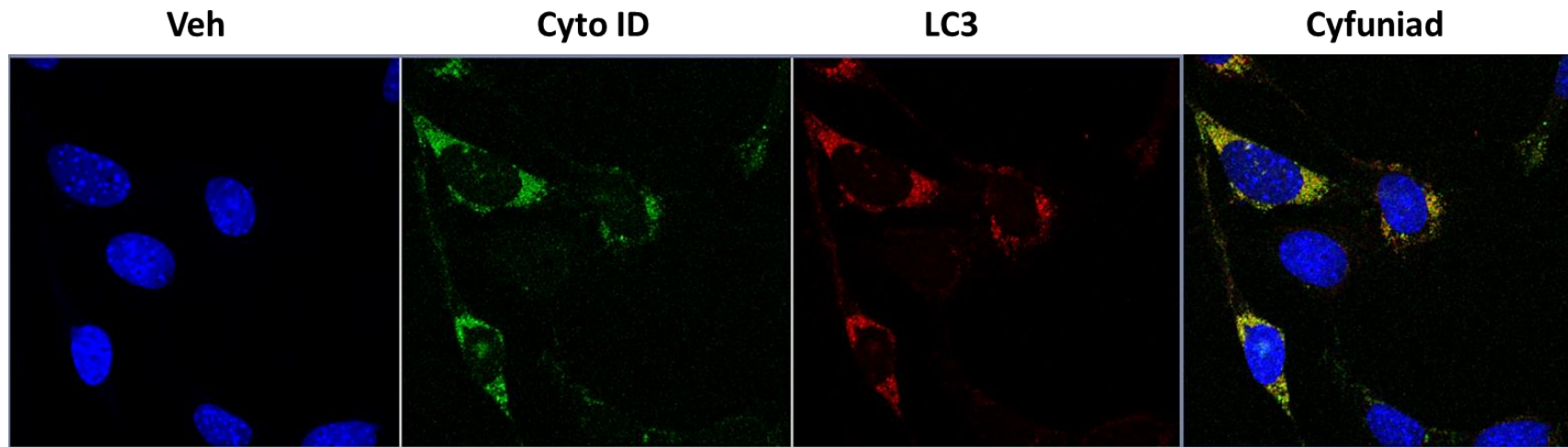


**Ffigur A9. Cymhariaeth nifer o gelloedd SN4741 yn dilyn magiad 1 awr o dan amodau maeth cyflawn neu newyn maetholion a serwm. A).** Delweddau cynrychioladol, a chymerir gyda gwrthrychiadur 10x microsgop cydffocal LSM710, o cnewyllau celloedd SN4741. Bariau graddfa yn cynrychioli 200 $\mu$ m. **B).** Arweiniodd newyn 1 awr at golled sylweddol ac arwyddocaol iawn ( $P = < 0.001$ ). Data a gyflwynir fel cymedr  $\pm$  SD o 16 maes golwg o un dyblyg arbrolol a'i ddadansoddi gan brawf-T heb bâr.

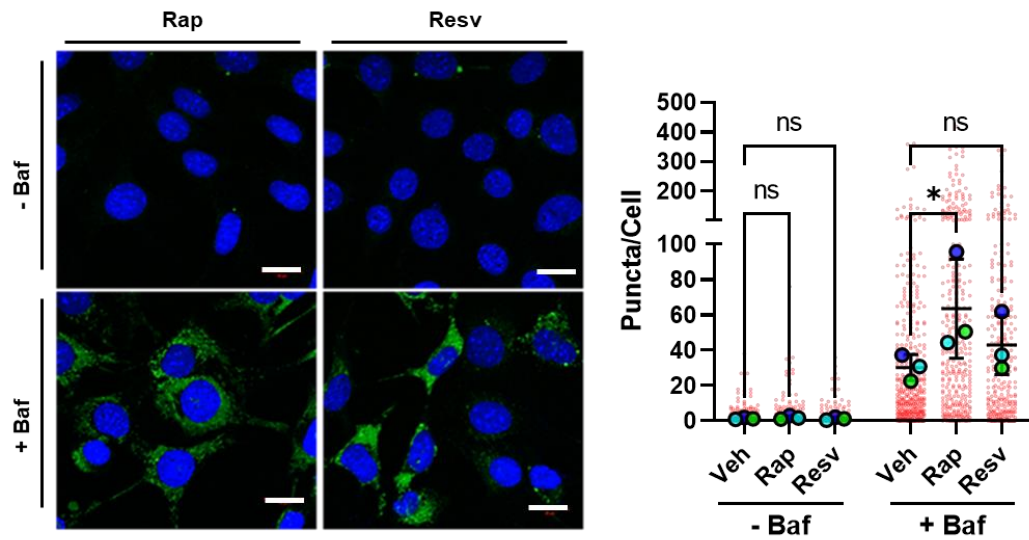


**Ffigur A10. Delweddau cynrychioladol o staenio Cyto ID yng nghelloedd SN4741 ar ôl newyn maetholion a triniaeth gyda CQ neu Veh am naill ai 1 neu 4 awr.**

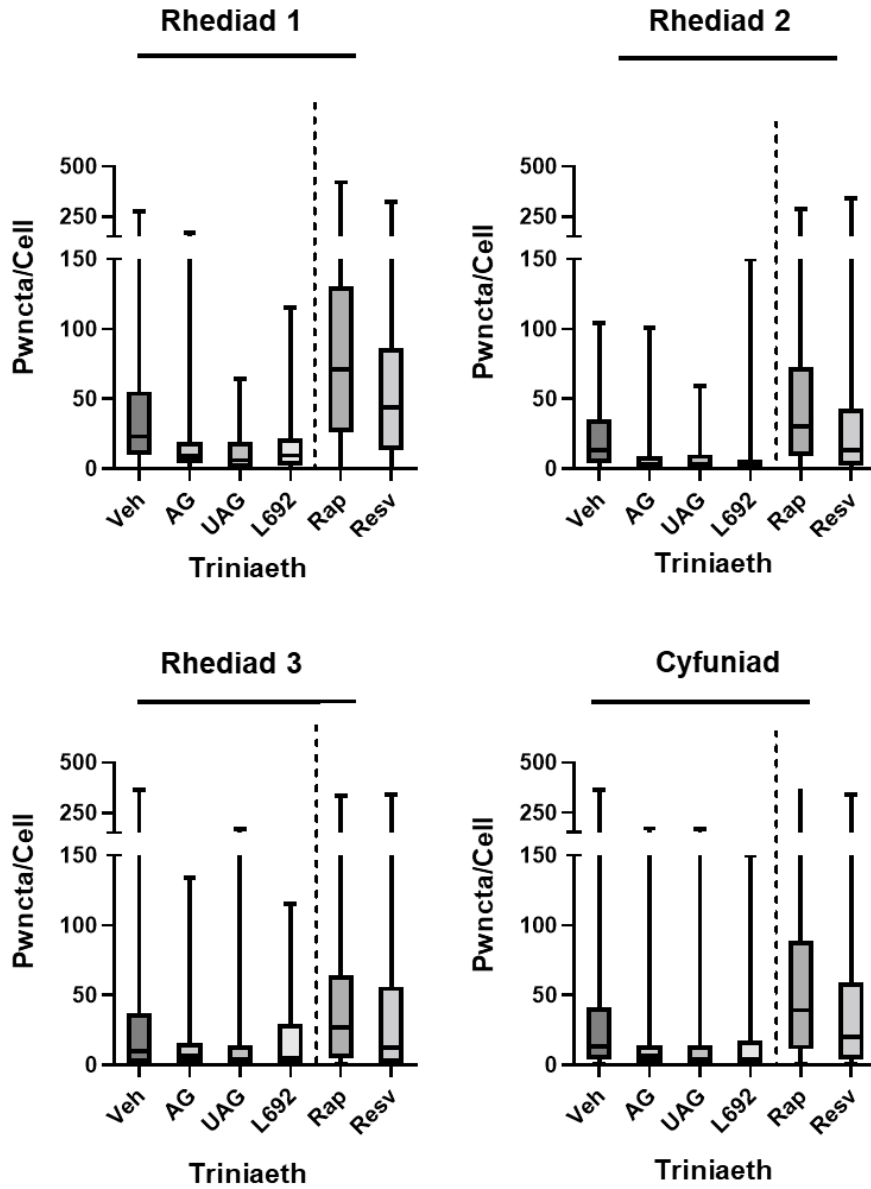




**Ffigur A11. Delwedd cynrychioladol o cyd-staenio Cyto ID ac LC3 yng nghelloedd SN4741 sydd wedi'u trin gyda rapamycin a bafilomycin.**



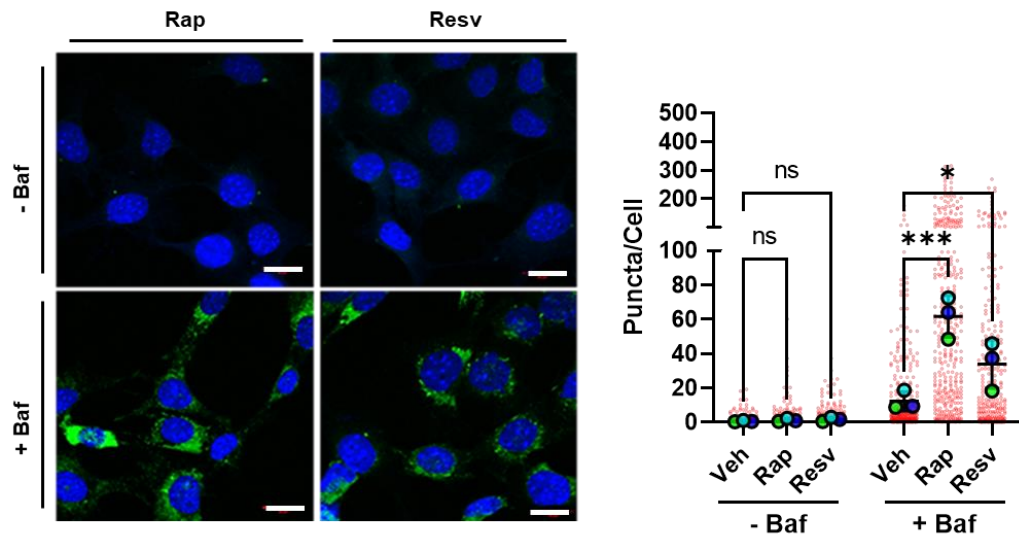
**Ffigur A12. Staenio Cyto ID yng nghelloedd SN4741 maeth cyflawn sydd wedi'u trin gyda rapamycin (Rap) a resveratrol (Resv) yn absenoldeb a phresenoldeb Baf. Mae'r data'n gysylltiedig â'r rhai yn ffigur 3.13. Nodir cymariaethau lluosog Tukey bod Rap wedi cynyddu'n nifer o pwncta Cyto ID yn arwyddocaol o'i gymharu â Veh, ym mhresenoldeb Baf ( $P = 0.02$ ), ond ni wnaeth Resv ( $P = 0.44$ ). Ni effeithiodd y naill driniaeth ar groniad pwncta Cyto ID yn absenoldeb Baf.**



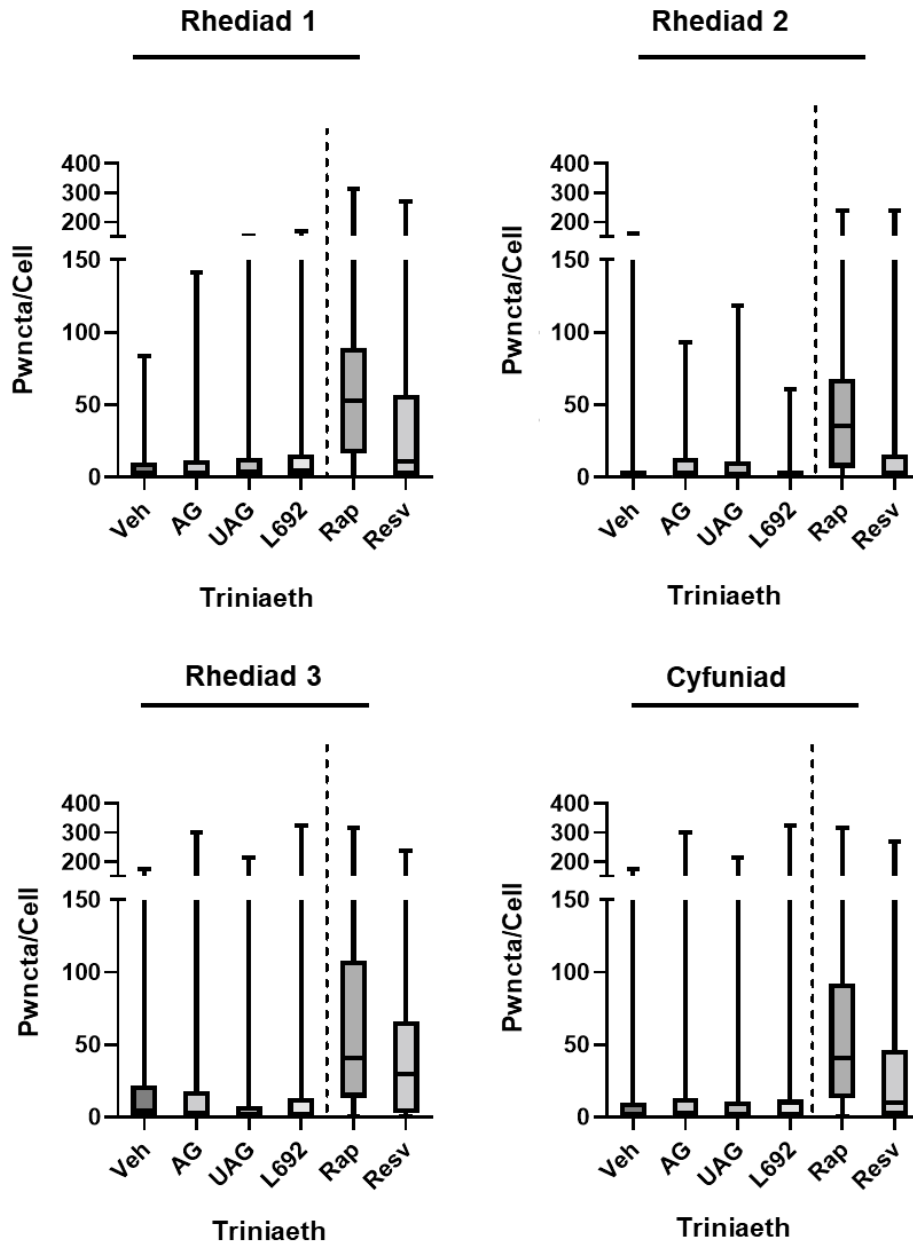
Ffigur A13. Plotiau blwch a wisger o ddata pwncta Cyto ID/cell ar gyfer celloedd SN4741 maeth cyflawn sydd wedi'u trin gyda Baf. Mae'r data'n gysylltiedig â ffigur 3.13.

Tabl A7. Crynodeb o cymariaethau ystadegol prawf Dunnet ar gyfer effeithiau triniaethau echelin ghrelin ar croniad pwncta Cyto ID yng nghelloedd SN4741 o dan amodau maeth cyflawn.

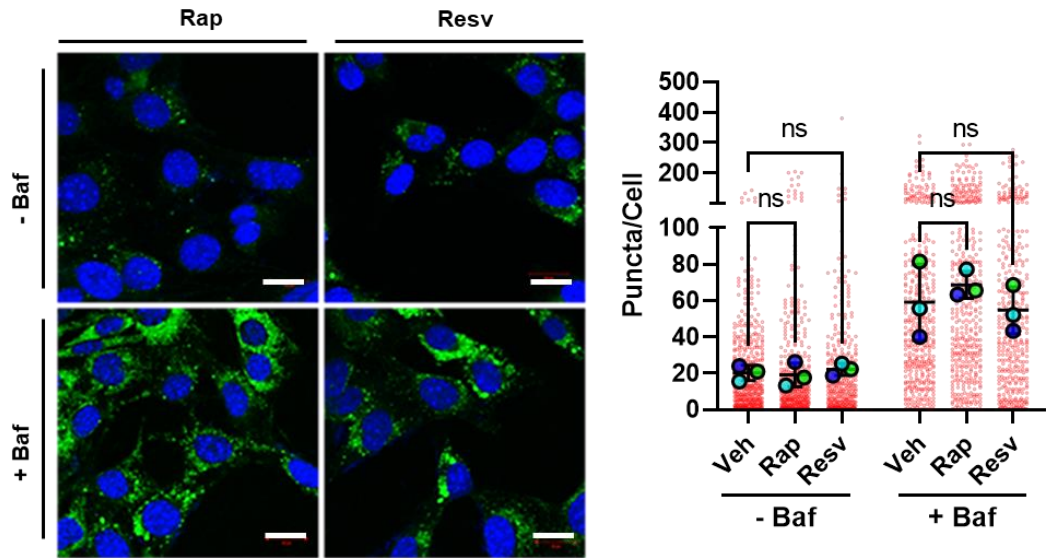
<b>SN4741 Maeth Cyflawn</b>					
<b>- Baf</b>					
<b>Cymariaethau</b>	<b>Gwahaniaeth</b>	<b>95.00% CI</b>	<b>O dan y trothwy?</b>	<b>Crynodeb</b>	<b>P</b>
Veh vs. AG	0.38	-0.61 to 1.4	No	ns	0.58
Veh vs. UAG	0.69	-0.30 to 1.7	No	ns	0.18
Veh vs. L692	0.73	-0.26 to 1.7	No	ns	0.15
<b>+ Baf</b>					
<b>Cymariaethau</b>	<b>Gwahaniaeth</b>	<b>95.00% CI</b>	<b>O dan y trothwy?</b>	<b>Crynodeb</b>	<b>P</b>
Veh vs. AG	17	2.6 to 31	Yes	*	0.02
Veh vs. UAG	18	4.0 to 32	Yes	*	0.02
Veh vs. L692	16	1.9 to 30	Yes	*	0.03



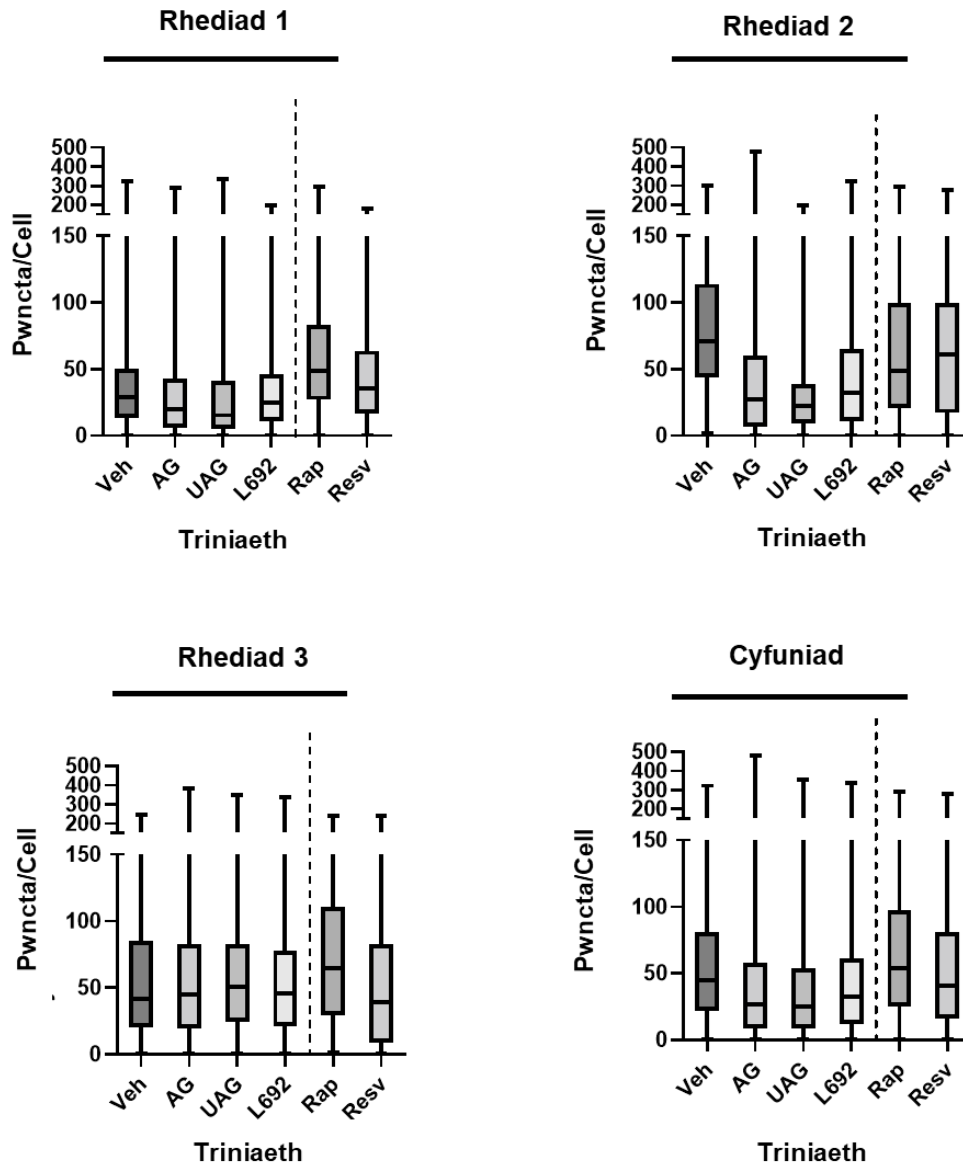
**Ffigur A14. Staenio Cyto ID yng nghelloedd SN4741 maeth cyfyngedig sydd wedi'u trin gyda rapamycin (Rap) a resveratrol (Resv) yn absenoldeb a phresenoldeb Baf. Mae'r data'n gysylltiedig â'r rhai yn ffigur 3.14. Nodir cymariaethau lluosog Tukey bod Rap ( $P = < 0.001$ ) a Resv ( $P = 0.01$ ) wedi cynyddu'n nifer o pwncta Cyto ID yn arwyddocaol o'i gymharu â Veh, ym mhresenoldeb Baf. Ni effeithiodd y naill driniaeth ar groniad pwncta Cyto ID yn absenoldeb Baf.**



Ffigur A15. Plotiau blwch a wisger o ddata pwncta Cyto ID/cell ar gyfer celloedd SN4741 maeth cyfyngedig sydd wedi'u trin gyda Baf. Mae'r data'n gysylltiedig â ffigur 3.14.

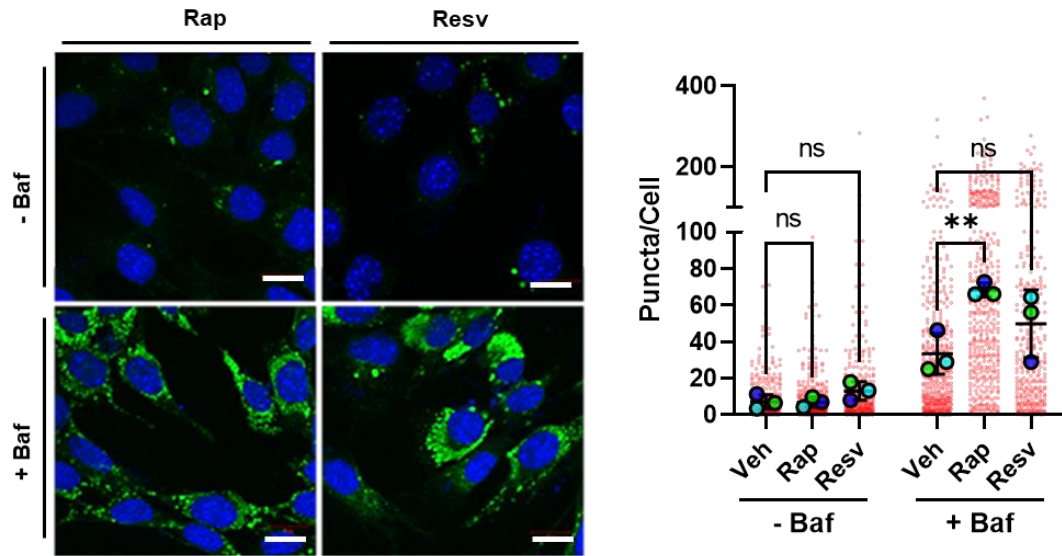


**Ffigur A16. Staenio Cyto ID yng nghelloedd HT-22 maeth cyflawn sydd wedi'u trin gyda rapamycin (Rap) a resveratrol (Resv) yn absenoldeb a phresenoldeb Baf. Mae'r data'n gysylltiedig â'r rhai yn ffigur 3.15. Ni chaeth Rap neu Resv effaith arwyddocaol ar croniad pwncta Cyto ID yn absenoldeb neu presenoldeb Baf.**

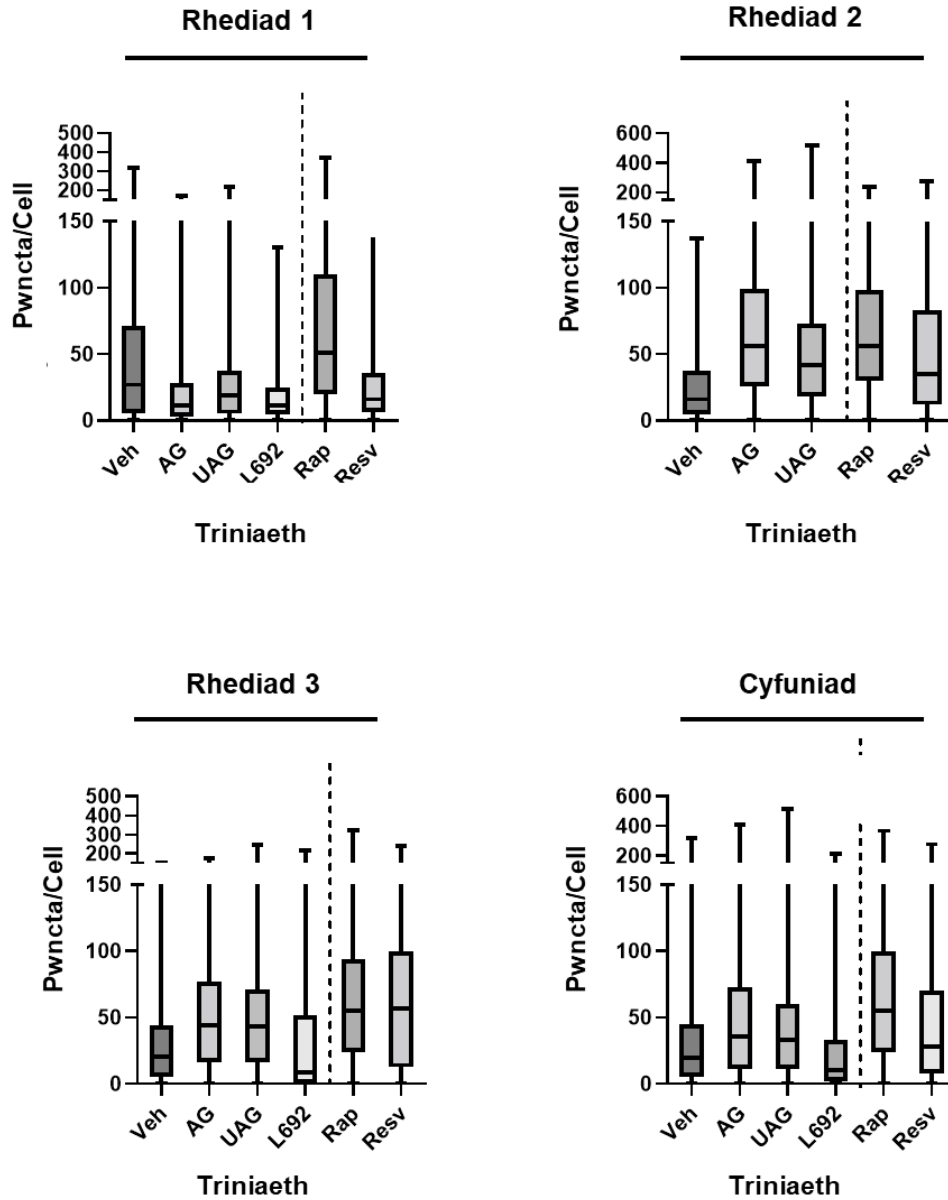


Ffigur A17 Plotiau blwch a wisger o ddata pwncta Cyto ID/cell ar gyfer celloedd HT-22 maeth cyflawn sydd wedi'u trin gyda Baf. Mae'r data'n gysylltiedig â ffigur 3.15

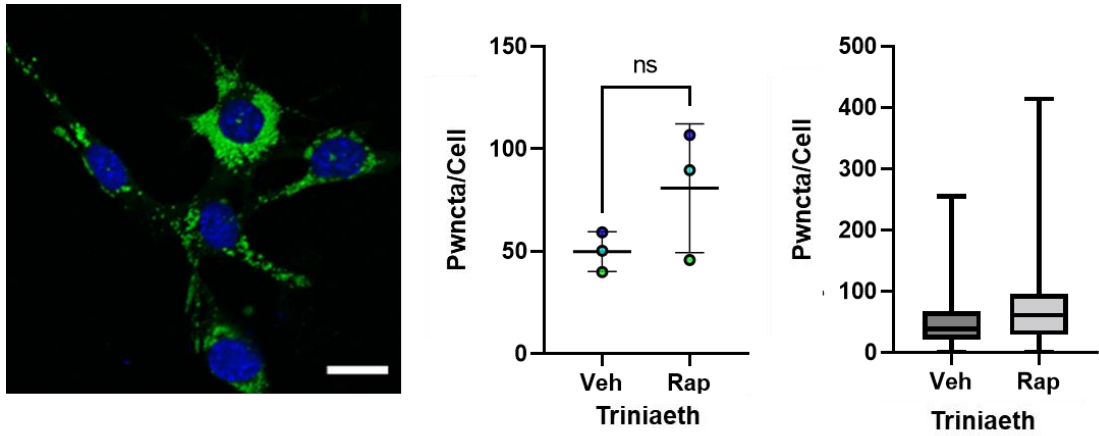




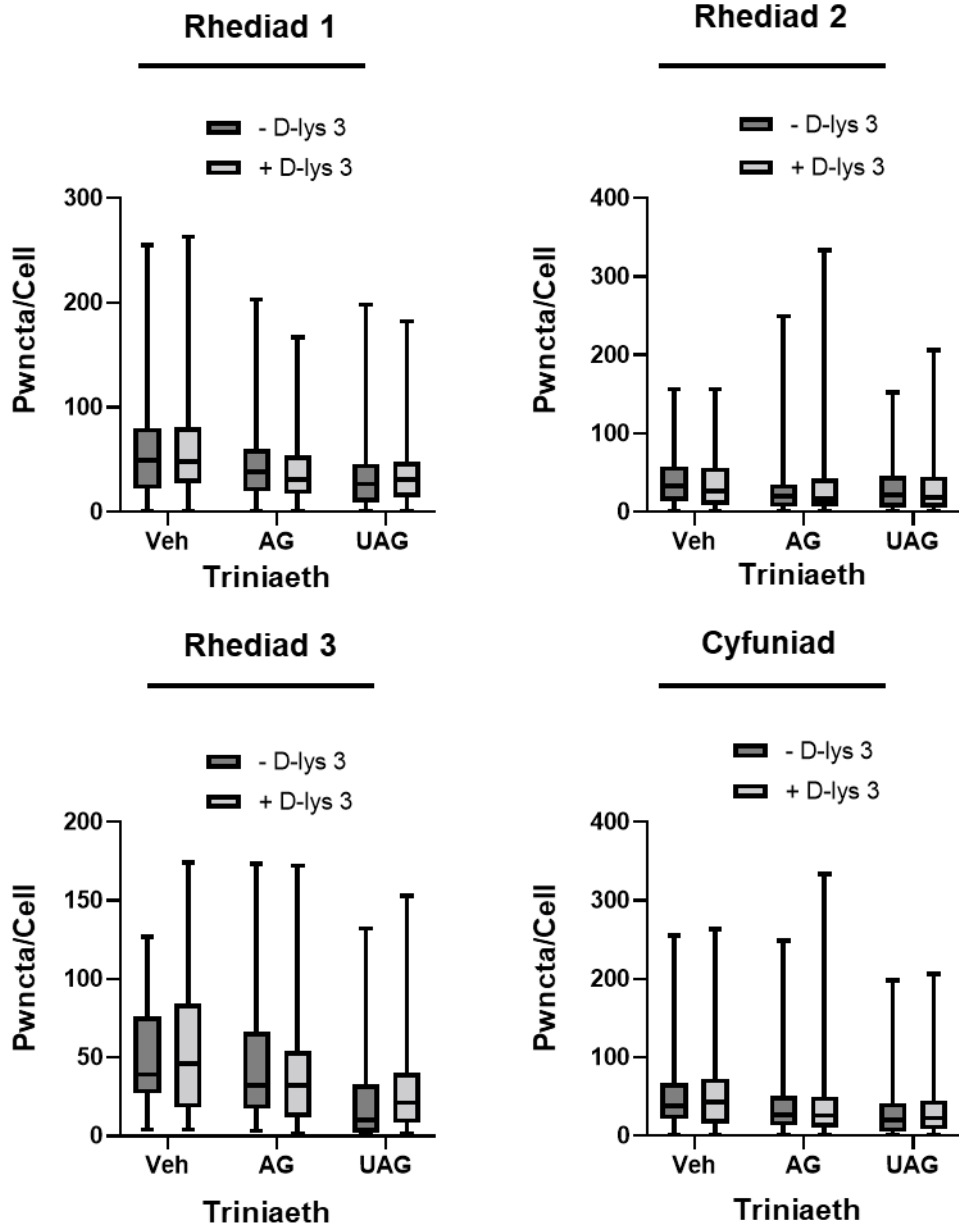
**Ffigur A18. Staenio Cyto ID yng nghelloedd HT-22 maeth cyfyngedig sydd wedi'u trin gyda rapamycin (Rap) a resveratrol (Resv) yn absenoldeb a phresenoldeb Baf. Mae'r data'n gysylltiedig â'r rhai yn ffigur 3.16. Nodir cymariaethau lluosog Tukey bod Rap wedi cynyddu'n nifer o pwncta Cyto ID yn arwyddocaol o'i gymharu â Veh, ym mhresenoldeb Baf ( $P = 0.001$ ), ond ni wnaeth Resv ( $P = 0.1$ ). Ni effeithiodd y naill driniaeth ar groniad pwncta Cyto ID yn absenoldeb Baf.**



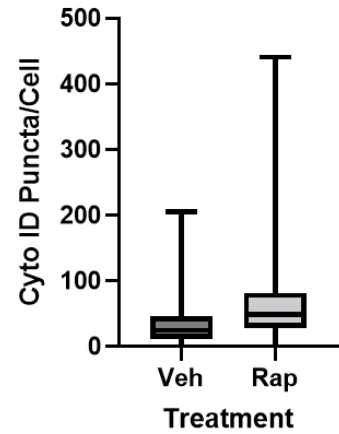
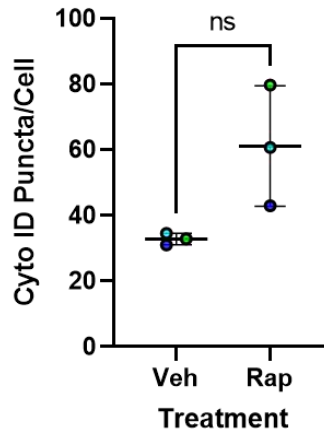
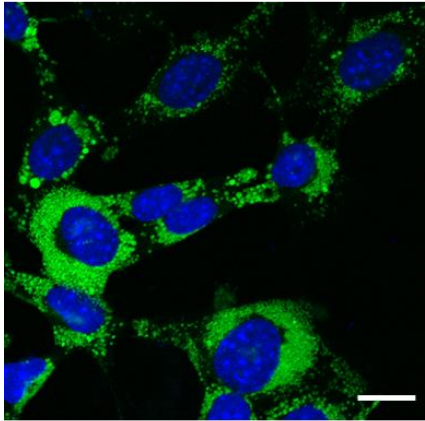
Ffigur A19. Plotiau blwch a wisger o ddata pwncta Cyto ID/cell ar gyfer celloedd HT-22 maeth cyfyngedig sydd wedi'u trin gyda Baf. Mae'r data'n gysylltiedig â ffigur 3.16



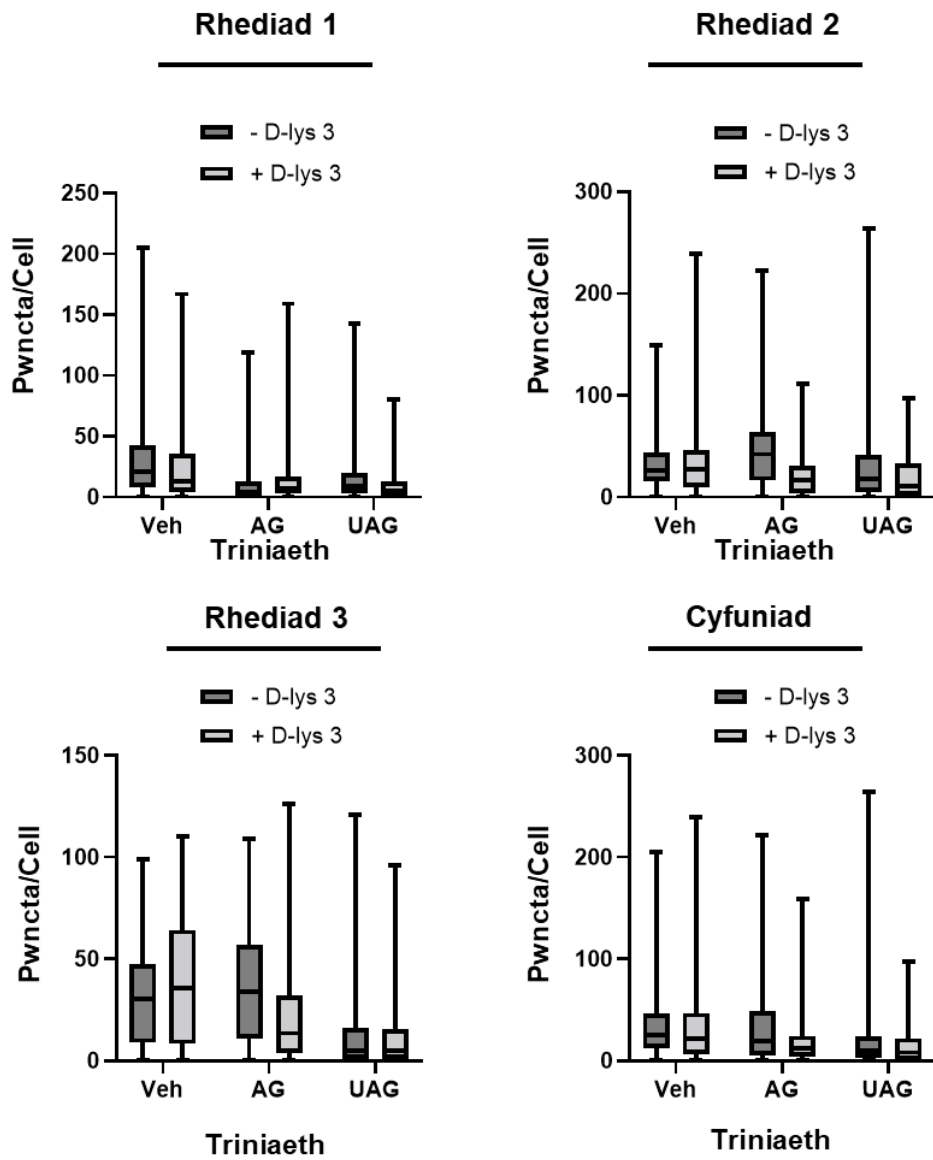
**Ffigur A20. Staenio Cyto ID o gelloedd SN4741 sydd wedi'u trin gyda rapamycin (Rap) yn presenoldeb Baf, o'r arbwrf D-lys 3 maeth cyflawn. Mae'r data'n gysylltiedig â'r rhai yn ffigur 3.17. Er achoswyd rap cynnydd yn niferoedd cymedrig, canolrif a chwartelau pwncta Cyto ID/cell, ni ystyriwyd effaith rap yn arwyddocaol ( $P = 0.18$ )**



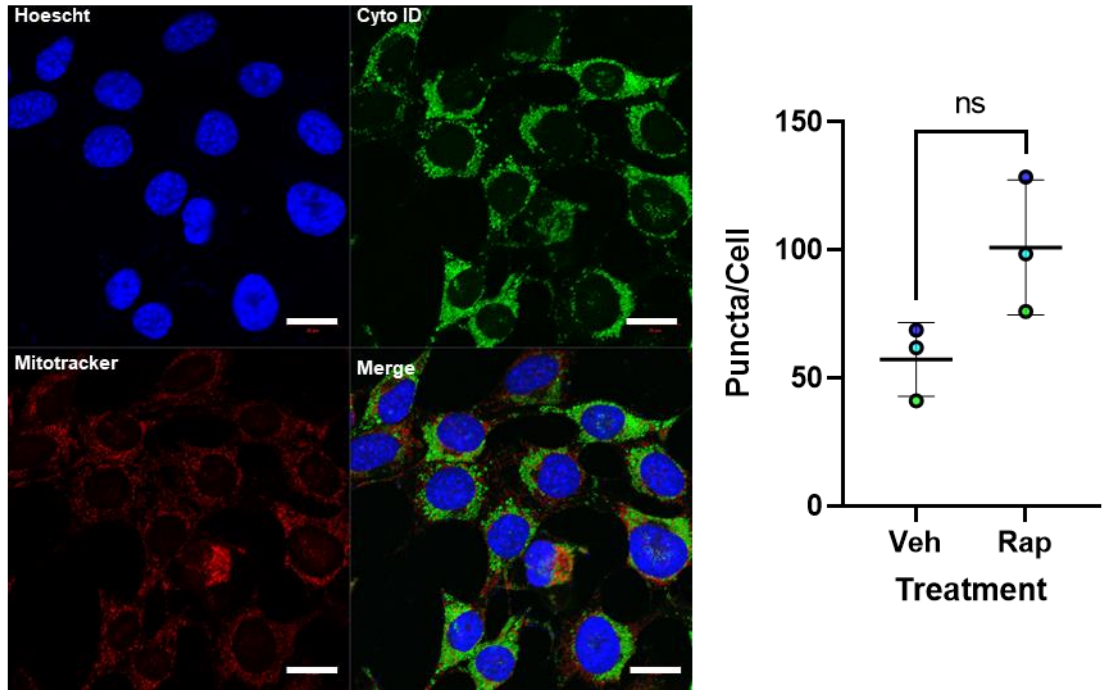
Ffigur A21. Plotiau blwch a wisger o ddata pwncta Cyto ID/cell ar gyfer arbrawf D-lys3 maeth cyflawn. Mae'r data'n gysylltiedig â ffigur 3.17.



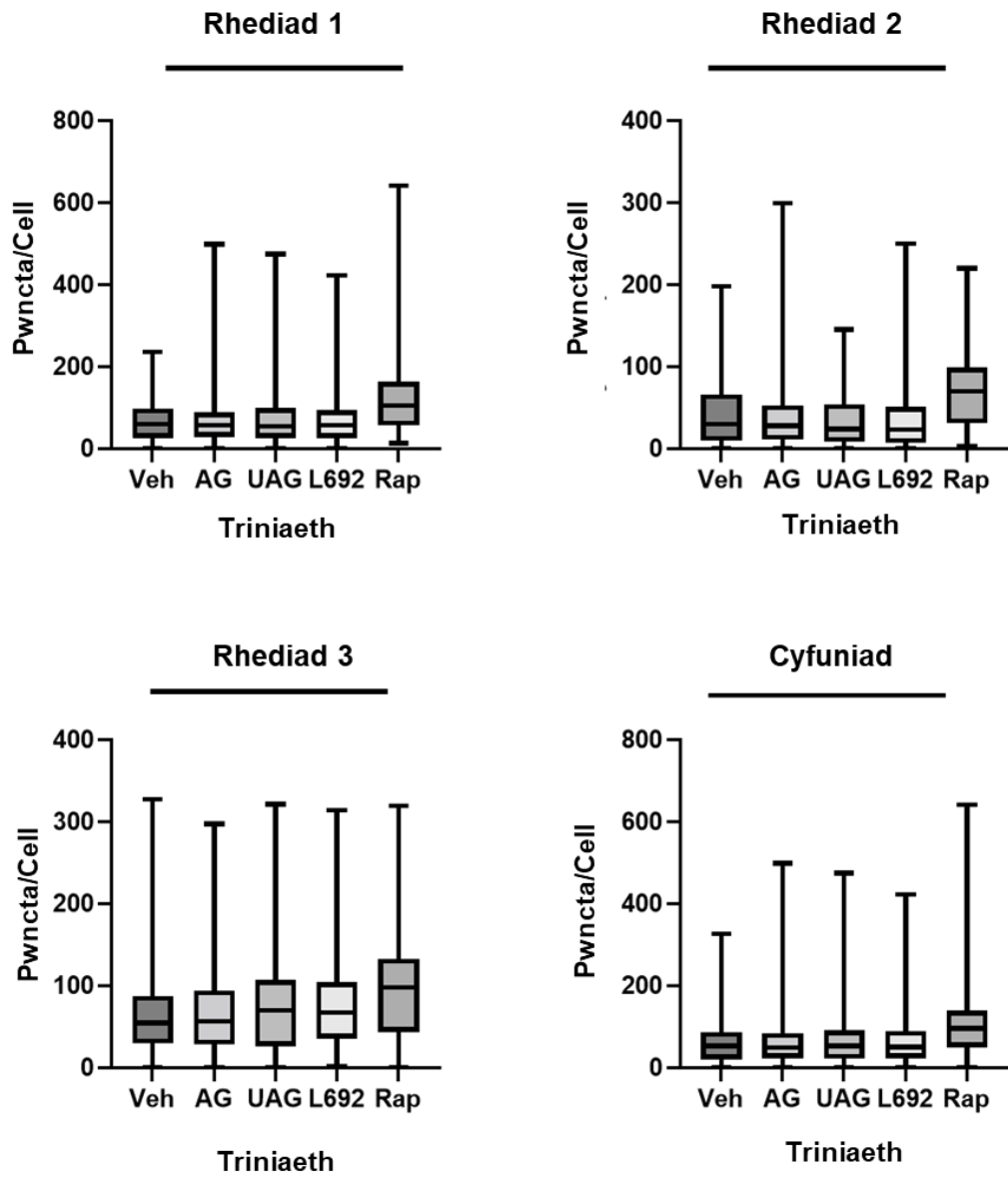
**Ffigur A22. Staenio Cyto ID o gelloedd SN4741 sydd wedi'u trin gyda rapamycin (Rap) yn presenoldeb Baf, or arbrawf D-lys 3 maeth cyfyngedig. Mae'r data'n gysylltiedig â'r rhai yn ffigur 3.18. Er achoswyd rap cynnydd yn niferoedd cymedrig, canolrif a chwartelau pwncta Cyto ID/cell, ni ystyriwyd effaith rap yn arwyddocaol ( $P = 0.06$ ).**



**Ffigur A23.** Plotiau blwch a wisger o ddata pwncta Cyto ID/cell ar gyfer arbrawf D-lys3 maeth cyfyngedig. Mae'r data'n gysylltiedig â ffigur 3.18.

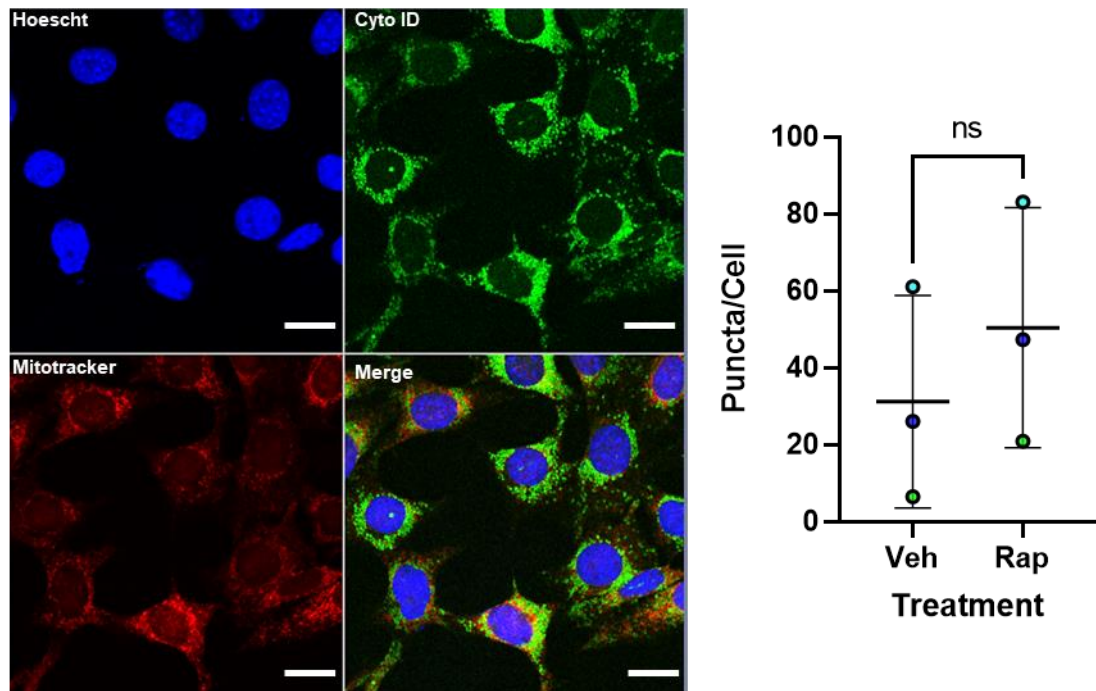


**Ffigur A24. Staenio Cyto ID o gelloedd SN4741 sydd wedi'u trin gyda rapamycin (Rap) yn presenoldeb Baf, or arbrawf Cyto ID-Mitotracker maeth cyflawn. Mae'r data'n gysylltiedig â'r rhai yn ffigur 3.20. Er achoswyd rap cynnydd yn nifer cymedrig pwncta Cyto ID/cell, ni ystyriwyd yr effaith yn arwyddocaol ( $P = 0.06$ ).**



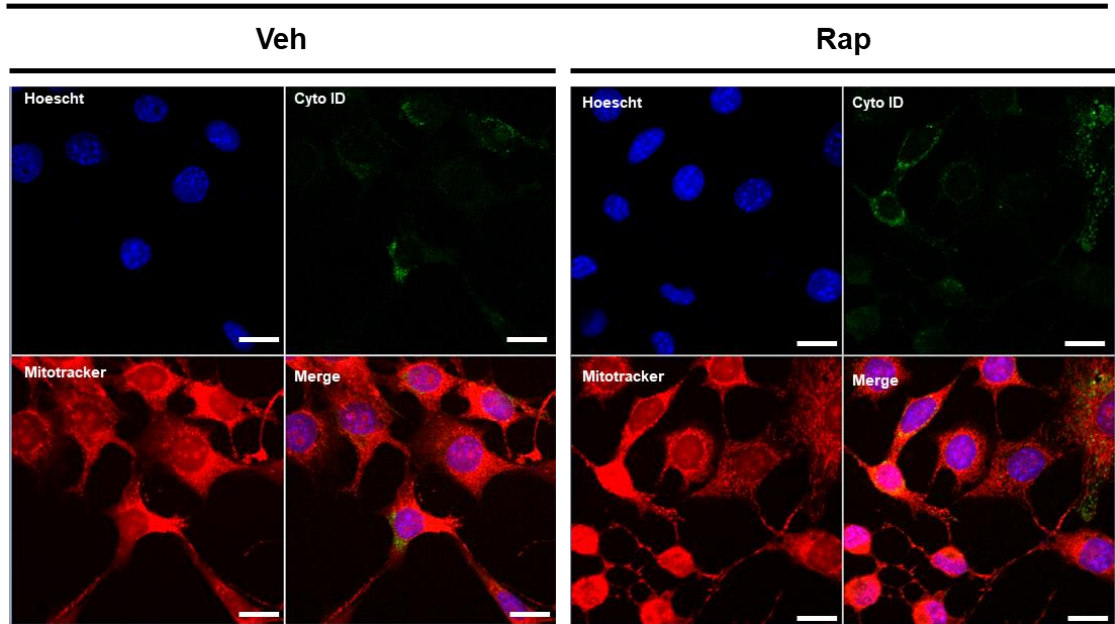
Ffigur A25. Plotiau blwch a wisger o ddata pwncta Cyto ID/cell ar gyfer arbrawf Cyto-ID maeth cyflawn. Mae'r data'n gysylltiedig â ffigur 3.20.



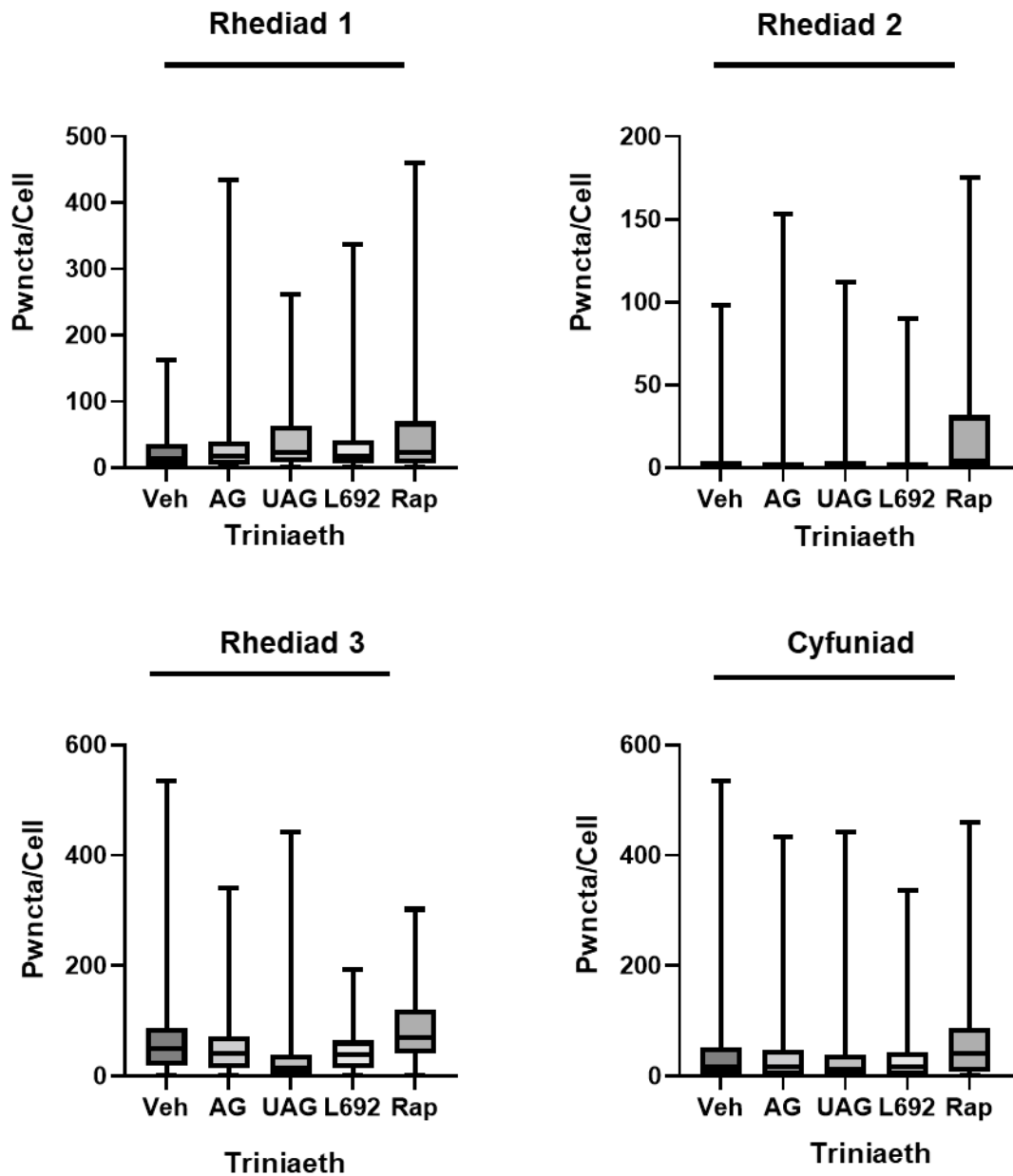


**Ffigur A26. Staenio Cyto ID o gelloedd SN4741 sydd wedi'u trin gyda rapamycin (Rap) yn presenoldeb Baf, or arbrawf Cyto ID-Mitotracker maeth cyfyngedig. Mae'r data'n gysylltiedig â'r rhai yn ffigur 3.21. Er achoswyd rap cynnydd yn nifer cymedrig pwncta Cyto ID/cell, ni ystyriwyd yr effaith yn arwyddocaol ( $P = 0.47$ ).**

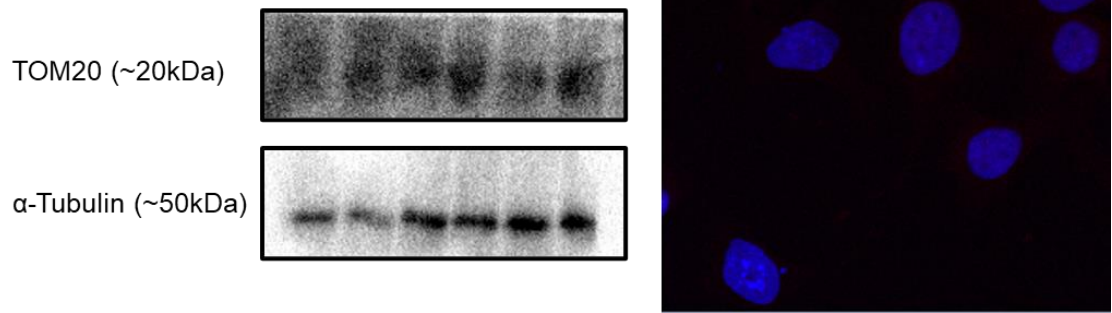
## Maeth Cyfyngedig: Rhediad 2



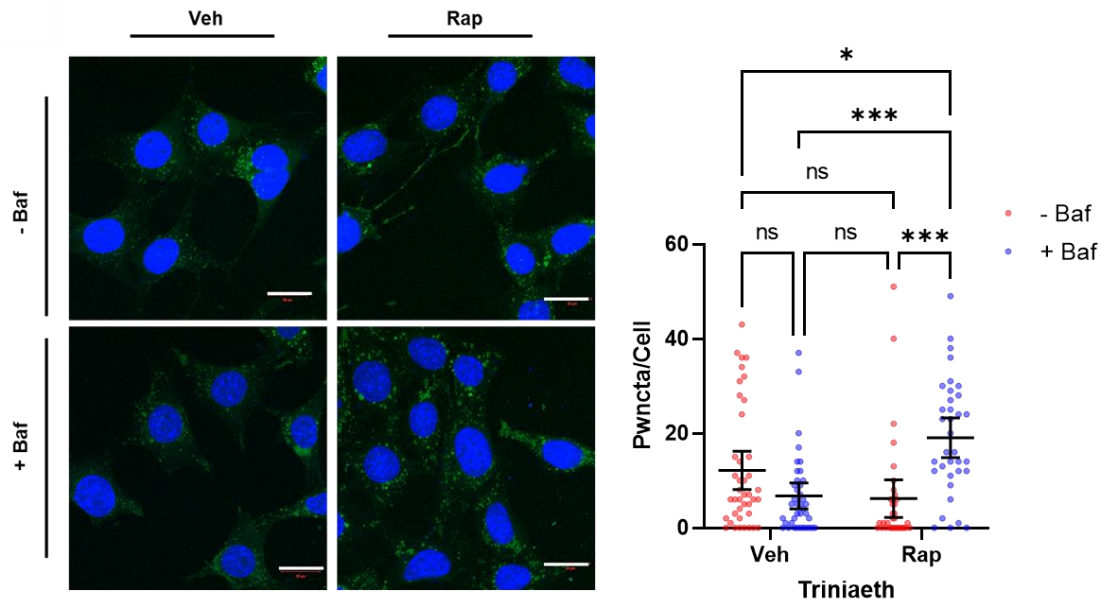
**Ffigur A27. Delweddau cynrychioladol o rhediad 2 arbrawf Cyto-ID mitotracker maeth cyfyngedig ysgafn, lle roedd gorlwythiad damweiniol o'r llifyn mitotracker.**



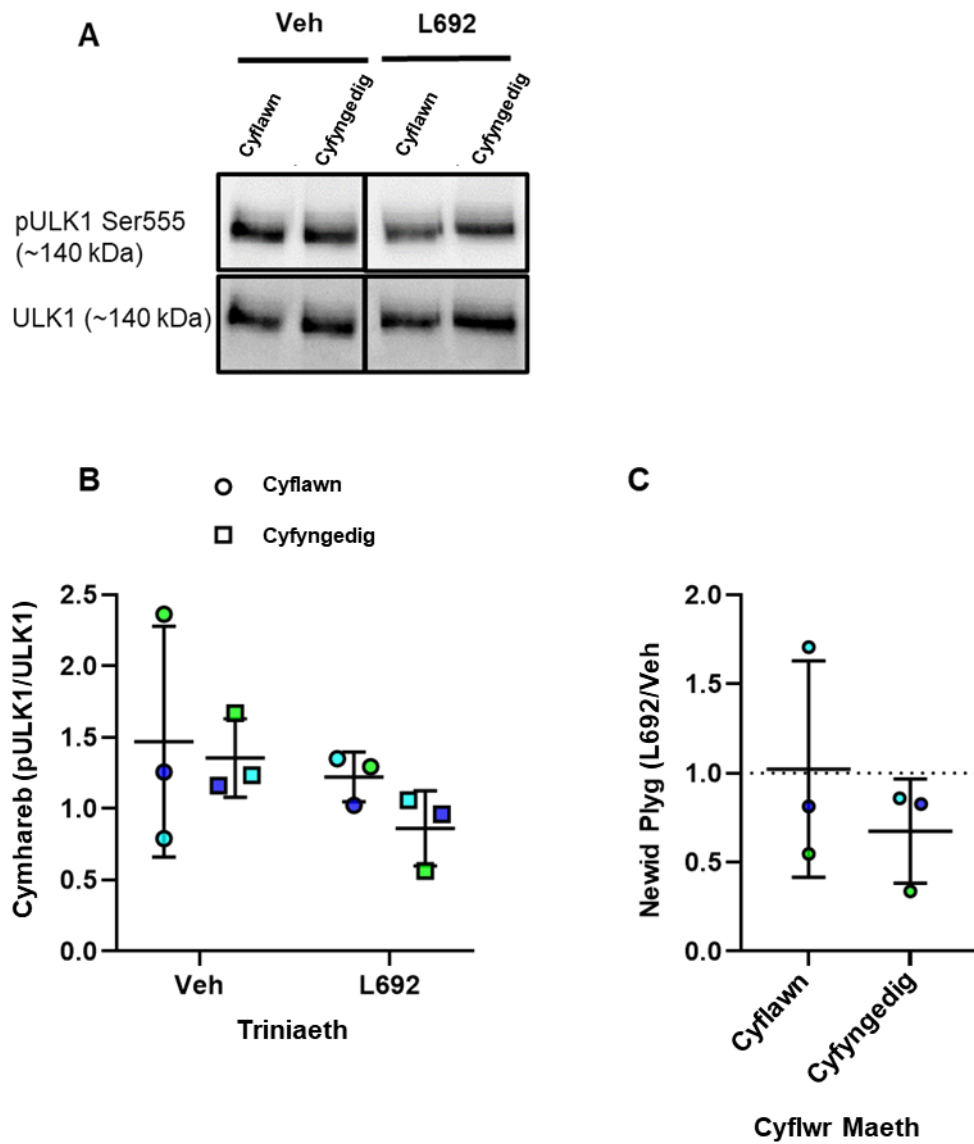
Ffigur A28. Plotiau blwch a wisger o ddata pwncta Cyto ID/cell ar gyfer arbrawf Cyto-ID maeth cyfyngedig. Mae'r data'n gysylltiedig â ffigur 3.21.



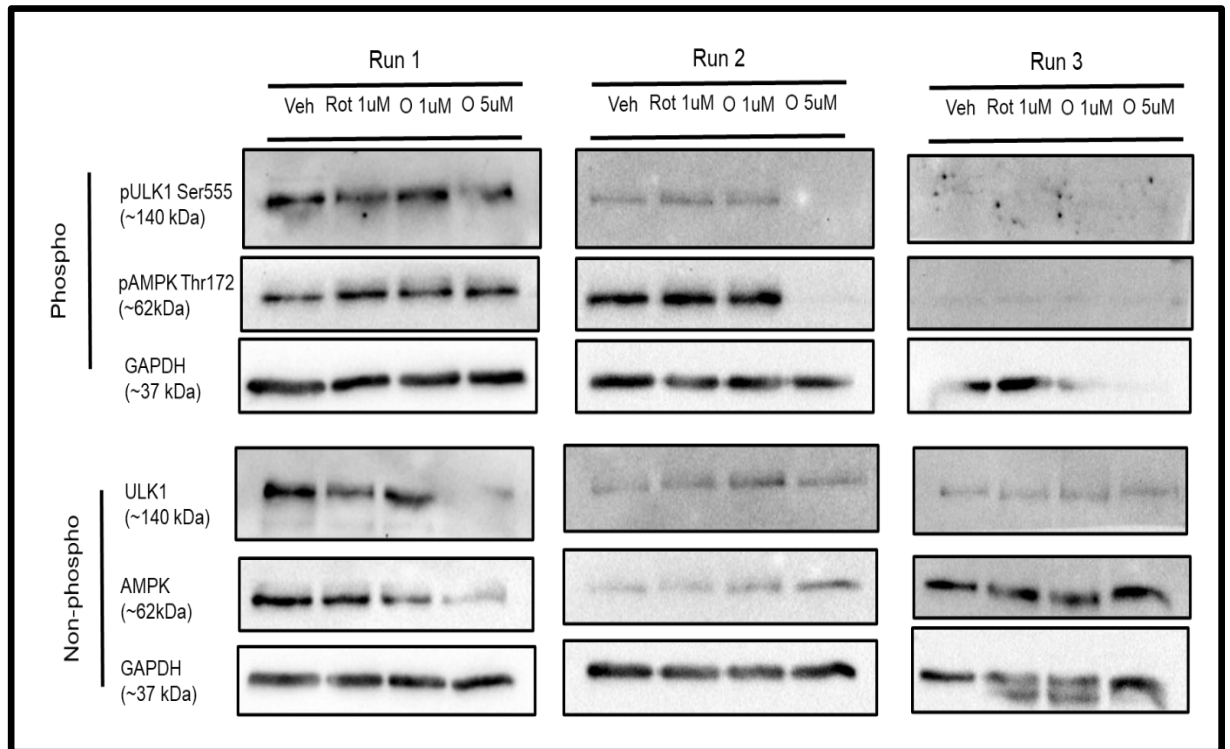
**Ffigur A29. Methiant gwrthgorff gwrth TOM20 i darparu imiwnoadweithedd penodol ac amlwg gyda WB a ICC.**



**Ffigur A30. Optimeiddiaeth arbrawf helfa Baf gyda'r prawf Cyto ID yng nghelloedd SN4741 maeth cyflawn.** Cafodd y celloedd eu trin am 20 awr gyda naill ai Veh neu Rap, cyn ychwanegiad Baf neu Veh (DMSO), a triniaeth am 4 awr pellach. Awgrymwyd y canlyniadau bod y dull hwn yn addas ar gyfer canfod ysgogiad awtoffagi yng nghelloedd SN4741, gan achoswyd cyd-triniaeth Rap + Baf cynyddiadau arwyddocaol mewn cymhariaeth i Veh -Baf ( $P = 0.04$ ), Rap -Baf ( $P = < 0.001$ ), a Veh + Baf ( $P = < 0.001$ ).

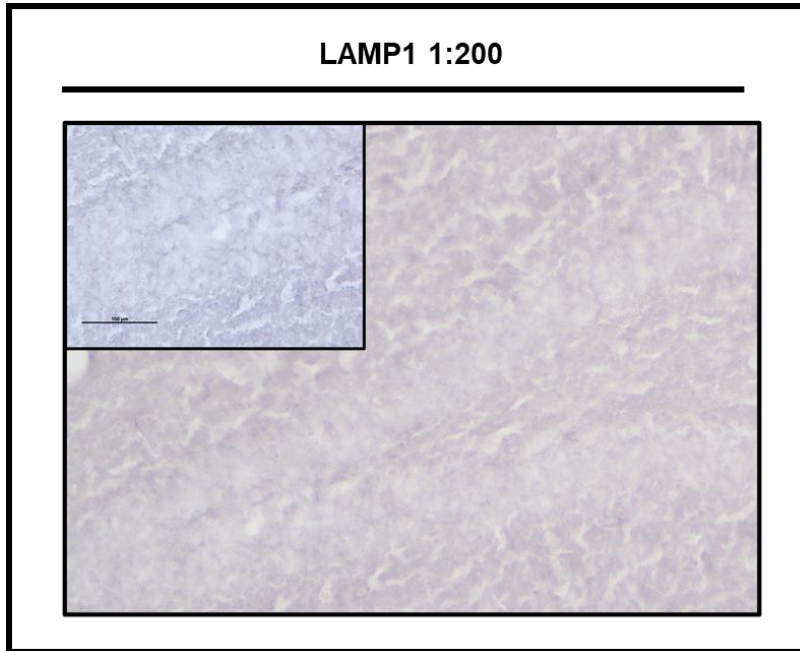


Ffigur A31. Data WB o gymhareb pULK1 Ser555/ULK1, ar ôl triniaeth 5 munud gyda Veh neu L692 yng nghelloedd SN4741, o dan amodau maeth cyflawn a cyfnygedig



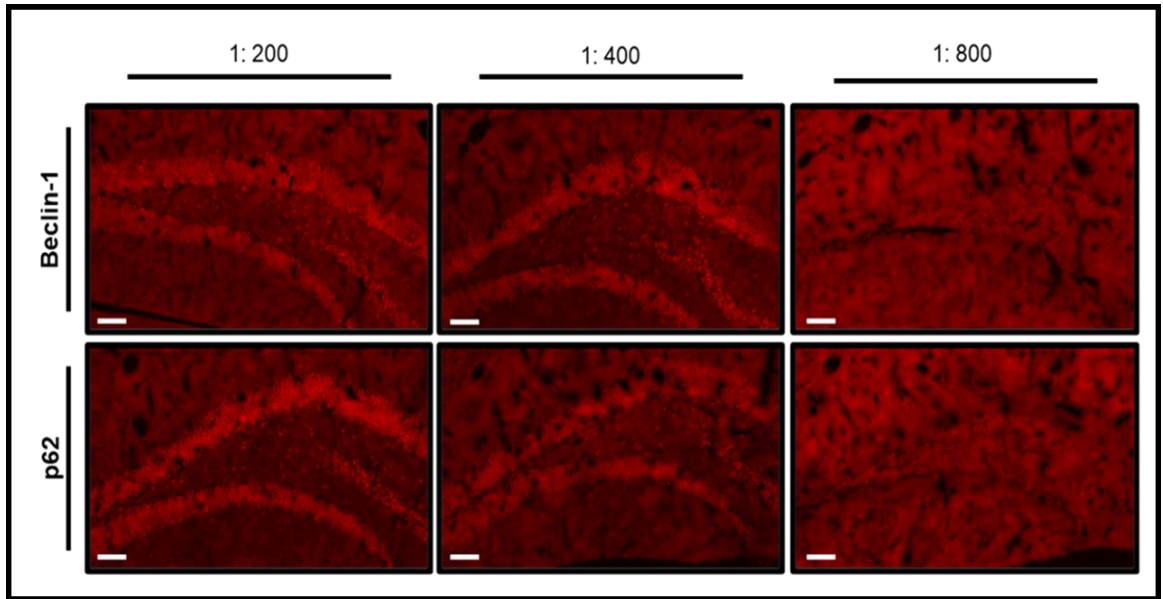
**Ffigur A32. Blotiau Gorllewinol am pULK1 Sêr 555, pAMPK Thr172, ULK1, AMPK, ar ôl triniaeth gyda atalyddion mitochondrial (Rotenon (R) & Oligomycin (O) neu Veh am 30 munud, yng nghelloedd SN4741 maeth cyflawn.**

## [Atodiad B: Data Atodol Pennod 4](#)



**Ffigur B1. Delwedd cynrychioladol o protocol IHC Ni-DAB gyda gwrthgorff gwrth LAMP1 (1:200). Nid oes iminwoadweithedd penodol clir a diffiniedig.**





**Ffigur B2. Delwedd cynrychioladol o imiwnofflworoleuedd Beclin-1 a p62 yn DG llygod mawr, yn dilyn magiad gyda gwrthgyrff gwrth-Beclin-1 a gwrth-p62 ar gwanediadau o 1:200, 1:400 a 1:800. Nid oes imiwnoadweithedd penodol gyda'r gwanediad 1:800. Bariau graddfa yn cynrychioli 100um.**

**Tabl B1. Ystadegau disgrifiadol ar gyfer mynegiad Beclin-1 yn hipocampau**

**Ilygod Ghrelin<sup>-/-</sup> a WT o'r un dorllwyth (perthnasol i ffigur 4.3)**

	DG		CA1		CA3	
	WT	Ghrelin <sup>-/-</sup>	WT	Ghrelin <sup>-/-</sup>	WT	Ghrelin <sup>-/-</sup>
n	6	5	6	5	6	5
<b>Celloedd/mm<sup>2</sup></b>						
Cymedr	6379	6218	4461	4476	3098	3129
SD	444.9	356.4	446.4	189	431.3	298.9
SEM	181.6	159.4	182.3	84.53	176.1	133.7
95% CIs	5912	5775	3992	4241	2645	2758
	6846	6660	4929	4710	3551	3500
<b>Imiwnoadweithedd (%)</b>						
Cymedr	44.9	44.06	34.38	34.39	24.9	25.49
SD	5.304	6.445	5.764	2.623	3.981	4.346
SEM	2.166	2.882	2.353	1.173	1.625	1.944
95% CIs	39.33	36.06	28.33	31.14	20.72	20.1
	50.47	52.06	40.42	37.65	29.08	30.89

**Tabl B2. Ystadegau disgrifiadol ar gyfer mynegiad Beclin-1 yn hipocampau**

**Ilygod GOAT<sup>-/-</sup> a WT o'r un dorllwyth (perthnasol i ffigur 4.4)**

	DG		CA1		CA3	
	WT	GOAT <sup>-/-</sup>	WT	GOAT <sup>-/-</sup>	WT	GOAT <sup>-/-</sup>
n	7	5	5	5	6	5
<b>Celloedd/mm<sup>2</sup></b>						
Cymedr	5984	5839	3825	3703	2745	2476
SD	770.5	1498	189.7	885	113.6	245.5
SEM	291.2	669.9	84.83	395.8	46.37	109.8
95% CIs	5161	4687	3590	2604	2626	2171
	7408	7998	4061	4802	2865	2780
<b>Imiwnoadweithedd (%)</b>						
Cymedr	37.33	36.74	27.2	24.89	20.61	18.54
SD	3.117	5.533	2.939	3.461	1.473	2.135
SEM	1.178	2.474	1.314	1.548	0.601	0.9546
95% CIs	34.44	29.87	23.55	20.6	19.06	15.89
	40.21	43.61	30.85	29.19	22.15	21.19

**Tabl B3. Crynodeb o ganlyniadau profion-t heb-bar, ar gyfer mynegiad hipocampaidd Beclin-1, rhwng llygod Ghrelin<sup>-/-</sup> a WT**

**(perthnasol i ffigur 4.4)**

	WT vs Ghrelin <sup>-/-</sup>					
	DG		CA1		CA3	
	Celloedd/mm <sup>2</sup>	Imiwnoadweithedd %	Celloedd/mm <sup>2</sup>	Imiwnoadweithedd %	Celloedd/mm <sup>2</sup>	Imiwnoadweithedd %
<b>P</b>	0.53	0.82	0.95	0.99	0.89	0.82
<b>Crynodeb</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>Gwahaniaeth</b>	161	0.838	14.72	0.019	31.41	0.5937
<b>95% CIs</b>	-719.8 to 397.8	-8.836 to 7.160	-472.7 to 502.1	-6.335 to 6.373	-486.7 to 549.5	-5.087 to 6.275

**Tabl B4. Crynodeb o ganlyniadau profion-t heb-bar, ar gyfer mynegiad hipocampaidd Beclin-1, rhwng llygod GOAT<sup>-/-</sup> a WT**

**(perthnasol i ffigur 4.4)**

	WT vs GOAT <sup>-/-</sup>					
	DG		CA1		CA3	
	Celloedd/mm <sup>2</sup>	Imiwnoadweithedd %	Celloedd/mm <sup>2</sup>	Imiwnoadweithedd %	Celloedd/mm <sup>2</sup>	Imiwnoadweithedd %
<b>P</b>	0.83	0.82	0.77	0.29	<b>0.04</b>	0.09
<b>Crynodeb</b>	ns	ns	ns	ns	*	ns
<b>Gwahaniaeth</b>	145.5	0.5821	122.7	2.309	269.8	2.07
<b>95% CIs</b>	-1606 to 1315	-6.129 to 4.965	-1056 to 810.7	-6.992 to 2.373	-522.2 to -17.44	-4.532 to 0.3916

**Tabl B5. Ystadeqau disgrifiadol ar gyfer mynegiad Beclin-1 yn hipocampau llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a WT o'r un dorllwyth (perthnasol i ffigur 4.5)**

	DG				CA1				CA3			
	Benyw		Gwryw		Benyw		Gwryw		Benyw		Gwryw	
	WT	GHS-R <sup>-/-</sup>	WT	GHS-R <sup>-/-</sup>	WT	GHS-R <sup>-/-</sup>	WT	GHS-R <sup>-/-</sup>	WT	GHS-R <sup>-/-</sup>	WT	GHS-R <sup>-/-</sup>
<b>n</b>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<b>Celloedd/mm<sup>2</sup></b>												
<b>Mean</b>	5972	5132.16	5964	5040.64	4151	3587.84	4383.36	3714.88	2696.32	2672.64	2844.16	2714.88
<b>SD</b>	578.9	486.46	445	716.17	414.7	335.45	284.77	361.73	584.46	363.99	323.07	623.59
<b>SEM</b>	258.9	217.55	199	320.28	185.5	150.02	127.35	161.77	261.38	162.78	144.48	278.88
<b>95% CIs</b>	5253	4528.14	5930	4151.4	4004	3171.33	4164.03	3265.73	1970.62	2220.69	2443.02	1940.59
	6691	5736.18	6516	5410.94	4666	3636.13	4736.95	4029.77	3422.02	3124.59	3245.3	3489.17
<b>Imiwnoadweithedd (%)</b>												
<b>Mean</b>	35.55	30.59	36.39	31.47	28.19	25.37	31.55	25.07	18.12	18.6	20.168	17.828
<b>SD</b>	3.65	3.74	4.25	5.33	2.46	2.59	4.92	2.45	4.32	2.17	3.6	5.15
<b>SEM</b>	1.63	1.67	1.9	2.38	1.1	1.16	2.2	1.1	1.93	0.97	1.61	2.3
<b>95% CIs</b>	31.01	25.95	31.11	24.86	25.14	22.15	25.45	22.03	12.76	15.9	15.7	11.44
	40.08	35.24	41.66	38.09	31.24	28.59	37.65	28.12	23.48	21.3	24.63	24.22

**Tabl B6. Crynodeb o ganlyniadau prawf ANOVA dwyffordd ar gyfer mynegiad**

**Beclin-1 rhwng DG llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a WT (perthnasol i ffigur 4.5)**

DG				
Celloedd/mm <sup>2</sup>				
Ffynhonell Amrywiad	% o'r amrywiad cyfan	P	Crynodeb	Arwyddocaol?
Rhyngweithiad	0.095	0.87	Ns	No
Genoteip	42.99	<b>0.003</b>	**	Yes
Rhyw	0.139	0.85	Ns	No
Imiwnoadweithedd %				
Ffynhonell Amrywiad	% o'r amrywiad cyfan	P	Crynodeb	Arwyddocaol?
Rhyngweithiad	>0.001	0.99	Ns	No
Genoteip	28.95	<b>0.02</b>	*	Yes
Rhyw	0.88	0.66	Ns	No

**Tabl B7. Crynodeb o ganlyniadau prawf ANOVA dwyffordd ar gyfer mynegiad**

**Beclin-1 rhwng CA1 llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a WT (perthnasol i ffigur 4.5)**

CA1				
Celloedd/mm <sup>2</sup>				
Ffynhonell Amrywiad	% o'r amrywiad cyfan	P	Crynodeb	Arwyddocaol?
Rhyngweithiad	0.34	0.74	Ns	No
Genoteip	46.74	<b>0.001</b>	**	Yes
Rhyw	3.98	0.27	Ns	No
Imiwnoadweithedd %				
Ffynhonell Amrywiad	% o'r amrywiad cyfan	P	Crynodeb	Arwyddocaol?
Rhyngweithiad	5.44	0.23	Ns	No
Genoteip	35.03	<b>0.01</b>	**	Yes
Rhyw	3.81	0.31	Ns	No

**Tabl B8. Crynodeb o ganlyniadau prawf ANOVA dwyffordd ar gyfer mynegiad**

**Beclin-1 rhwng CA1 llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a WT (perthnasol i ffigur 4.5)**

CA3				
Celloedd/mm <sup>2</sup>				
Ffynhonell Amrywiad	% o'r amrywiad cyfan	P	Crynodeb	Arwyddocaol?
Rhyngweithiad	0.35	0.81	ns	No
Genoteip	0.74	0.73	ns	No
Rhyw	1.14	0.67	ns	No
Imiwnoadweithedd %				
Ffynhonell Amrywiad	% o'r amrywiad cyfan	P	Crynodeb	Arwyddocaol?
Rhyngweithiad	3.72	0.44	ns	No
Genoteip	1.62	0.61	ns	No
Rhyw	0.76	0.72	ns	No

**Tabl B9. Crynodeb o ganlyniadau praw cymhariaeth lluosog Tukey o fynegiad Beclin-1 rhwng DG llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a WT gwrywaidd a benywaidd (perthnasol i ffigur 4.5)**

DG					
Cymariaethau	Gwahaniaeth	95.00% CI	O dan y trothwy?	Crynodeb	P
<b>Celloedd/mm2</b>					
WT:Gwryw vs. WT:Benyw	-8.64	-1033 to 1016	No	ns	>0.99
GHS-R <sup>-/-</sup> : Benyw vs. WT: Benyw	-840	-1865 to 184.7	No	ns	0.13
GHS-R <sup>-/-</sup> : Gwryw vs. WT:Benyw	-931.5	-1956 to 93.17	No	ns	0.08
GHS-R <sup>-/-</sup> : Benyw vs. WT: Gwryw	-831.4	-1856 to 193.3	No	ns	0.13
GHS-R <sup>-/-</sup> : Gwryw vs. WT: Gwryw	-922.9	-1948 to 101.8	No	ns	0.09
GHS-R <sup>-/-</sup> : Gwryw vs. GHS-R <sup>-/-</sup> : Benyw	-91.52	-1116 to 933.2	No	ns	0.99
<b>Imiwnoadweithedd %</b>					
WT:Gwryw vs. WT:Benyw	-0.84	-8.609 to 6.929	No	ns	0.99
GHS-R <sup>-/-</sup> : Benyw vs. WT: Benyw	4.952	-2.817 to 12.72	No	ns	0.30
GHS-R <sup>-/-</sup> : Gwryw vs. WT:Benyw	4.074	-3.695 to 11.84	No	ns	0.46
GHS-R <sup>-/-</sup> : Benyw vs. WT: Gwryw	5.792	-1.977 to 13.56	No	ns	0.18
GHS-R <sup>-/-</sup> : Gwryw vs. WT: Gwryw	4.914	-2.855 to 12.68	No	ns	0.30
GHS-R <sup>-/-</sup> : Gwryw vs. GHS-R <sup>-/-</sup> : Benyw	-0.878	-8.647 to 6.891	No	ns	0.99

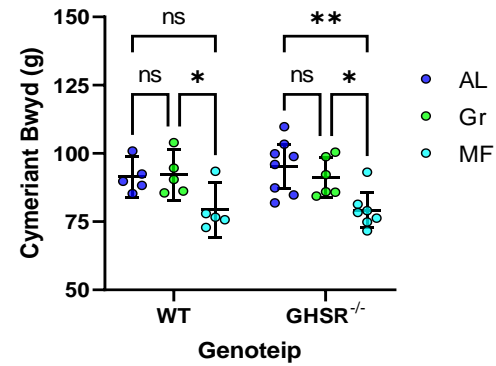
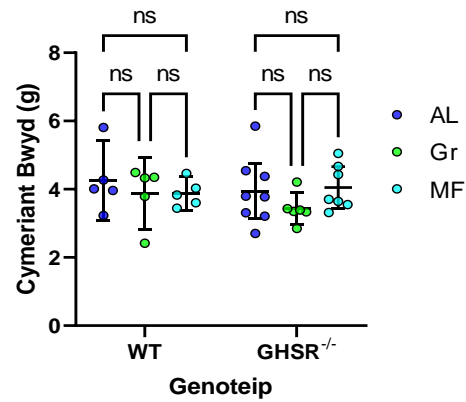
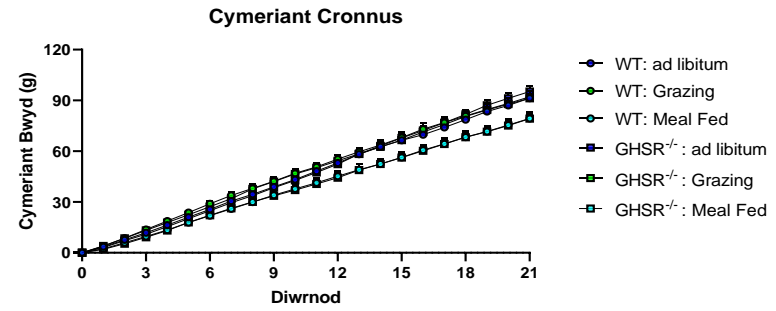
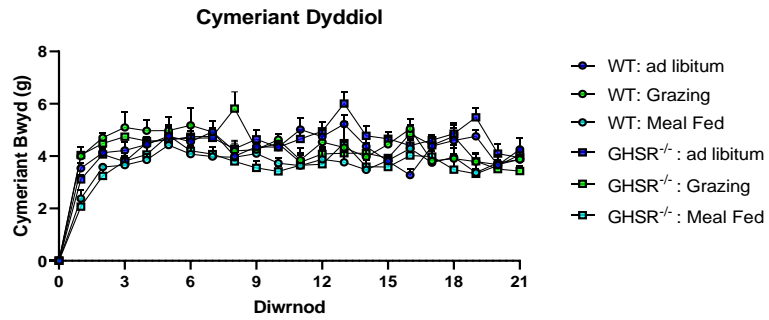
**Tabl B10. Crynodeb o ganlyniadau praw cymhariaeth lluosog Tukey o fynegiad Beclin-1 rhwng CA1 llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a WT gwrywaidd a benywaidd (perthnasol i ffigur 4.5)**

CA1					
Cymariaethau	Gwahaniaeth	95.00% CI	O dan y trothwy?	Crynodeb	P
<b>Celloedd/mm2</b>					
WT:Gwryw vs. WT:Benyw	232.3	-405.1 to 869.8	No	ns	0.73
GHS-R <sup>-/-</sup> : Benyw vs. WT: Benyw	-563.2	-1201 to 74.26	No	ns	0.09
GHS-R <sup>-/-</sup> : Gwryw vs. WT:Benyw	-436.2	-1074 to 201.3	No	ns	0.24
GHS-R <sup>-/-</sup> : Benyw vs. WT: Gwryw	-795.5	-1433 to -158.1	Yes	*	<b>0.01</b>
GHS-R <sup>-/-</sup> : Gwryw vs. WT: Gwryw	-668.5	-1306 to -31.02	Yes	*	<b>0.04</b>
GHS-R <sup>-/-</sup> : Gwryw vs. GHS-R <sup>-/-</sup> : Benyw	127	-510.4 to 764.5	No	ns	0.94
<b>Imiwnoadweithedd %</b>					
WT:Gwryw vs. WT:Benyw	3.362	-2.565 to 9.289	No	ns	0.39
GHS-R <sup>-/-</sup> : Benyw vs. WT: Benyw	-2.816	-8.743 to 3.111	No	ns	0.54
GHS-R <sup>-/-</sup> : Gwryw vs. WT:Benyw	-3.114	-9.041 to 2.813	No	ns	0.46
GHS-R <sup>-/-</sup> : Benyw vs. WT: Gwryw	-6.178	-12.11 to -0.2505	Yes	*	<b>0.04</b>
GHS-R <sup>-/-</sup> : Gwryw vs. WT: Gwryw	-6.476	-12.40 to -0.5485	Yes	*	<b>0.03</b>
GHS-R <sup>-/-</sup> : Gwryw vs. GHS-R <sup>-/-</sup> : Benyw	-0.298	-6.225 to 5.629	No	ns	>0.99

**Tabl B11. Crynodeb o ganlyniadau praw cymhariaeth lluosog Tukey o fynegiad Beclin-1 rhwng CA3 llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a WT gwrywaidd a benywaidd (Perthnasol i ffigur 4.5)**

CA3					
Cymariaethau	Gwahaniaeth	95.00% CI	O dan y trothwy?	Crynodeb	P
<b>Celloedd/mm2</b>					
WT:Gwryw vs. WT:Benyw	147.8	-742.0 to 1038	No	ns	0.96
GHS-R <sup>-/-</sup> : Benyw vs. WT: Benyw	-23.68	-913.5 to 866.1	No	ns	>0.99
GHS-R <sup>-/-</sup> : Gwryw vs. WT:Benyw	18.56	-871.3 to 908.4	No	ns	>0.99
GHS-R <sup>-/-</sup> : Benyw vs. WT: Gwryw	-171.5	-1061 to 718.3	No	ns	0.94
GHS-R <sup>-/-</sup> : Gwryw vs. WT: Gwryw	-129.3	-1019 to 760.5	No	ns	0.98
GHS-R <sup>-/-</sup> : Gwryw vs. GHS-R <sup>-/-</sup> : Benyw	42.24	-847.6 to 932.1	No	ns	>0.99
<b>Imiwnoadweithedd %</b>					
WT:Gwryw vs. WT:Benyw	2.048	-5.121 to 9.217	No	ns	0.85
GHS-R <sup>-/-</sup> : Benyw vs. WT: Benyw	0.48	-6.689 to 7.649	No	ns	>0.99
GHS-R <sup>-/-</sup> : Gwryw vs. WT:Benyw	-0.292	-7.461 to 6.877	No	ns	>0.99
GHS-R <sup>-/-</sup> : Benyw vs. WT: Gwryw	-1.568	-8.737 to 5.601	No	ns	0.92
GHS-R <sup>-/-</sup> : Gwryw vs. WT: Gwryw	-2.34	-9.509 to 4.829	No	ns	0.79
GHS-R <sup>-/-</sup> : Gwryw vs. GHS-R <sup>-/-</sup> : Benyw	-0.772	-7.941 to 6.397	No	ns	0.99





**Ffigur B3. Data cymeriant bwyd dyddiol a chronnus o arbrawf patrymau bwydo llygod mawr Sprague Dawley. Cynhyrchir y data crai gan lab Dr Tim Wells ym Mhrifysgol Caerdydd.**

**Tabl B12. Crynodeb o ganlyniadau prawf cymariaethau lluosog Tukey o fynegiad LC3 cortigol rhwng llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.11)**

<b>Cortecs</b>					
<b>LC3-II</b>					
<b>Cymariaethau</b>	<b>Gwahaniaeth</b>	<b>95.00% CI</b>	<b>O dan y trothwy?</b>	<b>Crynodeb</b>	<b>P</b>
Gr vs. AL	-0.15	-0.47 to 0.16	No	ns	0.44
MF vs. AL	-0.086	-0.39 to 0.21	No	ns	0.74
MF vs. Gr	0.068	-0.26 to 0.39	No	ns	0.85
<b>LC3-I</b>					
<b>Cymariaethau</b>	<b>Gwahaniaeth</b>	<b>95.00% CI</b>	<b>O dan y trothwy?</b>	<b>Crynodeb</b>	<b>P</b>
Gr vs. AL	-1.4	-3.8 to 0.98	No	ns	0.3
MF vs. AL	-0.00052	-2.3 to 2.3	No	ns	>0.99
MF vs. Gr	1.4	-1.1 to 3.9	No	ns	0.33
<b>LC3-II/LC3-I</b>					
<b>Cymariaethau</b>	<b>Gwahaniaeth</b>	<b>95.00% CI</b>	<b>O dan y trothwy?</b>	<b>Crynodeb</b>	<b>P</b>
Gr vs. AL	0.23	-0.036 to 0.50	No	ns	0.1
MF vs. AL	-0.011	-0.27 to 0.25	No	ns	>0.99
MF vs. Gr	-0.25	-0.53 to 0.034	No	ns	0.09

**Tabl B13. Crynodeb o ganlyniadau prawf cymariaethau lluosog Tukey o fynegiad LC3 hypothalamig rhwng llygod mawr**

**Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.12)**

Hypothalmws					
LC3-II					
Cymariaethau	Gwahaniaeth	95.00% CI	O dan y trothwy?	Crynodeb	P
Gr vs. AL	-0.041	-0.35 to 0.27	No	ns	0.94
MF vs. AL	-0.17	-0.46 to 0.12	No	ns	0.32
MF vs. Gr	-0.13	-0.46 to 0.20	No	ns	0.58
LC3-I					
Cymariaethau	Gwahaniaeth	95.00% CI	O dan y trothwy?	Crynodeb	P
Gr vs. AL	-0.099	-1.4 to 1.2	No	ns	0.98
MF vs. AL	-0.075	-1.4 to 1.2	No	ns	0.99
MF vs. Gr	0.024	-1.4 to 1.5	No	ns	>0.99
LC3-II/LC3-I					
Cymariaethau	Gwahaniaeth	95.00% CI	O dan y trothwy?	Crynodeb	P
Gr vs. AL	0.021	-0.30 to 0.34	No	ns	0.98
MF vs. AL	-0.19	-0.49 to 0.11	No	ns	0.27
MF vs. Gr	-0.21	-0.55 to 0.13	No	ns	0.27

**Tabl B14. Crynodeb o ganlyniadau prawf cymariaethau lluosog Tukey o fynegiad LC3 hipocampaidd rhwng llygod mawr**

**Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.13)**

Hipocampws					
LC3-II					
Cymariaethau	Gwahaniaeth	95.00% CI	O dan y trothwy?	Crynodeb	P
Gr vs. AL	0.14	-0.37 to 0.65	No	ns	0.76
MF vs. AL	-0.0098	-0.49 to 0.47	No	ns	>0.99
MF vs. Gr	-0.15	-0.70 to 0.40	No	ns	0.77
LC3-I					
Cymariaethau	Gwahaniaeth	95.00% CI	O dan y trothwy?	Crynodeb	P
Gr vs. AL	0.4	-0.69 to 1.5	No	ns	0.62
MF vs. AL	-0.086	-1.1 to 0.94	No	ns	0.97
MF vs. Gr	-0.49	-1.7 to 0.70	No	ns	0.55
LC3-II/LC3-I					
Cymariaethau	Gwahaniaeth	95.00% CI	O dan y trothwy?	Crynodeb	P
Gr vs. AL	-0.09	-0.49 to 0.31	No	ns	0.83
MF vs. AL	0.011	-0.37 to 0.39	No	ns	>0.99
MF vs. Gr	0.1	-0.33 to 0.54	No	ns	0.82

**Tabl B15. Crynodeb o ganlyniadau prawf cymariaethau lluosog Tukey o fynegiad LC3 hepatic rhwng llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.14)**

Afu					
LC3-II					
Cymariaethau	Gwahaniaeth	95.00% CI	O dan y trothwy?	Crynodeb	P
Gr vs. AL	0.47	-0.36 to 1.3	No	ns	0.34
MF vs. AL	0.16	-0.63 to 0.96	No	ns	0.85
MF vs. Gr	-0.31	-1.2 to 0.58	No	ns	0.65
LC3-I					
Cymariaethau	Gwahaniaeth	95.00% CI	O dan y trothwy?	Crynodeb	P
Gr vs. AL	0.15	-0.72 to 1.0	No	ns	0.89
MF vs. AL	0.28	-0.54 to 1.1	No	ns	0.65
MF vs. Gr	0.13	-0.79 to 1.1	No	ns	0.93
LC3-II/LC3-I					
Cymariaethau	Gwahaniaeth	95.00% CI	O dan y trothwy?	Crynodeb	P
Gr vs. AL	0.21	-0.089 to 0.50	No	ns	0.2
MF vs. AL	-0.037	-0.32 to 0.24	No	ns	0.94
MF vs. Gr	-0.24	-0.56 to 0.071	No	ns	0.15

**Tabl B16. Cydberthyniadau rhwng mynegiad LC3 cortigol a chrynodiad plasma AG yn llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.11)**

<b>Cortecs LC3 vs Plasma [AG]</b>				
	<b>Pob Anifail</b>	<b>AL</b>	<b>Gr</b>	<b>MF</b>
<b>R</b>				
<b>LC3-II</b>	0.2	0.16	0.25	-0.38
<b>LC3-I</b>	0.27	0.53	-0.42	-0.5
<b>LC3-II/LC3-I</b>	-0.2	-0.34	0.18	0.31
<b>P</b>				
<b>LC3-II</b>	0.42	0.73	0.69	0.46
<b>LC3-I</b>	0.28	0.22	0.48	0.31
<b>LC3-II/LC3-I</b>	0.43	0.46	0.78	0.56

**Tabl B17. Cydberthyniadau rhwng mynegiad LC3 hypothalamig a chrynodiad plasma AG yn llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.12)**

<b>Hypothalmws LC3 vs Plasma [AG]</b>				
	<b>Pob Anifail</b>	<b>AL</b>	<b>Gr</b>	<b>MF</b>
<b>R</b>				
<b>LC3-II</b>	0.15	0.33	-0.53	-0.21
<b>LC3-I</b>	-0.22	-0.26	-0.27	-0.39
<b>LC3-II/LC3-I</b>	0.18	0.51	-0.29	-0.17
<b>P</b>				
<b>LC3-II</b>	0.54	0.43	0.36	0.69
<b>LC3-I</b>	0.37	0.54	0.67	0.45
<b>LC3-II/LC3-I</b>	0.45	0.2	0.63	0.75

**Tabl B18. Cydberthyniadau rhwng mynegiad LC3 hipocampaidd a chrynodiad plasma AG yn llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.13)**

<b>Hipocampws LC3 vs Plasma [AG]</b>				
	<b>Pob Anifail</b>	<b>AL</b>	<b>Gr</b>	<b>MF</b>
<b>R</b>				
<b>LC3-II</b>	0.14	0.26	<b>0.88</b>	-0.41
<b>LC3-I</b>	-0.19	-0.14	0.27	-0.81
<b>LC3-II/LC3-I</b>	0.29	0.22	0.82	0.25
<b>P</b>				
<b>LC3-II</b>	0.55	0.51	<b>&lt;0.05</b>	0.42
<b>LC3-I</b>	0.42	0.72	0.66	0.05
<b>LC3-II/LC3-I</b>	0.21	0.57	0.09	0.64

**Tabl B19. Cydberthyniadau rhwng mynegiad LC3 hepatig a chrynodiad plasma AG yn llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.14)**

<b>Afu LC3 vs Plasma [AG]</b>				
	<b>Pob Anifail</b>	<b>AL</b>	<b>Gr</b>	<b>MF</b>
<b>R</b>				
<b>LC3-II</b>	-0.062	0.055	-0.16	0.45
<b>LC3-I</b>	-0.2	-0.45	-0.27	0.21
<b>LC3-II/LC3-I</b>	0.28	0.74	0.088	0.79
<b>P</b>				
<b>LC3-II</b>	0.8	0.9	0.79	0.37
<b>LC3-I</b>	0.42	0.27	0.67	0.7
<b>LC3-II/LC3-I</b>	0.25	<b>0.04</b>	0.89	0.06

**Tabl B20. Cydberthyniadau rhwng crynodiad plasma AG a chymeriant bwyd llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.10)**

Plasma [AG] vs Cymeriant bwyd (FI)												
Pob Anifail			AL			Gr			MF			
LFD	HFD	Cyfanswm	LFD	HFD	Cyfanswm	LFD	HFD	Cyfanswm	LFD	HFD	Cyfanswm	
<b>FI Cronnus</b>												
R	0.07	0.04	0.12	-0.14	-0.06	-0.43	-0.01	0.11	0.08	-0.08	0.19	0.35
P	0.77	0.88	0.61	0.74	0.89	0.28	0.98	0.85	0.90	0.88	0.72	0.49
<b>FI Diwrnod olaf</b>												
R	0.10	0.10	0.21	0.01	-0.05	-0.07	0.03	-0.22	-0.09	-0.45	0.18	-0.02
P	0.67	0.69	0.39	0.98	0.90	0.86	0.96	0.72	0.88	0.37	0.74	0.98



**Tabl B21. Cydberthyniadau rhwng mynegiad LC3 cortigol a chymeriant bwyd cronnus llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.11)**

	Cortecs LC3 vs FI Cronnus											
	Pob Anifail			AL			Gr			MF		
	LFD	HFD	Cyfanswm	LFD	HFD	Cyfanswm	LFD	HFD	Cyfanswm	LFD	HFD	Cyfanswm
	R											
LC3-II	0.06	-0.13	-0.06	-0.04	-0.44	<b>-0.91</b>	-0.50	0.36	-0.59	-0.15	0.20	0.25
LC3-I	-0.14	0.14	-0.03	-0.49	-0.01	<b>-0.90</b>	-0.09	-0.10	-0.26	-0.40	0.41	0.41
LC3-II/LC3-I	-0.06	-0.26	-0.31	<b>0.87</b>	<b>-0.81</b>	0.02	-0.52	0.55	-0.46	0.63	-0.65	-0.61
	P											
LC3-II	0.83	0.61	0.80	0.94	0.33	<b>&gt;0.01</b>	0.39	0.55	0.30	0.77	0.71	0.64
LC3-I	0.57	0.58	0.92	0.26	0.99	<b>&gt;0.01</b>	0.88	0.88	0.68	0.44	0.41	0.42
LC3-II/LC3-I	0.82	0.30	0.21	<b>0.01</b>	<b>0.03</b>	0.96	0.37	0.34	0.44	0.18	0.17	0.20

**Tabl B22. Cydberthyniadau rhwng mynegiad LC3 cortigol a chymeriant bwyd diwrnod olaf llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.11)**

	Cortecs LC3 vs FI Diwrnod Olaf											
	Pob Anifail			AL			Gr			MF		
	LFD	HFD	Cyfanswm	LFD	HFD	Cyfanswm	LFD	HFD	Cyfanswm	LFD	HFD	Cyfanswm
	<b>R</b>											
<b>LC3-II</b>	0.30	-0.46	-0.12	0.28	-0.70	<b>-0.71</b>	-0.38	-0.64	-0.76	0.68	-0.56	-0.43
<b>LC3-I</b>	0.11	-0.13	-0.02	-0.12	-0.33	<b>-0.83</b>	-0.54	<b>0.92</b>	-0.04	0.54	-0.29	-0.11
<b>LC3-II/LC3-I</b>	-0.05	-0.39	-0.40	0.66	-0.56	0.32	-0.12	<b>-0.89</b>	-0.63	-0.04	-0.32	-0.52
	<b>P</b>											
<b>LC3-II</b>	0.22	0.06	0.64	0.55	0.08	<b>0.07</b>	0.53	0.24	0.14	0.14	0.25	0.39
<b>LC3-I</b>	0.67	0.59	0.94	0.80	0.47	<b>0.02</b>	0.35	<b>0.03</b>	0.95	0.27	0.57	0.84
<b>LC3-II/LC3-I</b>	0.86	0.11	0.10	0.11	0.20	0.49	0.85	<b>0.04</b>	0.25	0.95	0.54	0.29

**Tabl B23. Cydberthyniadau rhwng mynegiad LC3 hypothalamig a chymeriant bwyd cronus llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.12)**

	Hypothalmws LC3 vs FI Cronus											
	Pob Anifail			AL			Gr			MF		
	LFD	HFD	Cyfanswm	LFD	HFD	Cyfanswm	LFD	HFD	Cyfanswm	LFD	HFD	Cyfanswm
	R											
LC3-II	-0.30	0.41	0.03	-0.62	0.42	<b>-0.52</b>	-0.72	0.58	-0.79	-0.39	0.28	0.09
LC3-I	-0.27	0.26	-0.08	-0.50	0.40	<b>-0.29</b>	-0.10	-0.02	-0.20	-0.16	-0.01	-0.29
LC3-II/LC3-I	0.11	0.02	0.15	<b>0.37</b>	<b>-0.36</b>	0.07	-0.55	0.58	-0.47	-0.39	0.35	0.25
	P											
LC3-II	0.22	0.08	0.90	0.10	0.30	<b>0.19</b>	0.17	0.31	0.11	0.45	0.59	0.87
LC3-I	0.26	0.27	0.74	0.21	0.32	<b>0.48</b>	0.87	0.98	0.75	0.76	0.98	0.58
LC3-II/LC3-I	0.66	0.93	0.54	<b>0.37</b>	<b>0.38</b>	0.86	0.34	0.31	0.42	0.45	0.50	0.63

**Tabl B24. Cydberthyniadau rhwng mynegiad LC3 hypothalamig a chymeriant bwyd diwrnod olaf llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.12)**

	Hypothalmws LC3 vs FI Diwrnod Olaf											
	Pob Anifail			AL			Gr			MF		
	LFD	HFD	Cyfanswm	LFD	HFD	Cyfanswm	LFD	HFD	Cyfanswm	LFD	HFD	Cyfanswm
	R											
LC3-II	-0.37	0.36	-0.06	-0.60	0.49	-0.55	-0.84	0.47	-0.60	0.08	-0.12	-0.13
LC3-I	<b>-0.52</b>	<b>0.55</b>	-0.03	-0.64	0.62	-0.40	-0.51	<b>0.98</b>	0.03	-0.51	0.61	0.62
LC3-II/LC3-I	0.24	-0.24	0.03	0.42	-0.44	0.22	-0.12	-0.73	-0.55	0.29	-0.30	-0.28
	P											
LC3-II	0.12	0.13	0.82	0.11	0.22	0.16	0.08	0.43	0.28	0.88	0.82	0.80
LC3-I	<b>0.02</b>	<b>0.01</b>	0.91	0.09	0.10	0.32	0.38	<b>&gt; 0.01</b>	0.97	0.30	0.20	0.19
LC3-II/LC3-I	0.32	0.33	0.90	0.29	0.28	0.61	0.84	0.16	0.34	0.58	0.57	0.60

**Tabl B25. Cydberthyniadau rhwng mynegiad LC3 hipocampaidd a chymeriant bwyd cronnus llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.13)**

	Hipocampws LC3 vs FI Cronnus											
	Pob Anifail			AL			Gr			MF		
	LFD	HFD	Cyfanswm	LFD	HFD	Cyfanswm	LFD	HFD	Cyfanswm	LFD	HFD	Cyfanswm
	R											
LC3-II	0.09	-0.36	-0.26	0.15	-0.34	-0.37	-0.09	0.03	-0.13	0.68	-0.79	<b>-0.90</b>
LC3-I	-0.14	-0.21	-0.36	-0.14	-0.22	<b>-0.70</b>	-0.37	0.15	-0.54	0.53	-0.55	-0.53
LC3-II/LC3-I	0.35	-0.20	0.19	0.49	-0.26	0.41	0.36	-0.20	0.47	0.09	-0.18	-0.31
	P											
LC3-II	0.72	0.11	0.27	0.70	0.37	0.33	0.89	0.96	0.84	0.14	0.06	<b>0.02</b>
LC3-I	0.54	0.37	0.12	0.72	0.56	<b>0.04</b>	0.54	0.80	0.35	0.28	0.26	0.28
LC3-II/LC3-I	0.13	0.41	0.43	0.18	0.50	0.27	0.55	0.75	0.42	0.86	0.73	0.55

**Tabl B26. Cydberthyniadau rhwng mynegiad LC3 hipocampaidd a chymeriant bwyd diwrnod olaf llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.13)**

	Hipocampws LC3 vs FI Diwrnod Olaf											
	Pob Anifail			AL			Gr			MF		
	LFD	HFD	Cyfanswm	LFD	HFD	Cyfanswm	LFD	HFD	Cyfanswm	LFD	HFD	Cyfanswm
	R											
LC3-II	0.12	-0.38	-0.28	0.34	-0.57	-0.36	-0.19	-0.19	-0.30	0.16	-0.29	-0.35
LC3-I	0.06	-0.43	-0.40	0.24	-0.54	-0.51	-0.45	-0.37	-0.68	0.78	-0.56	-0.37
LC3-II/LC3-I	0.18	0.08	0.26	0.30	-0.14	0.40	0.28	0.18	0.40	-0.66	0.41	0.21
	P											
LC3-II	0.62	0.10	0.23	0.37	0.11	0.34	0.76	0.76	0.62	0.76	0.58	0.50
LC3-I	0.81	0.06	0.08	0.53	0.14	0.16	0.45	0.54	0.21	0.06	0.24	0.47
LC3-II/LC3-I	0.46	0.75	0.27	0.43	0.72	0.28	0.64	0.78	0.51	0.15	0.42	0.68

**Tabl B27. Cydberthyniadau rhwng mynegiad LC3 hepatic a chymeriant bwyd cronnus llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.14)**

	Afu LC3 vs FI Cronnus											
	Pob Anifail			AL			Gr			MF		
	LFD	HFD	Cyfanswm	LFD	HFD	Cyfanswm	LFD	HFD	Cyfanswm	LFD	HFD	Cyfanswm
	R											
LC3-II	-0.24	-0.05	-0.31	-0.59	0.56	0.00	-0.12	-0.19	-0.38	0.75	-0.61	-0.33
LC3-I	-0.11	-0.07	-0.20	-0.54	0.66	0.27	0.03	-0.24	-0.17	<b>0.82</b>	-0.71	-0.46
LC3-II/LC3-I	-0.26	0.00	-0.29	-0.21	-0.02	-0.44	-0.17	-0.10	-0.40	-0.54	0.59	0.63
	P											
LC3-II	0.31	0.85	0.19	0.13	0.15	0.99	0.85	0.76	0.53	0.09	0.20	0.53
LC3-I	0.64	0.77	0.42	0.16	0.07	0.51	0.97	0.70	0.78	<b>0.04</b>	0.11	0.35
LC3-II/LC3-I	0.28	1.00	0.23	0.61	0.96	0.28	0.79	0.87	0.50	0.27	0.21	0.18

**Tabl B28. Cydberthyniadau rhwng mynegiad LC3 hepatic a chymeriant bwyd diwrnod olaf llygod mawr Sprague-Dawley ar patrymau bwydo amserol penodol (perthnasol i ffigur 4.14)**

	Afu LC3 vs FI Diwrnod Olaf											
	Pob Anifail			AL			Gr			MF		
	LFD	HFD	Cyfanswm	LFD	HFD	Cyfanswm	LFD	HFD	Cyfanswm	LFD	HFD	Cyfanswm
	R											
LC3-II	<b>-0.49</b>	0.04	-0.45	<b>-0.88</b>	<b>0.82</b>	-0.33	-0.57	0.50	-0.31	0.34	-0.50	-0.56
LC3-I	-0.32	0.03	-0.30	<b>-0.76</b>	<b>0.77</b>	-0.15	-0.48	<b>0.89</b>	0.01	0.43	-0.51	-0.51
LC3-II/LC3-I	-0.39	0.03	-0.35	-0.37	0.22	-0.38	-0.38	-0.18	-0.50	-0.53	0.31	0.14
	P											
LC3-II	<b>0.03</b>	0.88	0.05	<b>&gt;0.001</b>	<b>0.01</b>	0.43	0.31	0.39	0.61	0.51	0.32	0.25
LC3-I	0.18	0.92	0.22	<b>0.03</b>	<b>0.03</b>	0.72	0.41	<b>0.04</b>	0.99	0.39	0.31	0.30
LC3-II/LC3-I	0.10	0.89	0.14	0.37	0.60	0.36	0.53	0.77	0.39	0.28	0.55	0.79



**Tabl B29. Crynodeb o ganlyniadau prawf ANOVA Dwyffordd o fynegiad LC3 y blaen-ymennydd rhwng llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a llygod WT sydd wedi bwydo ar patrymau bwydo amserol penodol**

<b>Blaen-ymennydd</b>				
<b>LC3-II/Tubulin</b>				
<b>Ffynhonell Amrywiad</b>	<b>% o'r amrywiad cyfan</b>	<b>P</b>	<b>Crynodeb</b>	<b>Arwyddocaol?</b>
Rhyngweithiad	5.3	0.47	ns	No
Patrwm Bwydo	5.7	0.44	ns	No
Genoteip	14	<b>0.06</b>	ns	No
<b>LC3-I/Tubulin</b>				
<b>Ffynhonell Amrywiad</b>	<b>% o'r amrywiad cyfan</b>	<b>P</b>	<b>Crynodeb</b>	<b>Arwyddocaol?</b>
Rhyngweithiad	2	0.77	ns	No
Patrwm Bwydo	2.8	0.69	ns	No
Genoteip	15	<b>0.05</b>	ns	No
<b>LC3-II/LC3-I</b>				
<b>Ffynhonell Amrywiad</b>	<b>% o'r amrywiad cyfan</b>	<b>P</b>	<b>Crynodeb</b>	<b>Arwyddocaol?</b>
Rhyngweithiad	4.6	0.58	ns	No
Patrwm Bwydo	3.6	0.65	ns	No
Genoteip	0.41	0.76	ns	No

**Tabl B30. Crynodeb o ganlyniadau prawf Tukey o gwahaniaethau yn LC3-II y blaen-ymennydd rhwng patrymau bwydo amserol llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a llygod WT**

<b>Blaen-ymennydd: LC3-II/Tubulin</b>					
<b>Cymariaethau</b>	<b>Gwahaniaeth</b>	<b>95.00% CI</b>	<b>O dan y trothwy?</b>	<b>Crynodeb</b>	<b>P</b>
<b>WT</b>					
AL vs. Gr	0.043	-0.15 to 0.23	No	ns	0.84
AL vs. MF	0.011	-0.18 to 0.20	No	ns	0.99
Gr vs. MF	-0.033	-0.24 to 0.17	No	ns	0.91
<b>GHS-R<sup>-/-</sup></b>					
AL vs. Gr	-0.014	-0.16 to 0.13	No	ns	0.97
AL vs. MF	-0.11	-0.25 to 0.035	No	ns	0.16
Gr vs. MF	-0.093	-0.25 to 0.064	No	ns	0.32

**Tabl B31. Crynodeb o ganlyniadau prawf Tukey o gwahaniaethau yn LC3-I y blaen-ymennydd rhwng patrymau bwydo amserol llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a llygod WT**

Blaen-ymennydd: LC3-I/Tubulin					
Cymariaethau	Gwahaniaeth	95.00% CI	O dan y trothwy?	Crynodeb	P
<b>WT</b>					
AL vs. Gr	0.39	-0.59 to 1.4	No	ns	0.59
AL vs. MF	0.12	-0.86 to 1.1	No	ns	0.95
Gr vs. MF	-0.27	-1.3 to 0.78	No	ns	0.8
<b>GHS-R<sup>-/-</sup></b>					
AL vs. Gr	0.034	-0.70 to 0.77	No	ns	>0.99
AL vs. MF	0.0026	-0.73 to 0.73	No	ns	>0.99
Gr vs. MF	-0.031	-0.84 to 0.78	No	ns	>0.99

**Tabl B32. Crynodeb o ganlyniadau prawf Tukey o gwahaniaethau yn LC3-II/LC3-I y blaen-ymennydd rhwng patrymau bwydo amserol llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a llygod WT**

<b>Blaen-ymennydd: LC3-II/LC3-I</b>					
<b>Cymariaethau</b>	<b>Gwahaniaeth</b>	<b>95.00% CI</b>	<b>O dan y trothwy?</b>	<b>Crynodeb</b>	<b>P</b>
<b>WT</b>					
AL vs. Gr	-0.06	-0.34 to 0.22	No	ns	0.86
AL vs. MF	0.0017	-0.28 to 0.28	No	ns	>0.99
Gr vs. MF	0.062	-0.24 to 0.36	No	ns	0.87
<b>GHS-R<sup>-/-</sup></b>					
AL vs. Gr	-0.037	-0.25 to 0.17	No	ns	0.9
AL vs. MF	-0.12	-0.33 to 0.089	No	ns	0.33
Gr vs. MF	-0.086	-0.32 to 0.15	No	ns	0.63

**Tabl B33. Crynodeb o ganlyniadau prawf ANOVA Dwyffordd o fynegiad LC3 y hypothalamws rhwng llygod GHS-R<sup>-</sup> a llygod**

**WT sydd wedi bwydo ar patrymau bwydo amserol penodol**

<b>Hypothalmws</b>				
<b>LC3-II/Tubulin</b>				
<b>Ffynhonell Amrywiad</b>	<b>% o'r amrywiad cyfan</b>	<b>P</b>	<b>Crynodeb</b>	<b>Arwyddocaol?</b>
Rhyngweithiad	9	0.28	ns	No
Patrwm Bwydo	14	0.14	ns	No
Genoteip	1.7	0.48	ns	No
<b>LC3-I/Tubulin</b>				
<b>Ffynhonell Amrywiad</b>	<b>% o'r amrywiad cyfan</b>	<b>P</b>	<b>Crynodeb</b>	<b>Arwyddocaol?</b>
Rhyngweithiad	1.3	0.83	ns	No
Patrwm Bwydo	19	0.09	ns	No
Genoteip	1.4	0.53	ns	No
<b>LC3-II/LC3-I</b>				
<b>Ffynhonell Amrywiad</b>	<b>% o'r amrywiad cyfan</b>	<b>P</b>	<b>Crynodeb</b>	<b>Arwyddocaol?</b>
Rhyngweithiad	4.2	0.61	ns	No
Patrwm Bwydo	15	0.18	ns	No
Genoteip	0.82	0.66	ns	No

**Tabl B34. Crynodeb o ganlyniadau prawf Tukey o gwahaniaethau yn LC3-II y hypothalamws rhwng patrymau bwydo amserol**

**Ilygod GHS-R<sup>-/-</sup> a Ilygod WT**

<b>Hypothalmws: LC3-II/Tubulin</b>					
<b>Cymariaethau</b>	<b>Gwahaniaeth</b>	<b>95.00% CI</b>	<b>O dan y trothwy?</b>	<b>Crynodeb</b>	<b>P</b>
<b>WT</b>					
AL vs. Gr	0.027	-0.50 to 0.55	No	ns	>0.99
AL vs. MF	0.059	-0.46 to 0.58	No	ns	0.96
Gr vs. MF	0.032	-0.49 to 0.55	No	ns	0.99
<b>GHS-R<sup>-/-</sup></b>					
AL vs. Gr	0.38	0.00036 to 0.75	<b>Yes</b>	*	<b>&lt;0.05</b>
AL vs. MF	0.44	0.035 to 0.84	<b>Yes</b>	*	<b>0.03</b>
Gr vs. MF	0.061	-0.37 to 0.49	No	ns	0.93

**Tabl B35. Crynodeb o ganlyniadau prawf Tukey o gwahaniaethau yn LC3-I y hypothalamws rhwng patrymau bwydo amserol**

**Ilygod GHS-R<sup>-/-</sup> a Ilygod WT**

Hypothalmws: LC3-I/Tubulin					
Cymariaethau	Gwahaniaeth	95.00% CI	O dan y trothwy?	Crynodeb	P
<b>WT</b>					
AL vs. Gr	2	-1.1 to 5.0	No	ns	0.25
AL vs. MF	1.5	-1.6 to 4.6	No	ns	0.45
Gr vs. MF	-0.48	-3.9 to 2.9	No	ns	0.93
<b>GHS-R<sup>-/-</sup></b>					
AL vs. Gr	1.1	-1.3 to 3.5	No	ns	0.5
AL vs. MF	1.4	-0.97 to 3.8	No	ns	0.32
Gr vs. MF	0.33	-2.3 to 3.0	No	ns	0.95

**Tabl B36. Crynodeb o ganlyniadau prawf Tukey o gwahaniaethau yn LC3-II/LC3-I y hypothalamws rhwng patrymau bwydo amserol llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a llygod WT**

Hypothalmws: LC3-II/LC3-I					
Cymariaethau	Gwahaniaeth	95.00% CI	O dan y trothwy?	Crynodeb	P
<b>WT</b>					
AL vs. Gr	0.0044	-0.42 to 0.43	No	ns	>0.99
AL vs. MF	0.23	-0.19 to 0.65	No	ns	0.37
Gr vs. MF	0.23	-0.20 to 0.65	No	ns	0.38
<b>GHS-R<sup>-/-</sup></b>					
AL vs. Gr	0.16	-0.15 to 0.46	No	ns	0.4
AL vs. MF	0.17	-0.15 to 0.50	No	ns	0.38
Gr vs. MF	0.018	-0.33 to 0.36	No	ns	>0.99



**Tabl B37. Crynodeb o ganlyniadau prawf ANOVA Dwyffordd o fynegiad LC3 y blaen-ymennydd rhwng llygod GHS-R<sup>-/-</sup> a llygod WT sydd wedi bwydo ar patrymau bwydo amserol penodol**

Afu				
LC3-II/GAPDH				
Ffynhonell Amrywiad	% o'r amrywiad cyfan	P	Crynodeb	Arwyddocaol?
Rhyngweithiad	0.13	0.98	ns	No
Patrwm Bwydo	0.9	0.88	ns	No
Genoteip	17	<b>0.04</b>	*	Yes
LC3-I/GAPDH				
Ffynhonell Amrywiad	% o'r amrywiad cyfan	P	Crynodeb	Arwyddocaol?
Rhyngweithiad	2	0.76	ns	No
Patrwm Bwydo	0.56	0.93	ns	No
Genoteip	15	<b>0.05</b>	ns	No
LC3-II/LC3-I				
Ffynhonell Amrywiad	% o'r amrywiad cyfan	P	Crynodeb	Arwyddocaol?
Rhyngweithiad	20	<b>0.06</b>	ns	No
Patrwm Bwydo	12	0.17	ns	No
Genoteip	4	0.26	ns	No

**Tabl B38. Crynodeb o ganlyniadau prawf Tukey o gwahaniaethau yn LC3-II yr afu rhwng patrymau bwydo amserol llygod**

**GHS-R<sup>-/-</sup> a llygod WT**

<b>Afu: LC3-II/GAPDH</b>					
<b>Cymariaethau</b>	<b>Gwahaniaeth</b>	<b>95.00% CI</b>	<b>O dan y trothwy?</b>	<b>Crynodeb</b>	<b>P</b>
<b>WT</b>					
Gr vs. AL	0.16	-1.7 to 2.0	No	ns	0.97
MF vs. AL	-0.08	-1.9 to 1.8	No	ns	>0.99
MF vs. Gr	-0.24	-2.3 to 1.8	No	ns	0.95
<b>GHS-R<sup>-/-</sup></b>					
Gr vs. AL	0.033	-1.4 to 1.5	No	ns	>0.99
MF vs. AL	-0.25	-1.7 to 1.2	No	ns	0.9
MF vs. Gr	-0.28	-1.9 to 1.3	No	ns	0.9

**Tabl B39. Crynodeb o ganlyniadau prawf Tukey o gwahaniaethau yn LC3-I yr afu rhwng patrymau bwydo amserol llygod**

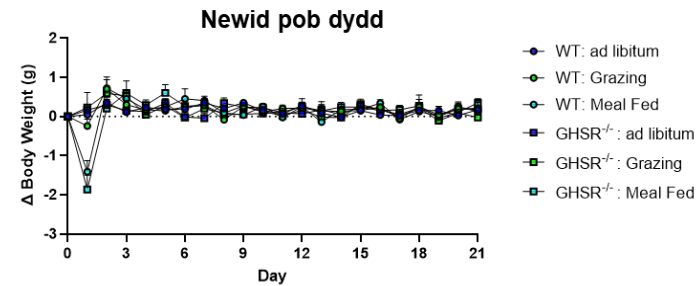
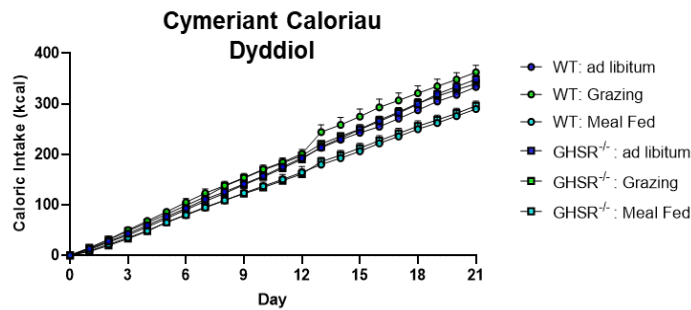
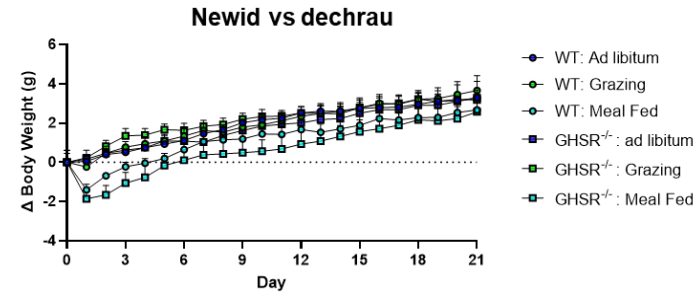
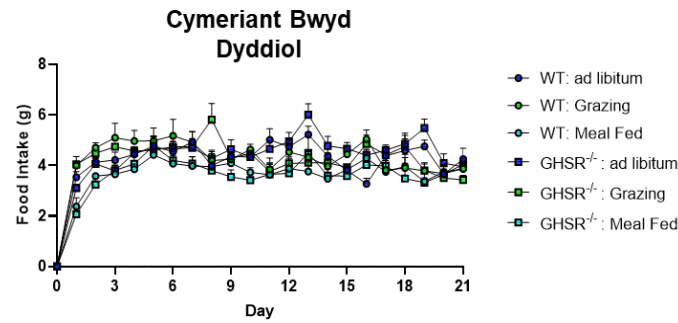
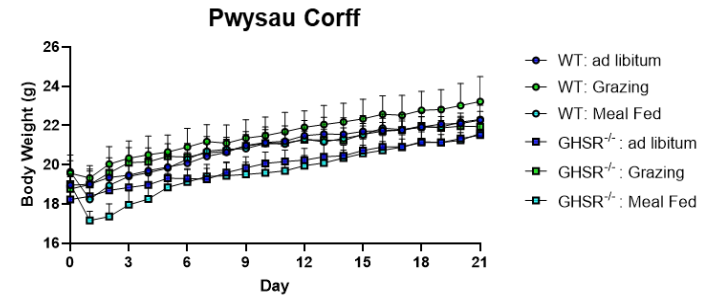
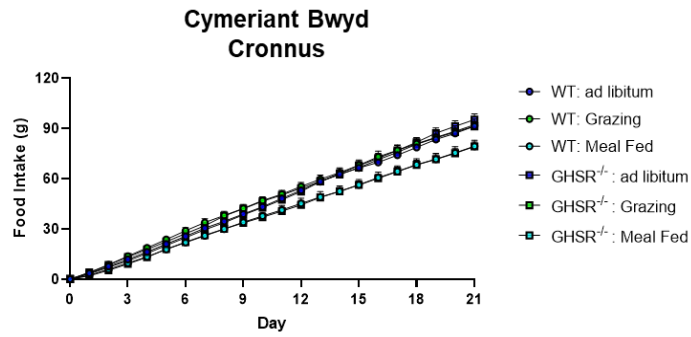
**GHS-R<sup>-/-</sup> a llygod WT**

<b>Afu: LC3-I/GAPDH</b>					
<b>Cymariaethau</b>	<b>Gwahaniaeth</b>	<b>95.00% CI</b>	<b>O dan y trothwy?</b>	<b>Crynodeb</b>	<b>P</b>
<b>WT</b>					
Gr vs. AL	-0.3	-3.4 to 2.8	No	ns	0.97
MF vs. AL	-0.28	-3.3 to 2.8	No	ns	0.97
MF vs. Gr	0.014	-3.4 to 3.4	No	ns	>0.99
<b>GHS-R<sup>-/-</sup></b>					
Gr vs. AL	0.3	-2.1 to 2.7	No	ns	0.95
MF vs. AL	0.85	-1.5 to 3.2	No	ns	0.65
MF vs. Gr	0.55	-2.1 to 3.2	No	ns	0.86

**Tabl B40. Crynodeb o ganlyniadau prawf Tukey o gwahaniaethau yn LC3-I yr afu rhwng patrymau bwydo amserol llygod**

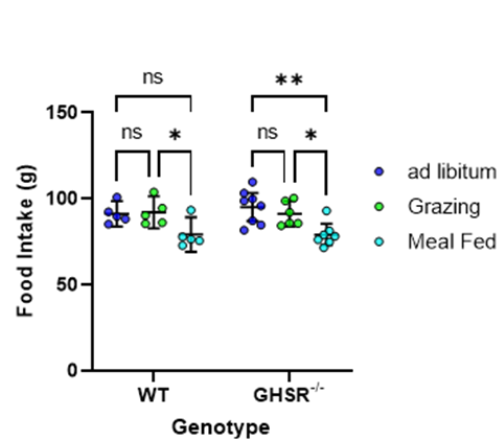
**GHS-R<sup>-/-</sup> a llygod WT**

<b>Afu: LC3-II/LC3-I</b>					
<b>Cymariaethau</b>	<b>Gwahaniaeth</b>	<b>95.00% CI</b>	<b>O dan y trothwy?</b>	<b>Crynodeb</b>	<b>P</b>
<b>WT</b>					
Gr vs. AL	1.1	0.011 to 2.2	Yes	*	<b>&lt;0.05</b>
MF vs. AL	0.17	-0.92 to 1.3	No	ns	0.92
MF vs. Gr	-0.93	-2.1 to 0.28	No	ns	0.16
<b>GHS-R<sup>-/-</sup></b>					
Gr vs. AL	-0.28	-1.1 to 0.57	No	ns	0.69
MF vs. AL	-0.52	-1.4 to 0.33	No	ns	0.3
MF vs. Gr	-0.23	-1.2 to 0.71	No	ns	0.81

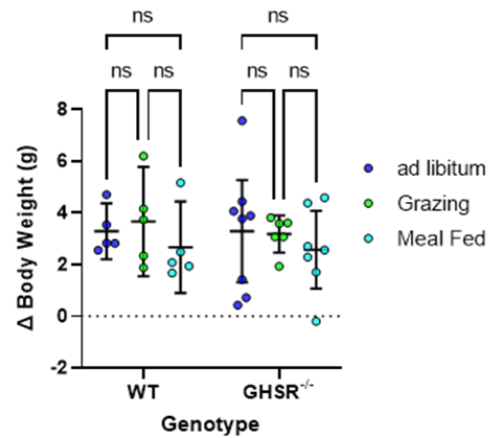


**Ffigur B.4. Data cymeriant bwyd a pwysau corff arbrawf patrymau bwydo amserol llygod GHS-R<sup>-/-</sup>. Cynhyrchir y data crai gan lab Dr Tim Wells ym Mhrifysgol Caerdydd.**

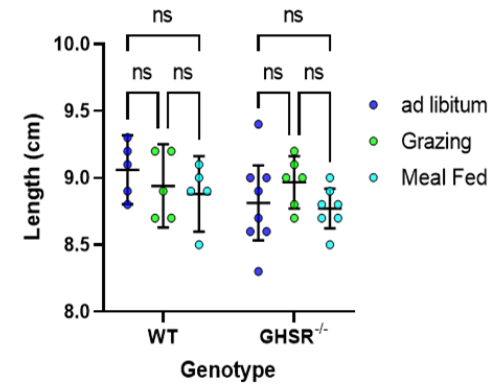
### Cymeriant Bwyd Cronnus



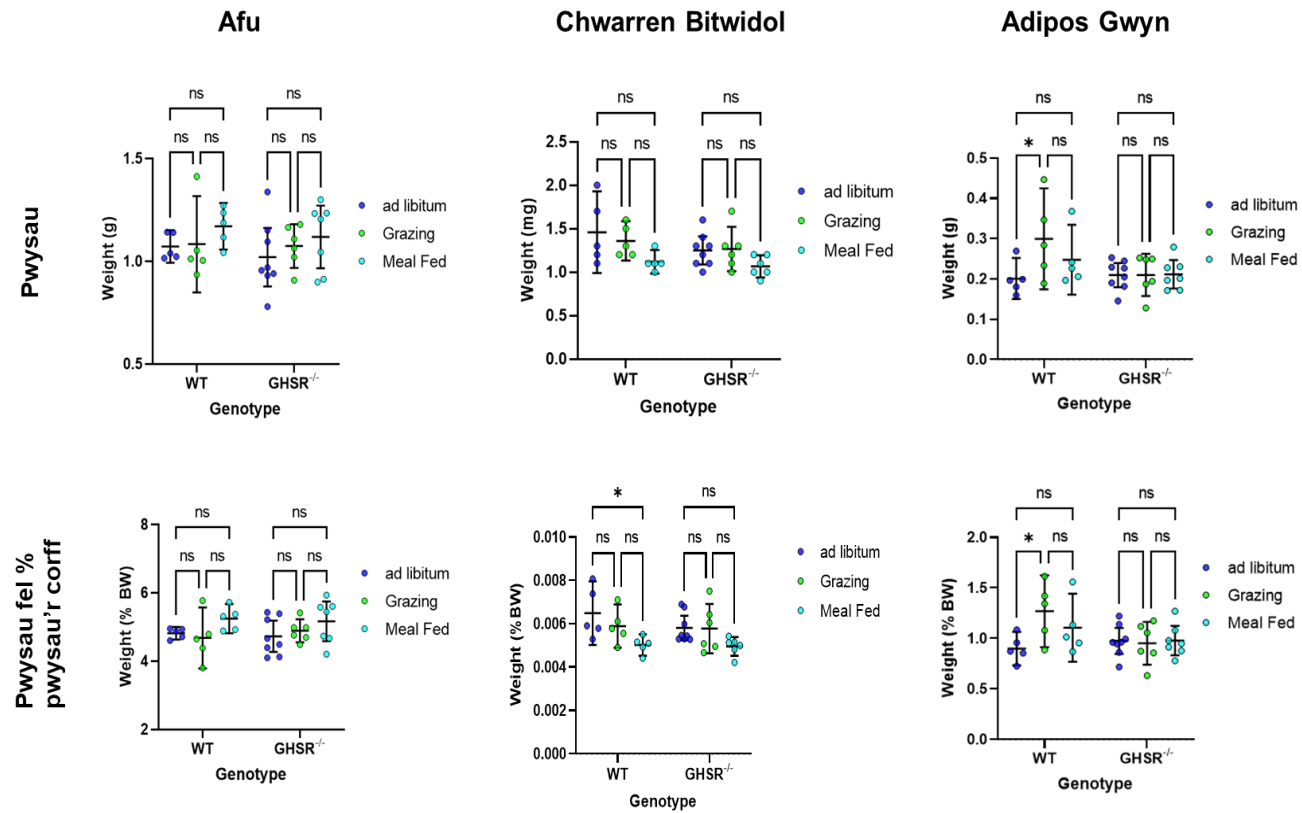
### Newidiad Pwysau



### Hyd o'r Trwyn i'r Anws

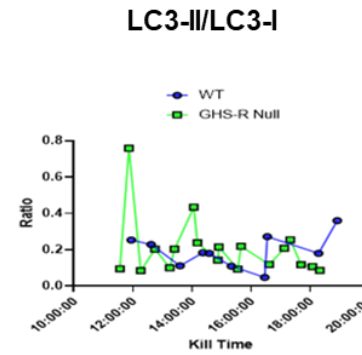
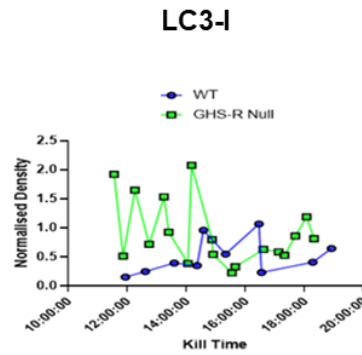
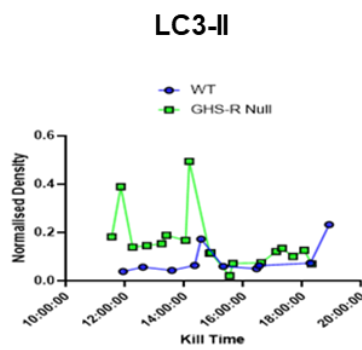


**Ffigur B5.** Cymariaethau ystadegol ANOVA dwyffordd a phrawf cymariaethau lluosog Tukey, o gymeriant bwyd cronnus, newidiad pwysau, a hyd o'r trwyn i'r anws, o'r arbrawf patrymau bwydo amserol yn llygod GHS-R<sup>-/-</sup>. Cynhyrchir y data crai gan lab Dr Tim Wells ym mhrifysgol Caerdydd. Gwelir fod niferoedd mwy o lygod yn y grwpiau Gr a MF mewn cymhariaeth i'r data LC3 yn pennod 4.

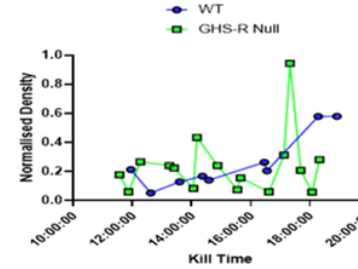
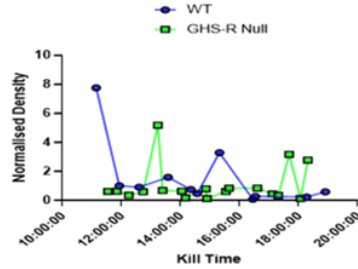
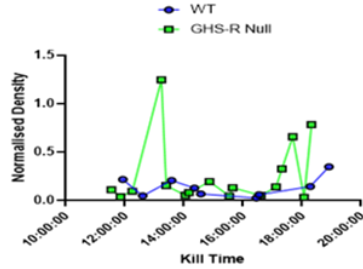


**Ffigur B6. Cymariaethau ystadegol ANOVA dwyffordd a phrawf cymariaethau lluosog Tukey, o pwysau'r afu, chwarren bitwidol ac adipos gwyn, o'r arbrawf patrymau bwydo amserol yn llygod GHSR<sup>-/-</sup>. Cynhyrchir y data crai gan lab Dr Tim Wells ym mhrifysgol Caerdydd. Gwelir fod niferoedd mwy o lygod yn y grwpiau Gr a MF mewn cymhariaeth i'r data LC3 yn pennod 4.**

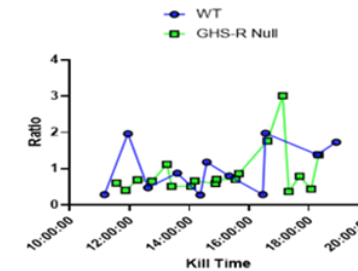
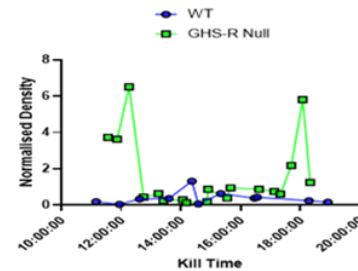
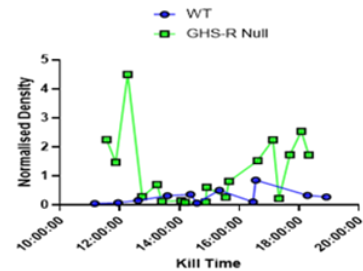
Blaen-ymennydd



Hypothalamws

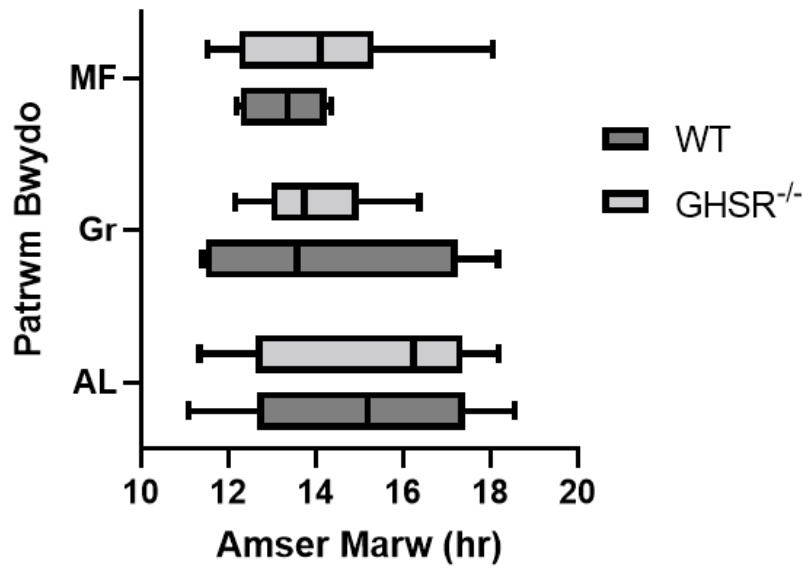


Afu



Ffigur B7. Mynegiad LC3 y blaen-ymennydd, hypothalamws ac afu mewn perthynas i amser marw, o'r arbrawf patrymau bwydo amserol llygod GHS-R<sup>-/-</sup>. Oherwydd y samplau fach, mae'r grwpiau patrymau bwydo (AL, Gr, MF) wedi cyfuno ar gyfer y dau genoteip.





Ffigur B8. Gwahaniaethau yn amseroedd marw grwpiau yr arbrawf patrymau bwydo amserol yn llygod GHS-R<sup>-/-</sup>.

## Cyfeiriadau

- Abbott, N. J., Dolman, D. E. M., & Patabendige, A. K. (2008). Assays to Predict Drug Permeation Across the Blood-Brain Barrier, and Distribution to Brain. *Current Drug Metabolism*, 9(9), 901-910. doi:10.2174/138920008786485182
- Acosta-Rodríguez, V., Rijo-Ferreira, F., Izumo, M., Xu, P., Wight-Carter, M., Green, C. B., & Takahashi, J. S. (2022). Circadian alignment of early onset caloric restriction promotes longevity in male C57BL/6J mice. *Science*, 376(6598), 1192-1202. doi:10.1126/science.abk0297
- Acosta-Rodriguez, V. A., de Groot, M. H. M., Rijo-Ferreira, F., Green, C. B., & Takahashi, J. S. (2017). Mice under Caloric Restriction Self-Impose a Temporal Restriction of Food Intake as Revealed by an Automated Feeder System. *Cell Metabolism*, 26(1), 267-+. doi:10.1016/j.cmet.2017.06.007
- Adriaenssens, A. E., Svendsen, B., Lam, B. Y. H., Yeo, G. S. H., Holst, J. J., Reimann, F., & Gribble, F. M. (2016). Transcriptomic profiling of pancreatic alpha, beta and delta cell populations identifies delta cells as a principal target for ghrelin in mouse islets. *Diabetologia*, 59(10), 2156-2165. doi:10.1007/s00125-016-4033-1
- Aimone, J. B., Deng, W., & Gage, F. H. (2011). Resolving New Memories: A Critical Look at the Dentate Gyrus, Adult Neurogenesis, and Pattern Separation. *Neuron*, 70(4), 589-596. doi:10.1016/j.neuron.2011.05.010
- Alers, S., Löffler, A. S., Wesselborg, S., & Stork, B. (2012). Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the Regulation of Autophagy: Cross Talk, Shortcuts, and Feedbacks. *Molecular and Cellular Biology*, 32(1), 2-11. doi:10.1128/mcb.06159-11
- Allen, G. F. G., Toth, R., James, J., & Ganley, I. G. (2013). Loss of iron triggers PINK1/Parkin-independent mitophagy. *Embo Reports*, 14(12), 1127-1135. doi:10.1038/embor.2013.168
- Amherdt, M., Harris, V., Renold, A. E., Orci, L., & Unger, R. H. (1974). Hepatic Autophagy in Uncontrolled Experimental Diabetes and Its Relationships to Insulin and Glucagon. *Journal of Clinical Investigation*, 54(1), 188-193. doi:10.1172/jci107742
- Anacker, C., & Hen, R. (2017). Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility - linking memory and mood. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(6), 335-346. doi:10.1038/nrn.2017.45
- Andrews, Z. B., Erion, D., Beiler, R., Liu, Z. W., Abizaid, A., Zigman, J., . . . Horvath, T. L. (2009). Ghrelin Promotes and Protects Nigrostriatal Dopamine Function via a UCP2-Dependent Mitochondrial Mechanism. *Journal of Neuroscience*, 29(45), 14057-14065. doi:10.1523/jneurosci.3890-09.2009
- Andrews, Z. B., Liu, Z. W., Wallingford, N., Erion, D. M., Borok, E., Friedman, J. M., . . . Diano, S. (2008). UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature*, 454(7206), 846-851. doi:10.1038/nature07181
- Angelini, R., Lobasso, S., Gorgoglione, R., Bowron, A., Steward, C. G., & Corcelli, A. (2015). Cardiolipin fingerprinting of leukocytes by MALDI-TOF/MS as a screening tool for Barth syndrome. *Journal of Lipid Research*, 56(9), 1787-1794. doi:10.1194/jlr.D059824
- Angelini, R., Vitale, R., Patil, V. A., Cocco, T., Ludwig, B., Greenberg, M. L., & Corcelli, A. (2012). Lipidomics of intact mitochondria by MALDI-TOF/MS. *Journal of Lipid Research*, 53(7), 1417-1425. doi:10.1194/jlr.D026203
- Aon, M. A., Bernier, M., Mitchell, S. J., Di Germanio, C., Mattison, J. A., Ehrlich, M. R., . . . de Cabo, R. (2020). Untangling Determinants of Enhanced Health and Lifespan through a Multi-omics Approach in Mice. *Cell Metabolism*, 32(1), 100-+. doi:10.1016/j.cmet.2020.04.018

- Aoun, P., Watson, D. G., & Simpkins, J. W. (2003). Neuroprotective effects of PPAR-gamma agonists against oxidative insults in HT-22 cells. *European Journal of Pharmacology*, 472(1-2), 65-71. doi:10.1016/s0014-2999(03)01867-3
- Axe, E. L., Walker, S. A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H. L., Habermann, A., . . . Ktistakis, N. T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology*, 182(4), 685-701. doi:10.1083/jcb.200803137
- Bach, M., Larance, M., James, D. E., & Ramm, G. (2011). The serine/threonine kinase ULK1 is a target of multiple phosphorylation events. *Biochemical Journal*, 440, 283-291. doi:10.1042/bj20101894
- Bagherniya, M., Butler, A. E., Barreto, G. E., & Sahebkar, A. (2018). The effect of fasting or calorie restriction on autophagy induction: A review of the literature. *Ageing Research Reviews*, 47, 183-197. doi:10.1016/j.arr.2018.08.004
- Bakula, D., Muller, A. J., Zuleger, T., Takacs, Z., Franz-Wachtel, M., Thost, A. K., . . . Proikas-Cezanne, T. (2017). WIPI3 and WIPI4 beta-propellers are scaffolds for LKB1-AMPK-TSC signalling circuits in the control of autophagy. *Nature Communications*, 8, 18. doi:10.1038/ncomms15637
- Baldini, G., & Phelan, K. D. (2019). The melanocortin pathway and control of appetite-progress and therapeutic implications. *Journal of Endocrinology*, 241(1), R1-R33. doi:10.1530/joe-18-0596
- Ballard, P. A., Tetrud, J. W., & Langston, J. W. (1985). PERMANENT HUMAN PARKINSONISM DUE TO 1-METHYL-4-PHENYL-1,2,3,6-TETRAHYDROPYRIDINE (MPTP) - 7 CASES. *Neurology*, 35(7), 949-956. doi:10.1212/wnl.35.7.949
- Banks, W. A., Tschop, M., Robinson, S. M., & Heiman, M. L. (2002). Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302(2), 822-827. doi:10.1124/jpet.102.034827
- Barnett, B. P., Hwang, Y. S., Taylor, M. S., Kirchner, H., Pfluger, P. T., Bernard, V., . . . Cole, P. A. (2010). Glucose and Weight Control in Mice with a Designed Ghrelin O-Acyltransferase Inhibitor. *Science*, 330(6011), 1689-1692. doi:10.1126/science.1196154
- Barzilai, N., Huffman, D. M., Muzumdar, R. H., & Bartke, A. (2012). The Critical Role of Metabolic Pathways in Aging. *Diabetes*, 61(6), 1315-1322. doi:10.2337/db11-1300
- Bayliss, J. A., Lemus, M. B., Stark, R., Santos, V. V., Thompson, A., Rees, D. J., . . . Andrews, Z. B. (2016). Ghrelin-AMPK Signaling Mediates the Neuroprotective Effects of Calorie Restriction in Parkinson's Disease. *Journal of Neuroscience*, 36(10), 3049-3063. doi:10.1523/jneurosci.4373-15.2016
- Beckervordersandforth, R., Ebert, B., Schaffner, I., Moss, J., Fiebig, C., Shin, J., . . . Lie, D. C. C. (2017). Role of Mitochondrial Metabolism in the Control of Early Lineage Progression and Aging Phenotypes in Adult Hippocampal Neurogenesis. *Neuron*, 93(3), 560-+. doi:10.1016/j.neuron.2016.12.017
- Beliën, J. A. M., & Wouterlood, F. G. (2012). 1 - Confocal Laser Scanning: of Instrument, Computer Processing, and Men. In F. G. Wouterlood (Ed.), *Cellular Imaging Techniques for Neuroscience and Beyond* (pp. 1-34). San Diego: Academic Press.
- Bewick, G. A., Kent, A., Campbell, D., Patterson, M., Ghatei, M. A., Bloom, S. R., & Gardiner, J. V. (2009). Mice With Hyperghrelinemia Are Hyperphagic and Glucose Intolerant and Have Reduced Leptin Sensitivity. *Diabetes*, 58(4), 840-846. doi:10.2337/db08-1428

- Beynon, A. L., Brown, M. R., Wright, R., Rees, M. I., Sheldon, I. M., & Davies, J. S. (2013). Ghrelin inhibits LPS-induced release of IL-6 from mouse dopaminergic neurones. *Journal of Neuroinflammation*, *10*(1), 40. doi:10.1186/1742-2094-10-40
- Bloem, B. R., Okun, M. S., & Klein, C. (2021). Parkinson's disease. *Lancet*, *397*(10291), 2284-2303. doi:10.1016/s0140-6736(21)00218-x
- Boland, B., Kumar, A., Lee, S., Platt, F. M., Wegiel, J., Yu, W. H., & Nixon, R. A. (2008). Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: Relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, *28*(27), 6926-6937. doi:10.1523/jneurosci.0800-08.2008
- Boldrini, M., Fulmore, C. A., Tartt, A. N., Simeon, L. R., Pavlova, I., Poposka, V., . . . Mann, J. J. (2018). Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell*, *22*(4), 589+. doi:10.1016/j.stem.2018.03.015
- Bordi, M., Berg, M. J., Mohan, P. S., Peterhoff, C. M., Alldred, M. J., Che, S. L., . . . Nixon, R. A. (2016). Autophagy flux in CA1 neurons of Alzheimer hippocampus: Increased induction overburdens failing lysosomes to propel neuritic dystrophy. *Autophagy*, *12*(12), 2467-2483. doi:10.1080/15548627.2016.1239003
- Breijyeh, Z., & Karaman, R. (2020). Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*, *25*(24), 28. doi:10.3390/molecules25245789
- Briggs, D. I., Enriori, P. J., Lemus, M. B., Cowley, M. A., & Andrews, Z. B. (2010). Diet-Induced Obesity Causes Ghrelin Resistance in Arcuate NPY/AgRP Neurons. *Endocrinology*, *151*(10), 4745-4755. doi:10.1210/en.2010-0556
- Broglio, F., Arvat, E., Benso, A., Gottero, C., Muccioli, G., Papotti, M., . . . Ghigo, E. (2001). Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *86*(10), 5083-5086. doi:10.1210/jc.86.10.5083
- Broglio, F., Gottero, C., Prodam, F., Gauna, C., Muccioli, G., Papotti, M., . . . Ghigo, E. (2004). Non-Acylated Ghrelin Counteracts the Metabolic But Not the Neuroendocrine Response to Acylated Ghrelin in Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *89*(6), 3062-3065. doi:10.1210/jc.2003-031964
- Bruce-Keller, A. J., Umberger, G., McFall, R., & Mattson, M. P. (1999). Food restriction reduces brain damage and improves behavioral outcome following excitotoxic and metabolic insults. *Annals of Neurology*, *45*(1), 8-15. doi:10.1002/1531-8249(199901)45:1<8::aid-art4>3.0.co;2-v
- Buntwal, L., Sassi, M., Morgan, A. H., Andrews, Z. B., & Davies, J. S. (2019). Ghrelin-Mediated Hippocampal Neurogenesis: Implications for Health and Disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *30*(11), 844-859. doi:10.1016/j.tem.2019.07.001
- Carlini, V. P., Monzon, M. E., Varas, M. M., Cragolini, A. B., Schioth, H. B., Scimonelli, T. N., & de Barioglio, S. R. (2002). Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *299*(5), 739-743. doi:10.1016/s0006-291x(02)02740-7
- Carlini, V. P., Varas, M. M., Cragolini, A. B., Schioth, H. B., Scimonelli, T. N., & de Barioglio, S. R. (2004). Differential role of the hippocampus, amygdala, and dorsal raphe nucleus in regulating feeding, memory, and anxiety-like behavioral responses to ghrelin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *313*(3), 635-641. doi:10.1016/j.bbrc.2003.11.150
- Castillo, K., Valenzuela, V., Matus, S., Nassif, M., Onate, M., Fuentealba, Y., . . . Hetz, C. (2013). Measurement of autophagy flux in the nervous system in vivo. *Cell Death & Disease*, *4*, 11. doi:10.1038/cddis.2013.421
- Castillo, K., Valenzuela, V., Onate, M., & Hetz, C. (2017). A Molecular Reporter for Monitoring Autophagic Flux in Nervous System In Vivo. In L. Galluzzi, J. Pedro, & G. Kroemer

- (Eds.), *Molecular Characterization of Autophagic Responses, Pt B* (Vol. 588, pp. 109-131). San Diego: Elsevier Academic Press Inc.
- Cecarini, V., Bonfili, L., Cuccioloni, M., Keller, J. N., Bruce-Keller, A. J., & Eleuteri, A. M. (2016). Effects of Ghrelin on the Proteolytic Pathways of Alzheimer's Disease Neuronal Cells [Article]. *Molecular Neurobiology*, 53(5), 3168-3178. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9227-x>
- Chaix, A., Manoogian, E. N. C., Melkani, G. C., & Panda, S. (2019). Time-Restricted Eating to Prevent and Manage Chronic Metabolic Diseases. In P. J. Stover & R. Balling (Eds.), *Annual Review of Nutrition, Vol 39, 2019* (Vol. 39, pp. 291-315). Palo Alto: Annual Reviews.
- Chan, E. Y. W., Longatti, A., McKnight, N. C., & Tooze, S. A. (2009). Kinase-Inactivated ULK Proteins Inhibit Autophagy via Their Conserved C-Terminal Domains Using an Atg13-Independent Mechanism. *Molecular and Cellular Biology*, 29(1), 157-171. doi:10.1128/mcb.01082-08
- Chang, A. Y., Skirbekk, V. F., Tyrovolas, S., Kassebaum, N. J., & Dieleman, J. L. (2019). Measuring population ageing: an analysis of the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Public Health*, 4(3), E159-E167. doi:10.1016/s2468-2667(19)30019-2
- Chen, H. Y., Trumbauer, M. E., Chen, A. S., Weingarth, D. T., Adams, J. R., Frazier, E. G., . . . Qian, S. (2004). Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology*, 145(6), 2607-2612. doi:10.1210/en.2003-1596
- Chen, L., Xing, T., Wang, M., Miao, Y., Tang, M., Chen, J., . . . Ruan, D. Y. (2011). Local infusion of ghrelin enhanced hippocampal synaptic plasticity and spatial memory through activation of phosphoinositide 3-kinase in the dentate gyrus of adult rats. *Eur J Neurosci*, 33(2), 266-275. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07491.x
- Cheong, H., Lindsten, T., Wu, J. M., Lu, C., & Thompson, C. B. (2011). Ammonia-induced autophagy is independent of ULK1/ULK2 kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(27), 11121-11126. doi:10.1073/pnas.1107969108
- Chu, C. T., Ji, J., Dagda, R. K., Jiang, J. F., Tyurina, Y. Y., Kapralov, A. A., . . . Kagan, V. E. (2013). Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nature Cell Biology*, 15(10), 1197-1205. doi:10.1038/ncb2837
- Chuang, J. C., Sakata, I., Kohno, D., Perello, M., Osborne-Lawrence, S., Repa, J. J., & Zigman, J. M. (2011). Ghrelin Directly Stimulates Glucagon Secretion from Pancreatic alpha-Cells. *Molecular Endocrinology*, 25(9), 1600-1611. doi:10.1210/me.2011-1001
- Chung, H., Choi, J., & Park, S. (2018). Ghrelin protects adult rat hippocampal neural stem cells from excessive autophagy during oxygen-glucose deprivation. *Endocrine Journal*, 65(1), 63-73. doi:10.1507/endocrj.EJ17-0281
- Chung, H., Li, E., Kim, Y., Kim, S., & Park, S. (2013). Multiple signaling pathways mediate ghrelin-induced proliferation of hippocampal neural stem cells. *Journal of Endocrinology*, 218(1), 49-59. doi:10.1530/joe-13-0045
- Cleeter, M. W. J., Cooper, J. M., & Schapira, A. H. V. (1992). IRREVERSIBLE INHIBITION OF MITOCHONDRIAL COMPLEX-I BY 1-METHYL-4-PHENYLPYRIDINIUM - EVIDENCE FOR FREE-RADICAL INVOLVEMENT. *Journal of Neurochemistry*, 58(2), 786-789. doi:10.1111/j.1471-4159.1992.tb09789.x
- Clelland, C. D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson, G. D., Fragniere, A., Tyers, P., . . . Bussey, T. J. (2009). A Functional Role for Adult Hippocampal Neurogenesis in Spatial Pattern Separation. *Science*, 325(5937), 210-213. doi:10.1126/science.1173215

- Colman, R. J., Anderson, R. M., Johnson, S. C., Kastman, E. K., Kosmatka, K. J., Beasley, T. M., . . . Weindruch, R. (2009). Caloric Restriction Delays Disease Onset and Mortality in Rhesus Monkeys. *Science*, *325*(5937), 201-204. doi:10.1126/science.1173635
- Cone, R. D. (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature Neuroscience*, *8*(5), 571-578. doi:10.1038/nn1455
- Cowley, M. A., Smith, R. G., Diano, S., Tschop, M., Pronchuk, N., Grove, K. L., . . . Horvath, T. L. (2003). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*, *37*(4), 649-661. doi:10.1016/s0896-6273(03)00063-1
- Cummings, D. E., Purnell, J. Q., Frayo, R. S., Schmidova, K., Wisse, B. E., & Weigle, D. S. (2001). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*, *50*(8), 1714-1719. doi:10.2337/diabetes.50.8.1714
- Cunnane, S. C., Trushina, E., Morland, C., Prigione, A., Casadesus, G., Andrews, Z. B., . . . Millan, M. J. (2020). Brain energy rescue: an emerging therapeutic concept for neurodegenerative disorders of ageing. *Nature Reviews Drug Discovery*, *19*(9), 609-633. doi:10.1038/s41573-020-0072-x
- Damian, M., Pons, V., Renault, P., M'Kadmi, C., Delort, B., Hartmann, L., . . . Baneres, J. L. (2018). GHSR-D2R heteromerization modulates dopamine signaling through an effect on G protein conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(17), 4501-4506. doi:10.1073/pnas.1712725115
- Darios, F., & Stevanin, G. (2020). Impairment of Lysosome Function and Autophagy in Rare Neurodegenerative Diseases. *Journal of Molecular Biology*, *432*(8), 2714-2734. doi:10.1016/j.jmb.2020.02.033
- Dasgupta, A., Kim, J., Manakkadan, A., Arumugam, T. V., & Sajikumar, S. (2018). Intermittent fasting promotes prolonged associative interactions during synaptic tagging/capture by altering the metaplastic properties of the CA1 hippocampal neurons. *Neurobiology of Learning and Memory*, *154*, 70-77. doi:10.1016/j.nlm.2017.12.004
- Date, Y., Kojima, M., Hosoda, H., Sawaguchi, A., Mondal, M. S., Suganuma, T., . . . Nakazato, M. (2000). Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*, *141*(11), 4255-4261. doi:10.1210/en.141.11.4255
- Dauer, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: Mechanisms and models. *Neuron*, *39*(6), 889-909. doi:10.1016/s0896-6273(03)00568-3
- Davis, B. J. (1964). Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann N Y Acad Sci*, *121*, 404-427. doi:10.1111/j.1749-6632.1964.tb14213.x
- Davis, J. B., & Maher, P. (1994). PROTEIN-KINASE-C ACTIVATION INHIBITS GLUTAMATE-INDUCED CYTOTOXICITY IN A NEURONAL CELL-LINE. *Brain Research*, *652*(1), 169-173. doi:10.1016/0006-8993(94)90334-4
- Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G. H., . . . White, E. (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*, *10*(1), 51-64. doi:10.1016/j.ccr.2006.06.001
- Delhanty, P. J. D., Sun, Y., Visser, J. A., Van Kerkwijk, A., Huisman, M., Van Ijcken, W. F. J., . . . Van Der Lely, A.-J. (2010). Unacylated Ghrelin Rapidly Modulates Lipogenic and Insulin Signaling Pathway Gene Expression in Metabolically Active Tissues of GHSR Deleted Mice. *PLOS ONE*, *5*(7), e11749. doi:10.1371/journal.pone.0011749
- Deter, R. L., Baudhuin, P., & De Duve, C. (1967). PARTICIPATION OF LYSOSOMES IN CELLULAR AUTOPHAGY INDUCED IN RAT LIVER BY GLUCAGON. *Journal of Cell Biology*, *35*(2), C11-C16. doi:10.1083/jcb.35.2.c11
- Dezaki, K., Hosoda, H., Kakei, M., Hashiguchi, S., Watanabe, M., Kangawa, K., & Yada, T. (2004). Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by

- attenuating Ca<sup>2+</sup> signaling in beta-cells - Implication in the glycemic control in rodents. *Diabetes*, 53(12), 3142-3151. doi:10.2337/diabetes.53.12.3142
- Dezaki, K., Kakei, M., & Yada, T. (2007). Ghrelin uses G<sub>α(i2)</sub> and activates voltage-dependent K<sup>+</sup> channels to attenuate glucose-induced Ca<sup>2+</sup> signaling and insulin release in islet beta-cells - Novel signal transduction of ghrelin. *Diabetes*, 56(9), 2319-2327. doi:10.2337/db07-0345
- Dezaki, K., Sone, H., Koizumi, M., Nakata, M., Kakei, M., Nagai, H., . . . Yada, T. (2006). Blockade of pancreatic islet-derived ghrelin enhances insulin secretion to prevent high-fat diet-induced glucose intolerance. *Diabetes*, 55(12), 3486-3493. doi:10.2337/db06-0878
- Di Francesco, A., Di Germanio, C., Bernier, M., & de Cabo, R. (2018). A time to fast. *Science*, 362(6416), 770-775. doi:10.1126/science.aau2095
- Diano, S., Farr, S. A., Benoit, S. C., McNay, E. C., da Silva, I., Horvath, B., . . . Horvath, T. L. (2006). Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nature Neuroscience*, 9(3), 381-388. doi:10.1038/nn1656
- Dias, G. P., Murphy, T., Stangl, D., Ahmet, S., Morisse, B., Nix, A., . . . Thuret, S. (2021). Intermittent fasting enhances long-term memory consolidation, adult hippocampal neurogenesis, and expression of longevity gene Klotho. *Molecular Psychiatry*, 15. doi:10.1038/s41380-021-01102-4
- Dibble, C. C., Elis, W., Menon, S., Qin, W., Klekota, J., Asara, J. M., . . . Manning, B. D. (2012). TBC1D7 Is a Third Subunit of the TSC1-TSC2 Complex Upstream of mTORC1. *Molecular Cell*, 47(4), 535-546. doi:10.1016/j.molcel.2012.06.009
- DiGruccio, M. R., Mawla, A. M., Donaldson, C. J., Noguchi, G. M., Vaughan, J., Cowing-Zitron, C., . . . Huising, M. O. (2016). Comprehensive alpha, beta and delta cell transcriptomes reveal that ghrelin selectively activates delta cells and promotes somatostatin release from pancreatic islets. *Molecular Metabolism*, 5(7), 449-458. doi:10.1016/j.molmet.2016.04.007
- Djadjadikerta, A., Keshri, S., Pavel, M., Prestil, R., Ryan, L., & Rubinsztein, D. C. (2020). Autophagy Induction as a Therapeutic Strategy for Neurodegenerative Diseases. *Journal of Molecular Biology*, 432(8), 2799-2821. doi:10.1016/j.jmb.2019.12.035
- Dorling, J. L., van Vliet, S., Huffman, K. M., Kraus, W. E., Bhapkar, M., Pieper, C. F., . . . Grp, C. S. (2021). Effects of caloric restriction on human physiological, psychological, and behavioral outcomes: highlights from CALERIE phase 2. *Nutrition Reviews*, 79(1), 98-113. doi:10.1093/nutrit/nuaa085
- du Toit, A., Hofmeyr, J. H. S., Gniadek, T. J., & Loos, B. (2018). Measuring autophagosome flux. *Autophagy*, 14(6), 1060-1071. doi:10.1080/15548627.2018.1469590
- Duan, W. Z., & Mattson, M. P. (1999). Dietary restriction and 2-deoxyglucose administration improve behavioral outcome and reduce degeneration of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Research*, 57(2), 195-206. doi:10.1002/(sici)1097-4547(19990715)57:2<195::aid-jnr5>3.0.co;2-p
- Dudley, L. J., Makar, A. N., & Gammoh, N. (2020). Membrane targeting of core autophagy players during autophagosome biogenesis. *The FEBS Journal*, 287(22), 4806-4821. doi:10.1111/febs.15334
- Dugger, B. N., & Dickson, D. W. (2017). Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(7), 22. doi:10.1101/cshperspect.a028035
- Egan, D. F., Shackelford, D. B., Mihaylova, M. M., Gelino, S., Kohnz, R. A., Mair, W., . . . Shaw, R. J. (2011). Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-Activated Protein Kinase Connects Energy Sensing to Mitophagy. *Science*, 331(6016), 456-461. doi:10.1126/science.1196371
- Ehrnhoefer, D. E., Martin, D. D. O., Schmidt, M. E., Qiu, X. F., Ladha, S., Caron, N. S., . . . Hayden, M. R. (2018). Preventing mutant huntingtin proteolysis and intermittent

- fasting promote autophagy in models of Huntington disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 6, 16. doi:10.1186/s40478-018-0518-0
- Ekdahl, C. T., Claassen, J. H., Bonde, S., Kokaia, Z., & Lindvall, O. (2003). Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23), 13632-13637. doi:10.1073/pnas.2234031100
- Eng, C. H., Yu, K., Lucas, J., White, E., & Abraham, R. T. (2010). Ammonia Derived from Glutaminolysis Is a Diffusible Regulator of Autophagy. *Science Signaling*, 3(119), 9. doi:10.1126/scisignal.2000911
- Esler, W. P., Rudolph, J., Claus, T. H., Tang, W. F., Barucci, N., Brown, S. E., . . . Sweet, L. J. (2007). Small-molecule ghrelin receptor antagonists improve glucose tolerance, suppress appetite, and promote weight loss. *Endocrinology*, 148(11), 5175-5185. doi:10.1210/en.2007-0239
- Ezaki, J., Matsumoto, N., Takeda-Ezaki, M., Komatsu, M., Takahashi, K., Hiraoka, Y., . . . Ueno, T. (2011). Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels. *Autophagy*, 7(7), 727-736. doi:10.4161/auto.7.7.15371
- Fang, F., Shi, X. M., Brown, M. S., Goldstein, J. L., & Liang, G. S. (2019). Growth hormone acts on liver to stimulate autophagy, support glucose production, and preserve blood glucose in chronically starved mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(15), 7449-7454. doi:10.1073/pnas.1901867116
- Ferreira-Marques, M., Aveleira, C. A., Carmo-Silva, S., Botelho, M., de Almeida, L. P., & Cavadas, C. (2016). Caloric restriction stimulates autophagy in rat cortical neurons through neuropeptide Y and ghrelin receptors activation. *Aging-Us*, 8(7), 1470-1484. doi:10.18632/aging.100996
- Fletcher, E., Gavett, B., Harvey, D., Farias, S. T., Olichney, J., Beckett, L., . . . Mungas, D. (2018). Brain Volume Change and Cognitive Trajectories in Aging. *Neuropsychology*, 32(4), 436-449. doi:10.1037/neu0000447
- Fontan-Lozano, A., Saez-Cassanelli, J. L., Inda, M. C., Santos-Arteaga, M. D. L., Sierra-Dominguez, S. A., Lopez-Lluch, G., . . . Carrion, A. M. (2007). Caloric restriction increases learning consolidation and facilitates synaptic plasticity through mechanisms dependent on NR2B Subunits of the NMDA receptor. *Journal of Neuroscience*, 27(38), 10185-10195. doi:10.1523/jneurosci.2757-07.2007
- Fontana, L., & Partridge, L. (2015). Promoting Health and Longevity through Diet: From Model Organisms to Humans. *Cell*, 161(1), 106-118. doi:10.1016/j.cell.2015.02.020
- Fullgrabe, J., Ghislat, G., Cho, D.-H., & Rubinsztein, D. C. (2016). Transcriptional regulation of mammalian autophagy at a glance. *Journal of Cell Science*, 129(16), 3059-3066. doi:10.1242/jcs.188920
- Gale, S. A., Acar, D., & Daffner, K. R. (2018). Dementia. *American Journal of Medicine*, 131(10), 1161-1169. doi:10.1016/j.amjmed.2018.01.022
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., . . . Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, 25(3), 486-541. doi:10.1038/s41418-017-0012-4
- Gao, S., Casals, N., Keung, W., Moran, T. H., & Lopaschuk, G. D. (2013). Differential effects of central ghrelin on fatty acid metabolism in hypothalamic ventral medial and arcuate nuclei [Article]. *Physiology & Behavior*, 118, 165-170. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.03.030>
- Garfin, D. E. (2009). One-dimensional gel electrophoresis. In R. R. Burgess & M. P. Deutscher (Eds.), *Guide to Protein Purification, Second Edition* (Vol. 463, pp. 497-513). San Diego: Elsevier Academic Press Inc.



- Gauna, C., Delhanty, P. J. D., Hofland, L. J., Janssen, J. A. M. J. L., Broglio, F., Ross, R. J. M., . . . Van Der Lely, A. J. (2005). Ghrelin Stimulates, Whereas Des-Octanoyl Ghrelin Inhibits, Glucose Output by Primary Hepatocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *90*(2), 1055-1060. doi:10.1210/jc.2004-1069
- Gauna, C., Meyler, F. M., Janssen, J. A. M. J. L., Delhanty, P. J. D., Abribat, T., Van Koetsveld, P., . . . Van Der Lely, A. J. (2004). Administration of Acylated Ghrelin Reduces Insulin Sensitivity, Whereas the Combination of Acylated Plus Unacylated Ghrelin Strongly Improves Insulin Sensitivity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *89*(10), 5035-5042. doi:10.1210/jc.2004-0363
- Ge, S. Y., Yang, C. H., Hsu, K. S., Ming, G. L., & Song, H. J. (2007). A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron*, *54*(4), 559-566. doi:10.1016/j.neuron.2007.05.002
- Ge, X. C., Yang, H., Bednarek, M. A., Galon-Tilleman, H., Chen, P. R., Chen, M., . . . Kaplan, D. D. (2018). LEAP2 Is an Endogenous Antagonist of the Ghrelin Receptor. *Cell Metabolism*, *27*(2), 461-+. doi:10.1016/j.cmet.2017.10.016
- Gherzi, M. S., Gabach, L. A., Buteler, F., Vilcaes, A. A., Schioth, H. B., Perez, M. F., & de Barioglio, S. R. (2015). Ghrelin increases memory consolidation through hippocampal mechanisms dependent on glutamate release and NR2B-subunits of the NMDA receptor. *Psychopharmacology*, *232*(10), 1843-1857. doi:10.1007/s00213-014-3817-6
- Glatigny, M., Moriceau, S., Rivagorda, M., Ramos-Brossier, M., Nascimbeni, A. C., Lante, F., . . . Oury, F. (2019). Autophagy Is Required for Memory Formation and Reverses Age-Related Memory Decline. *Current Biology*, *29*(3), 435-+. doi:10.1016/j.cub.2018.12.021
- Godar, R. J., Ma, X., Liu, H., Murphy, J. T., Weinheimer, C. J., Kovacs, A., . . . Diwan, A. (2015). Repetitive stimulation of autophagy-lysosome machinery by intermittent fasting preconditions the myocardium to ischemia-reperfusion injury. *Autophagy*, *11*(9), 1537-1560. doi:10.1080/15548627.2015.1063768
- Gowans, G. J., Hawley, S. A., Ross, F. A., & Hardie, D. G. (2013). AMP Is a True Physiological Regulator of AMP-Activated Protein Kinase by Both Allosteric Activation and Enhancing Net Phosphorylation. *Cell Metabolism*, *18*(4), 556-566. doi:10.1016/j.cmet.2013.08.019
- Graham, S. H., & Liu, H. (2017). Life and death in the trash heap: The ubiquitin proteasome pathway and UCHL1 in brain aging, neurodegenerative disease and cerebral Ischemia. *Ageing Research Reviews*, *34*, 30-38. doi:10.1016/j.arr.2016.09.011
- Grohms, J., Kim, S. W., Mamrak, U., Tobaben, S., Cassidy-Stone, A., Nunnari, J., . . . Culmsee, C. (2012). Inhibition of Drp1 provides neuroprotection in vitro and in vivo. *Cell Death and Differentiation*, *19*(9), 1446-1458. doi:10.1038/cdd.2012.18
- Gutierrez, J. A., Solenberg, P. J., Perkins, D. R., Willency, J. A., Knierman, M. D., Jin, Z., . . . Hale, J. E. (2008). Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(17), 6320-6325. doi:10.1073/pnas.0800708105
- Halagappa, V. K. M., Guo, Z. H., Pearson, M., Matsuoka, Y., Cutler, R. G., LaFerla, F. M., & Mattson, M. P. (2007). Intermittent fasting and caloric restriction ameliorate age-related behavioral deficits in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, *26*(1), 212-220. doi:10.1016/j.nbd.2006.12.019
- Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., . . . Yoshimori, T. (2013). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*, *495*(7441), 389-393. doi:10.1038/nature11910
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., . . . Mizushima, N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes

- neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441(7095), 885-889. doi:10.1038/nature04724
- Hara, T., Takamura, A., Kishi, C., Iemura, S. I., Natsume, T., Guan, J. L., & Mizushima, N. (2008). FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, 181(3), 497-510. doi:10.1083/jcb.200712064
- Harder, L. M., Bunkenborg, J., & Andersen, J. S. (2014). Inducing autophagy. *Autophagy*, 10(2), 339-355. doi:10.4161/auto.26863
- Hardie, D. G. (2011). AMP-activated protein kinase-an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes & Development*, 25(18), 1895-1908. doi:10.1101/gad.17420111
- Hardie, D. G., Ross, F. A., & Hawley, S. A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(4), 251-262. doi:10.1038/nrm3311
- Hardy, J., & De Strooper, B. (2017). Alzheimer's disease: where next for anti-amyloid therapies? *Brain*, 140, 853-855. doi:10.1093/brain/awx059
- Hatori, M., Vollmers, C., Zarrinpar, A., DiTacchio, L., Bushong, E. A., Gill, S., . . . Panda, S. (2012). Time-Restricted Feeding without Reducing Caloric Intake Prevents Metabolic Diseases in Mice Fed a High-Fat Diet. *Cell Metabolism*, 15(6), 848-860. doi:10.1016/j.cmet.2012.04.019
- Havaki, S., Vlachou, V., Zampetidis, C. P., Selemenakis, P., Kotsinas, A., Mavrogonatou, E., . . . Gorgoulis, V. G. (2017). Monitoring Autophagy Immunohistochemically and Ultrastructurally during Human Head and Neck Carcinogenesis. Relationship with the DNA Damage Response Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 17. doi:10.3390/ijms18091920
- Hawley, S. A., Boudeau, J., Reid, J. L., Mustard, K. J., Udd, L., Makela, T. P., . . . Hardie, D. G. (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol*, 2(4), 28. doi:10.1186/1475-4924-2-28
- Hawley, S. A., Davison, M., Woods, A., Davies, S. P., Beri, R. K., Carling, D., & Hardie, D. G. (1996). Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 271(44), 27879-27887. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:A1996VQ67900105
- Hawley, S. A., Pan, D. A., Mustard, K. J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A. M., . . . Hardie, D. G. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metabolism*, 2(1), 9-19. doi:10.1016/j.cmet.2005.05.009
- Hedegaard, M. A., & Holst, B. (2020). The Complex Signaling Pathways of the Ghrelin Receptor. *Endocrinology*, 161(4), 12. doi:10.1210/endocr/bqaa020
- Heilbronn, L. K., de Jonge, L., Frisard, M. I., DeLany, J. P., Larson-Meyer, D. E., Rood, J., . . . Pennington, C. T. (2006). Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals - A randomized controlled trial. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 295(13), 1539-1548. doi:10.1001/jama.295.13.1539
- Hernandez, D., Torres, C. A., Setlik, W., Cebrian, C., Mosharov, E. V., Tang, G. M., . . . Sulzer, D. (2012). Regulation of Presynaptic Neurotransmission by Macroautophagy. *Neuron*, 74(2), 277-284. doi:10.1016/j.neuron.2012.02.020
- Hoffmann, S., Orlando, M., Andrzejak, E., Bruns, C., Trimbuch, T., Rosenmund, C., . . . Ackermann, F. (2019). Light-Activated ROS Production Induces Synaptic Autophagy.

- The Journal of Neuroscience*, 39(12), 2163-2183. doi:10.1523/jneurosci.1317-18.2019
- Holst, B., Cygankiewicz, A., Jensen, T. H., Ankersen, M., & Schwartz, T. W. (2003). High constitutive signaling of the ghrelin receptor - Identification of a potent inverse agonist. *Molecular Endocrinology*, 17(11), 2201-2210. doi:10.1210/me.2003-0069
- Hopkins, A. L., Nelson, T. A. S., Guschina, I. A., Parsons, L. C., Lewis, C. L., Brown, R. C., . . . Wells, T. (2017). Unacylated ghrelin promotes adipogenesis in rodent bone marrow via ghrelin O-acyl transferase and GHS-R1a activity: evidence for target cell-induced acylation. *Scientific Reports*, 7(1), 45541. doi:10.1038/srep45541
- Hornsby, A. K. E., Buntwal, L., Carisi, M. C., Santos, V. V., Johnston, F., Roberts, L. D., . . . Davies, J. S. (2020). Unacylated-Ghrelin Impairs Hippocampal Neurogenesis and Memory in Mice and Is Altered in Parkinson's Dementia in Humans. *Cell Reports Medicine*, 1(7), 23. doi:10.1016/j.xcrm.2020.100120
- Hornsby, A. K. E., Redhead, Y. T., Rees, D. J., Ratcliff, M. S. G., Reichenbach, A., Wells, T., . . . Davies, J. S. (2016). Short-term calorie restriction enhances adult hippocampal neurogenesis and remote fear memory in a Ghrelin-dependent manner. *Psychoneuroendocrinology*, 63, 198-207. doi:10.1016/j.psyneuen.2015.09.023
- Hosoda, H., Kojima, M., Matsuo, H., & Kangawa, K. (2000). Ghrelin and des-acyl ghrelin: Two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279(3), 909-913. doi:10.1006/bbrc.2000.4039
- Hosokawa, N., Sasaki, T., Iemura, S., Natsume, T., Hara, T., & Mizushima, N. (2009). Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy*, 5(7), 973-979. doi:10.4161/auto.5.7.9296
- Howard, A. D., Feighner, S. D., Cully, D. F., Arena, J. P., Liberators, P. A., Rosenblum, C. I., . . . Vanderploeg, L. H. T. (1996). A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*, 273(5277), 974-977. doi:10.1126/science.273.5277.974
- Howell, J. J., & Manning, B. D. (2011). mTOR couples cellular nutrient sensing to organismal metabolic homeostasis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 22(3), 94-102. doi:10.1016/j.tem.2010.12.003
- Hyllin, M. J., Zhao, J., Tangavelou, K., Rozas, N. S., Hood, K. N., MacGowan, J. S., . . . Dash, P. K. (2018). A role for autophagy in long-term spatial memory formation in male rodents. *Journal of Neuroscience Research*, 96(3), 416-426. doi:10.1002/jnr.24121
- Inhoff, T., Monnikes, H., Noetzel, S., Stengel, A., Goebel, M., Dinh, Q. T., . . . Kobelt, P. (2008). Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats. *Peptides*, 29(12), 2159-2168. doi:10.1016/j.peptides.2008.09.014
- Inoki, K., Li, Y., Xu, T., & Guan, K. L. (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes & Development*, 17(15), 1829-1834. doi:10.1101/gad.1110003
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T. Q., Wu, J., & Guan, K. L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biology*, 4(9), 648-657. doi:10.1038/ncb839
- Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K., & Mizushima, N. (2008). Beclin 1 Forms Two Distinct Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes with Mammalian Atg14 and UVRAG. *Molecular Biology of the Cell*, 19(12), 5360-5372. doi:10.1091/mbc.E08-01-0080
- Itakura, E., & Mizushima, N. (2010). Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy*, 6(6), 764-776. doi:10.4161/auto.6.6.12709
- Jacquín, E., Leclerc-Mercier, S., Judon, C., Blanchard, E., Fraitag, S., & Florey, O. (2017). Pharmacological modulators of autophagy activate a parallel noncanonical pathway

- driving unconventional LC3 lipidation. *Autophagy*, 13(5), 854-867. doi:10.1080/15548627.2017.1287653
- Jernigan, T. L., Archibald, S. L., Fennema-Notestine, C., Gamst, A. C., Stout, J. C., Bonner, J., & Hesselink, J. R. (2001). Effects of age on tissues and regions of the cerebrum and cerebellum. *Neurobiology of Aging*, 22(4), 581-594. doi:10.1016/s0197-4580(01)00217-2
- Ji, Z. S., Mullendorff, K., Cheng, I. H., Miranda, R. D., Huang, Y. D., & Mahley, R. W. (2006). Reactivity of apolipoprotein E4 and amyloid beta peptide - Lysosomal stability and neurodegeneration. *Journal of Biological Chemistry*, 281(5), 2683-2692. doi:10.1074/jbc.M506646200
- Johansen, T., & Lamark, T. (2020). Selective Autophagy: ATG8 Family Proteins, LIR Motifs and Cargo Receptors. *J Mol Biol*, 432(1), 80-103. doi:10.1016/j.jmb.2019.07.016
- Johansson, I., Destefanis, S., Aberg, N. D., Aberg, M. A. I., Blomgren, K., Zhu, C., . . . Isgaard, J. (2008). Proliferative and protective effects of growth hormone secretagogues on adult rat hippocampal progenitor cells. *Endocrinology*, 149(5), 2191-2199. doi:10.1210/en.2007-0733
- Jung, C. H., Jun, C. B., Ro, S. H., Kim, Y. M., Otto, N. M., Cao, J., . . . Kim, D. H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery. *Molecular Biology of the Cell*, 20(7), 1992-2003. doi:10.1091/mbc.E08-12-1249
- Juste, Y. R., Kaushik, S., Bourdenx, M., Aflakpui, R., Bandyopadhyay, S., Garcia, F., . . . Cuervo, A. M. (2021). Reciprocal regulation of chaperone-mediated autophagy and the circadian clock. *Nature Cell Biology*, 23(12), 1255+. doi:10.1038/s41556-021-00800-z
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Uero, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., . . . Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *Embo Journal*, 19(21), 5720-5728. doi:10.1093/emboj/19.21.5720
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *Journal of Cell Science*, 117(13), 2805-2812. doi:10.1242/jcs.01131
- Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D., & Hardie, D. G. (2005). AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metabolism*, 1(1), 15-25. doi:10.1016/j.cmet.2004.12.003
- Kang, S., Moon, N. R., Kim, D. S., Kim, S. H., & Park, S. (2015). Central acylated ghrelin improves memory function and hippocampal AMPK activation and partly reverses the impairment of energy and glucose metabolism in rats infused with beta-amyloid. *Peptides*, 71, 84-93. doi:10.1016/j.peptides.2015.07.005
- Kanoski, S. E., Fortin, S. M., Ricks, K. M., & Grill, H. J. (2013). Ghrelin Signaling in the Ventral Hippocampus Stimulates Learned and Motivational Aspects of Feeding via PI3K-Akt Signaling. *Biological Psychiatry*, 73(9), 915-923. doi:10.1016/j.biopsych.2012.07.002
- Kent, B. A., Beynon, A. L., Hornsby, A. K. E., Bekinschtein, P., Bussey, T. J., Davies, J. S., & Saksida, L. M. (2015). The orexigenic hormone acyl-ghrelin increases adult hippocampal neurogenesis and enhances pattern separation. *Psychoneuroendocrinology*, 51, 431-439. doi:10.1016/j.psyneuen.2014.10.015
- Kern, A., Albarran-Zeckler, R., Walsh, H. E., & Smith, R. G. (2012). Apo-Ghrelin Receptor Forms Heteromers with DRD2 in Hypothalamic Neurons and Is Essential for Anorexigenic Effects of DRD2 Agonism. *Neuron*, 73(2), 317-332. doi:10.1016/j.neuron.2011.10.038

- Kern, A., Mavrikaki, M., Ullrich, C., Albarran-Zeckler, R., Brantley, A. F., & Smith, R. G. (2015). Hippocampal Dopamine/DRD1 Signaling Dependent on the Ghrelin Receptor. *Cell*, *163*(5), 1176-1190. doi:10.1016/j.cell.2015.10.062
- Kheirbek, M. A., Drew, L. J., Burghardt, N. S., Costantini, D. O., Tannenholz, L., Ahmari, S. E., . . . Hen, R. (2013). Differential Control of Learning and Anxiety along the Dorsoventral Axis of the Dentate Gyrus. *Neuron*, *77*(5), 955-968. doi:10.1016/j.neuron.2012.12.038
- Kim, J., Kim, Y. C., Fang, C., Russell, R. C., Kim, J. H., Fan, W., . . . Guan, K. L. (2013). Differential Regulation of Distinct Vps34 Complexes by AMPK in Nutrient Stress and Autophagy. *Cell*, *152*(1-2), 290-303. doi:10.1016/j.cell.2012.12.016
- Kimura, S., Noda, T., & Yoshimori, T. (2007). Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy*, *3*(5), 452-460. https://doi.org/10.4161/auto.4451
- Kirchner, H., Gutierrez, J. A., Solenberg, P. J., Pfluger, P. T., Czyzyk, T. A., Willency, J. A., . . . Tschop, M. H. (2009). GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance. *Nature Medicine*, *15*(7), 741-745. doi:10.1038/nm.1997
- Kishi-Itakura, C., Koyama-Honda, I., Itakura, E., & Mizushima, N. (2014). Ultrastructural analysis of autophagosome organization using mammalian autophagy-deficient cells. *Journal of Cell Science*, *127*(18), 4089-4102. doi:10.1242/jcs.156034
- Klionsky, D. J., Abdel-Aziz, A. K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., . . . Tong, C. K. (2021). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). *Autophagy*, *17*(1), 1-382. doi:10.1080/15548627.2020.1797280
- Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., . . . Ohsumi, Y. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental Cell*, *5*(4), 539-545. doi:10.1016/s1534-5807(03)00296-x
- Klionsky, D. J., Elazar, Z., Seglen, P. O., & Rubinsztein, D. C. (2008). Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes? *Autophagy*, *4*(7), 849-850. doi:10.4161/auto.6845
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., & Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, *402*(6762), 656-660. doi:10.1038/45230
- Kojima, M., & Kangawa, K. (2005). Ghrelin: Structure and function. *Physiological Reviews*, *85*(2), 495-522. doi:10.1152/physrev.00012.2004
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., . . . Tanaka, K. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, *441*(7095), 880-884. doi:10.1038/nature04723
- Kononenko, N. L., Classen, G. A., Kuijpers, M., Puchkov, D., Maritzen, T., Tempes, A., . . . Haucke, V. (2017). Retrograde transport of TrkB-containing autophagosomes via the adaptor AP-2 mediates neuronal complexity and prevents neurodegeneration. *Nature Communications*, *8*, 16. doi:10.1038/ncomms14819
- Korolchuk, V. I., Mansilla, A., Menzies, F. M., & Rubinsztein, D. C. (2009). Autophagy Inhibition Compromises Degradation of Ubiquitin-Proteasome Pathway Substrates. *Molecular Cell*, *33*(4), 517-527. doi:10.1016/j.molcel.2009.01.021
- Kovacs, G. G. (2019). Molecular pathology of neurodegenerative diseases: principles and practice. *Journal of Clinical Pathology*, *72*(11), 725-735. doi:10.1136/jclinpath-2019-205952
- Kovsan, J., Bluher, M., Tarnovscki, T., Kloting, N., Kirshtein, B., Madar, L., . . . Rudich, A. (2011). Altered Autophagy in Human Adipose Tissues in Obesity. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *96*(2), E268-E277. doi:10.1210/jc.2010-1681

- Kozareva, D. A., Cryan, J. F., & Nolan, Y. M. (2019). Born this way: Hippocampal neurogenesis across the lifespan. *Aging Cell*, *18*(5), 18. doi:10.1111/accel.13007
- Kroemer, G., Marino, G., & Levine, B. (2010). Autophagy and the Integrated Stress Response. *Molecular Cell*, *40*(2), 280-293. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.023
- Ku, J. M., Andrews, Z. B., Barsby, T., Reichenbach, A., Lemus, M. B., Drummond, G. R., . . . Miller, A. A. (2015). Ghrelin-Related Peptides Exert Protective Effects in the Cerebral Circulation of Male Mice Through a Nonclassical Ghrelin Receptor(s). *Endocrinology*, *156*(1), 280-290. doi:10.1210/en.2014-1415
- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., . . . Mizushima, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, *432*(7020), 1032-1036. doi:10.1038/nature03029
- Kumar, R., Salehi, A., Rehfeld, J. F., Hoglund, P., Lindstrom, E., & Hakanson, R. (2010). Proghrelin peptides: Desacyl ghrelin is a powerful inhibitor of acylated ghrelin, likely to impair physiological effects of acyl ghrelin but not of obestatin A study of pancreatic polypeptide secretion from mouse islets. *Regulatory Peptides*, *164*(2-3), 65-70. doi:10.1016/j.regpep.2010.06.005
- Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2015). Western Blotting: An Introduction. In (pp. 17-30): Springer New York.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*, *10*(3-4), 203-209. doi:10.1016/0165-022x(84)90040-x
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680-685. doi:10.1038/227680a0
- Laker, R. C., Drake, J. C., Wilson, R. J., Lira, V. A., Lewellen, B. M., Ryall, K. A., . . . Yan, Z. (2017). Ampk phosphorylation of Ulk1 is required for targeting of mitochondria to lysosomes in exercise-induced mitophagy. *Nature Communications*, *8*(1). doi:10.1038/s41467-017-00520-9
- Larson-Meyer, D. E., Heilbronn, L. K., Redman, L. M., Newcomer, B. R., Frisard, M. I., Anton, S., . . . Pennington, C. t. (2006). Effect of calorie restriction with or without exercise on insulin sensitivity, beta-cell function, fat cell size, and ectopic lipid in overweight subjects. *Diabetes Care*, *29*(6), 1337-1344. doi:10.2337/dc05-2565
- Leandro, G. S., Sykora, P., & Bohr, V. A. (2015). The impact of base excision DNA repair in age-related neurodegenerative diseases. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *776*, 31-39. doi:10.1016/j.mrfmmm.2014.12.011
- Lee, J., Seroogy, K. B., & Mattson, M. P. (2002). Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *Journal of Neurochemistry*, *80*(3), 539-547. doi:10.1046/j.0022-3042.2001.00747.x
- Lee, J. H., Rao, M. V., Yang, D. S., Stavrides, P., Im, E., Pensalfini, A., . . . Nixon, R. A. (2019). Transgenic expression of a ratiometric autophagy probe specifically in neurons enables the interrogation of brain autophagy in vivo. *Autophagy*, *15*(3), 543-557. doi:10.1080/15548627.2018.1528812
- Lee, J. H., Yu, W. H., Kumar, A., Lee, S., Mohan, P. S., Peterhoff, C. M., . . . Nixon, R. A. (2010). Lysosomal Proteolysis and Autophagy Require Presenilin 1 and Are Disrupted by Alzheimer-Related PS1 Mutations. *Cell*, *141*(7), 1146-U1191. doi:10.1016/j.cell.2010.05.008
- Leeman, D. S., Hebestreit, K., Ruetz, T., Webb, A. E., McKay, A., Pollina, E. A., . . . Brunet, A. (2018). Lysosome activation clears aggregates and enhances quiescent neural stem cell activation during aging. *Science*, *359*(6381), 1277-1282. doi:10.1126/science.aag3048

- Li, R. L., Sherbet, D. P., Elsbernd, B. L., Goldstein, J. L., Brown, M. S., & Zhao, T. J. (2012). Profound Hypoglycemia in Starved, Ghrelin-deficient Mice Is Caused by Decreased Gluconeogenesis and Reversed by Lactate or Fatty Acids. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(22), 17942-17950. doi:10.1074/jbc.M112.358051
- Li, Z., Ji, X., Wang, W., Liu, J., Liang, X., Wu, H., . . . Zhang, X. (2016). Ammonia Induces Autophagy through Dopamine Receptor D3 and MTOR. *PLOS ONE*, *11*(4), e0153526. doi:10.1371/journal.pone.0153526
- Lichtman, J. W., & Conchello, J. A. (2005). Fluorescence microscopy. *Nat Methods*, *2*(12), 910-919. doi:10.1038/nmeth817
- Lieberman, O. J., & Sulzer, D. (2020). The Synaptic Autophagy Cycle. *Journal of Molecular Biology*, *432*(8), 2589-2604. doi:10.1016/j.jmb.2019.12
- Lin, L., Nuotio-Antar, A. M., Ma, X., Liu, F., Fiorotto, M. L., & Sun, Y. (2014). Ghrelin receptor regulates appetite and satiety during aging in mice by regulating meal frequency and portion size but not total food intake. *J Nutr*, *144*(9), 1349-1355. doi:10.3945/jn.114.191171
- Liu, G. Y., & Sabatini, D. M. (2020). mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *21*(4), 183-203. doi:10.1038/s41580-019-0199-y
- Liu, H. Y., Javaheri, A., Godar, R. J., Murphy, J., Ma, X. C., Rohatgi, N., . . . Diwan, A. (2017). Intermittent fasting preserves beta-cell mass in obesity-induced diabetes via the autophagy-lysosome pathway. *Autophagy*, *13*(11), 1952-1968. doi:10.1080/15548627.2017.1368596
- Livingston, G., Huntley, J., Sommerlad, A., Ames, D., Ballard, C., Banerjee, S., . . . Mukadam, N. (2020). Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *Lancet*, *396*(10248), 413-446. doi:10.1016/s0140-6736(20)30367-6
- Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Yonezawa, K., & Avruch, J. (2005). Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Current Biology*, *15*(8), 702-713. doi:10.1016/j.cub.2005.02.053
- Longo, K. A., Charoenthongtrakul, S., Giuliana, D. J., Govek, E. K., McDonagh, T., Qi, Y., . . . Geddes, B. J. (2008). Improved insulin sensitivity and metabolic flexibility in ghrelin receptor knockout mice. *Regulatory Peptides*, *150*(1-3), 55-61. doi:10.1016/j.regpep.2008.03.011
- Longo, K. A., Govek, E. K., Nolan, A., McDonagh, T., Charoenthongtrakul, S., Giuliana, D. J., . . . Geddes, B. J. (2011). Pharmacologic Inhibition of Ghrelin Receptor Signaling Is Insulin Sparing and Promotes Insulin Sensitivity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *339*(1), 115-124. doi:10.1124/jpet.111.183764
- Loos, B., Klionsky, D. J., Du Toit, A., & Hofmeyr, J.-H. S. (2020). On the relevance of precision autophagy flux control in vivo – Points of departure for clinical translation. *Autophagy*, *16*(4), 750-762. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1687211>
- Loos, B., Toit, A. D., & Hofmeyr, J.-H. S. (2014). Defining and measuring autophagosome flux—concept and reality. *Autophagy*, *10*(11), 2087-2096. doi:10.4161/15548627.2014.973338
- Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell*, *153*(6), 1194-1217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039
- López, M., Lage, R., Saha, A. K., Pérez-Tilve, D., Vázquez, M. J., Varela, L., . . . Vidal-Puig, A. (2008). Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metab*, *7*(5), 389-399. doi:10.1016/j.cmet.2008.03.006
- Lord, S. J., Velle, K. B., Mullins, R. D., & Fritz-Laylin, L. K. (2020). SuperPlots: Communicating reproducibility and variability in cell biology. *J Cell Biol*, *219*(6). doi:10.1083/jcb.202001064
- Lorincz, P., & Juhasz, G. (2020). Autophagosome-Lysosome Fusion. *Journal of Molecular Biology*, *432*(8), 2462-2482. doi:10.1016/j.jmb.2019.10.028

- Lowe, D. A., Wu, N., Rohdin-Bibby, L., Moore, A. H., Kelly, N., Liu, Y. E., . . . Weiss, E. J. (2020). Effects of Time-Restricted Eating on Weight Loss and Other Metabolic Parameters in Women and Men With Overweight and Obesity. *JAMA Internal Medicine*, *180*(11), 1491. doi:10.1001/jamainternmed.2020.4153
- Lu, S. Y., Sung, T., Lin, N. W., Abraham, R. T., & Jessen, B. A. (2017). Lysosomal adaptation: How cells respond to lysosomotropic compounds. *PLOS ONE*, *12*(3), 22. doi:10.1371/journal.pone.0173771
- M'Kadmi, C., Leyris, J. P., Onfroy, L., Gales, C., Sauliere, A., Gagne, D., . . . Marie, J. (2015). Agonism, Antagonism, and Inverse Agonism Bias at the Ghrelin Receptor Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(45), 27021-27039. doi:10.1074/jbc.M115.659250
- Ma, L., Chen, Z. B., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Pandolfi, P. P. (2005). Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk: Implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell*, *121*(2), 179-193. doi:10.1016/j.cell.2005.02.031
- Maday, S., & Holzbaur, E. L. F. (2014). Autophagosome Biogenesis in Primary Neurons Follows an Ordered and Spatially Regulated Pathway. *Developmental Cell*, *30*(1), 71-85. doi:10.1016/j.devcel.2014.06.001
- Maday, S., & Holzbaur, E. L. F. (2016). Compartment-Specific Regulation of Autophagy in Primary Neurons. *Journal of Neuroscience*, *36*(22), 5933-5945. doi:10.1523/jneurosci.4401-15.2016
- Maday, S., Wallace, K. E., & Holzbaur, E. L. F. (2012). Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons. *Journal of Cell Biology*, *196*(4), 407-417. doi:10.1083/jcb.201106120
- Makin, S. (2018). The amyloid hypothesis on trial. *Nature*, *559*(7715), S4-s7. doi:10.1038/d41586-018-05719-4
- Mani, B. K., Shankar, K., & Zigman, J. M. (2019). Ghrelin's Relationship to Blood Glucose. *Endocrinology*, *160*(5), 1247-1261. doi:10.1210/en.2019-00074
- Mani, B. K., & Zigman, J. M. (2017). Ghrelin as a Survival Hormone. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *28*(12), 843-854. doi:10.1016/j.tem.2017.10.001
- Martinet, W., Roth, L., & De Meyer, G. R. Y. (2017). Standard Immunohistochemical Assays to Assess Autophagy in Mammalian Tissue. *Cells*, *6*(3), 12. doi:10.3390/cells6030017
- Martinez-Lopez, N., Tarabra, E., Toledo, M., Garcia-Macia, M., Sahu, S., Coletto, L., . . . Singh, R. (2017). System-wide Benefits of Intermeal Fasting by Autophagy. *Cell Metabolism*, *26*(6), 856-+. doi:10.1016/j.cmet.2017.09.020
- Martinez-Vicente, M., Talloczy, Z., Wong, E., Tang, G. M., Koga, H., Kaushik, S., . . . Cuervo, A. M. (2010). Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nature Neuroscience*, *13*(5), 567-U574. doi:10.1038/nn.2528
- Martins, L., Fernández-Mallo, D., Novelle, M. G., Vázquez, M. J., Tena-Sempere, M., Nogueiras, R., . . . Diéguez, C. (2012). Hypothalamic mTOR Signaling Mediates the Orexigenic Action of Ghrelin. *PLOS ONE*, *7*(10), e46923. doi:10.1371/journal.pone.0046923
- Maswood, N., Young, J., Tilmont, E., Zhang, Z. M., Gash, D. M., Gerhardt, G. A., . . . Ingram, D. K. (2004). Caloric restriction increases neurotrophic factor levels and attenuates neurochemical and behavioral deficits in a primate model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(52), 18171-18176. doi:10.1073/pnas.0405831102
- Mattison, J. A., Colman, R. J., Beasley, T. M., Allison, D. B., Kemnitz, J. W., Roth, G. S., . . . Anderson, R. M. (2017). Caloric restriction improves health and survival of rhesus monkeys. *Nature Communications*, *8*. doi:10.1038/ncomms14063



- Mattison, J. A., Roth, G. S., Beasley, T. M., Tilmont, E. M., Handy, A. M., Herbert, R. L., . . . de Cabo, R. (2012). Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature*, *489*(7415), 318-+. doi:10.1038/nature11432
- Mattson, M. P., & Arumugam, T. V. (2018). Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States. *Cell Metabolism*, *27*(6), 1176-1199. doi:10.1016/j.cmet.2018.05.011
- Mattson, M. P., Moehl, K., Ghena, N., Schmaedick, M., & Cheng, A. W. (2018). Intermittent metabolic switching, neuroplasticity and brain health. *Nature Reviews Neuroscience*, *19*(2), 81-94. doi:10.1038/nrn.2017.156
- McWilliams, T. G., Prescott, A. R., Montava-Garriga, L., Ball, G., Singh, F., Barini, E., . . . Ganley, I. G. (2018). Basal Mitophagy Occurs Independently of PINK1 in Mouse Tissues of High Metabolic Demand. *Cell Metabolism*, *27*(2), 439-449.e435. doi:10.1016/j.cmet.2017.12.008
- Meijer, A. J. (2009). Autophagy research Lessons from metabolism. *Autophagy*, *5*(1), 3-5. doi:10.4161/auto.5.1.7207
- Melia, T. J., Lystad, A. H., & Simonsen, A. (2020). Autophagosome biogenesis: From membrane growth to closure. *Journal of Cell Biology*, *219*(6), 18. doi:10.1083/jcb.202002085
- Meng, Q. Y., & Cai, D. S. (2011). Defective Hypothalamic Autophagy Directs the Central Pathogenesis of Obesity via the I kappa B Kinase beta (IKK beta)/NF-kappa B Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(37), 32324-32332. doi:10.1074/jbc.M111.254417
- Mitchell, S. J., Bernier, M., Mattison, J. A., Aon, M. A., Kaiser, T. A., Anson, R. M., . . . de Cabo, R. (2019). Daily Fasting Improves Health and Survival in Male Mice Independent of Diet Composition and Calories. *Cell Metabolism*, *29*(1), 221-+. doi:10.1016/j.cmet.2018.08.011
- Mitchell, S. J., Madrigal-Matute, J., Scheibye-Knudsen, M., Fang, E., Aon, M., Gonzalez-Reyes, J. A., . . . de Cabo, R. (2016). Effects of Sex, Strain, and Energy Intake on Hallmarks of Aging in Mice. *Cell Metabolism*, *23*(6), 1093-1112. doi:10.1016/j.cmet.2016.05.027
- Mizushima, N. (2004). Role of mammalian autophagy as a starvation response. *Molecular Biology of the Cell*, *15*, 242A-242A. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000224648802059
- Mizushima, N., & Komatsu, M. (2011). Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. *Cell*, *147*(4), 728-741. doi:10.1016/j.cell.2011.10.026
- Mizushima, N., Sugita, H., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (1998). A new protein conjugation system in human - The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(51), 33889-33892. doi:10.1074/jbc.273.51.33889
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Molecular Biology of the Cell*, *15*(3), 1101-1111. doi:10.1091/mbc.E03-09-0704
- Mizushima, N., Yoshimori, T., & Levine, B. (2010). Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell*, *140*(3), 313-326. doi:10.1016/j.cell.2010.01.028
- Montava-Garriga, L., & Ganley, I. G. (2020). Outstanding Questions in Mitophagy: What We Do and Do Not Know. *Journal of Molecular Biology*, *432*(1), 206-230. doi:10.1016/j.jmb.2019.06.032
- Moon, M., Cha, M. Y., & Mook-Jung, I. (2014). Impaired Hippocampal Neurogenesis and its Enhancement with Ghrelin in 5XFAD Mice [Article]. *Journal of Alzheimers Disease*, *41*(1), 233-241. https://doi.org/10.3233/jad-132417

- Moon, M., Choi, J. G., Nam, D. W., Hong, H. S., Choi, Y. J., Oh, M. S., & Mook-Jung, I. (2011). Ghrelin Ameliorates Cognitive Dysfunction and Neurodegeneration in Intrahippocampal Amyloid-beta(1-42) Oligomer-Injected Mice [Article]. *Journal of Alzheimers Disease*, 23(1), 147-159. <https://doi.org/10.3233/jad-2010-101263>
- Moon, M., Kim, S., Hwang, L., & Park, S. (2009). Ghrelin Regulates Hippocampal Neurogenesis in Adult Mice. *Endocrine Journal*, 56(3), 525-531. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000267689100025
- Moreno-Jimenez, E. P., Flor-Garcia, M., Terreros-Roncal, J., Rabano, A., Cafini, F., Pallas-Bazarra, N., . . . Llorens-Martin, M. (2019). Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 25(4), 554-+. doi:10.1038/s41591-019-0375-9
- Morgan, A. H., Andrews, Z. B., & Davies, J. S. (2017). Less is more: Caloric regulation of neurogenesis and adult brain function. *J Neuroendocrinol*, 29(10). doi:10.1111/jne.12512
- Morozov, Y. M., Datta, D., Paspalas, C. D., & Arnsten, A. F. T. (2017). Ultrastructural evidence for impaired mitochondrial fission in the aged rhesus monkey dorsolateral prefrontal cortex. *Neurobiology of Aging*, 51, 9-18. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2016.12.001
- Mortimore, G. E., & Schworer, C. M. (1977). Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver. *Nature*, 270(5633), 174-176. doi:10.1038/270174a0
- Most, J., Tosti, V., Redman, L. M., & Fontana, L. (2016). Calorie restriction in humans: An update. *Ageing Res Rev*. doi:10.1016/j.arr.2016.08.005
- Muller, T. D., Nogueiras, R., Andermann, M. L., Andrews, Z. B., Anker, S. D., Argente, J., . . . Tschop, M. H. (2015). Ghrelin. *Molecular metabolism*, 4(6), 437-460. doi:10.1016/j.molmet.2015.03.005
- Musiwaro, P., Smith, M., Manifava, M., Walker, S. A., & Ktistakis, N. T. (2013). Characteristics and requirements of basal autophagy in HEK 293 cells. *Autophagy*, 9(9), 1407-1417. doi:10.4161/auto.25455
- Mustafa, E. R., Soto, E. J. L., Damonte, V. M., Rodriguez, S. S., Lipscombe, D., & Raingo, J. (2017). Constitutive activity of the Ghrelin receptor reduces surface expression of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in a Ca-V beta-dependent manner. *Journal of Cell Science*, 130(22), 3907-3917. doi:10.1242/jcs.207886
- Nakatogawa, H. (2020). Mechanisms governing autophagosome biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21(8), 439-458. doi:10.1038/s41580-020-0241-0
- Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K., & Matsukura, S. (2001). A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*, 409(6817), 194-198. doi:10.1038/35051587
- Nikoletopoulou, V., Sidiropoulou, K., Kallergi, E., Dalezios, Y., & Tavernarakis, N. (2017). Modulation of Autophagy by BDNF Underlies Synaptic Plasticity. *Cell Metabolism*, 26(1), 230-+. doi:10.1016/j.cmet.2017.06.005
- Nikoletopoulou, V., & Tavernarakis, N. (2018). Regulation and Roles of Autophagy at Synapses. *Trends in Cell Biology*, 28(8), 646-661. doi:10.1016/j.tcb.2018.03.006
- Nishimura, T., & Tooze, S. A. (2020). Emerging roles of ATG proteins and membrane lipids in autophagosome formation. *Cell Discovery*, 6(1), 18. doi:10.1038/s41421-020-0161-3
- Nixon, R. A. (2013). The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nature Medicine*, 19(8), 983-997. doi:10.1038/nm.3232
- Nixon, R. A., Wegiel, J., Kumar, A., Yu, W. H., Peterhoff, C., Cataldo, A., & Cuervo, A. M. (2005). Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: An immuno-electron microscopy study. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 64(2), 113-122. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000227106700003

- Nixon, R. A., & Yang, D. S. (2011). Autophagy failure in Alzheimer's disease-locating the primary defect. *Neurobiology of Disease*, *43*(1), 38-45. doi:10.1016/j.nbd.2011.01.021
- Norman, J. M., Cohen, G. M., & Bampton, E. T. W. (2010). The in vitro cleavage of the hAtg proteins by cell death proteases. *Autophagy*, *6*(8), 1042-1056. doi:10.4161/auto.6.8.13337
- Oeste, C. L., Seco, E., Patton, W. F., Boya, P., & Perez-Sala, D. (2013). Interactions between autophagic and endo-lysosomal markers in endothelial cells. *Histochemistry and Cell Biology*, *139*(5), 659-670. doi:10.1007/s00418-012-1057-6
- Ornstein, L. (1964). Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann N Y Acad Sci*, *121*, 321-349. doi:10.1111/j.1749-6632.1964.tb14207.x
- Paddock, S. W., & Eliceiri, K. W. (2014). Laser scanning confocal microscopy: history, applications, and related optical sectioning techniques. *Methods Mol Biol*, *1075*, 9-47. doi:10.1007/978-1-60761-847-8\_2
- Pandey, K., Yu, X. W., Steinmetz, A., & Alberini, C. M. (2021). Autophagy coupled to translation is required for long-term memory. *Autophagy*, *17*(7), 1614-1635. doi:10.1080/15548627.2020.1775393
- Pandya, J. D., Grondin, R., Yonutas, H. M., Hagh Nazar, H., Gash, D. M., Zhang, Z. M., & Sullivan, P. G. (2015). Decreased mitochondrial bioenergetics and calcium buffering capacity in the basal ganglia correlates with motor deficits in a nonhuman primate model of aging. *Neurobiology of Aging*, *36*(5), 1903-1913. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.01.018
- Pandya, J. D., Royland, J. E., MacPhail, R. C., Sullivan, P. G., & Kodavanti, P. R. S. (2016). Age- and brain region-specific differences in mitochondrial bioenergetics in Brown Norway rats. *Neurobiology of Aging*, *42*, 25-34. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2016.02.027
- Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., . . . Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(33), 24131-24145. doi:10.1074/jbc.m702824200
- Park, H. W., Park, H., Semple, I. A., Jang, I., Ro, S. H., Kim, M., . . . Lee, J. H. (2014). Pharmacological correction of obesity-induced autophagy arrest using calcium channel blockers. *Nature Communications*, *5*, 12. doi:10.1038/ncomms5834
- Pastore, N., Vainshtein, A., Herz, N. J., Huynh, T., Brunetti, L., Klisch, T. J., . . . Ballabio, A. (2019). Nutrient-sensitive transcription factors TFEB and TFE3 couple autophagy and metabolism to the peripheral clock. *Embo Journal*, *38*(12), 14. doi:10.15252/embj.2018101347
- Pena-Llopis, S., Vega-Rubin-de-Celis, S., Schwartz, J. C., Wolff, N. C., Tran, T. A. T., Zou, L., . . . Brugarolas, J. (2011). Regulation of TFEB and V-ATPases by mTORC1. *Embo Journal*, *30*(16), 3242-3258. doi:10.1038/emboj.2011.257
- Peris-Sampedro, F., Le May, M. V., Stoltenberg, I., Schele, E., & Dickson, S. L. (2021). A skeleton in the cupboard in ghrelin research: Where are the skinny dwarfs? *Journal of Neuroendocrinology*, *33*(11), 36. doi:10.1111/jne.13025
- Pfeifer, U. (1978). Inhibition by insulin of the formation of autophagic vacuoles in rat liver. A morphometric approach to the kinetics of intracellular degradation by autophagy. *Journal of Cell Biology*, *78*(1), 152-167. doi:10.1083/jcb.78.1.152
- Pfister, J. A., Ma, C., Morrison, B. E., & D'Mello, S. R. (2008). Opposing Effects of Sirtuins on Neuronal Survival: SIRT1-Mediated Neuroprotection Is Independent of Its Deacetylase Activity. *PLOS ONE*, *3*(12), 8. doi:10.1371/journal.pone.0004090
- Pfluger, P. T., Kirchner, H., Guenel, S., Schrott, B., Perez-Tilve, D., Fu, S., . . . Tschoep, M. H. (2008). Simultaneous deletion of ghrelin and its receptor increases motor activity

- and energy expenditure. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 294(3), G610-G618. doi:10.1152/ajpgi.00321.2007
- Pickford, F., Masliah, E., Britschgi, M., Lucin, K., Narasimhan, R., Jaeger, P. A., . . . Wyss-Coray, T. (2008). The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 118(6), 2190-2199. doi:10.1172/jci33585
- Pollard, A. K., Craig, E. L., & Chakrabarti, L. (2016). Mitochondrial Complex 1 Activity Measured by Spectrophotometry Is Reduced across All Brain Regions in Ageing and More Specifically in Neurodegeneration. *PLOS ONE*, 11(6), 13. doi:10.1371/journal.pone.0157405
- Polson, H. E. J., de Lartigue, J., Rigden, D. J., Reedijk, M., Urbe, S., Clague, M. J., & Tooze, S. A. (2010). Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy*, 6(4), 506-522. doi:10.4161/auto.6.4.11863
- Popelka, H., & Klionsky, D. J. (2015). Post-translationally-modified structures in the autophagy machinery: an integrative perspective. *Febs Journal*, 282(18), 3474-3488. doi:10.1111/febs.13356
- Porporato, P. E., Filigheddu, N., Reano, S., Ferrara, M., Angelino, E., Gnocchi, V. F., . . . Graziani, A. (2013). Acylated and unacylated ghrelin impair skeletal muscle atrophy in mice. *Journal of Clinical Investigation*. doi:10.1172/jci39920
- Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). MECHANISMS OF DISEASE Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, 362(4), 329-344. doi:10.1056/NEJMra0909142
- Racette, S. B., Weiss, E. P., Villareal, D. T., Arif, H., Steger-May, K., Schechtman, K. B., . . . Washington Univ Sch Med, C. G. (2006). One year of caloric restriction in humans: Feasibility and effects on body composition and abdominal adipose tissue. *Journals of Gerontology Series a-Biological Sciences and Medical Sciences*, 61(9), 943-950. doi:10.1093/gerona/61.9.943
- Ramirez, S., Martins, L., Jacas, J., Carrasco, P., Pozo, M., Clotet, J., Serra, D., Hegardt, F. G., Dieguez, C., Lopez, M., & Casals, N. (2013). Hypothalamic Ceramide Levels Regulated by CPT1C Mediate the Orexigenic Effect of Ghrelin [Article]. *Diabetes*, 62(7), 2329-2337. <https://doi.org/10.2337/db12-1451>
- Ramirez, V. T., van Oeffelen, W., Torres-Fuentes, C., Chruscicka, B., Druelle, C., Golubeva, A. V., . . . Schellekens, H. (2019). Differential functional selectivity and downstream signaling bias of ghrelin receptor antagonists and inverse agonists. *Faseb Journal*, 33(1), 518-531. doi:10.1096/fj.201800655R
- Ratcliff, M., Rees, D., McGrady, S., Buntwal, L., Hornsby, A. K. E., Bayliss, J., . . . Davies, J. S. (2019). Calorie restriction activates new adult born olfactory-bulb neurones in a ghrelin-dependent manner but acyl-ghrelin does not enhance subventricular zone neurogenesis. *Journal of Neuroendocrinology*, 31(7), 11. doi:10.1111/jne.12755
- Ravussin, E., Redman, L. M., Rochon, J., Das, S. K., Fontana, L., Kraus, W. E., . . . Grp, C. S. (2015). A 2-Year Randomized Controlled Trial of Human Caloric Restriction: Feasibility and Effects on Predictors of Health Span and Longevity. *Journals of Gerontology Series a-Biological Sciences and Medical Sciences*, 70(9), 1097-1104. doi:10.1093/gerona/glv057
- Reed, J. A., Benoit, S. C., Pfluger, P. T., Tschoep, M. H., D'Alessio, D. A., & Seeley, R. J. (2008). Mice with chronically increased circulating ghrelin develop age-related glucose intolerance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 294(4), E752-E760. doi:10.1152/ajpendo.00463.2007
- Rees, D. J., Roberts, L., Carla Carisi, M., Morgan, A. H., Brown, M. R., & Davies, J. S. (2020). Automated Quantification of Mitochondrial Fragmentation in an In Vitro Parkinson's Disease Model. *Curr Protoc Neurosci*, 94(1), e105. doi:10.1002/cpns.105

- Regnell, C. E., Hildrestrand, G. A., Sejersted, Y., Medin, T., Moldestad, O., Rolseth, V., . . . Bergersen, L. H. (2012). Hippocampal Adult Neurogenesis Is Maintained by Neil3-Dependent Repair of Oxidative DNA Lesions in Neural Progenitor Cells. *Cell Reports*, 2(3), 503-510. doi:10.1016/j.celrep.2012.08.008
- Reimer, M. K., Pacini, G., & Ahren, B. (2003). Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology*, 144(3), 916-921. doi:10.1210/en.2002-220819
- Ribeiro, L. F., Catarino, T., Santos, S. D., Benoist, M., van Leeuwen, J. F., Esteban, J. A., & Carvalho, A. L. (2014). Ghrelin triggers the synaptic incorporation of AMPA receptors in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(1), E149-E158. doi:10.1073/pnas.1313798111
- Rickman, A. D., Williamson, D. A., Martin, C. K., Gilhooly, C. H., Stein, R. I., Bales, C. W., . . . Grp, C. S. (2011). The CALERIE Study: Design and methods of an innovative 25% caloric restriction intervention. *Contemporary Clinical Trials*, 32(6), 874-881. doi:10.1016/j.cct.2011.07.002
- Romanov, J., Walczak, M., Ibiricu, I., Schuchner, S., Ogris, E., Kraft, C., & Martens, S. (2012). Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *Embo Journal*, 31(22), 4304-4317. doi:10.1038/emboj.2012.278
- Rubinsztein, D. C., Cuervo, A. M., Ravikumar, B., Sarkar, S., Korolchuk, V. I., Kaushik, S., & Klionsky, D. J. (2009). In search of an "autophagometer". *Autophagy*, 5(5), 585-589. doi:10.4161/auto.5.5.8823
- Sabatini, D. D., & Adesnik, M. (2013). Christian de Duve: Explorer of the cell who discovered new organelles by using a centrifuge. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(33), 13234-13235. doi:10.1073/pnas.1312084110
- Sahay, A., Scobie, K. N., Hill, A. S., O'Carroll, C. M., Kheirbek, M. A., Burghardt, N. S., . . . Hen, R. (2011). Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*, 472(7344), 466-469. doi:10.1038/nature09817
- Sakata, I., Nakamura, K., Yamazaki, M., Matsubara, M., Hayashi, Y., Kangawa, K., & Sakai, T. (2002). Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides*, 23(3), 531-536. doi:10.1016/s0196-9781(01)00633-7
- Salašová, A., Yokota, C., Potěšil, D., Zdráhal, Z., Bryja, V., & Arenas, E. (2017). A proteomic analysis of LRRK2 binding partners reveals interactions with multiple signaling components of the WNT/PCP pathway. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1). doi:10.1186/s13024-017-0193-9
- Sancak, Y., Peterson, T. R., Shaul, Y. D., Lindquist, R. A., Thoreen, C. C., Bar-Peled, L., & Sabatini, D. M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*, 320(5882), 1496-1501. doi:10.1126/science.1157535
- Santos, V. V., Stark, R., Rial, D., Silva, H. B., Bayliss, J. A., Lemus, M. B., . . . Andrews, Z. B. (2017). Acyl ghrelin improves cognition, synaptic plasticity deficits and neuroinflammation following amyloid beta (A beta 1-40) administration in mice. *Journal of Neuroendocrinology*, 29(5), 11. doi:10.1111/jne.12476
- Satou, M., Nishi, Y., Yoh, J., Hattori, Y., & Sugimoto, H. (2010). Identification and Characterization of Acyl-Protein Thioesterase 1/Lysophospholipase I As a Ghrelin Deacylation/Lysophospholipid Hydrolyzing Enzyme in Fetal Bovine Serum and Conditioned Medium. *Endocrinology*, 151(10), 4765-4775. doi:10.1210/en.2010-0412

- Satou, M., & Sugimoto, H. (2012). The Study of Ghrelin Deacylation Enzymes. In M. Kojima & K. Kangawa (Eds.), *Ghrelin* (Vol. 514, pp. 165-179). San Diego: Elsevier Academic Press Inc.
- Schaffner, I., Minakaki, G., Khan, M. A., Balta, E. A., Schlotzer-Schrehardt, U., Schwarz, T. J., . . . Lie, D. C. (2018). FoxO Function Is Essential for Maintenance of Autophagic Flux and Neuronal Morphogenesis in Adult Neurogenesis. *Neuron*, *99*(6), 1188-+. doi:10.1016/j.neuron.2018.08.017
- Schulte, G., Bryja, V., Rawal, N., Castelo-Branco, G., Sousa, K. M., & Arenas, E. (2005). Purified Wnt-5a increases differentiation of midbrain dopaminergic cells and dishevelled phosphorylation. *Journal of Neurochemistry*, *92*(6), 1550-1553. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.03022.x
- Seglen, P. O., Gordon, P. B., & Poli, A. (1980). Amino acid inhibition of the autophagic/lysosomal pathway of protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*, *630*(1), 103-118. doi:10.1016/0304-4165(80)90141-5
- Shankar, K., Metzger, N. P., Singh, O., Mani, B. K., Osborne-Lawrence, S., Varshney, S., . . . Zigman, J. M. (2021). LEAP2 deletion in mice enhances ghrelin's actions as an orexigen and growth hormone secretagogue. *Molecular Metabolism*, *53*, 18. doi:10.1016/j.molmet.2021.101327
- Sharp, Z. D., & Bartke, A. (2005). Evidence for down-regulation of phosphoinositide 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR)-dependent translation regulatory signaling pathways in ames dwarf mice. *Journals of Gerontology Series A-Biological Sciences and Medical Sciences*, *60*(3), 293-300. doi:10.1093/gerona/60.3.293
- Shaw, R. J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R. L., Witters, L. A., DePinho, R. A., & Cantley, L. C. (2004). The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(10), 3329-3335. doi:10.1073/pnas.0308061100
- Shehata, M., Abdou, K., Choko, K., Matsuo, M., Nishizono, H., & Inokuchi, K. (2018). Autophagy Enhances Memory Erasure through Synaptic Destabilization. *Journal of Neuroscience*, *38*(15), 3809-3822. doi:10.1523/jneurosci.3505-17.2018
- Sherer, T. B., Kim, J. H., Betarbet, R., & Greenamyre, J. T. (2003). Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Experimental Neurology*, *179*(1), 9-16. doi:10.1006/exnr.2002.8072
- Shi, J., Sabbagh, M. N., & Vellas, B. (2020). Alzheimer's disease beyond amyloid: strategies for future therapeutic interventions. *Bmj-British Medical Journal*, *371*, 4. doi:10.1136/bmj.m3684
- Shiimura, Y., Horita, S., Hamamoto, A., Asada, H., Hirata, K., Tanaka, M., . . . Kojima, M. (2020). Structure of an antagonist-bound ghrelin receptor reveals possible ghrelin recognition mode. *Nature Communications*, *11*(1). doi:10.1038/s41467-020-17554-1
- Shiia, T., Nakazato, M., Mizuta, M., Date, Y., Mondal, M. S., Tanaka, M., . . . Matsukura, S. (2002). Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *87*(1), 240-244. doi:10.1210/jc.87.1.240
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y. J., Xiang, Y. Q., Novak, I., Komatsu, M., . . . Czaja, M. J. (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, *458*(7242), 1131-U1164. doi:10.1038/nature07976
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., . . . Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, *150*(1), 76-85. doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7

- Son, J. H., Chun, H. S., Joh, T. H., Cho, S., Conti, B., & Lee, J. W. (1999). Neuroprotection and neuronal differentiation studies using substantia nigra dopaminergic cells derived from transgenic mouse embryos. *Journal of Neuroscience*, *19*(1), 10-20. doi:10.1523/jneurosci.19-01-00010.1999
- Son, S. M., Song, H., Byun, J., Park, K. S., Jang, H. C., Park, Y. J., & Mook-Jung, I. (2012). Altered APP Processing in Insulin-Resistant Conditions Is Mediated by Autophagosome Accumulation via the Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin Pathway. *Diabetes*, *61*(12), 3126-3138. doi:10.2337/db11-1735
- Sorrells, S. F., Paredes, M. F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D. S., Kelley, K. W., . . . Alvarez-Buylla, A. (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*, *555*(7696), 377-+. doi:10.1038/nature25975
- Sou, Y., Waguri, S., Iwata, J., Ueno, T., Fujimura, T., Hara, T., . . . Komatsu, M. (2008). The Atg8 Conjugation System Is Indispensable for Proper Development of Autophagic Isolation Membranes in Mice. *Molecular Biology of the Cell*, *19*(11), 4762-4775. doi:10.1091/mbc.E08-03-0309
- Stahon, K. E., Bastian, C., Griffith, S., Kidd, G. J., Brunet, S., & Baltan, S. (2016). Age-Related Changes in Axonal and Mitochondrial Ultrastructure and Function in White Matter. *Journal of Neuroscience*, *36*(39), 9990-10001. doi:10.1523/jneurosci.1316-16.2016
- Stathakos, P., Jimenez-Moreno, N., Crompton, L. A., Nistor, P. A., Badger, J. L., Barbuti, P. A., . . . Lane, J. D. (2021). A monolayer hiPSC culture system for autophagy/mitophagy studies in human dopaminergic neurons. *Autophagy*, *17*(4), 855-871. doi:10.1080/15548627.2020.1739441
- Stevanovic, D., Trajkovic, V., Müller-Lühlhoff, S., Brandt, E., Abplanalp, W., Bumke-Vogt, C., . . . Castañeda, T. R. (2013). Ghrelin-induced food intake and adiposity depend on central mTORC1/S6K1 signaling. *Mol Cell Endocrinol*, *381*(1-2), 280-290. doi:10.1016/j.mce.2013.08.009
- Stoll, E. A., Cheung, W., Mikheev, A. M., Sweet, I. R., Bielas, J. H., Zhang, J., . . . Horner, P. J. (2011). Aging Neural Progenitor Cells Have Decreased Mitochondrial Content and Lower Oxidative Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(44), 38592-38601. doi:10.1074/jbc.M111.252171
- Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*, *111*(1). doi:10.1002/0471142735.ima03bs111
- Sun, Y. X., Ahmed, S., & Smith, R. G. (2003). Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(22), 7973-7981. doi:10.1128/mcb.23.22.7973-7981.2003
- Sun, Y. X., Butte, N. F., Garcia, J. M., & Smith, R. G. (2008). Characterization of adult ghrelin and ghrelin receptor knockout mice under positive and negative energy balance. *Endocrinology*, *149*(2), 843-850. doi:10.1210/en.2007-0271
- Tilston, T. W., Brown, R. D., Wateridge, M. J., Arms-Williams, B., Walker, J. J., Sun, Y., & Wells, T. (2019). A Novel Automated System Yields Reproducible Temporal Feeding Patterns in Laboratory Rodents. *J Nutr*, *149*(9), 1674-1684. doi:10.1093/jn/nxz116
- Tobin, M. K., Musaraca, K., Disouky, A., Shetti, A., Bheri, A., Honer, W. G., . . . Lazarov, O. (2019). Human Hippocampal Neurogenesis Persists in Aged Adults and Alzheimer's Disease Patients. *Cell Stem Cell*, *24*(6), 974-+. doi:10.1016/j.stem.2019.05.003
- Togliatto, G., Trombetta, A., Dentelli, P., Cotogni, P., Rosso, A., Tschöp, M. H., . . . Brizzi, M. F. (2013). Unacylated Ghrelin Promotes Skeletal Muscle Regeneration Following Hindlimb Ischemia via SOD-2-Mediated miR-221/222 Expression. *Journal of the American Heart Association*, *2*(6), e000376-e000376. doi:10.1161/jaha.113.000376
- Toledo, M., Batista-Gonzalez, A., Merheb, E., Aoun, M. L., Tarabra, E., Feng, D. R., . . . Singh, R. (2018). Autophagy Regulates the Liver Clock and Glucose Metabolism by Degrading CRY1. *Cell Metabolism*, *28*(2), 268-+. doi:10.1016/j.cmet.2018.05.023

- Tong, J., Prigeon, R. L., Davis, H. W., Bidlingmaier, M., Kahn, S. E., Cummings, D. E., . . . D'Alessio, D. (2010). Ghrelin Suppresses Glucose-Stimulated Insulin Secretion and Deteriorates Glucose Tolerance in Healthy Humans. *Diabetes*, *59*(9), 2145-2151. doi:10.2337/db10-0504
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *76*(9), 4350-4354. doi:10.1073/pnas.76.9.4350
- Tschop, M., Smiley, D. L., & Heiman, M. L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, *407*(6806), 908-913. doi:10.1038/35038090
- Tschop, M., Weyer, C., Tataranni, P. A., Devanarayan, V., Ravussin, E., & Heiman, M. L. (2001). Circulating Ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes*, *50*(4), 707-709. doi:10.2337/diabetes.50.4.707
- Tsvetkov, A. S., Arrasate, M., Barmada, S., Ando, D. M., Sharma, P., Shaby, B. A., & Finkbeiner, S. (2013). Proteostasis of polyglutamine varies among neurons and predicts neurodegeneration. *Nature Chemical Biology*, *9*(9), 586-U591. doi:10.1038/nchembio.1308
- Uchida, A., Zigman, J. M., & Perello, M. (2013). Ghrelin and eating behavior: evidence and insights from genetically-modified mouse models. *Frontiers in Neuroscience*, *7*, 10. doi:10.3389/fnins.2013.00121
- Ueno, T., & Komatsu, M. (2017). Autophagy in the liver: functions in health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *14*(3), 170-184. doi:10.1038/nrgastro.2016.185
- Velikkath, A. K. G., Nishimura, T., Oita, E., Ishihara, N., & Mizushima, N. (2012). Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. *Molecular Biology of the Cell*, *23*(5), 896-909. doi:10.1091/mbc.E11-09-0785
- VerPlank, J. J. S., & Goldberg, A. L. (2017). Regulating protein breakdown through proteasome phosphorylation. *Biochemical Journal*, *474*, 3355-3371. doi:10.1042/bcj20160809
- Wahl, D., Solon-Biet, S. M., Cogger, V. C., Fontana, L., Simpson, S. J., Le Couteur, D. G., & Ribeiro, R. V. (2019). Aging, lifestyle and dementia. *Neurobiology of Disease*, *130*, 15. doi:10.1016/j.nbd.2019.104481
- Walker, S. A., & Ktistakis, N. T. (2020). Autophagosome Biogenesis Machinery. *Journal of Molecular Biology*, *432*(8), 2449-2461. doi:10.1016/j.jmb.2019.10.027
- Wang, H. Q., Dou, S. S., Zhu, J. G., Shao, Z. Q., Wang, C. M., & Cheng, B. H. (2020). Ghrelin protects dopaminergic neurons against MPTP neurotoxicity through promoting autophagy and inhibiting endoplasmic reticulum mediated apoptosis [Article]. *Brain Research*, *1746*, 13, Article 147023.
- Wani, W. Y., Boyer-Guittaut, M., Dodson, M., Chatham, J., Darley-Usmar, V., & Zhang, J. H. (2015). Regulation of autophagy by protein post-translational modification. *Laboratory Investigation*, *95*(1), 14-25. doi:10.1038/labinvest.2014.131
- Willcox, B. J., Willcox, D. C., Todoriki, H., Fujiyoshi, A., Yano, K., He, Q. M., . . . Suzuki, M. (2007). Caloric restriction, the traditional Okinawan diet, and healthy aging - The diet of the world's longest-lived people and its potential impact on morbidity and life span. *Healthy Aging and Longevity*, *1114*, 434-455. doi:10.1196/annals.1396.037
- Willcox, B. J., Yano, K., Chen, R. D., Willcox, D. C., Rodriguez, B. L., Masaki, K. H., . . . Curb, J. D. (2004). How much should we eat? The association between energy intake and mortality in a 36-year follow-up study of Japanese-American men. *Journals of Gerontology Series a-Biological Sciences and Medical Sciences*, *59*(8), 789-795. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000223697800003



- Witte, A. V., Fobker, M., Gellner, R., Knecht, S., & Floel, A. (2009). Caloric restriction improves memory in elderly humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(4), 1255-1260. doi:10.1073/pnas.0808587106
- Woods, A., Azzout-Marniche, D., Foretz, M., Stein, S. C., Lemarchand, P., Ferre, P., . . . Carling, D. (2000). Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(18), 6704-6711. doi:10.1128/mcb.20.18.6704-6711.2000
- Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S. P., Momcilovic, M., Johnstone, S. R., . . . Carling, D. (2005). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metabolism*, *2*(1), 21-33. doi:10.1016/j.cmet.2005.06.005
- Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G. D., Neumann, D., . . . Carling, D. (2003). LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Current Biology*, *13*(22), 2004-2008. doi:10.1016/j.cub.2003.10.031
- Wortley, K. E., Anderson, K. D., Garcia, K., Murray, J. D., Malinova, L., Liu, R., . . . Sleeman, M. W. (2004). Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(21), 8227-8232. doi:10.1073/pnas.0402763101
- Wren, A. M., Seal, L. J., Cohen, M. A., Brynes, A. E., Frost, G. S., Murphy, K. G., . . . Bloom, S. R. (2001). Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *86*(12), 5992-5995. doi:10.1210/jc.86.12.5992
- Wren, A. M., Small, C. J., Abbott, C. R., Dhillon, W. S., Seal, L. J., Cohen, M. A., . . . Bloom, S. R. (2001). Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes*, *50*(11), 2540-2547. doi:10.2337/diabetes.50.11.2540
- Wren, A. M., Small, C. J., Ward, H. L., Murphy, K. G., Dakin, C. L., Taheri, S., . . . Bloom, S. R. (2000). The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology*, *141*(11), 4325-4328. doi:10.1210/en.141.11.4325
- Wu, X., Fleming, A., Ricketts, T., Pavel, M., Virgin, H., Menzies, F. M., & Rubinsztein, D. C. (2016). Autophagy regulates Notch degradation and modulates stem cell development and neurogenesis. *Nature Communications*, *7*. doi:10.1038/ncomms10533
- Wyss-Coray, T. (2016). Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. *Nature*, *539*(7628), 180-186. doi:10.1038/nature20411
- Xi, Y., Dhaliwal, J. S., Ceizar, M., Vaculik, M., Kumar, K. L., & Lagace, D. C. (2016). Knockout of Atg5 delays the maturation and reduces the survival of adult-generated neurons in the hippocampus. *Cell Death & Disease*, *7*, 9. doi:10.1038/cddis.2015.406
- Xiao, B., Heath, R., Saiu, P., Leiper, F. C., Leone, P., Jing, C., . . . Gamblin, S. J. (2007). Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature*, *449*(7161), 496-U414. doi:10.1038/nature06161
- Xiao, B., Sanders, M. J., Underwood, E., Heath, R., Mayer, F. V., Carmena, D., . . . Gamblin, S. J. (2011). Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature*, *472*(7342), 230-233. doi:10.1038/nature09932
- Xin, F. J., Wang, J., Zhao, R. Q., Wang, Z. X., & Wu, J. W. (2013). Coordinated regulation of AMPK activity by multiple elements in the alpha-subunit. *Cell Research*, *23*(10), 1237-1240. doi:10.1038/cr.2013.121
- Yamada, G., Ariyasu, H., Iwakura, H., Hosoda, H., Akamizu, T., Nakao, K., & Kangawa, K. (2010). Generation of Transgenic Mice Overexpressing a Ghrelin Analog. *Endocrinology*, *151*(12), 5935-5940. doi:10.1210/en.2010-0635

- Yamamoto, H., Kakuta, S., Watanabe, T. M., Kitamura, A., Sekito, T., Kondo-Kakuta, C., . . . Ohsumi, Y. (2012). Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *Journal of Cell Biology*, *198*(2), 219-233. doi:10.1083/jcb.201202061
- Yanagi, S., Sato, T., Kangawa, K., & Nakazato, M. (2018). The Homeostatic Force of Ghrelin. *Cell Metabolism*, *27*(4), 786-804. doi:10.1016/j.cmet.2018.02.008
- Yang, J., Brown, M. S., Liang, G., Grishin, N. V., & Goldstein, J. L. (2008). Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell*, *132*(3), 387-396. doi:10.1016/j.cell.2008.01.017
- Yang, J. L., Tadokoro, T., Keijzers, G., Mattson, M. P., & Bohr, V. A. (2010). Neurons Efficiently Repair Glutamate-induced Oxidative DNA Damage by a Process Involving CREB-mediated Up-regulation of Apurinic Endonuclease 1. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(36), 28191-28199. doi:10.1074/jbc.M109.082883
- Yang, L., Li, P., Fu, S. N., Calay, E. S., & Hotamisligil, G. S. (2010). Defective Hepatic Autophagy in Obesity Promotes ER Stress and Causes Insulin Resistance. *Cell Metabolism*, *11*(6), 467-478. doi:10.1016/j.cmet.2010.04.005
- Yang, Y., Atasoy, D., Helen, & Scott. (2011). Hunger States Switch a Flip-Flop Memory Circuit via a Synaptic AMPK-Dependent Positive Feedback Loop. *Cell*, *146*(6), 992-1003. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.039>
- Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2010). Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nature Cell Biology*, *12*(9), 814-822. doi:10.1038/ncb0910-814
- Yassa, M. A., & Stark, C. E. L. (2011). Pattern separation in the hippocampus. *Trends in Neurosciences*, *34*(10), 515-525. doi:10.1016/j.tins.2011.06.006
- Young, A. R. J., Chan, E. Y. W., Hu, X. W., Koch, R., Crawshaw, S. G., High, S., . . . Tooze, S. A. (2006). Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *Journal of Cell Science*, *119*(18), 3888-3900. doi:10.1242/jcs.03172
- Yu, S. W., Baek, S. H., Brennan, R. T., Bradley, C. J., Park, S. K., Lee, Y. S., . . . Kim, S. W. (2008). Autophagic Death of Adult Hippocampal Neural Stem Cells Following Insulin Withdrawal. *Stem Cells*, *26*(10), 2602-2610. doi:10.1634/stemcells.2008-0153
- Zhang, Y. Y., Fang, F., Goldstein, J. L., Brown, M. S., & Zhao, T. J. (2015). Reduced autophagy in livers of fasted, fat-depleted, ghrelin-deficient mice: Reversal by growth hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(4), 1226-1231. doi:10.1073/pnas.1423643112
- Zhao, T. J., Liang, G. S., Li, R. L., Xie, X. F., Sleeman, M. W., Murphy, A. J., . . . Brown, M. S. (2010). Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(16), 7467-7472. doi:10.1073/pnas.1002271107
- Zhao, Y. G., & Zhang, H. (2019). Autophagosome maturation: An epic journey from the ER to lysosomes. *Journal of Cell Biology*, *218*(3), 757-770. doi:10.1083/jcb.201810099
- Zhu, K., Zhang, M. L., Liu, S. T., Li, X. Y., Zhong, S. M., Li, F., . . . Miao, Y. (2017). Ghrelin Attenuates Retinal Neuronal Autophagy and Apoptosis in an Experimental Rat Glaucoma Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *58*(14), 6113-6122. doi:10.1167/iovs.17-22465
- Zigman, J. M., Bouret, S. G., & Andrews, Z. B. (2016). Obesity Impairs the Action of the Neuroendocrine Ghrelin System. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *27*(1), 54-63. doi:10.1016/j.tem.2015.09.010
- Zigman, J. M., Nakano, Y., Coppari, R., Balthasar, N., Marcus, J. N., Lee, C. E., . . . Elmquist, J. K. (2005). Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *Journal of Clinical Investigation*, *115*(12), 3564-3572. doi:10.1172/jci26002

Zoncu, R., Bar-Peled, L., Efeyan, A., Wang, S. Y., Sancak, Y., & Sabatini, D. M. (2011). mTORC1 Senses Lysosomal Amino Acids Through an Inside-Out Mechanism That Requires the Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Science*, 334(6056), 678-683. doi:10.1126/science.1207056