Doktori értekezés

Jipa András

Szegedi Tudományegyetem

Biológia Doktori Iskola

A *Drosophila melanogaster* Atg8 fehérjék lipidációtól független szerepeinek a vizsgálata

PhD értekezés

Jipa András

Témavezető: Prof. Dr. Juhász Gábor, MTA Doktora,
tudományos tanácsadó

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Genetikai Intézet

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatika Kar

Szeged

2020

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék 2

Rövidítések jegyzéke 5

1. Irodalmi áttekintés 7

1.1 Lizoszóma-függő intracelluláris lebontó folyamatok 7

1.1.1 A lizoszóma 7

1.1.2 Az autofágia és típusai a folyamat mechanizmusai alapján 7

1.1.2.1 Makroautofágia 7

1.1.2.2 A chaperon-közvetítette autofágia 8

1.1.2.3 RN/DNautofágia 9

1.1.2.4 Mikroautofágia 9

1.1.2.5 Krinofágia 9

1.1.3 Szelektív autofágia és jelentősebb típusai 10

1.1.4 Az autofágia szabályozása 13

1.1.4.2 Atg1 iniciációs komplex 14

1.1.4.3 Vps34 lipid kináz komplex 14

1.1.4.4 Atg9 vezikulák és az Atg2-Atg18 komplex 14

1.1.4.5 Atg8 konjugációs komplex 15

1.1.4.6 Autofagoszóma-lizoszóma fúzió faktorai 16

1.1.4.7 Atg8 homológok és szerepeik 17

1.1.5 Az autofágia fiziológiás és patológiás jelentősége 19

2. Célkitűzések 22

3. Anyagok és módszerek 24

3.1 Felhasznált *Drosophila melanogaster* törzsek 24

3.2 Fertilitási tesztek 24

3.3 Atg8 mutánsok generálása 25

3.4 Molekuláris klónozás és transzgénikus törzsek létrehozása 26

3.5 Mikroszkópos technikák 29

3.5.1 LTR festés 29

3.5.2 Fluoreszcens immunjelölés 29

3.5.3 Az alkalmazott mikroszkópok és képfeldolgozási technikák 30

3.6 Western blot technikák 31

3.7 A rovarfajok Atg8 génfájának elkészítése 32

3.8 Statisztika 33

4. Eredmények.....34

4.1 A *Drosophila melanogaster* Atg8 homológok evolúciója rovarokban 34

4.2 Új Atg8a és Atg8b allélok izolálása 35

4.2.1 Az Atg8a$^{Tro\text{-}Gal4}$ null allél létrehozása..... *35*

4.2.2 Az Atg8a^{G116*} lipidációra képtelen allél létrehozása *37*

4.2.3 Az Atg8b^{16} null allél létrehozása *38*

4.3 Az Atg8a és Atg8b autofágiában betöltött szerepe 39

4.4 Az Atg8a szerepe az autofagoszómák képződésében.....42

4.5 Az Atg8a és az Atg8b egyedfejlődésben betöltött szerepének vizsgálata 43

4.6 Az Atg8a és az Atg8b kifejeződési mintázata.....44

4.7 Az Atg8b szerepe a hím egyedek fertilitásában 46

4.7.1 Az Atg gének szerepe a hím fertilitásban 46

4.7.2 Az Atg8b hiánya hímsterilitást okoz megfigyelhető morfológiai elváltozások nélkül 48

4.7.3 Az Atg8b hímsteril fenotípusa független az autofágia folyamatától 50

5. Eredmények megvitatása 52

5.1 A *Drosophila melanogaster* Atg8 homológjai és azok szerepe az autofágiában és az egyedfejlődésben.....52

5.2 Az autofágia és az Atg8b szerepe a *Drosophila melanogaster* hím fertilitásban 54

5.3 Az eredményeink potenciális felhasználási területei.....56

5.4 A legfontosabb eredményeink rövid összefoglalása 57

6. Irodalomjegyzék.....58

7. Összefoglalás.....68

8. Summary 71

9. Köszönetnyilvánítás.....74

10. Saját hozzájárulásom a munkához.....75

11. Függelék.....76

Rövidítések jegyzéke

3'UTR – 3' Untranslated Region (3' Nem Transzlálódó Régió)

5'UTR – 5' Untranslated Region (5' Nem Transzlálódó Régió)

Act – Actin (Aktin)

Atg – Autophagy related gene (Autofágiát szabályozó gén)

ATP – Adenosine triphosphate (Adenozin-trifoszfát)

CMA – Chaperone-mediated autophagy (dajkafehérje közvetítette autofágia)

DAPI – 4', 6-diamidino-2-fenilindol

DJ-GFP – Don Juan-GFP

E1 – E1 ubikvitin aktiváló enzim

E2 – E2 ubikvitin konjugáz

E3 – E3 ubikvuitin ligáz

ER – Endoplazmatikus Retikulum

FLAG – Flagellin

Flp – Flippase (Flippáz)

FRT – Flippase Recognition Target (Flippáz felismerő hely)

GFP – Green Fluorescent Protein (Zölden fluoreszkáló fehérje)

HA – Hemagglutinin

HOPS – Homotypic fusion and vacuole protein sorting (Homotipikus fúzió és vakuoláris fehérje osztályzás)

Lamp – Lysosomal Associated Membrane Protein (Lizoszómához kapcsolódó membránfehérje)

LIR – LC3 Interacting Region (LC3-mal kölcsönható régió)

LTR – LysoTracker-Red

MARCM – Mosaic Analysis with Repressible Cell Marker (Mozaik analízis gátolható sejt markerrel)

NEB – New England Biology

NES - Nuclear Export Signal (Sejtmagi Export Szignál)

PBS – Phosphate Buffered Saline puffer

PI3P – Phosphatidylinositol-3-Phosphate (Foszfatidil-inozitol-3-foszfát)

PCR – Polymerase chain reaction (Polimeráz láncreakció)

Rab – RAs-related proteins in Brain (Ras-sal rokon fehérjék az agyban)

RNS – ribonukleinsav

SDS – Sodium dodecyl sulfate (Nátrium-dodecil-szulfát)

ssDNS – Single stranded dezoxiribonukleinsav (Egyszálú dezoxidibonukleinsav)

TORC – Target of rapamycin (Rapamicin célpont komplex)

UAS – Upstream Activation Sequence (Upstream Aktiváló Szekvencia)

1. Irodalmi áttekintés

1.1 Lizoszóma-függő intracelluláris lebontó folyamatok

1.1.1 A lizoszóma

A lizoszómák olyan lebontó funkciójú organellumok, amelyeket membrán határol el a citoszoltól és savas pH-n működő hidrolítikus enzimek tömege tölt ki. Ezeket az első elektronmikroszkópos felvételeken sötét állományként azonosították. A lizoszóma többek között rendelkezik nukleázokkal, proteázokkal, glikozidázokkal, lipázokkal és lizozimmel. Ezen enzimek képesek az összes, sejtet felépítő szerves polimert azok monomereire bontani. A lizoszomális enzimek működését biztosító 5-5,5 pH-jú környezetet a lizoszómális protonpumpa biztosítja, amely ATP bontásából származó energia segítségével H^+-ionokat juttat a lizoszóma belsejébe. A lizoszóma membránjában számos permeáz is található, amelyek a citoszolba juttatják a lebontási folyamatok során keletkezett monomereket, melyeket a sejt energiatermelésre és felépítő folyamatok során képes hasznosítani (Yim és Mizushima, 2020).

A lizoszómákat Christian de Duve és munkatársai írták le először: patkánymájból izolálták és a hidrolítikus aktivitása után nevezték el (de Duve, és mtsai, 1955). Ezen képletek viszonylag jól látható struktúrák, az elektronmikroszkópiás vizsgálatok hőskorában Novikoff és munkatársai patkánymájban írták le a lizoszómát, melyet savas pH-ja miatt sötét és denz képletként lehetett megfigyelni (Novikoff és mtsai, 1956). Bár a különböző endocitotikus útvonalakon keresztül a lizoszóma jelentős mennyiségű anyagot vesz fel az extracelluláris térből, jelen dolgozatban főleg a sejt saját anyagait lebontó lizoszomális útvonalakat fogom bemutatni.

1.1.2 Az autofágia és típusai a folyamat mechanizmusai alapján

Az autofágia (vagy autofagocitózis az ógörög *autóphagos* [jelentése: önemésztés] *és kýtos* [jelentése: üreg] szavakból formálódott) az eukarióta élőlényekben erősen konzerválódott sejtbiológiai folyamat, amely során a sejt képes lebontani a saját makromolekuláit és sejtszervecskéit egy lizoszómák közbeiktatásával. Az ubikvitin-proteaszóma rendszer mellett ez a sejt legjelentősebb belső lebontó útvonala.

1.1.2.1 Makroautofágia

A makroautofágia (a dolgozatban a nemzetközi gyakorlatnak megfelelően, autofágiaként említem) az egyetlen olyan típusa az autofágiának, amely egy sajátos, a folyamatra jellemző organellum megjelenésével jár, egyben ez a legismertebb és leggyakoribb

típusa az autofágiának. A folyamat első lépéseként egy csésze alakú, duplamembránú ciszterna keletkezik, amelyet fagofórnak (izoláló membránnak) hívnak (**1. ábra A**). A folyamat előrehaladtával a fagofór körbenövi a citoplazma egy részét és vele együtt a sejtszervecskéket és makromolekulákat, majd bezáródik (**1. ábra A**). Ezt az új kettős membránnal körülvett vezikulumot nevezik autofagoszómának. A folyamat lezárásaképpen az autofagoszóma egy endoszómával vagy lizoszómával egyesül, létrehozva előbbi esetben az amfiszómát utóbbi esetben az autolizoszómát. Az autolizoszóma már csak egy egyszeres membránnal határolt sejtalkotó, mivel a folyamat során az autofagoszóma belső membránja lebomlik (Klionsky és Ohsumi, 1999).

A fagofórt és az autofagoszómákat, benne a sejt citoplazmájának egy részével az 1950-es évek végén sikerült azonosítani elektronmikroszkópos vizsgálatok segítségével, ami alapján Christian de Duve bevezette az autofágia fogalmát (de Duve és mtsai, 1963). A folyamatban résztvevő gének leírásával azonban még a ’90-es évekig várni kellett (lásd még 1.1.4 fejezet).

1.1.2.2 A chaperon-közvetítette autofágia

A chaperon-közvetítette autofágia (CMA) folyamata során bizonyos fehérjék egy molekuláris szállítórendszer révén a citoszólból közvetlenül a lizoszóma membránon átjutva annak lumenébe kerülnek (**1. ábra B**). A KFERQ motívumot (egy vagy két pozitív, egy negatív töltésű illetve egy vagy két hidrofób aminosavat tartalmazó pentapeptidet, melyet egy glutamin [Q] határol) tartalmazó, hibás térszerkezetű fehérjék szelektív felismerését a Hsc70 (heat shock cognate 70 kDa protein) citoszolikus dajkafehérje (chaperon) végzi. Ezt követően a Hsc70 hozzákötődik a lizoszóma membránban elhelyezkedő Lamp2A-hoz (lysosomal associated membrane protein-2), majd további együttműködő dajkafehérjék membrántranszportra alkalmas szerkezetűre tekerik. Végül a Lamp2A multimerizáció által formált csatornán keresztül bejut a lebontandó fehérje a lizoszóma lumenébe, ahol savas közegben hidrolítikus enzimek segítségével lebomlik (Cuervo, 1996).

Olyan egerekben, amelyek mája nem fejezett ki Lamp2A-t, kimutatták, hogy a folyamat fontos szerepet játszik a máj anyagcseréjében, továbbá megfigyelték, hogy a folyamat aktivitása jelentősen megnő éhezés, hypoxia és oxidatív stressz esetén (Schneider és mtsai, 2014, Kaushik és mtsai, 2018). Ezen folyamat szabályozása alig ismert. Érdekes módon az egyes típusú mTOR komplex (TOR1C) nem vesz részt a CMA szabályozásában, ellenben a TOR2C befolyásolja a Lamp2A multimerizációját az Akt kináz aktiválásán keresztül (Bandyopadhyay és mtsai, 2010).

1.1.2.3 RN/DNautofágia

Az RN/DNautofágia (RDA) neve arra utal, hogy ez olyan autofágia típus, amely során a lizoszóma közvetlenül vesz fel nukleinsavakat, majd lebontja azokat (**1. ábra C**). A jelenség felfedezése során leírták az első RDA receptort, a Lamp2B és a Lamp2C DNS és RNS kötő képességét (Fujiwara és mtsai, 2013). Ugyanakkor azt is megfigyelték, hogy a Lamp2 hiányos lizoszómákban ugyan csökkent az RDA aktivitás, de nem szűnt meg, ami egy további RDA receptor jelenlétére is utalt. Ez vezetett a SIDT2 felfedezéséhez, ami egy dupla szálú RNS transzporter (Aizawa és mtsai, 2016).

Az RDA fiziológiás jelentősége valószínűleg az, hogy a sejt számára nem kívánatos nukleinsavakat (vírus eredetű, vagy mitokondriális DNS) lebontja, de a pontos mechanizmus még nem teljesen ismert, számos hiányzó részlet és ellentmondás vár még feltárásra (Nguyen és mtsai, 2017).

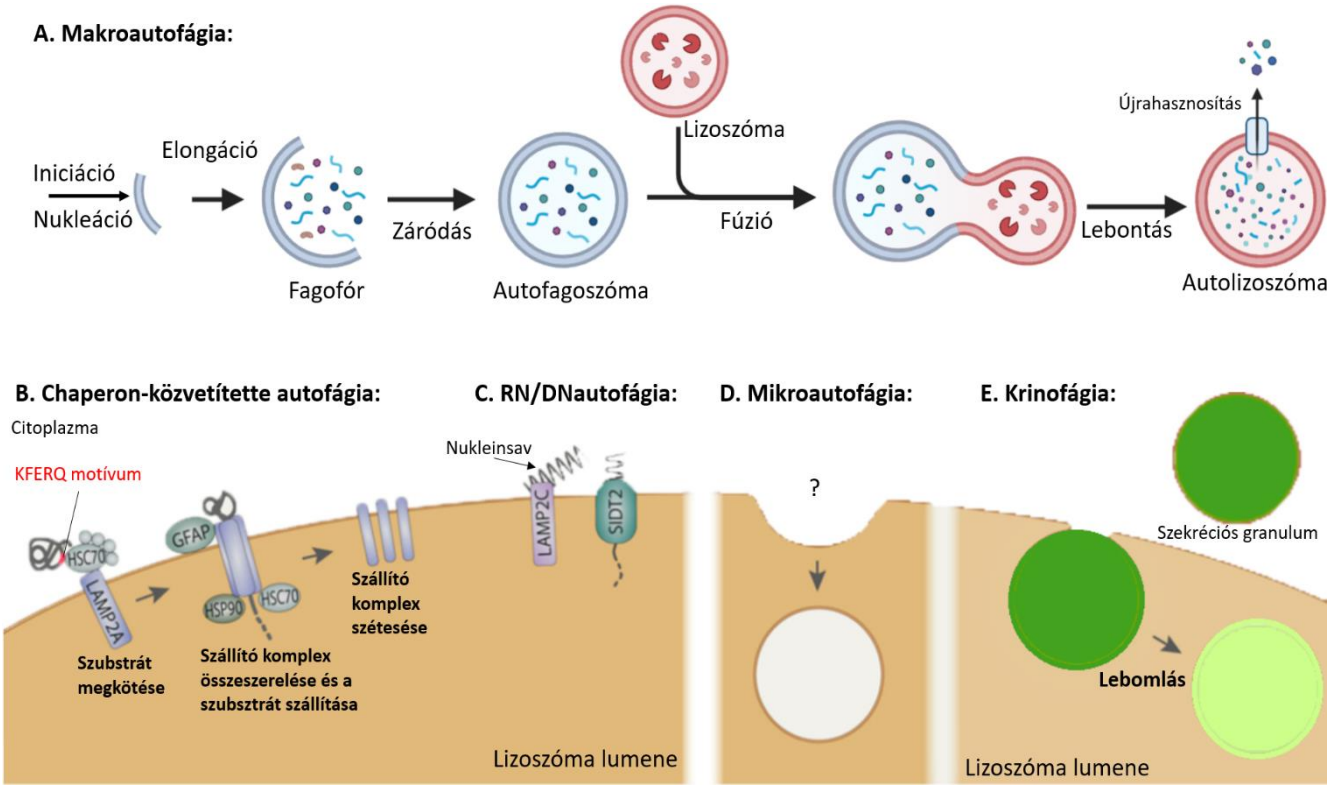
1.1.2.4 Mikroautofágia

Egy másik autofágia típus a mikroautofágia (**1. ábra D**), amelyet 50 éve írtak le (De Duve és Wattiaux 1966). A mikroautofágia során a lizoszóma membránja betüremkedik, közben magával ragadja a citoplazma egy részét. Végül a betüremkedés lefűződik a lizoszóma lumenébe és ott lebomlik annak tartalmával együtt. A jelenség még kevéssé ismert és a jelentősége is kisebb a makroautofágiánál, viszont a szelektív változata képes akár organellumok lebontására is. *Pichia pastoris*-ban leírták, hogy ha a táptalajban kicserélik a metanolt glükózra, az addig metanol bontására felhalmozódott peroxiszómákat felgyorsult mikroautofágia bontja le (Yuan, W., és mtsai, 1997). A folyamat továbbá részt vehet az ER, a mitokondrium, vagy akár a sejtmag egy részének lebontásában is (Yim és Mizushima 2020). Élesztőn végzett vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy a szabályozásában részt vesz az ESCRT komplex és a TORC1, azaz a makro- és mikroautofágia szabályozásában jelentős átfedés van (Oku és mtsai, 2017, Hatakeyama és mtsai, 2019).

1.1.2.5 Krinofágia

A krinofágia során a sejt által megtermelt, ám valamilyen oknál fogva kiürítésre nem kerülő, illetve elöregedett szekréciós granulumok fúzionálnak a lizoszómákkal (**1. ábra E**). A folyamat során egy autolizoszómához hasonló egyszeres membránnal határolt, vegyes eredetű és beltartalmú (az eredeti lizoszóma és szekréciós granulum membránja és beltartalma) képlet, a krinoszóma jön létre. A jelenség főleg az intenzív szekréciós tevékenységet folytató sejtekben (például endokrin sejtek) figyelhető meg, emiatt a jelenség orvostudományi potenciálja óriási.

Habár a jelenséget már fél évszázada leírták, de az ebben a folyamatban résztvevő különböző faktorokat csak mostanában kezdték megismerni (Csizmadia és mtsai, 2018).



1. ábra. Az autofágia különböző típusai. Az összes autofágia típusban közös, hogy a sejt saját anyagait juttatja be és bontja le a lizoszómában. A. A makroautofágia folyamata, benne az iniciáció, nukleáció, elongáció, záródás, fúzió és lebomlás szakasza. B. A chaperon-közvetítette autofágia során dajkafehérjék és a Lamp2A fehérjék együttműködve bontják le a hibás konformációjú fehérjéket. C. Az RN/DNautofágia során a sejt nukleinsavat bont le specifikusan. D. A mikroautofágia során a lizoszómán egy invaginació során jut be a citoplazma egy része a lizoszómába, a folyamat szabályozása ismeretlen. E. Krinofágia során a lizoszóma szekréciós granulumokat bont le (Mizushima, 2020 alapján a Biorender felhasználásával).

1.1.3 Szelektív autofágia és jelentősebb típusai

Míg a nem szelektív autofágia leginkább táplálékhiányra, esetleg egy egyedfejlődési jelzésre adott válasz és azzal jár, hogy a sejt a citoplazma egészét véletlenszerűen megemészti, addig a szelektív autofágia során a sejt célzott módon szabadul meg sérült, vagy fölösleges makromolekuláktól és sejtszervecskéktől. Ez tulajdonképpen a makroautofágia egyik változata. A szelektív autofágia során kulcsszerepet játszanak az úgynevezett autofágia receptor fehérjék, amelyek egyszerre képesek kötni a poliubikvitinnel jelölt lebontandó fehérjéket és a fagofór „dokkoló” képleteként szolgáló Atg8-at, így juttatva a későbbi autofagoszómába a lebontandó anyagokat (Gatica és mtsai, 2018). Bár az autofágia kutatás egyik legdinamikusabban fejlődő ágáról van szó, ebben a fejezetben csak a leginkább kutatott szelektív autofágia típusok emlős változatát ismertetem röviden.

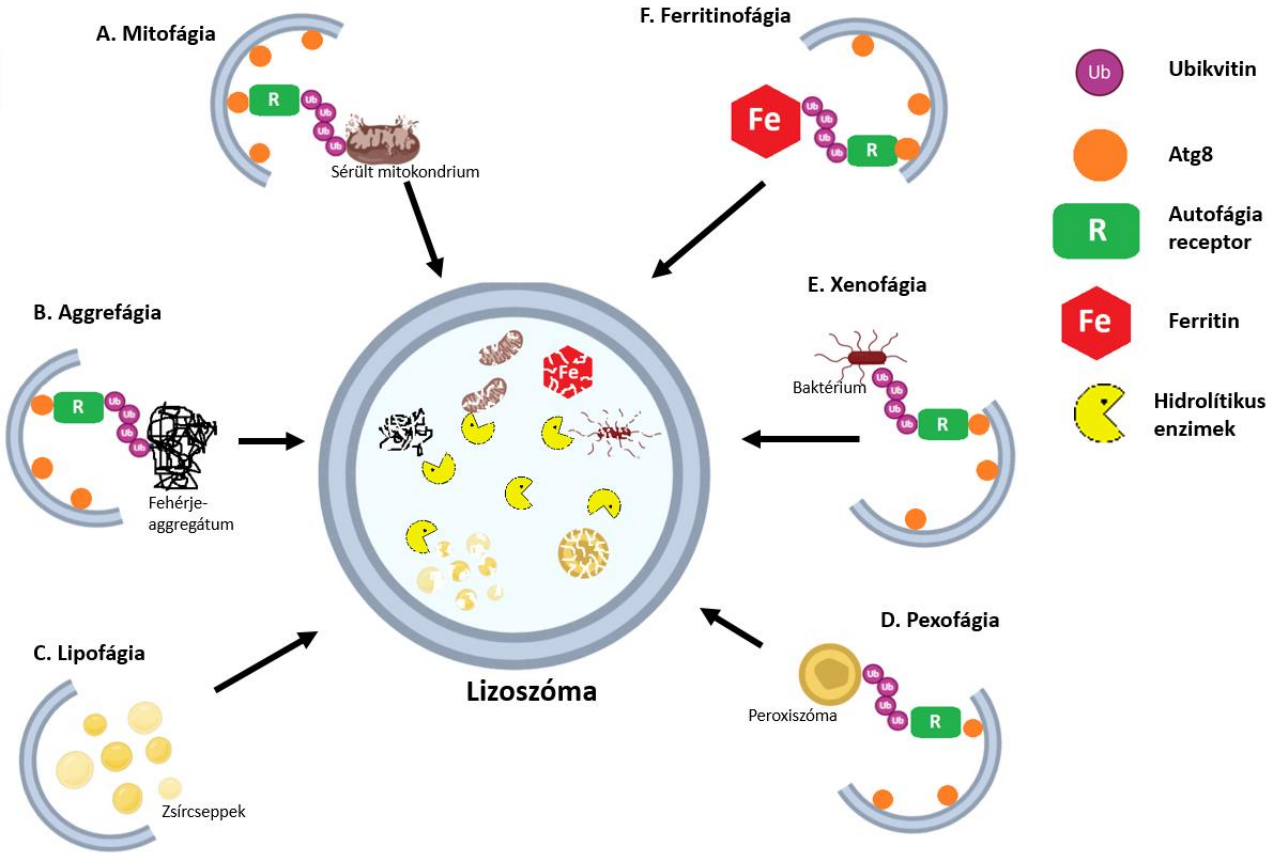
A **mitofágia** a legjobban jellemzett szelektív autofágia típus, amely felelős a hibás vagy fölösleges mitokondriumok lebontásáért, így biztosítva a sejt és/vagy szervezet metabolikus homeosztázisát, illetve amely megakadályoz számos idegrendszeri és mozgásszervi megbetegedést, valamint számos egyéb kór kialakulását (**2. ábra A**). A mitokondrium sérülése esetén, a leginkább ismert folyamat során, a PINK1 kináz aktiválódik és a mitokondrium külső membránjára köt, ahol foszforilálja többek között az ubikvitint és a Parkin E_3 ligázt (Narendra és mtsai, 2010). Az így aktivált Parkin foszforilált ubikvitin láncokat köt a mitokondrium külső membránján lévő szubsztrátjaira (Kondapalli és mtsai, 2012). Az így létrejött ubikvitin láncokat emlősökben számos autofágia receptor (p62, NBR1, OPTN, NDP52 és TAX1BP1) felismeri, és ezáltal a mitokondriumot a formálódó fagofórhoz horgonyozza (Wang és mtsai, 2019).

Aggrefágia az az autofág folyamat, amely során a fehérje-aggregátumokat a sejt szelektív módon begyűjti és lebontja (**2. ábra B**). Több aggregációra hajlamos fehérje, mint a β-amiloid (Pickford és mtsai, 2008), a mutáns HTT (Huntingtin) (Ravikumar és mtsai, 2004), az SNCA (synuclein alpha) (Winslow, és mtsai, 2010), a tau (Lopez és mtsai, 2017) képes lebomlani szelektív autofágia segítségével. Ezen fehérjék felhalmozódását kapcsolatba hozták számos neurodegeneratív megbetegedéssel, mint pl. az Alzheimer-kór, Parkinson-kór és a Huntington-kór (Bhattacharjee és mtsai, 2019). A folyamat mechanizmusa hasonló az általános szelektív autofágiához, a lebontandó aggregátumok ubikvitinálódnak, amit egy receptor (emlősben főleg SQSTM1, NBR1, OPTN) összeköt a fagofóron lévő valamelyik Atg8 homológgal (Gatica és mtsai, 2018).

Lipofágia a zsírcseppek szelektív lebontását jelenti (**2. ábra C**). A folyamatnak jelentős szerepe van az éhezési stressz leküzdésében a sejt triglicerid homeosztázisának fenntartásával (Singh és mtsai, 2009). Érdekes módon a zsírtesteket körbevevő perilipin fehérjéket a chaperon közvetítette autofágia (CMA) képes lebontani, ami felgyorsítja a lipofágiát, habár specifikus receptora nincs a folyamatnak (Kaushik és mtsai, 2015).

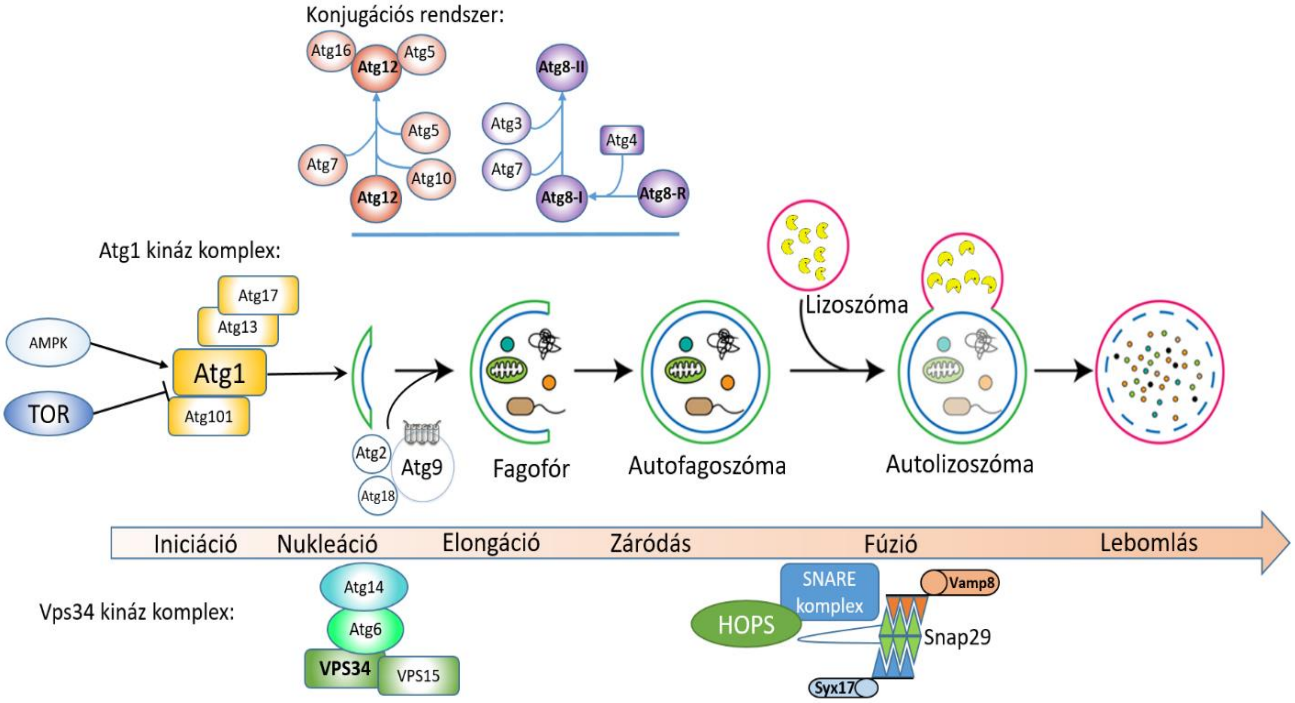
A **pexofágia** a peroxiszómák szelektív autofágiás lebontását jelenti (**2. ábra D**). A folyamat során egy PEX2 nevű E3 enzim monoubikvitilálja a PEX5-öt, amelyet így felismer az SQSTM1 és az NBR1 receptor, amely a fagofórhoz köti a sejtszervecskét (Zhang és mtsai, 2015).

Továbbá még érdemes megemlíteni a **xenofágiát** (**2. ábra E**), ami az intracelluláris patogének lebontásában játszik szerepet. A **nukleofágia** során a sejtmag egy része, **lizofágia** során a lizoszóma bomlik le. Számos molekula képes szelektív autofágia során lebomlani, talán az egyik legérdekesebb a vaskötő funkcióval rendelkező ferritin, amely a **ferritinofágia** (**2. ábra F**) folyamata során bomlik le az NCOA4 receptor közvetítésével, így biztosítva a sejt vashiányának a pótlását (Gatica és mtsai, 2018).



2. ábra. A szelektív autofágia kiemelt típusai. A szelektív autofágia legtöbb típusában az a közös, hogy a lebontandó szubsztráton lévő poliubikvitint egy autofágia receptor köti össze a fagofóron lévő Atg8-cal (Gatica és mtsai, 2018 alapján, a Biorender felhasználásával).

1.1.4 Az autofágia szabályozása



3. ábra. Az autofágiát befolyásoló legfontosabb fehérje komplexek. Az autofágia legfontosabb szabályozó fehérjéi komplexekbe tömörülnek. Ezek közül a legjelentősebbek a TOR kináz komplex, Atg1 kináz komplex, Vp34 kináz komplex, reciklizáló komplex, konjugációs komplex és a lizoszóma autofagoszóma fúzióját segítő HOPS és SNARE komplexek. Készült Nakamura és Yoshimori 2018, valamint Hansen és mtsai, 2018 alapján.

1.1.4.1 TOR kináz komplex és az AMPK

A sejt anyagcsere homeosztázisának fenntartásában számos külső és belső szabályozó faktor vesz részt, de ezen jelzéseket egy kulcsszereplő integrálja, majd ad rá választ, ez a TOR kináz komplex. Tápanyag bőségben (alacsony AMP szint, lizoszómák magas szabad aminosav-szintje, növekedési faktorok [például inzulin] aktiválta szignalizációs útvonalak) a TOR kináz komplex a sejt építő folyamatait serkenti, például a fehérjék, lipidek és nukleotidok szintézisét, sejtnövekedést, sejtosztódást, valamint visszafogja a lebontási folyamatokat, például az autofágiát. A TOR egy szerin-treonin kináz, amely az autofágiát úgy szabályozza, hogy elsősorban az Atg1-et és az Atg13-at foszforilálja (**3. ábra**), amelyek ebben az esetben gátló jellegű poszt-transzlációs módosítások. Táplálék szűkében a TOR nem foszforilálja az Atg1-et és az Atg13-at, ezek defoszforilálódása aktiválja az autofágiát (Lane és mtsai, 2017).

Az AMPK-t (AMP aktivált protein kináz) a sejt ATP készleteinek a kimerülése aktiválja és az anabolikus folyamatokat gátolják, ezáltal a TOR komplexel ellentétes a működése. Az AMKPK aktiválja az autofágiát az Atg1 kináz foszforilálásával (Egan és mtsai, 2011).

1.1.4.2 Atg1 iniciációs komplex

Az autofágiát befolyásoló kulcsgének sokáig ismeretlenek voltak. A téma első nagy áttörését az hozta, hogy Yoshinori Ohsumi a tudomány első közel teljes genomot érintő mutagenezis szűrése során azonosított 15 autofágiához kapcsolható (Atg) gént élesztőben, ami akkoriban még nem váltott ki jelentős érdeklődést (Tsukada és Ohsumi, 1993). Bár korában ez nem volt egy jelentős közlemény, később ezen publikációja jelentősen hozzájárult a 2016-ban odaítélt Nobel-díjához.

Ma már tudjuk, hogy az Atg gének fehérjetermékei komplexekbe tömörülve töltik be a funkcióikat. Az autofágia **iniciációjáért** az Atg1 komplex felel, ez a komplex van legelöl az Atg fehérjék hierarchiájában. Az Atg1 (emlősökben ULK1/2) egy szerin-treonin kináz. A komplex többi tagja ecetmuslicában az Atg13, a FIP200 és az Atg101 (**3. ábra**). A komplex legfőbb feladata, hogy a főleg TOR felől érkező jelek alapján elindítják az autofágiát, odatoborozva és aktiválva az autofágiáért felelős fehérjéket (Ganley és mtsai, 2009). Az Atg1 kináz egyik legfontosabb szubsztrátja az Atg6, ami az autofágia következő lépésében játszik aktiváló szerepet (Nazarko és Zhong, 2013).

1.1.4.3 Vps34 lipid kináz komplex

A **nukleáció** során elindul a fagofór képződése, amely folyamatért a Vps34-komplex felel (**3. ábra**), amelynek tagjai: Atg14, Atg6 (emlősökben Beclin 1), Vps15 és Vps34 (Juhász és mtsai, 2008). A Vps34 egy III-as típusú PI3-kináz, amely a foszfatidil-inozitolt az inozitol harmadik szénatomjához kapcsolódó hidroxilcsoportot foszforilálva foszfatidil-inozitol-3-foszfátot (PI3P) hoz létre. Ez a membránon jelként funkcionál az izoláló membrán képződéséhez. A komplex tagja az állványfehérjeként is funkcionáló Atg6/Beclin-1 és Vps15, előbbi fontos szerepet játszik a komplex összeszerelésében és aktiválásában, míg az utóbbi rendelkezik egy olyan lipidhorgonnyal, amely a komplexet membránhoz képes rögzíteni (Cao és Klionsky 2007). Az Atg14 felel a komplex fagofór specifikusságáért. Érdemes megemlíteni, hogy ha ez a komplex Atg14 helyett UVRAG-ot tartalmaz, akkor elsősorban endocitotikus membránokra lesz specifikus (Itakura és mtsai, 2008 és Hegedűs és mtsai, 2016).

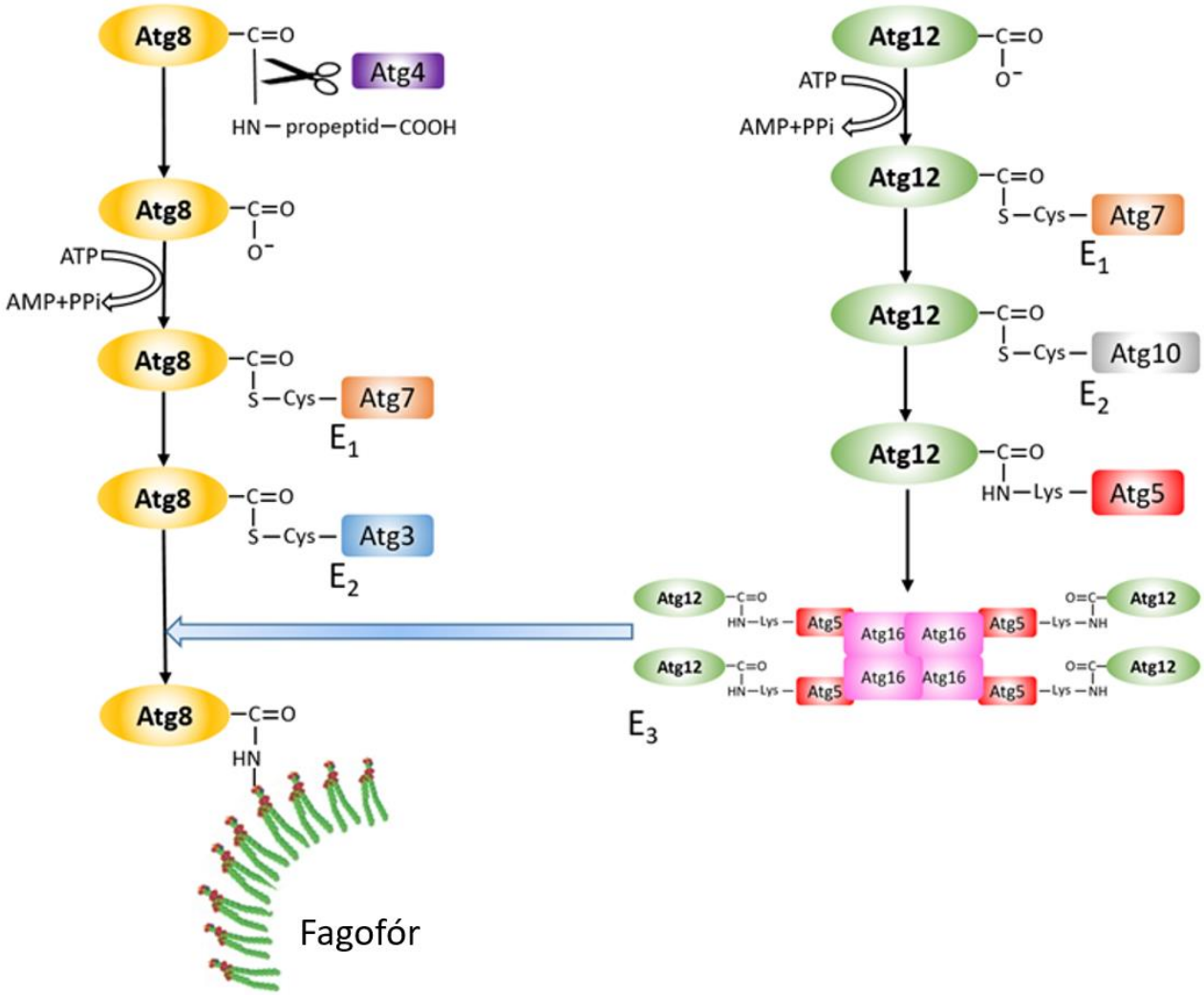
1.1.4.4 Atg9 vezikulák és az Atg2-Atg18 komplex

Az Atg9 az egyetlen transzmembrán fehérje az Atg gének között, a fagofór növekedése során a membránok szállításáért és **reciklizálásáért** felel. Indukált autofágia hiányában emlős sejtvonalakban azt figyelték meg, hogy az Atg9 pozitív vezikulák az ER, transz-Golgi, korai és újrahasznosuló endoszómák közelében fordulnak elő (Yamamoto és mtsai, 2012, Bento és mtsai, 2016). Az utóbbi időkben többféle modell is megjelent azzal kapcsolatban, hogy honnan

származik a lipid forrás az autofágiához, illetve milyen effektorok járulnak hozzá az Atg9 pozitív vezikulák mozgatásához. A legáltalánosabb elfogadott elképzelés az, hogy ezt a funkciót az Atg2 és az Atg18 (emlősökben WIPI) alkotta komplex tölti be (**3. ábra**), amely rendelkezik PI(3)P kötő képességgel (Bento és mtsai, 2016). Az Atg2-ről nemrég kiderült, hogy szerepet játszik a lipid transzport funkcióban, mivel képez egy csövet, amin át foszfolipid-acil láncokat szállíthat az ER és a fagofór között (Osawa és mtsai, 2019). A jelenség megértését tovább nehezíti, hogy az Atg9 rendelkezik autofágiától független szereppel is. Egy nemrég megjelent cikkünkben kimutattuk ecetmuslicákban, hogy az Atg9 szerepet játszik a kortikális aktin hálózat kialakításában, valószínűleg horgonyzási pontként funkcionálva (Kiss és mtsai, 2019).

1.1.4.5 Atg8 konjugációs komplex

A legtöbb komponenssel rendelkező komplex a fagofór **elongációjában** (**3. ábra**) játszik szerepet. Tulajdonképpen két ubikvitin-szerű fehérje, az Atg8 és az Atg12 ubikvitinálásával analóg folyamat zajlik le (**4. ábra**), (Ichimura és mtsai, 2000). Ebben a folyamatban az Atg12 ubikvitin-szerű fehérjét ATP-függő módon az Atg7 E_1-szerű enzime aktiválja, amelynek eredményeképpen az Atg12 utolsó glicinjén keresztül tiolészter kötést alakít ki először az Atg7-el, majd az Atg10-el, ami egy E2-szerű enzim. Végül az Atg12 az Atg5 akceptor lizin aminosav gyökre konjugálódik egy izopeptid kötésen keresztül (Ohsumi és Mizushima 2004). Ehhez a dimerhez az Atg16 a C-terminális régióján keresztül az Atg5 N-terminális régiójához kötődik és ebből a három fehérjéből kialakult egység tovább multimerizálódhat. Az Atg16-nak főleg a komplex fagofórhoz való lokalizálásában van szerepe, magának a komplexnek pedig E_3-szerű funkciója van a következő lépésben (Hanada és mtsai, 2007, Fujita és mtsai, 2008). A komplex másik ubikvitin-szerű fehérjéje, az Atg8, előalakként transzlálódik. C-terminális, glicin utáni régióját az Atg4 cisztein endoproteáz hasítja le (Sánchez-Wandelmer és mtsai, 2017). Ezt a poszt-transzlációs módosításon átesett Atg8-at szintén az Atg7 E_1 funkciójú enzim aktiválja, de ez esetben E_2 funkciójú enzimként az Atg3 szolgál. Az E_3-szerű funkcióval rendelkező Atg12-Atg5~Atg16 komplex az Atg8-at a fagofór egyik foszfatidiletanolamin feji részére konjugálja, ezért ezt a folyamatot az Atg8 lipidációjának is hívják (Hanada és mtsai, 2007). Az Atg4 képes dekonjugálni is az Atg8-at az autofagoszómáról. Bizonyos egysejtű eukariótákban, mint a *Plasmodium*-ban, vagy a *Toxoplasma*-ban leírták, hogy az Atg5 és Atg12 fehérjék nem kötődnek kovalens módon, de az így kialakult Atg5~Atg12 komplex képes az Atg8 lipidálására. Ezen fajokból rendszerint hiányzik az Atg10 enzim és/vagy az Atg12 C-terminális glicinje (Pang és mtsai, 2019).



4. ábra. Az Atg8 konjugációs rendszer. Az autofágiában két ubikvitin-szerű fehérje van, az Atg12 és az Atg8, amelyek ubikvitinálással analóg módon konjugálódnak. Az Atg12 az Atg5-re konjugálódik és az Atg16 segítségével oligomerizálódik egy olyan komplexé, amely katalizálja a poszttranszlációs aktiváláson átesett Atg8 fehérje lipidációját a fagofór foszfatidiletanolamin lipidjére (Lane és Nakatogawa, 2013).

1.1.4.6 Autofagoszóma-lizoszóma fúzió faktorai

A fagofór záródása után a kialakult autofagoszóma a lizoszómával **fúzionál** (**3. ábra**). Mivel mindkét vezikula meglehetősen stabil, ezért a két vezikula fúziójához szükséges energiát a SNARE fehérjék biztosítják. A lizoszómák és az autofagoszómák fúziójáért két SNARE komplex felel: Syx17-Snap29-Vamp7/Vamp8 (Itakura és mtsai, 2012, Takáts és mtsai, 2013), vagy a Syx17-Snap29-Ykt6 (Takáts és mtsai, 2018) felel. A SNARE komplexek kialakításában jelentős segítséget nyújtanak a pányvázó faktorok, azáltal, hogy közelebb húzzák a két vezikulát. Az egyik ilyen nagyon fontos faktor a HOPS komplex, amely egyrészt köti a lizoszómális kis GTPáz fehérje Arl8b^{GTP}-t, másrészt az autofagoszóma membránján található Syx17-hez is kötődik (Jiang és mtsai, 2014). A membránnal burkolt sejt kompartimentumok

identitását különböző GTP aktivált kis GTPáz Rab-ok és Arl-ok membránhoz kötődése adja. Az autofagoszóma lizoszóma fúzió során ezekhez a Rab-okhoz különböző Rab-effektorok kötődnek, mint motorfehérjék (kinezinek, dinein), illetve azok adaptorai (PLEKHM1), HOPS komplex tagjai, de befolyásolják a SNARE komplexek működését is (Lőrincz, és Juhász, 2019). Az autofagoszóma-lizoszóma fúzió során leginkább az Arl8, Rab7 és a Rab2 játszanak fontos szerepet a Rab-ok közül (Hegedűs és mtsai, 2016, Lőrincz és mtsai, 2017).

1.1.4.7 Atg8 homológok és szerepeik

Amíg a *Saccharomyces cerevisiae*-ben és számos egysejtű eukariótában mindössze egy Atg8 homológ van, addig a többsejtű eukariótákban rendszerint több Atg8 homológ is megtalálható (**1. táblázat**). Emlősökben két csoportra oszthatóak az Atg8 fehérjék: az LC3-akra és a GABARAP-okra. Filogenetikai elemzések azt bizonyítják, hogy a *Saccharomyces cerevisiae* Atg8 fehérjéje sokkal közelebb áll az emlősök GABARAP homológjához, habár az N-terminális része hasonlóan nyitott konformációjú, mint az emlős LC3 N-terminális vége (Mizushima, 2020).

Emberben hét Atg8 homológot írtak le. Olyan sejtvonalakban, ahol mind a hat gént kiütötték CRISPR/Cas9 módszerrel, LC3 vagy GABARAP ektopikus kifejezésével az Atg8 KO sejtvonal fenotípusai menekíthetők (Wirth és mtsai, 2019). Annak ellenére, hogy az LC3 és a GABARAP is alapvetően autofágiában játszik szerepet, mégis úgy tűnik, hogy vannak árnyalatbeli különbségek a funkcióikat tekintve. Több Atg8 homológ kiütésével járó kísérletek során kimutatták, hogy a GABARAP-ok fontosabb szerepet játszanak a tömeges, leginkább valamely indukált, nem szelektív autofágiában, mint a szelektív autofágiában, utóbbiban az LC3-aknak van jelentősebb szerepe (Szalai és mtsai, 2015). A GABARAP-ról úgy vélik, hogy fontosabb szerepük van a pányvázásban és az autofagoszóma-lizoszóma fúzióban, mint az LC3-nak (Landajuela és mtsai, 2016). Ezek arra utalnak, hogy a GABARAP alcsalád tagjai sokkal jelentősebb szerepet töltenek be az autofágiában, mint az LC3 alcsalád.

Az Atg8 homológoknak jelentős szerepük van a fagofór elongációjában, a lebontandó szubsztrát megkötésében (lásd még az 1.1.3), az autofagoszóma záródásában, az autofagoszómák mozgatásában a PLEKHM-en keresztül, valamint az autofagoszóma lizoszóma egyesülésében, pányvázásában és a fúziójában játszik szerepet (Mizushima, 2020). Ezt a nagyfokú pleiotrópiát, legalább részben, azzal lehet magyarázni, hogy az Atg8 fehérjéknek van egy konzerválódott motívumuk, amelyek képesek kötni a LIR motívummal rendelkező, meglehetősen nagy változatosságot mutató fehérjékhez (Gatica és mtsai, 2018).

Ezen kívül az Atg8 számos, autofágiával szorosan nem összekapcsolható folyamatban vesz részt, rendszerint egyrétegű lipid vezikulákon, habár az Atg8 ezen funkciói még kevéssé ismertek. Fagocitózis során a sejt membránja körbevesz valamilyen partikulumot és lefűzi egy intracelluláris vezikulumba a fagofórt. Ezt az egyrétegű lipiddel ellátott képletet esetenként Atg8 borítja be (Sanjuan és mtsai, 2007). Ezt a folyamatot hívják LC3-asszociált fagocitózisnak (LAP). Érdekes módon ezen folyamat igényli az Atg konjugációs komplex tagjait, valamint a Vps34 lipid kináz komplex bizonyos tagjait, de nem igényli az Atg14-et, Atg18 (WIPI2)-t és az Atg1 kináz komplexet (Martinez és mtsai, 2011, 2015). Azonban a folyamathoz szükséges a Rubicon (mint Atg6-al együttműködő fehérje) és a reaktív oxigéngyökök képzéséért felelős NADPH oxidáz (Martinez és mtsai, 2015).

Az Atg8 lipidálatlan formáját számos vezikulán megfigyelték már. Az ER-kapcsolt lebontási (ERAD) útvonal során fontos szerepet játszó EDEMoszómákon figyeltek meg lipidálatlan Atg8-at (Liu és mtsai, 2018). Az Atg8 homológok ezen kívül jelen lehetnek szekréciós vezikulákon, vagy virális replikációs vezikulákon is (Lystad és Simonsen, 2019).

1. Táblázat. Atg8 homológok a különböző eukarióta fajokban.

Élesztő	*C. elegans*	Ecetmuslica	Lúdfű	Ember
Atg8	***LGG-1***	***Atg8a***	***Atg8A***	***LC3A***
-	***LGG-2***	***Atg8b***	***Atg8B***	***LC3B***
-	-	-	***Atg8C***	***LC3B2***
-	-	-	***Atg8D***	***LC3C***
-	-	-	***Atg8E***	***GABARAP***
-	-	-	***Atg8F***	***GABARAPL1***
-	-	-	***Atg8G***	***GABARAPL2***
-	-	-	***Atg8H***	-
-	-	-	***Atg8I***	-

Évek óta ismert, hogy az Atg8 homológok hajlamosak a sejtmagban jelentősen felhalmozódni, bár ennek nem volt ismert a funkciója. Ecetmuslicában sikerült bebizonyítani, hogy az Atg8a LIR motívumán keresztül képes kötni a Sequoia nevű transzkripciós faktort. Kimutatták, hogy a Sequoia visszafogja az autofágiát az *Atg* gének kifejezésének gátlásával. A felfedezésnek abban van a jelentősége, hogy betekintést ad az éhezés-indukálta autofágia szabályozásában. Az Atg8a kölcsönhat az YL-1-el, amely része egyik sejtmagi acetiltranszferáz

komplexnek és acetilálja az Atg8a-t táplálékbőségben. Éhezés esetén a Sir2 deacetilálja az Atg8a-t, ami így képes kötni a Sequoia-hoz, amely így gátlás alá kerül, így nem képes csökkenteni az Atg fehérjék kifejezését (Jacomin és mtsai, 2020). Ez az újonnan leírt folyamat arra enged következtetni, hogy az Atg8-nak az autofágia szabályozásában egyaránt funkcionál effektorként és felülről szabályozó faktorként.

1.1.5 Az autofágia fiziológiás és patológiás jelentősége

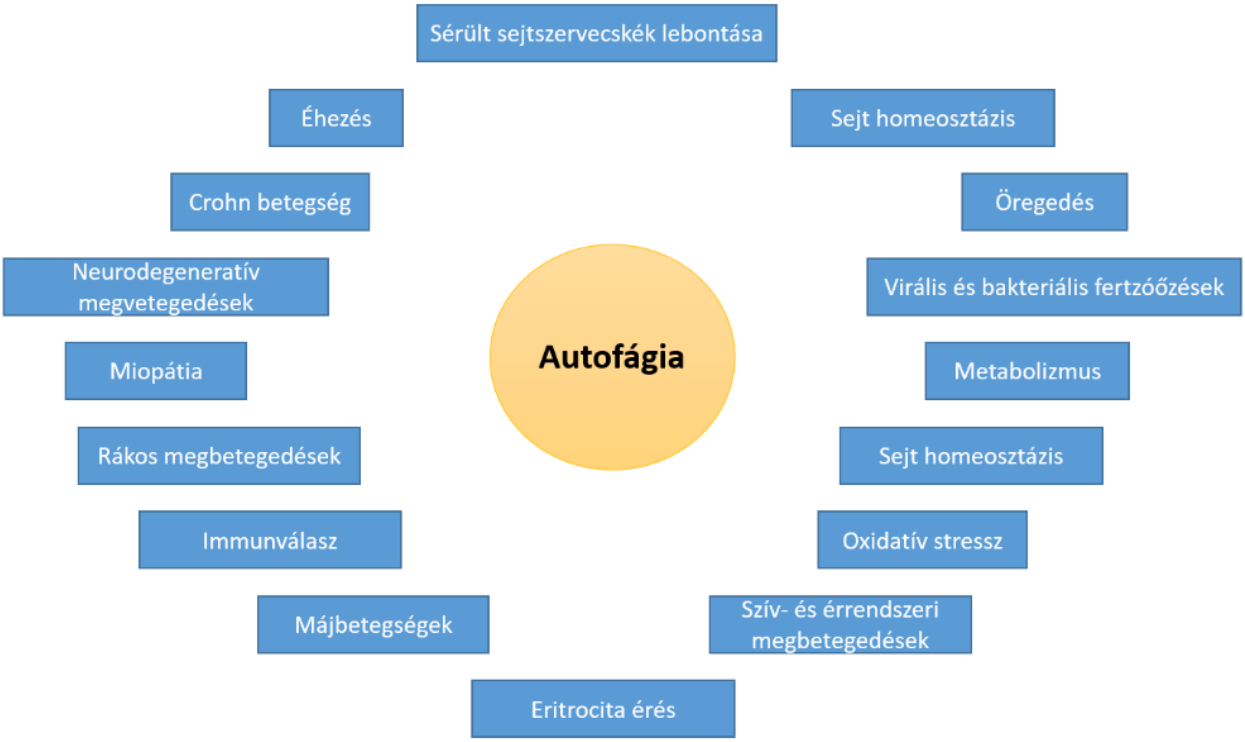
Az autofágia legjobban jellemzett funkciója a táplálékhiányból adódó sejtszintű stressz leküzdésére adott válasz. Mivel autofágia során lebomolhatnak a sérült, illetve fölösleges fehérjék és makromolekulák, az autofágia jelentősen hozzájárul a sejt megújuló képességéhez, illetve az élethossz növekedéshez. A különböző fajoknál és a többsejtű élőlényeknél különböző sejttípusoknál eltérő az autofágia jelentősége és funkciója. Ebben a fejezetben az autofágiát néhány orvosbiológiai vonatkozásában mutatom be.

Az idegsejtek rendkívül hosszú életűek és osztódással történő megújulásuk komoly korlátokba ütközik, ezért a homeosztázisuk fenntartásában fokozottan fontos szerepet tölt be az autofágia. Számos kutatás igazolta már, hogy az autofágia gátlása az agyban jelentősen hozzájárul a fehérje aggregátumok keletkezéséhez vezet, ezért az autofágia a jellemzően időskori neurodegeneratív megbetegedések gátlásához. Az autofágiának ezen felül jelentős szerepe van az idegrendszer fejlődésében és a szinapszisok kialakulásában is (Kulkarni és mtsai, 2018). *Atg5* null újszülött egerek nem életképesek, de az Atg5 transzgén neuron-specifikus kifejeztetése menekíti a mutánst, ami szintén hangsúlyozza, hogy az autofágia nélkülözhetetlen szerepet tölt be az idegrendszerben az emlősök esetén (Yoshii és mtsai, 2016).

Az autofágia a tumorokkal szemben kétélű kardként viselkedik. Egyrészt az autofágia proteosztázisban betöltött szerepe, valamint az indukált autofágia erős proapoptótikus hatása miatt kifejezetten tumorellenes hatása van (Notte és mtsai, 2011). Ugyanakkor az autofágia a tumoros sejtekben hozzájárul a jellegzetesen gyors sejtnövekedés és osztódás okozta nagy energia és anyagigényhez is. Ez fokozottan igaz a kisméretű, saját erek nélküli tumorok és az áttéteket képező sejtek túlélésére (White 2012).

Az autofágia számos módon járul hozzá az emlősök hím fertilitásához. Az emlős spermatogenézis során autofágia útján bomlik le a PDLIM1, amelynek hiánya az úgynevezett negatív citoszkeleton lebontását teszi lehetővé. Autofágia nélkül jelentős citoszkeleton fölösleg halmozódik fel, ami a spermiumok mozgásképességét csökkenti (Shang és mtsai, 2016). Az akroszóma a spermiumok feji részén található speciális sejtszervecske és a megtermékenyítéséhez biztosítja azokat az enzimeket (hialuronidáz és akrozin) amelyek a

petesejtet burkoló zona pellucida feloldásához szükségesek. Az akroszóma kialakulásában a konjugációs rendszer létfontosságú (Wang és mtsai, 2014). A közvetlen spermatogenezisen felül az autofágia szerepet játszik a Leydig-sejtekben a tesztoszteron szintéziséhez szükséges koleszterin biztosításában (Gao és mtsai, 2018).



5. ábra. Az autofágiához kapcsolódó fiziológiás és patológiás jelenségek. Az autofágia és a hozzá kötődő számos folyamat zavara több megbetegedésnek lehet a forrása, ezért az autofágia egyike lett a legjelentősebb orvosbiológiai jelentőségű kutatási témáknak (Zappavigna és mtsai, 2013 alapján).

Az autofágia folyamatának számos egyéb orvosbiológiai jelentősége van még, ezeket az **5. ábrán** foglaltam össze, ezenk kívül az 1.1.3-as fejezetben már az autofágia több fiziológiás és patológiás szerepéről is említést tettem. Emberben viszonylag ritka az Atg gének okozta örökletes megbetegedés. Ez részben azért van, mert az Atg gének kiütése komoly fejlődési rendellenességeket okoz, valamint heterozigóta genotípusú emberek nem mutatnak kóros elváltozásokat, továbbá emlősökben gyakori, hogy az Atg géneknél jelentős a redundancia (eklatáns példa a hét kópiában jelen lévő humán Atg8 homológok). Azonban pár esetben leírtak misszenz mutációtól szenvedő betegeket is. Az egyik ilyen esetben egy török rokonházasságból született testvérpárnál veleszületett ataxiát figyeltek meg, amelyet egy homozigóta *Atg5* misszenz mutáció okozott. A mutáció az Atg5 és az Atg12 közötti kötődést gyengítette és ezáltal csökkentette az autofágia mértékét, amit élesztőben és humán sejtvonalakban is igazoltak. Végül ecetmuslica modellen igazoltuk, hogy ez a mutáció csökkenti a mozgásképességet, azaz valószínűsíthető, hogy magát az ataxiát is az Atg5 misszensz mutációja

okozta (Kim és mtsai, 2016). Egy másik esetben a WIPI2 (humán Atg18 homológ) misszensz mutációja okozott súlyos idegrendszeri és csontfejlődési rendellenességeket egy pakisztáni férfinál. Ebben az esetben úgy vélik, hogy az okozza kóros állapotot, hogy a mutáció gátolja az Atg18 és az Atg16 kölcsönhatását (Jelani és mtsai, 2019).

2. Célkitűzések

Az autofágia egy intracelluláris lebontó folyamat, amely nagyfokú konzerváltságot mutat az eukarióta élőlények között. A folyamat jelentősége az elmúlt 30 évben rendkívüli módon megnőtt a nagyfokú orvosbiológiai potenciálja miatt, amit jól jelez, hogy 2016-ban a témában komoly eredményeket elérő Ohsumi Yoshinori kapta a fiziológiai és orvostudományi Nobel-díjat. Kutatócsoportunk főleg az autofágiában szerepet játszó gének azonosításán és szerepeinek tisztázásán dolgozik.

Az autofágiát vizsgáló munkánk során főleg az ecetmuslincát, a *Drosophila melanogaster*-t használtuk, amely kiváló modell az autofágia vizsgálatában is. Könnyű tarthatósága, a mindenki számára elérhető kimeríthetetlen genetikai eszköztára mellett a *Drosophila melanogaster* genomjában a redundancia alacsony mértékű. Az autofágia központi génjei az *Atg* gének, amelyek fehérjetermékei általában komplexekbe tömörülve látják el a funkcióikat. A genetikai redundancia alacsony volta kifejezetten jellemző a Atg8 génekre, amelyekből a *Drosophila melanogaster*-ben kettő, míg az emberben hét homológ is van. Az Atg génekre egyre inkább erősen pleiotróp génekként tekintünk, ami az Atg8 homológokat fokozottan jellemzi. Ezek a gének szerepet játszanak fagofór növekedésében, a szelektív autofágiában, az autofagoszóma-lizoszóma fúzióban, de olyan nem autofág folyamatban is, mint a LAP (LC3-associated phagocytosis). Továbbá rendkívül fontos az autofágia vizsgálata szempontjából is, hiszen számos autofágia vizsgálatot alapoznak arra, hogy az Atg8 kovalens módon kötődik az autofág struktúrákhoz, ezért számos autofágia vizsgálatot alapoznak rá.

Ennek ellenére maguk az Atg8 homológok *Drosophila melanogaster*-ben még viszonylag ismeretlenek, amelynek egyik fő oka, hogy erősen eszközhiányos a kutatásuk. Az egyik ilyen gén az *Atg8a*, amelyről pár éve kiderült, hogy van két plusz izoformája a transzkript szintjén, amelyeket nem érintenek a jelenleg használt allélok, azaz valószínűleg csak erős hipomorf allélokkal rendelkezünk. A másik homológ az *Atg8b,* amely az *Atg8a*-hoz képest nem mutat általános expressziót, főleg a herékben mutat kifejeződést. Az *Atg8b* génre nagyon kevés igazán megbízható eszköz áll rendelkezésünkre. Számos esetben használtak a gén csendesítéséhez RNS interferenciát okozó transzgéneket olyan szövetekben, ahol ez a gén nem mutat endogén kifejeződést, mégis okoz valamilyen fenotípust (Singh és mtsai, 2018), ami arra utal, hogy az *Atg8b*-re tervezett mesterséges mikroRNS-t kifejező konstrukció felismeri az *Atg8a* homológot is. Egy másik megközelítés során hősokk promoteres konstrukcióval fejeztettek ki ektopikusan Atg8b-t (Scott és mtsai, 2004). Ellenben az Atg8b funkciójáról nincsenek megbízható adatok a szakirodalomban, ráadásul sem hipomorf, sem null allélt nem

készítettek még eddig a génre. Ezért csoportunk célul tűzte ki, hogy jobban megismeri ezt a két gént. Ezen célok eléréséhez a következő lépéseket terveztük:

1. Egy rovar Atg8 gén-fajfa szerkesztése, amelyből pontosabb információkat nyerhetünk a rovar Atg8 homológok evolúciójáról.
2. CRISPR/Cas9 és inszerciós módszerekkel null allélok készítése az *Atg8b* és az *Atg8a* génekre, valamint egy lipidációra képtelen csonkolt allél létrehozása az Atg8a génre.
3. Különböző transzgénikus vonalak létrehozása az *Atg8a* és *Atg8b* génekre, amelyekkel menekíteni lehet a különböző allélokat, valamint követni lehet a kifejeződési mintázataikat is.
4. Az új allélok vizsgálata biokémiai és immunhisztokémiai módszerekkel, hogy megismerjük ezen gének autofágiában betöltött szerepét.
5. Az Atg8 gének vizsgálata az egyedfejlődésben az új allélok felhasználásával.
6. Az *Atg8a* és az *Atg8b* gének kifejeződési mintázatának az összehasonlítása és vizsgálata.
7. Az *Atg8b* és egyéb Atg gének fenotípusának a vizsgálata a hímivarsejtek képződésében és a fertilitásban.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Felhasznált *Drosophila melanogaster* törzsek

A munkám során felhasznált törzseket standard agar és kukoricadara alapú táptalajon tartottam. A munkámban közvetlenül felhasznált *Drosophila melanogaster* törzsekkel 25°C-on dolgoztam, beleértve a keresztezéseket és a minta előkészítési munkálatokat is. Az éppen kísérletben részt nem vevő törzseket 18°C-on tároltam. A keresztezések során felhasznált balanszer kromoszómákat és markermutációit hordozó vonalakat az **2. táblázatban** foglaltam össze. Pontos leírásuk a FlyBase (https://flybase.org/) oldalon lehet megtalálni.

2. táblázat: A kísérleteim során felhasznált balanszer kromoszómák

Ballanszer típusa	Érintett kromoszóma	Domináns markermutáció	Fenotípusa
FM7, GFP	X. (első) kromoszóma	Bar (B), GFP	Vese alakú szemek
CyO, SM6	2. kromoszóma	Curly (Cy), GFP	Felfelé kunkorodó szárny
TM3	3. kromoszóma	Stubble (Sb)	Rövid szőrzet
TM6	3. kromoszóma	Humeral (Hu), Tubby (Tb)	3-5-ször a tor oldalán, rövid zömök test

A kísérleteim során a következő törzseket használtam föl: *Atg8a*$^{TRO\text{-}GAL4}$, *Atg8a*^{G116*}, Atg8b^{16}, *Atg8b>3xeGFP-Atg8b*, *Atg8b>3xHA-Atg8b*, *Atg8a>3xHA-Atg8b*, *Atg8b>3xHA-Atg8b*$^{\Delta G}$*-Flag* (ezeknek a leírása megtalálható a dolgozatban), *Atg7*$^{14/77}$ (Juhász és mtsai, 2007), *Atg101*$^{\Delta 6h}$ (Guo és mtsai, 2019), *Atg9*^{B5} (Kiss és mtsai, 2019), *Atg5*^{5CC5}, *Atg16*$^{\Delta 67}$ (Varga és mtsai, 2016), Lamp1-3xmCherry (Hegedűs és mtsai, 2016), *tubulin>GFP*-Ref(2)P (Hegedűs és mtsai, 2016), *3xmCherry-Atg8a* (Hegedűs és mtsai, 2016), Atg18-Cherry (Nagy és mtsai), Glue-Red (Csizmadia és mtsai, 2018), vasa-mKate (nincs leközölve, Erdélyi Miklós csoportjától származik), *Atg8a*^{MI13726}, *lox2-attB2-SA-T2A-Gal4-Hsp70; Dr/TM3 Sb Cre vas-int.Dm, UAS-2xeGFP, C784-Gal4, Act5C-Cas9.P.RFP, DNAlig4*^{169}, *Act5C-Cas9* (az összes törzs a Bloomington Drosophila törzsgyűjteményből lett rendelve), *DJ-GFP* (Santel és mtsai, 1998), *vasa-GFP* (Siddall és mtsai, 2017).

3.2 Fertilitási tesztek

A fertilitási teszt során minden genotípusból párkeresztezéssel egy-egy hímet kereszteztünk be két-két vadtípusú nősténnyel és öt nap petéztetés után megszámoltuk a kikelő egyedeket. A tesztet standard táptalajon végeztük és a bábok megszámolásával kvantifikáltuk.

DJ-GFP spermium markert használó fertilitási kísérletnél párkeresztezésekkel DJ-GFP-t hordozó allélokat kereszteztünk vad típusú nőstény szüzekhez, majd miután meggyőződtünk a kopuláció lefolyásáról, két napig hagytuk a nőstényeket inkubálódni. Ezután PBS-ben preparáltuk a szeminális receptákulumát és a spermatékájukat. Ezután a mintákat, DAPI-val és falloidinnel festettük (3.5.2 fejezetben olvasható módon), majd fluoreszcens mikroszkópon vizsgáltuk a DJ-GFP-vel megjelölt spermiumok jelenlétét.

3.3 Atg8 mutánsok generálása

Atg8a$^{Tro\text{-}Gal4}$ inszerciós null allélhoz a Plug-and-play géncsapdázás módszert használtunk (Diao és mtsai, 2015). Első lépésként, standard genetikai keresztezésekkel olyan konstrukciót hoztunk létre, amely egy vonalba tartalmazza az *Atg8a*^{MI13726} minos inszertet, *pC-(lox2-attB2-SA-T2A-Gal4-Hsp70)3* donor genetikai kazettát és *Cre vas-int.Dm* egy Cre rekombinázt és a ϕC31 integráz forrást. Ezután ezt a konstrukciót bekereszteztük UAS-2xeGFP törzzsel, így egy relatív nagyléptékű szűrést lehet végezni, amely során a GFP jel megléte a Tro-Gal4-et tartalmazó inszerció sikeres beépülését jelezte.

Atg8a^{G116*} lipidációra képtelen mutáns vonal generálásához CRISPR/Cas9 közvetítette *in vivo* homológ rekombináció alapú mutagenezist használtunk (Port és mtsai, 2014). Az Atg8a_gRNS1 és Atg8a_gRNS2 (**3. táblázat**) oligonukleotidokat anelláltuk, úgy hogy 95°C-ra melegítettük a két oligonukleotidot (a későbbi gRNS-t kódolja), majd hagyom lehűlni az oldatot. Az így kapott kétszálú oligonukleotidot pCFD5 (Addgene, 73914, Simon Bullock által megosztott) plazmid Bbs1 (NEB, R0539S) vágóhelyére ligáltuk. Az így kapott plazmidot koinjektáltattuk az Atg8a_DONOR polinukleotiddal együtt (**3. táblázat**) *Act5C-Cas9, lig4*^{169} törzsbe. Ezek utódaiból izoláltuk a mutáns allélt morfológiai fenotípusuk és Ref(2)P ellenanyag alapú Western blot szűréssel.

Atg8b^{16} null allél előállításához először az Atg8b-gRNS1, Atg8b-gRNS2 és az Atg8b-gRNS3, Atg8b-gRNS4 oligonukleotid párokból két gRNS-t kódoló kétszálú nukleotidokat hoztunk létre, amelyeket pBFv-U6.2B (Addgene, 138401, Shu Kondo által megosztott) vektorba klónoztuk, majd *Drosophila melanogaster*-be injektáltattuk és stabil törzseket hoztunk létre belőlük. Ezeket a gRNS-t hordozó transzgénikus vonalakat *act5C>Cas9* transzgénikus törzzsel kereszteztük be. Az utódok között jelölteket az Atg8b_1 és Atg8b_2 primerpárral (**3. táblázat**) PCR módszerrel izoláltuk a null allélt, deléciós fragmentet keresve.

A mutáns zsírtest klónsejtek előállításához ezen mutánsokat rekombináltuk egy neomicin rezisztenciát és FRT-et hordozó törzzsel. Az Atg8a mutánsokat *FRT19A*-val, az

Atg8b^{16}-ot *FRT82B*-vel rekombináltuk. Rekombinálásra szánt heterozigóta törzseket neomicint (62,5 mg/5ml-s törzsoldatból 250 µl/5 ml táptalajt gyártottunk, Sigma, A1720) tartalmazó táptalajon tartottuk, naponta egy órát hősokkoltuk, majd a túlélő legyeket stabil törzsekbe kereszteztük. Az Atg8a mutánsokat és FRT19A-t hordozó törzseket *hsFlp, FRT19A ubi-RFP* (vagy *ubi-GFP*)-vel kereszteztük, az *Atg8b^{16}-t* és *FRT82B*-t tartalmazó törzseket *hs-Flp; QUAS-mCD8-GFP*-vel vagy *RFP; ET49-QF, FRT82B tub-QS/TM6*-val vagy a *hsFlp; r4>Gal4, FRT82B, UAS-GFP*-el kereszteztük be, hogy a 2-4 órás petéjüket legyűjtve 45 perc 37°C-os vízfürdőben hősokkoljuk.

3. táblázat: Az Atg8 mutánsok generálása során felhasznált oligonukleotidok szekvenciája:

Oligonukleotid neve	Oligonukleotid szekvenciája
Atg8a_gRNS1	TGCACGATGAGAATGTTTACGGCA
Atg8a_gRNS2	AAACTGCCGTAAACATTCTCATCG
Atg8a_DONOR	TAGGAACATCACGAGGAGGACTATTTCCTGTACATTGCCTACTCCGATGAGAATGTTTACTA AATGGCCAAAATTAACTAACTTTGCTCCGGTCGGGATGCATCGGAATGAAGCCCCCCCCCT
Atg8b_gRNS1	CTTCGTAGTTCATATCCATCTGGG
Atg8b_gRNS2	AAACCCCAGATGGATATGAACTAC
Atg8b_gRNS3	CTTCGACTCGCGTAATCGTTTTGG
Atg8b_gRNS4	AAACCCAAAACGATTACGCGAGTC
0Atg8b_1	GGGATTAGCGGATGCTATGCAC
Atg8b_2	CCCCTAGGGAAATTTGGCACTC

3.4 Molekuláris klónozás és transzgénikus törzsek létrehozása

Endogén promoterrel meghajtott *3xeGFP-Atg8b* riporter transzgén előállításához először *Drosophila melanogaster* genomi DNS-t használva mintaként PCR technikával amplifikáltuk az *Atg8b 5'-UTR* régióját a 8bGFPPro_F és a 8bGFPPro_R primerek (**4. táblázat**) felhasználásával. Az így kapott inszertet ligáltuk a pUAST-attB-3xGFP vektorba, mint SphI (NEB, R3182)-EcoRI (NEB, R3101) fragmentet. Második lépésként az *Atg8b* kódoló és 3'-UTR régióját is amplifikáltuk a 8bGFPCDS_F és 8bGFPCDS_R primerek (**4. táblázat**) segítségével, majd az előző vektorba ligáltuk, mint NotI (NEB, R3189)-Acc65I (NEB, R0599S) fragment.

4. táblázat: a *3xeGFP-Atg8b* konstrukcióhoz felhasznált primerek:

Primer megnevezése	Primer szekvencia
8bGFPPro_F	ATCAATTGCATGCCAGGCGGACACGATTAAGTGG
8bGFPPro_R	GACTGAATTCTGGGCGGACTGGAATACGGTT
8bGFPCDS_F	GATATAGCGGCCGCGGAGGTGGCATGGATATGAACTACCAGTACAAGAAGG
8bGFPCDS_R	CTCGAGGTACCAGCCGATCAGTTTGCACGCTTC

Ahhoz, hogy C-terminális FLAG-et tartalmazó endogén promoterű Atg8b konstrukciót készítsünk, amelyiknek hiányzik a 118-adik pozícióján a fehérje utolsó glicinje (Atg8b$^{\Delta G}$-Flag),

egy közbeeső konstrukciót kellett előállítsunk. Az Atg8b kódoló régióját, a fehérje utolsó glicinje nélkül, de a C-terminálisán egy FLAG jelölővel és a 3'-UTR régióból 18 nukleotiddal együtt az Atg8bFWD és Atg8bFLAGGUTRREV primerpárral (**5. táblázat**) amplifikáltuk PCR segítségével. A PCR terméket a pBluescript SK (+) (Addgene, 212205) vektor, EcoRI (NEB, R3101) –XhoI (NEB, R0146S) helyeire ligáltuk. A 3'-UTR Atg8b régiót XhoUTRFWD és Acc65IUTRREV (**5. táblázat**) primerek segítségével amplifikáltuk és a kapott PCR terméket az előzőleg készített pBluescript-Atg8b(1-117)-FLAG plazmidba ligáltuk XhoI (NEB, R0146S)-Acc65I (NEB, R0599S) vágóhelyekre.

5. táblázat: az *Atg8b$^{\Delta G}$-Flag* konstrukcióhoz felhasznált primerek:

Primer megnevezése	Primer szekvencia
Atg8bFWD	AATAGAATTCATGGATATGAACTACCAGTACAAGAAGGAC
Atg8bFLAGUTR REV	AATTCTCGAGTCAAGCCCGCGTCTACTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCCTGCCGTCC ATAGACGTTCTCAT
XhoUTRFWD	GGGCTTGACTCGAGTAATCGTT
Acc65IUTRREV	TAGAGGTACCAGCCGATCAGT

Az N-terminális *3xHA-Atg8b* endogén promoterrel rendelkező konstrukcióhoz a 3xHA jelölő szekvenciát HAFWD és HAREV (**6. táblázat**) primerek segítségével az UAS-3xHA-VAMP7 plazmidról amplifikáltuk föl (Takáts és mtsai, 2013). A kapott fragmentet a pBluescript SK (+) (Addgene, 212205) plazmidba ligáltuk, XhoI EcoRI (NEB, R3101)-XhoI (NEB, R0146S) vágó helyekre. Az *Atg8b* kódolót és 3'UTR régióját Atg8bXhoFWD (**6. táblázat**) és az Acc65IUTRREV (**5. táblázat**) segítségével amplifikáltuk föl és a kapott PCR terméket a pBluescript SK (+)-3xHA vektor XhoI (NEB, R0146S)-Acc65I (NEB, R0599S) vágóhelyekre klónoztuk.

6. táblázat: Az *3xHA-Atg8b* endogén promoteres konstrukcióhoz használt primerek:

Primer megnevezése	Primer szekvencia
HAFWD	TACCGAATTCATGTACCCATACGATGTTCCT
HAREV	ATAACTCGAGAGCGTAATCTGGAACGTCATA
Atg8bXhoFWD	AAGGCTCGAGATGGATATGAACTACCAGTACAAGAAG

Az *Atg8b>3xHA-Atg8a* konstrukcióhoz az Atg8a kódoló régiót amplifikáltuk az Atg8aXhoFWD és Atg8aBGIIIREV (**7. táblázat**) primerek segítségével, majd az Atg8b 3'-UTR régiót Atg8bUTRBGLIIFWD és az Atg8bUTRAcc65IREV (**7. táblázat**) primerek segítségével amplifikáltuk. Ezeket XhoI (NEB, R0146S)-BglII (R0144S) és BglII (R0144S)-Acc65I (NEB, R0599S) restrikciós enzimekkel duplaemésztettük és a fragmenteket az XhoI (NEB, R0146S)-Acc65I (NEB, R0599S) emésztési helyeken pBluescript SK (+)-3xHA vektorba ligáltuk. Ennek a plazmidnak az XhoI-Acc65I emésztett fragmentjét végül a pGen

plazmidba klónoztuk, *pGen-Atg8b promoter-3xHA-Atg8a-Atg8b 3'-UTR* konstrukciót létrehozva.

7. táblázat: *Atg8b>3xHA-Atg8a* konstrukció létrehozásához szükséges primerek listája:

Primer megnevezése	Primer szekvencia
Atg8aXhoFWD	AAGGCTCGAGATGAAGTTCCAATACAAGGAGGAGC
Atg8aBglIIREV	TTAAAGATCTAGTTAATTTTGGCCATGCCGTAA
Atg8bUTRBGLIIFWD	AATTAGATCTCGCGGGCTTGACTCG
Atg8bUTRAcc65IREV	TAGAGGTACCAGCCGATCAGT

Atg8a>3xHA-Atg8b konstrukcióhoz először a pBluescript SK (+)-3xHA-Atg8b plazmidot BglII (NEB, R0144S)-Acc65I (NEB, R0599S) restrikciós endonukleázokkal emésztettük és ezekre a vágóhelyekbe ligáltuk a Atg8aUTRFWD és Atg8aUTRAccREV (**8. táblázat**) primerek által amplifikált, majd BamHI (NEB, R3136)-Acc65I (NEB, R0599S) enzimekkel emésztett *Atg8a* 3'-UTR régiót. Ez eredményez egy pBSK 3xHA-Atg8b-Atg8aUTR átmeneti konstrukciót. Ezután a pGen-3xHA-Atg8b plazmidot emésztettük SphI (NEB, R0182S)-EcoRI (NEB, R3101) enzimekkel, majd ebbe ligáltuk a szintén SphI-EcoRI enzimekkel emésztett Atg8a promoter régiót tartalmazó Atg8aPROMFWD és Atg8aPROMREV (**8. táblázat**) primerek által amplifikált fragmentet. Végül a *pUAST-attB-Atg8aprom-3XHA-Atg8b-Atg8aUTR* konstrukciót NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB, E2621G) felhasználásával EcoRI (R0101S)-Acc65I (NEB, R0599S) emésztett *pUAST-attB-Atg8aprom-Atg8b-UTR* konstrukciót és a *3xHA-Atg8b-Atg8aUTR* fragmentet, amelyet a GAEcoRIFWD és GAAcc65REV (**8. táblázat**) primerekkel amplifikáltuk a pBSK-3xHA-Atg8b-Atg8aUTR plazmidot mintaként használva, hoztunk létre.

8. táblázat: *Atg8a>3xHA-Atg8b* konstrukcióhoz felhasznált primerek.

Primer megnevezése	Primer szekvencia
Atg8aUTRFWD	TTTTGGATCCTTTGCTCCGGTCGGGATGCA
Atg8aUTRAccREV	TTTTGGATCCTTTGCTCCGGTCGGGATGCA
Atg8aPROMFWD	CTTGCATGCGAATGTGATTGATCA
Atg8aPROMREV	CCATGAATTCGATTGCAATGAAGAGGTAATTG
GAEcoRIFWD	AGCCAATTACCTCTTCATTGCAATCGAATTCATGTACCCATACGATGTTCCTG
GAAcc65REV	CCTTCACAAAGATCCTCTAGAGGTACCAAAACTGCGAGGCCAAC

Végül az összes elkészült konstrukciót teljesen szekvenáltattuk és az új konstrukciókat a Szegedi Biológia Kutatóközpont belső injektáló szolgáltatójával szúrattunk be és a transzgénikus jelölteket standard genetikai módszerekkel kereszteztük stabil transzgénikus vonalakba.

3.5 Mikroszkópos technikák

Indukált autofágia vizsgálatához az L3-as lárvákat először 3 órán át éheztettünk 20%-os szacharóz oldatban (tulajdonképpen aminosav éhezésnek kitéve a lárvákat). Ezután a transzgénikus törzseket közvetlenül lehetett vizsgálni (ez esetben DAPI oldatban történt a boncolás is), más típusú vizsgálatok esetén egy fixálási lépés után bizonyos festési eljárásokkal tettünk láthatóvá a különböző autofágiához kapcsolódó struktúrákat.

3.5.1 LTR festés

Az egyik ilyen festés az LTR, amely a sejt savas kompartmentumait jelöli ki fluoreszcens módon. A PBS-ben, sztereómikroszkóp alatt, csipesszel kiboncolt zsírtesteket 35 µl PBS-be tettünk, ami 100 µM LysoTracker Red (Invitrogen, L7528) és 0,2 µg/ml DAPI-t (4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole, Invitrogen, D1306) tartalmazott. Öt perc festődés után PBS segítségével lemostuk a fölösleges festéket majd 50%-os glicerin-PBS oldattal lefedjük és a frissen készült preparátumokat azonnal fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáljuk.

3.5.2 Fluoreszcens immunjelölés

Fluoreszcens immunjelölés esetén a lárvákat úgy boncoljuk ki, hogy csipesszel a kaudális végén a kutikulát leszakítjuk, majd óvatosan kipréseljük a lárva belső szerveit, úgy, hogy azok továbbra is a kutikulához rögzüljenek. Az így kapott képleteket 30 percig 3,7%-os formaldehid-PBS oldatban kevertettük, majd háromszor mostuk 0,1%-os Triton-X100-PBS oldatban 30 percig. Ezután blokkoltuk 5%-os magzati szarvasmarha szérummal (FCS) és 0,1%-os Triton-X100-PBS oldatban két óráig kevertettük. Ezután friss blokkoló folyadékhoz hozzámértük az elsődleges ellenanyagot, leszívtuk a mintákról a blokkolót és hozzáadtuk az elsődleges ellenanyag tartalmú blokkoló folyadékot és 4ºC-on kevertettük másnapig. Másnap leöntöttük az elsődleges ellenanyagot tartalmazó oldatot, majd 0,1%-os Triton-X100-PBS oldatban kevertettük háromszor 30 percig, mosás céljából. A mosás után hozzáadtuk a fluoreszcensen konjugált másodlagos ellenanyagot tartalmazó blokkoló oldatot és két órán át kevertettük fényvédett csomagolásban, szobahőmérsékleten. Ezután újra háromszor 30 percig kevertettük, 0,1%-os Triton-X100-PBS oldatban, mosás céljából, majd a 0,2% µg/ml DAPI-val festetettük 20 percig. Végül egy percig PBS-ben mostuk és 50%-os glicerin-PBS oldatban tárgylemezre tettük és fedjük. A tárgylemezeket 4ºC fényvédett módon tároltuk, vagy azonnal vizsgáltuk fluoreszcens mikroszkóp alatt. Zsírtest festések során a következő elsődleges ellenagyagokat a következő koncentrációban használtuk: poliklonális nyúl anti-Ref(2)P (1:1000, Pircs és mtsai, 2012), monoklonális csirke anti-GFP (1:1000, Aveslab, GFP-1020), monoklonális nyúl anti-Gabarap+GabarapL1 +GabarapL2 (1:400, Abcam, ab109364). A

következő immunkonjugált másodlagos ellenanyagokat használtuk: anti-nyúl Alexa Fluor 568 (1:800, Life Technologies, A11036), anti-csirke Alexa Fluor 488 (1:800, Thermo, SA5-10070).

A megtermékenyített nőstények spermatékáját PBS-ben boncoltuk ki és 4%-os formaldehid-PBS oldatban fixáltuk 20 percig. Ezután háromszor 10 percig mostuk PBST-ban (PBS és 0.1% Triton X-100 [Sigma-Aldrich, T8787]). A DAPI (1 µg/ml) és a TexasRed phalloidin (1:250) festést 30 percig végeztük. A mintákat SlowFade® Gold antifade reagent (Life Technologies, S36936) médiumban fedtük le.

A *Drosophila melanogaster* here preparálását és festését már korábban részletesen leírtak alapján végeztük (White-Cooper, H. és 2004). A heréket jégen, pufferben (183 mM KCl, 47 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 6.8) boncoltuk, majd 20 percig fixáltuk (frissen készített PBS 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 2 mM KH_2PO_4 pH 7.4, 4% formaldehid). A fixáló oldatot leszívtuk és a mintákat háromszor 20 percig mostuk PBSTX-ben (0.1% tween20-at 0.3% TritonX-et tartalmazó PBS). Egy órán keresztül PBSTX + 1% BSA–ban (1% BSA-t tartalmazó PBSTX) blokkoltuk, majd az elsődleges ellenanyaggal egy éjszakán keresztül kevertettük 4^oC-on. Elsődleges ellenanyagként nyúl anti-hasított-Caspase3 ellenanyagot (Cell Signalling, clone 5A1E) használtunk 1:200-es hígításban, valamint egér anti-pán poliglicilált Tubulin ellenanyagot (Merck, clone AXO 49) használtunk 1:5000 hígításban. A heréket ezt követően három alkalommal 20 percig PBSTX-ben mostuk szobahőmérsékleten, majd a preparátumokat a másodlagos ellenanyaggal 1,5-2 óráig kevertettük szintén szobahőmérsékleten. Alexa Fluor 488 konjugált anti-egér és anti-nyúl használtunk (Invitrogen, Z25002, Z25302), mint másodlagos ellenanyag (1:400 hígítás). A DAPI (1 µg/ml) és a Texas Red jelölésű phalloidin (1:250) festést 20 percig PBSTX-ben végeztük. Ezt követően a mintákat háromszor 20 percig PBSTX-ben mostuk. A mintákat SlowFade® Gold antifade reagent (Life Technologies) médiumban fedtük le.

3.5.3 Az alkalmazott mikroszkópok és képfeldolgozási technikák

A *Drosophila melanogaster* herékből készült fixált mintákat Olympus BX51 mikroszkópon vizsgáltuk meg és dokumentáltuk. A spermatéka képeket Olympus Fluoview Fv10i konfokális mikroszkóppal készítettük. A többi képet Zeiss AxioImager M2 mikroszkópon készítettük, amely fel volt szerelve egy konfokális képességeket adó ApoTome 2 ráccsal és egy ORCA-Flash4.0 LT sCMOS (Hamamatsu) kamerával. A lárválís vakbelek fotózását ugyanezen a mikroszkópon végeztük, csak az AxioCam 506-os (Zeiss) kamerát használtuk. Feldolgozásuk során a ImageJ program manuális bejelölő funkcióját használva

megmértem a vakbelek területét, amit kallibráltunk a mikroszkópos fotó skálájával. A mikroszkópos képek feldolgozását és szerkesztését egyrészt a Zeiss mikroszkóp saját programjával, a ZEN Lite 3.1-el, másrészt a Photoshop CS3 (Adobe), CombineZP (Yahoo) és ImageJ (NIH) programokkal végeztük.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatra szánt preparált *Drosophila melanogaster* here és imágó agyakat éjszakán át fixáltuk 4°C-on elektronmikroszkópos fixáló oldatban (3,2% paraformaldehid, 0,5% glutáraldehid, 1% szacharóz és 2 mM $CaCl_2$, 0,1 M Na-kakodilát oldatban, pH 7,4). Egy mosási lépés után, a mintákat Durcupan műgyantába (Fluka) ágyaztuk a gyártói utasításokat figyelembe vége. A beágyazott blokkokból 70 nm-es metszeteket készítettünk, melyeket a Reynolds-féle módszerrel kontrasztosítottunk. A fényképeket JEOL JEM-1011-es transzmissziós elektronmikroszkóp Olympus Morada kamerájával készítettük és az iTEM programmal dolgoztuk fel.

3.6 Western blot technikák

A fehérje minták előállításához 1 mg *Drosophila melanogaster* mintához 20 µl PBS-el egyszeresre hígított Laemmli minta puffert (Sigma, S3401) tettünk és öt percig 100°C-on inkubáltuk, majd dörzspálcikával homogenizáltuk. A kapott homogenizált oldatot újra 100°C-on inkubáltuk, majd centrifugáltuk 15000 RPM-en és a felülúszót óvatosan új csőbe helyeztük

A mintákat azonos térfogatban vittük föl 10 (Ref(2)P esetén) illetve 15%-os (Atg8 esetén) SDS (nátrium-dodecilszulfát) tartalmú poliakrilamid gélre. A fehérjéket ezután elektroforézissel méret szerint elválasztottuk. A gélt ezután egy PVDF (Polivinilidén-fluorid, Immobilon-P (Millipore), illetve fluoreszcensen jelölt ellenanyagok használata esetén Immobilon-FL, Merck, IPFL00010) membránra blottoltuk éjszakán át. Ezután a membránt 0,5% kazeint tartalmazó oldatban blokkoltuk, majd 0,1% Tween20-at tartalmazó blokkolóban feloldottuk az elsődleges ellenanyagot és ebben az oldatban kevertettük a membránt egy óráig szobahőmérsékleten. Ezt követően leszívtuk az elsődleges ellenanyagot tartalmazó oldatot és háromszor 10 percig mostuk TBST-ben (0,025 M Trisz-pufferelt sóoldat, pH 7.4, és 0.1% Tween20), vagy PBST-ben (PBS, 0.1% Tween20). Ezután hozzátettük a másodlagos ellenanyagokat és 1-2 óráig inkubáltuk. Ezután újra háromszor 10 percig mostuk TBST-ben, vagy PBST-ben. Az alkalikus foszfatáz enzimmel konjugált másodlagos ellenanyag használata esetén szükséges egy előhívási szakasz és ehhez az előhívó folyadék az NBT-BCIP-t (Nitro-Blue Tetrazolium klorid és 5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyl-Phosphate), mely az alkalikus foszfatáz szubsztrátjaként az enzimreakciót követően sötétlilás csapadékot eredményez a

membránon, így detektálhatóvá válnak a keresett fehérjék. Fluoreszcensen konjugált ellenanyagok esetén az előhívást egy fluoreszcens szkenner, az Odyssey CLx imager (LI-COR) végezte.

A Western blot kísérletek során elsődleges ellenanyagként a poliklonális nyúlt anti-Ref(2)P-t (1:4,000, Pircs és mtsai, 2012), a nyúl monoklonális anti-GABARAP+GABARAPL1+GABARAPL2-t (1:2.000, Abcam, ab109364) és az egér anti-tubulin (1:4.000, DSHB, 12g10) ellenanyagokat használtunk. Másodlagos ellenanyagként az alkalikus foszfatáz konjugált anti-nyúl és anti-egér (mindkettőt 1:5.000 hígításban; Sigma-Aldrich, A3812, A3562), vagy fluoreszcensen konjugált IRDye 800CW anti-nyúl (1:13.000, LI-COR, 926-32211) és IRDye 800CW anti-egér (1:13.000, LI-COR, 926-32210) ellenanyagokat használtunk.

3.7 A rovarfajok Atg8 génfájának elkészítése

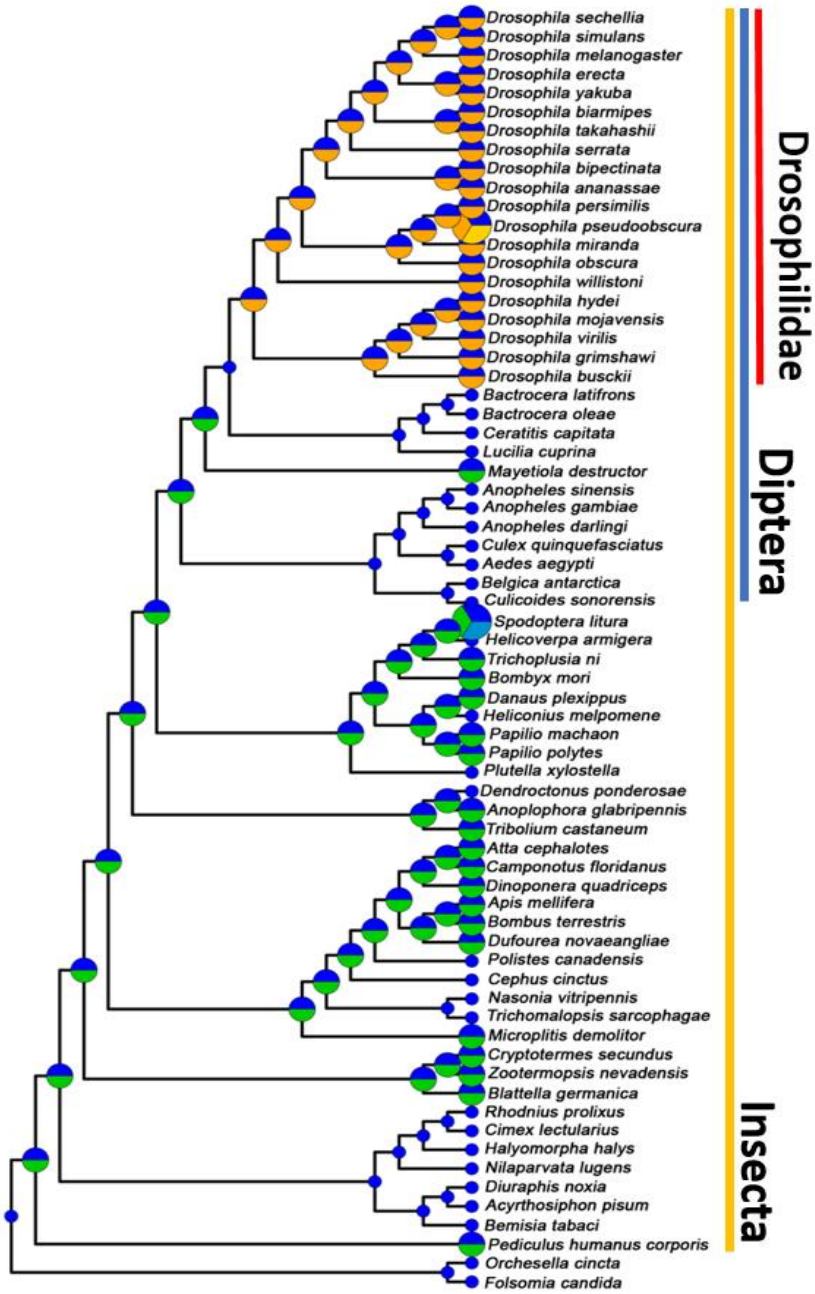
Az Atg8 géncsalád rekonstrukciójához 69 teljes genomot használtunk fel: ebből 20 a *Drosophila* nemzetségből került ki, további 47 rovarfajt, úgy válogattunk ki, hogy a kiválasztott fajok a rovarokon (Insecta) belül a lehető legtöbb taxonómiai csoportot reprezentáljanak egy, vagy két fajjal, míg külső taxonómiai csoportnak a rovarokkal közeli rokonságot mutató ugróvillásokat (Collembola) választottuk, amelyeket két fajjal reprezentáltunk. A pontos génfa rekonstrukciójához egy fajfa rekonstrukció is szükséges, ezért meghatároztuk a fajokban jelen levő konzervált eukarióta BUSCO géncsaládokat (Waterhouse és mtsai, 2018). A 302 megtalált, rekonstruálható BUSCO géncsaládot MAFFT L-INS-I algoritmussal illesztettük, majd trimAL (−strict) programmal eltávolítottuk a problémás pozíciókat, amelyek túl sok gapet tartalmaztak és túl variábilisak (Katoh és mtsai 2013, Seppey és mtsai, 2019). A géncsaládonkénti illesztéseket egy szupermátrixá fűztük össze, majd a filogenetikai rekonstrukciót a RAxML BlackBox-al végeztük a CIPRES Science Gateway közösségi szerveren, 1000 “rapid bootstrap” ismétlést és PROTGAMMAWAG modell-t alkalmazva. A génfa rekonstrukcióját a korábban leírt folyamat szerint és egyedi R szkriptekkel végeztük (Merényi és mtsai, 2020). A génfát a Notung 2.9-el gyökereztettük majd 50%-os “boostrap” támogatási küszöb mellett egyeztettük a fajfával (Darby és mtsai, 2017). A duplikációs/génvesztéses eseményeket a fajfán rögzítettünk Dollo parszinómia elvet követve a COMPARE programmal (Nagy és mtsai, 2014). A kiválasztott Atg8 homológokat CLUSTALW összeillesztését az Unipro UGENE v1.31.1 alkalmazásával hajtottuk végre (Okonechnikov és mtsai, 2012).

3.8 Statisztika

Az adatok számszerűsítését mindig az eredeti, módosítások nélküli képeken végeztünk. Az összes kísérletünket legalább három független mintán is megismételtük. A legtöbb mikroszkópos felvételt az ImageJ (NIH) program segítségével dolgoztuk fel. A Western blot képeken az Image Studio Lite (Li-Cor) programmal számszerűsítettük. Azt, hogy normál eloszlású-e, vagy nem normál eloszlású a kapott adatsor, azt a Prism 8.0.1 (GraphPad) program Shapiro–Wilk tesztjével döntöttük el. Normál eloszlás esetén ANOVA-t (három, vagy több adatsor esetén), vagy páros T-tesztet alkalmaztunk (két minta esetén). Abban az esetben, ha az adatsorunk nem normál eloszlású, akkor Kruskal-Wallis tesztet (három, vagy több adatsor esetén) használtunk. A hibasávok a standardszórást mutatják a grafikonokon. A statisztikai teszteket és az adatok grafikus ábrázolását a Prism 8.0.1 (GraphPad) segítségével végeztük.

4. Eredmények

4.1 A *Drosophila melanogaster* Atg8 homológok evolúciója rovarokban

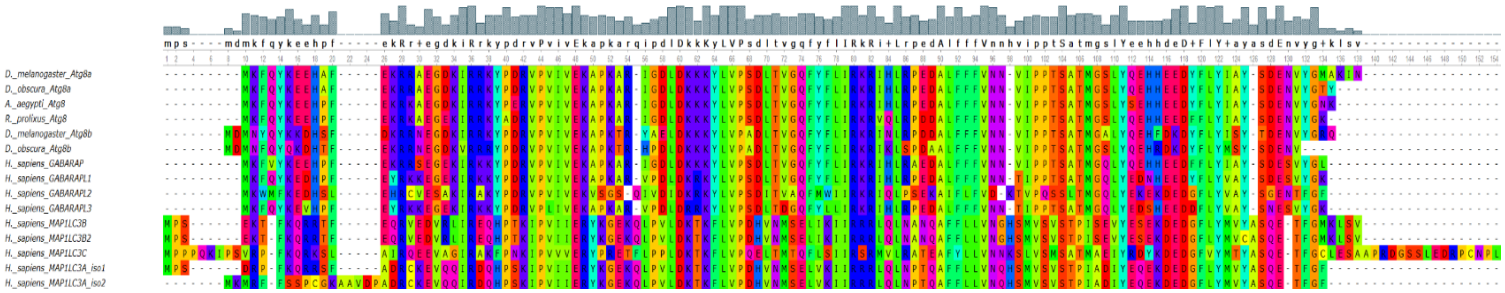


6. ábra. Az Atg8 fehérjecsalád kópiaszám evolúciója a rovarokban (Insecta) és két ugróvillások (Collembola) alosztályába tartozó fajban. A rovarokban alapvetően két Atg8 fehérjecsalád van (kék és zöld körcikkek), de a második (kék körcikk) Atg8 fehérje eltűnik, többek között a Dipterák rendjének legtöbb fajában. Ezen belül a Drosophilidae családban másodlagosan kialakul egy új Atg8 fehérje (narancssárga körcikk).

Először az Atg8 gének evolúciós rekonstrukcióját és ábrázolását végeztük el egy rovar és pár közeli rokonának filogenetikai fajfáján (**6. ábra**). Ezen analízisből kiderült, hogy minden fajban jelen van, a várakozásoknak megfelelően, legalább egy Atg8 homológ (kék körcikk). Ez

a homológ a *Drosophila melanogaster*-ben az *Atg8a*. Viszonylag korán megjelent egy második Atg8 homológ is (zöld körcikk), amit később több faj is elveszít, köztük a *Drosophilidae* családba tartozó fajok is. Ugyanakkor a *Drosophilidae* családban megjelent egy viszonylag új Atg8b homológ (narancssárga körcikk), amit *Drosophila melanogaster*-ben *Atg8b*-nek hívnak.

A *Drosophila melanogaster Atg8a* homológ minden általunk vizsgált fajban jelen van, ugyanakkor az *Atg8b* valószínűleg retrotranszpozíciós esemény során keletkezett (Betrán és mtsai, 2002). Erre az is utal, hogy míg az *Atg8a* számos intronnal rendelkezik, addig az *Atg8b*-ből ezek hiányoznak. Az Atg8a és a Drosophilidae specifikus Atg8b fehérjék aminosav szekvenciái 78%-os egyezést mutattak, és sokkal jobban hasonlítottak a humán GABARAP alcsaládhoz, mint a MAP1LC3 alcsalád aminosav szekvenciájához (**7. ábra**).



7. ábra. A rovar és humán Atg8 aminosav szekvenciák összehasonlítása. Különböző rovarfajok (*Drosophila melanogaster* és *obscura, Aedes egypti* és *Rhodnius prolixus*) és humán (beleértve a pszeudogén GABARAPL3-at) Atg8 fehérjék CLUSTALW szekvencia-összehasonlítása erős evolúciós konzerváltságot mutat. Megjegyezzük, hogy a *Drosophila obscura* Atg8b C-terminális régiójában lévő konzervált YG szekvencia elveszett, így ez a fehérje képtelen lipidálódni.

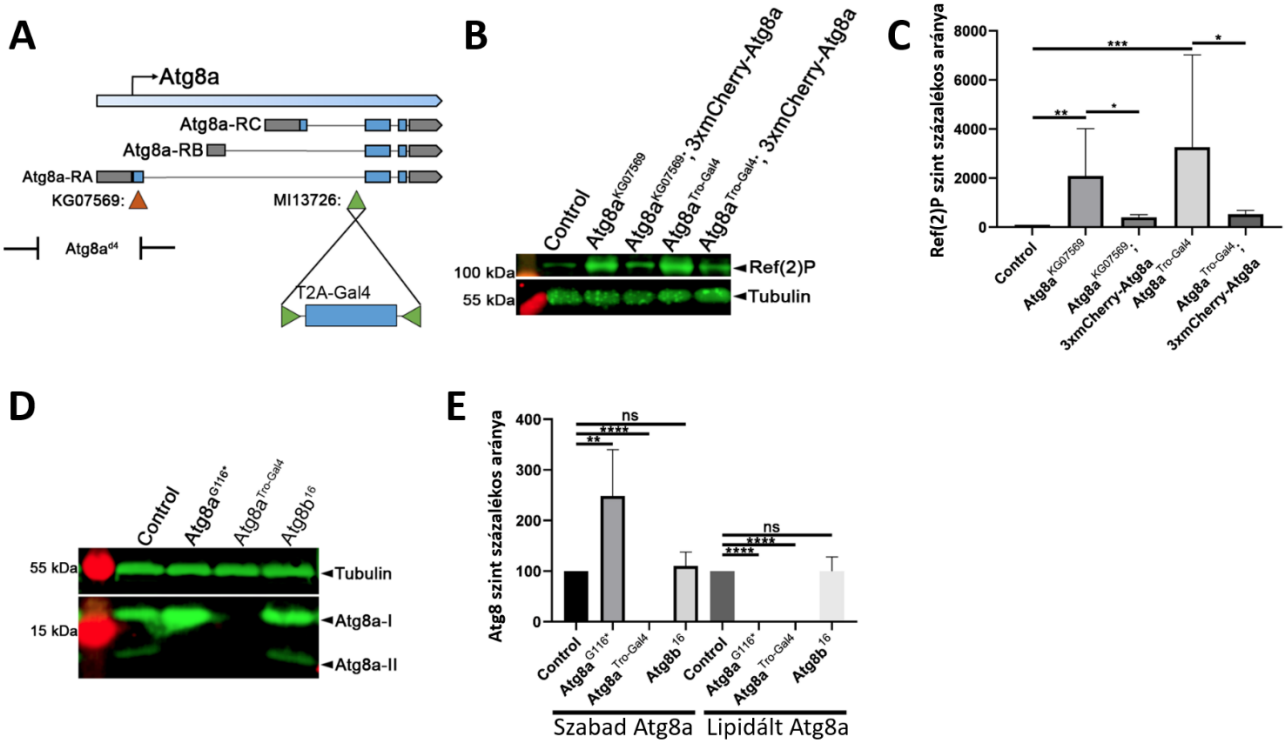
4.2 Új Atg8a és Atg8b allélok izolálása

PhD-hallgatói éveim alatt számos olyan Atg génre készítettünk CRISPR/Cas9 alapú null allélt, amelyekre azelőtt nem volt elérhető törzs. Habár ezek a mutánsok több publikációnkban (Kim és mtsai, 2016, Hegedűs és mtsai, 2016, Kiss és mtsai, 2019) is hasznos eszközként szolgáltak, ebben a dolgozatban csak az *Atg8a* és *Atg8b* génekkel kapcsolatos eredményeinket mutatom be.

4.2.1 Az *Atg8a*$^{Tro\text{-}Gal4}$ null allél létrehozása

Habár az *Atg8a* a *Drosophila melanogaster* modellben folyó autofágia kutatások során nagyon gyakran használt gén, ennek ellenére eddig főleg a P-elem inszerciós törzset használtak, amely csak az *Atg8a* egyik (bár leghosszabb) izoformájának kifejeződését képes meggátolni (*Atg8a*^{KG07569}), vagy egy olyan P-elem nem precíz kivágódása okozta deléciós vonalat (*Atg8a*^{d4}), amely főleg az Atg8a promoter régióját érinti (Scott és mtsai, 2007). Azonban nagy áteresztőképességű génkifejeződési vizsgálatok kimutatták, hogy az *Atg8a*-nak van még két alternatív promoter régiója, amiről két másik *Atg8a* izoforma is át tud íródni, ami arra utal, hogy

az eddig használt két mutáns nem igazi null allél, csak erősebb hipomorf allélok. A probléma megoldására felhasználtunk egy Minos-elem inszerciót (*Atg8a*^{MI13726}), amely az *Atg8a* első intronjában található, és amelyen mind a három *Atg8a* izoforma osztozik. Ezt a Minos-elemet genetikai módszerekkel (Diao és mtsai, 2015) kicseréltük egy fehérje kódoló exonjára, amit Trojan-Gal4-nek hívunk, és ami képes az összes izoforma csapdázására.

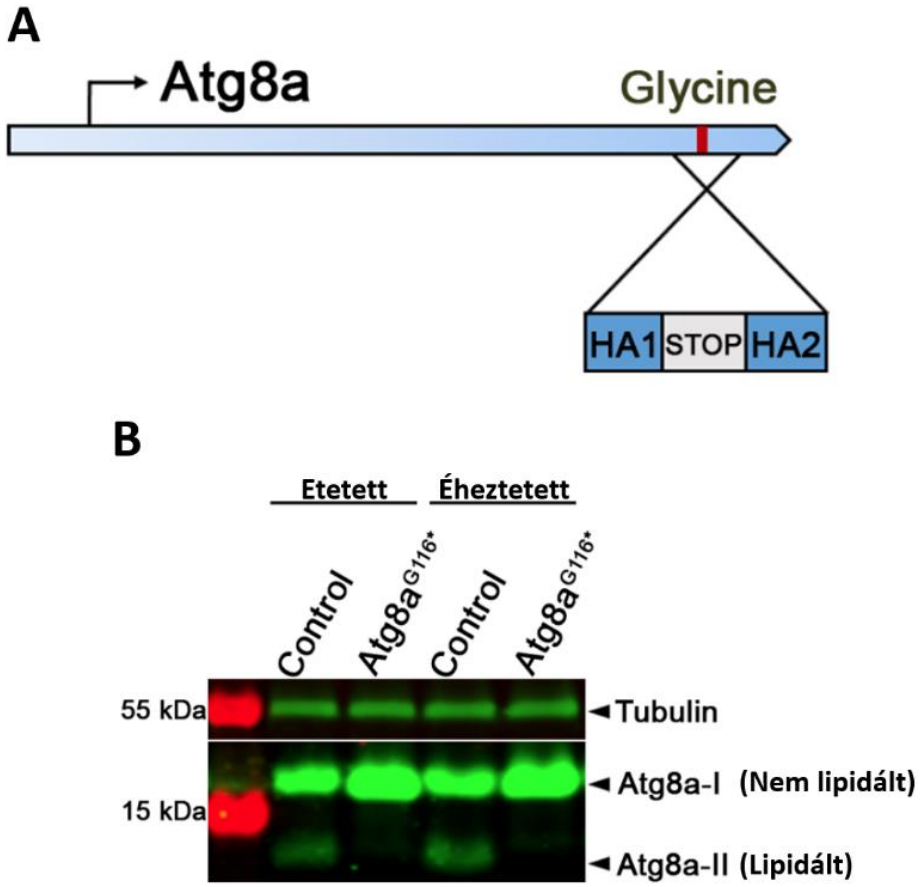


8. ábra. Az *Atg8a*$^{Tro-Gal4}$ készítése és jellemzése. (A) Az Atg8a null allélt egy Trojan (T2A) -Gal4 kazetta MI13726 transzpozon inszerció kicserélésével hoztuk létre, amely az Atg8a első (legnagyobb) intronjában található (a képen a korábbi *Atg8a* allélok is szerepelnek a géntérképen). (B) Western blot kísérlet segítségével kimutattuk, hogy az új allél halmozza a Ref(2)P-t (az autofágia specifikus szubsztrátja), (C) ezt számszerűsítettük és statisztikailag is igazoltuk. (D) Szintén Western blot-tal igazoltuk, hogy Atg8a ellenanyaggal nem mutaható ki az Atg8 kifejeződése, amit (E) számszerűsítettünk és statisztikailag is igazoltunk.

Ez az új inszerció létrehoz egy fúziót az összes izoforma és az önhasító T2A polipeptid között, amely fuzionál az élesztő transzkripciós faktor Gal4 fehérjéhez, és amely így alkalmazható a széles körben használt UAS promotert tartalmazó konstrukciók meghajtásához. Az új allél (*Atg8a*$^{Tro-Gal4}$) meggátolta az *Atg8a* összes izoformájának az átíródását, és így null allélként viselkedik (**8. ábra A**). Ezen allél késői báb stádiumban letálist okozott és a mutáns egyedekből készített fehérjemintákban erősebb halmozódást mutatott a Ref(2)P szintjén, mint az *Atg8a*^{KG07569} allél esetén. Ezt a fenotípust menekítette az endogén promoterrel rendelkező 3xmCherry-Atg8a transzgén expressziója (**8. ábra B, C**). Szintén Western blot-on mutattuk ki, hogy Atg8a ellenanyaggal nem mutat jelet az új null allél (**8. ábra D, E**).

4.2.2 Az *Atg8a*^{G116*} lipidációra képtelen allél létrehozása

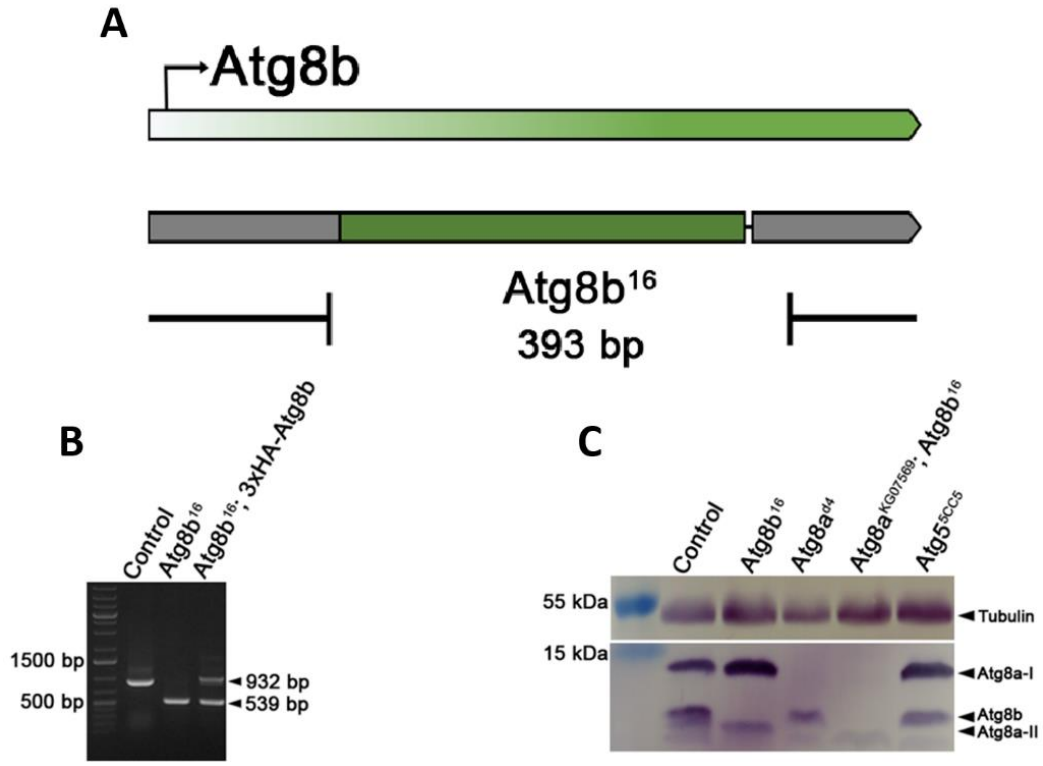
Az Atg8 C-terminális végén, a fehérje utolsó glicinje kulcsfontosságú, hiszen ezen a glicinen keresztül kapcsolódik a fagofórhoz (Mizushima, N., 2020). Ez motivált minket arra, hogy készítsünk egy olyan allélt, amely nem rendelkezik ezzel a glicinnel, hogy ezzel egy olyan új törzset állítsunk elő, amely további funkciók vizsgálatára lesz alkalmas. CRISPR/Cas9 rendszer felhasználásával egy pontmutációt okoztunk az endogén *Atg8a* génben, amely kijavítására tett kísérlet során egy homológ szekvenciákat hordozó donor oligonukleotid segítségével Stop kodonra cseréltük az addig 116. glicin aminosavat (**9. ábra A**). Az így létrehozott *Atg8a*^{G116*} allélt hordozó etetett és éheztetett (autofágia indukált) lárvák esetén egyaránt nem mutatott lipidált Atg8a formát Western blot kísérletünk (**8. ábra D, E; 9. ábra B**). A mutáns egyedek azonban életképesek és fertilisek voltak, továbbá semmilyen egyértelmű morfológiai elváltozást nem mutattak.



9. ábra. Az *Atg8a*^{G116*} lipidációra képtelen allél létrehozása és jellemzése. (A) Az új allélt egy ssDNS-templát felhasználásával állítottuk elő CRISPR/Cas9 által közvetített homológ rekombinációval (HA1 és 2: homológia karok). (B) Az új allélt hordozó lárvák fehérjelizátumából, Atg8 ellenanyaggal készült Western blot vizsgálatából világosan kiderült, hogy sem etetett, sem éheztetett mintákon nem mutatható ki a lipidált Atg8a forma (Atg8a-II).

4.2.3 Az *Atg8b*^{16} null allél létrehozása

Az *Atg8b* esetén előttünk még nem írtak le mutáns allélokat, nem álltak rendelkezésünkre inszerciós allélok sem. Mi azonban CRISPR/Cas9 módszerrel, *in vivo* mutagenezissel izoláltunk egy 393 bázispár hosszú deléciót mutató null mutánst (**10. ábra A**), amit PCR szűréssel azonosítottunk (**10. ábra B**). Ellentétben az *Atg8a*$^{Tro\text{-}Gal4}$ és *Atg8a*^{G116*} allélokkal, az *Atg8b*^{16} mutáns egyedekből készült lárvális fehérjeizolátum nem mutat nyilvánvaló mintázatváltozást a kereskedelmi forgalomban kapható pán-Atg8 ellenanyag felhasználásával készült Western blot-on (**8. ábra D**).



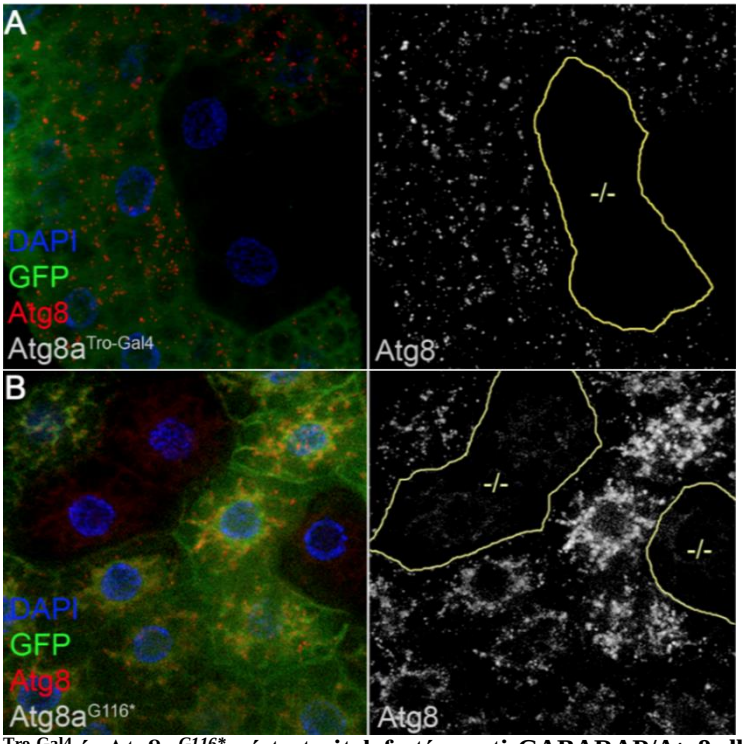
10. ábra. Az *Atg8b*^{16} null allél izolálása és jellemzése. (A) Az *Atg8b* gén mutáns alléljét két gRNS konstrukció transzgénikus kifejeztetésével állítottuk elő, CRISPR/Cas9 technika alkalmazásával. (B) A deléciós vonalat PCR alapú szűréssel azonosítottuk, genomi DNS-t használva templátként. Az így kapott deléciós fragment megerősíti a deléció méretét is. A transzgénikus konstrukciót hordozó vonalon egyaránt kimutatható vad és deléciós fragment. (C) Az intakt Atg8a-I, lipidált Atg8a-II és Atg8b kifejeződése *Atg8a, Atg8b* és *Atg5* mutánsok heréiben. Az Atg8b gyorsabb vándorlása az Atg8a-I-hez képest a gélen azzal magyarázható, hogy egy aminosavval rövidebb, illetve némileg különböző az aminosav-összetétele az Atg8a-hoz képest.

Mivel nagy áteresztőképességű génkifejeződési vizsgálatokból (Fly Atlas, FlyBase) tudjuk, hogy az *Atg8b* főleg *Drosophila melanogaster* herékben fejeződik ki, ezért herékből készült fehérjelizátumon is végeztünk pán-Atg8 ellenanyag alapú Western blot-ot (**10. ábra C**). Ebben a vizsgálatban egyértelműen azonosítottuk az *Atg8b* fehérjét, amely csak az *Atg8b*^{16}

lizátumból hiányzik, viszont jelen volt a vadtípusban és az *Atg8a*^{d4} és az *Atg5*^{5CC5} mutánsokban is (utóbbiakban nincs Atg8a vagy hiányzik az Atg8a lipidált formája).

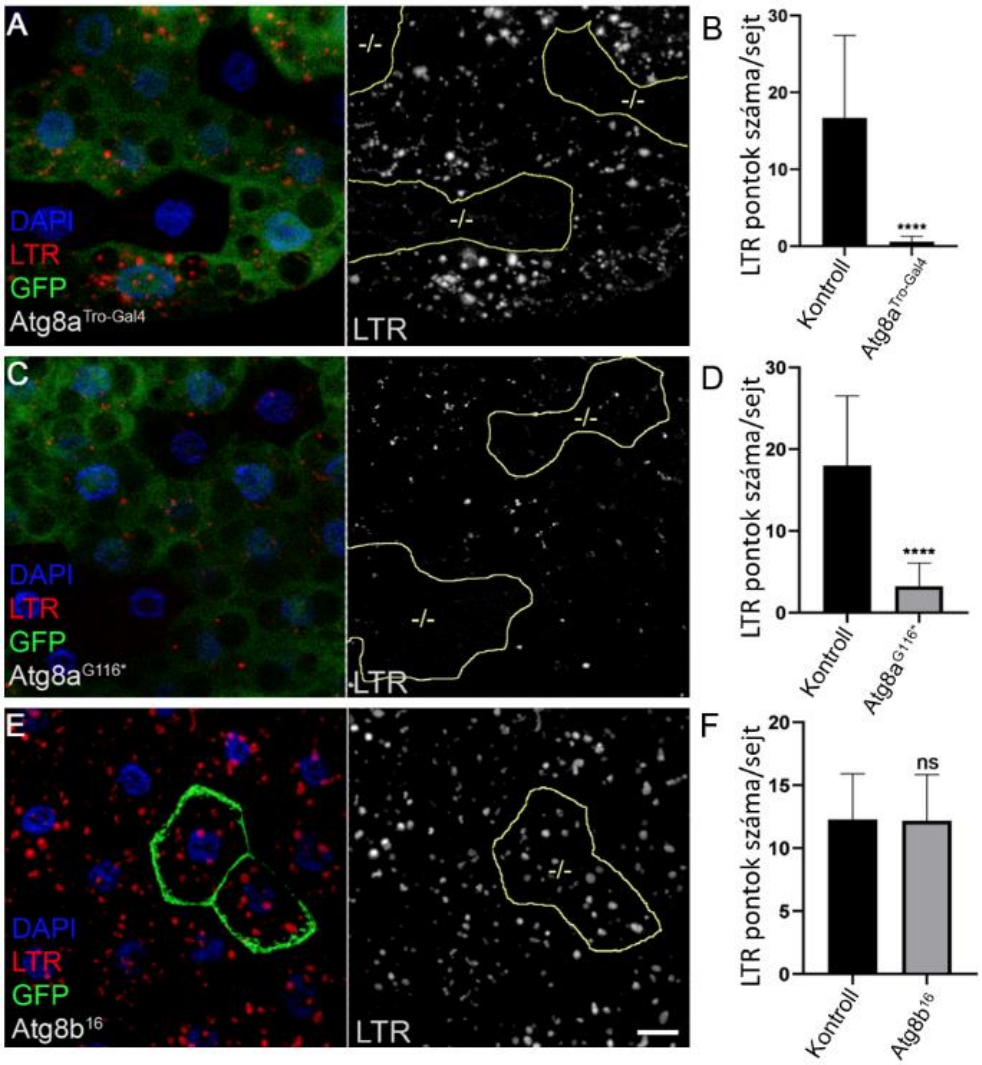
4.3 Az Atg8a és Atg8b autofágiában betöltött szerepe

Atg gének funkcióinak elemzése során kézenfekvő, hogy az autofágiában betöltött szerepüket vizsgáljuk először. Az *Atg8a* és az *Atg8b* autofágiában betöltött szerepét fluoreszcens mikroszkópia segítségével, különböző festési módszerekkel és riporter transzgének felhasználásával vizsgáltuk. Ehhez *Drosophila melanogaster* éheztetett harmadik stádiumú, de nem vándorló lárvák zsírtesteiben genetikai mozaik analízist alkalmaztunk, amelynek előnye, hogy ugyanazon szövetben, hasonló környezetben vizsgálhatóak a mutáns sejtek és a környező kontroll sejtek. A módszer és az allélok validálása okán először anti-GABARAP/Atg8 ellenanyaggal immunfluoreszcens festést alkalmaztunk. A GFP-t nem expresszáló, negatívan jelölt Atg8a$^{\text{Tro-Gal4}}$ mutáns sejtekben nem figyelhettünk meg Atg8 festődést, szemben a kontroll sejtekkel (**11. ábra A**). Az Atg8a^{G116*} mutáns sejtekben észleltünk a szomszédos sejtekénél jóval gyengébb jelet, amely valószínűleg a lipidálatlan Atg8a-I lehetett (**11. ábra B**). Összességében elmondható, hogy mindkét mutáció drasztikusan csökkentette az Atg8a szintjét a zsírsejtekben.



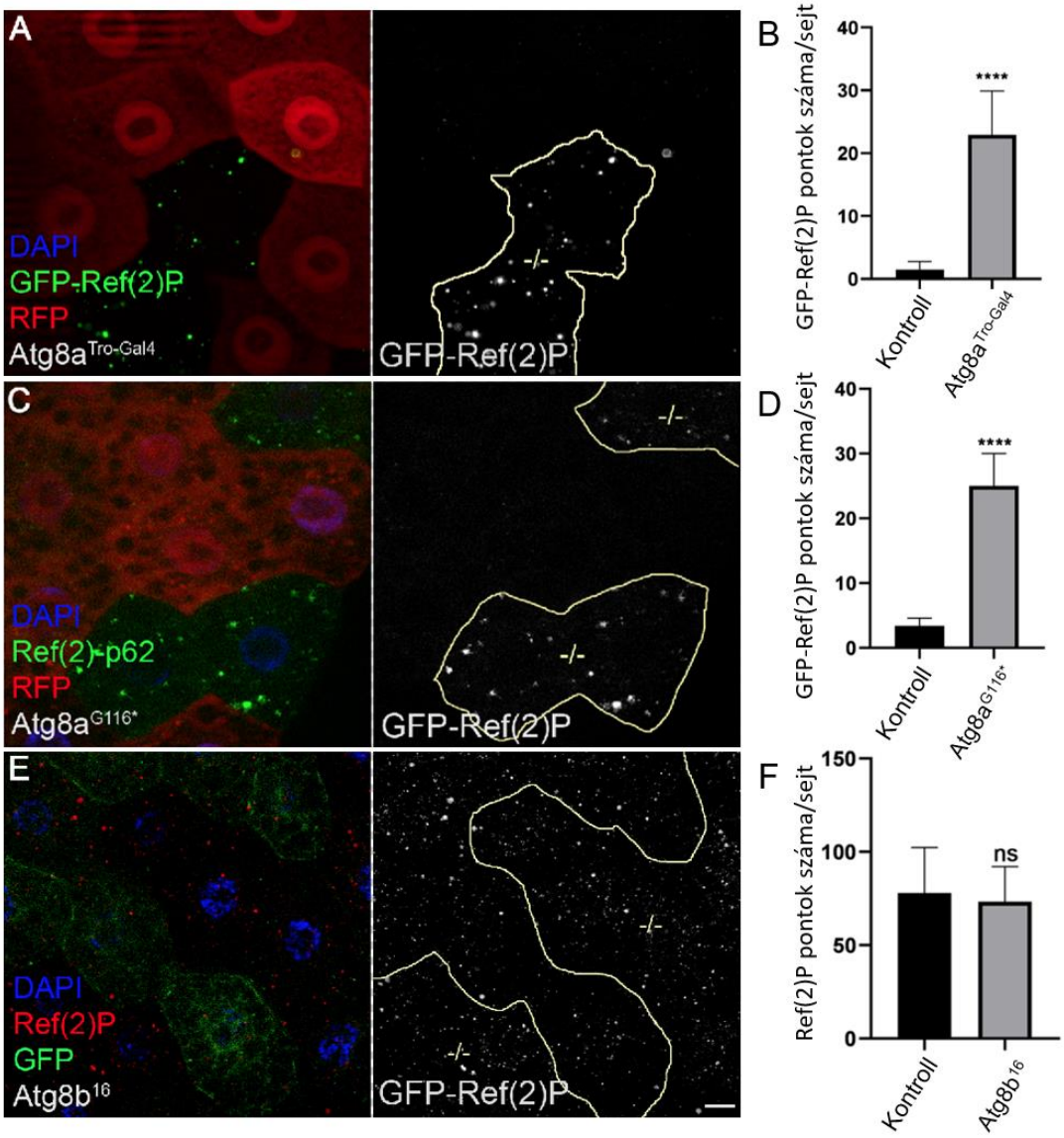
11. ábra. Az Atg8a$^{\text{Tro-Gal4}}$ és Atg8a^{G116*} zsírtestsejtek festése anti-GABARAP/Atg8 ellenanyaggal. (A) A GFP hiánya által kijelölt *Atg8a*$^{Tro\text{-}Gal4}$ mutáns sejtekben nem láttunk Atg8-jelet. (B) Az Atg8a^{G116*} mutáns klónsejtekben halvány, felhőszerű jel figyeltünk meg. Elmondhatjuk, hogy mindkét típusú mutációnak drasztikus hatása van az Atg8a kifejeződésére. Skála méret: 10 µm.

A Lysotracker Red egy általánosan használt fluoreszcens festés a savas kompartmentumok, főképpen az autolizoszómák kimutatására (Nagy és mtsai, 2015). Ezen festés alkalmazása során a GFP-t nem expresszáló *Atg8a*$^{Tro\text{-}Gal4}$ és *Atg8a*^{G116*} mutáns sejtekben erősen lecsökkent a savas kompartmentumok száma és mérete (**12. ábra A, B, C, D**), míg az *Atg8b*^{16} null allél vizsgálatakor, ezek száma a kontroll és a mutáns (ebben az esetben GFP-pozitív) sejtekben közel azonos volt (**12. ábra E, F**). A Lamp1-3xmCherry egy gyakran használt lizoszóma riporter. Hasonlóan az Lysotracker Red festéshez, a Lamp1-pozitív struktúrák száma és mérete mérsékelten lecsökkent az *Atg8a* mutánsokban, de nem változott az *Atg8b* mutáns sejtekben (**Függelékek F1. ábra A, B, C**).



12. ábra. Az *Atg8a* és *Atg8b* mutáns klónsejtek Lysotracker mintázata. (A, B, C, D) Az *Atg8a* mutáns (GFP-t nem tartalmazó) klónsejtekben szignifikáns módon lecsökkent a savas struktúrák száma, míg az *Atg8b* (GFP-t kifejező) mutáns sejtekben nem tapasztaltunk változást ebben a tekintetben (E, F). Az adatok összehasonlítása páros T-próbával történt, n = 10/genotípus, ****: $p < 0.0001$, ns: nem szignifikáns. Skála mérete: 10 µm.

A Ref(2)P (az emlős p62 *Drosophila* homológja) az autofágia specifikus szubsztrátja. Mivel más úton nem képes lebomlani, ezért az autofágia folyamatának sérülése jelentősen megnöveli a Ref(2)P szintjét a sejtekben. Az előző kísérlethez hasonló módon mutáns klónsejteket hoztunk létre zsírtestbe, de ezesetben egy konstitutívan expresszáló *tubulin>GFP-Ref(2)P* riporter szintjét vizsgáltuk, a mutáns sejteket pedig az RFP hiánya jelölte ki. Az *Atg8a* mutáns klónsejtekben erős felhalmozódást mutatott a GFP-Ref(2)P (**13. ábra A-D**). Az *Atg8b* esetén technikai okok miatt a riporter helyett anti-Ref(2)P immunfestést használtunk, amely alapján a GFP-t nem expresszáló Atg8b mutáns sejtekben nem halmozódott fel a Ref(2)P (**13. ábra E, F**).

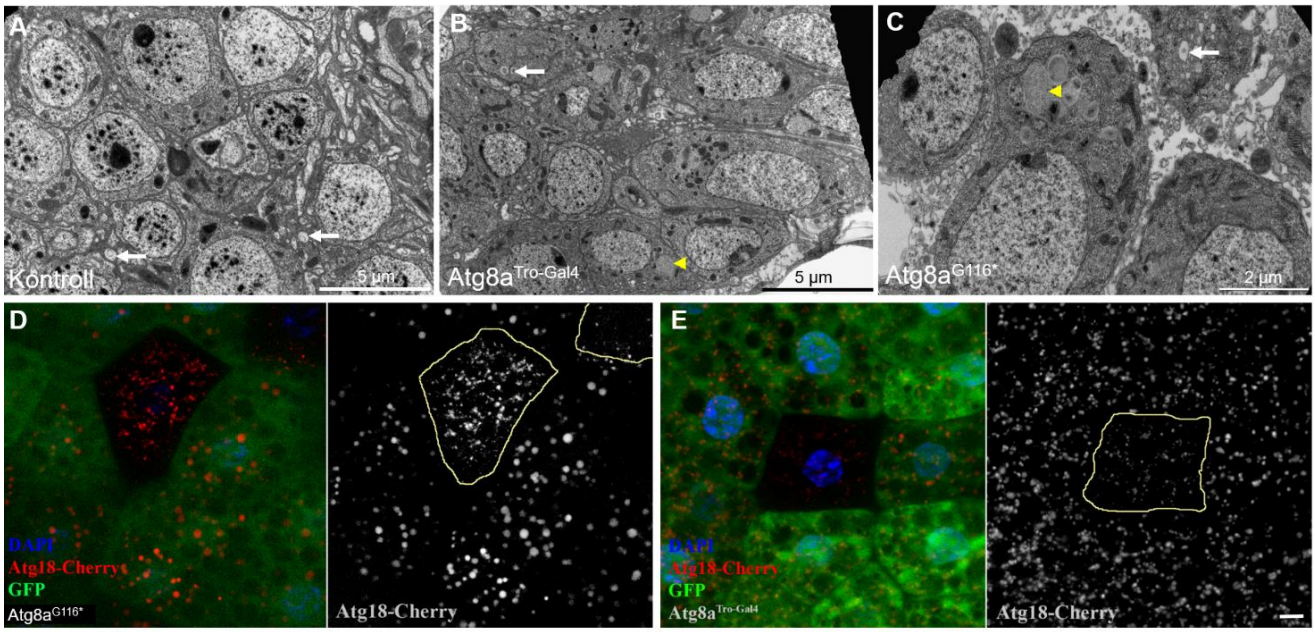


13. ábra. Az *Atg8a* és *Atg8b* mutáns klónsejtek Ref(2)P mintázata. (A, B, C, D) Az *Atg8a* mutáns (RFP-t nem tartalmazó) klónsejtekben szignifikáns módon megnőtt a GFP-Ref(2)P-pozitív struktúrák száma, míg az *Atg8b* (GFP-t nem expresszáló) mutáns és kontroll sejtek között nem mutattunk ki különbség ebben a tekintetben (E, F). Az adatok összehasonlítása páros T-próbával történt, n = 10/genotípus, ****: $p < 0.0001$, ns: nem szignifikáns. Skála mérete: 10 µm.

4.4 Az Atg8a szerepe az autofagoszómák képződésében

Az eukarióták között nem teljesen egyértelmű, hogy az Atg8-nak milyen jelentősége van a fagofór képződésében és érésében. Amíg az élesztőben az Atg8 kiütése ellehetetleníti még a fagofór-kezdemény kialakulását is (Kirisako, T és mtsai, 1999), addig emlősöknél ez nem ilyen egyértelmű, a fagofórok növekedése ugyan erősen sérül, de még előfordulnak autofág struktúrákra emlékeztető képletek a sejtekben (Nguyen és mtsai, 2016).

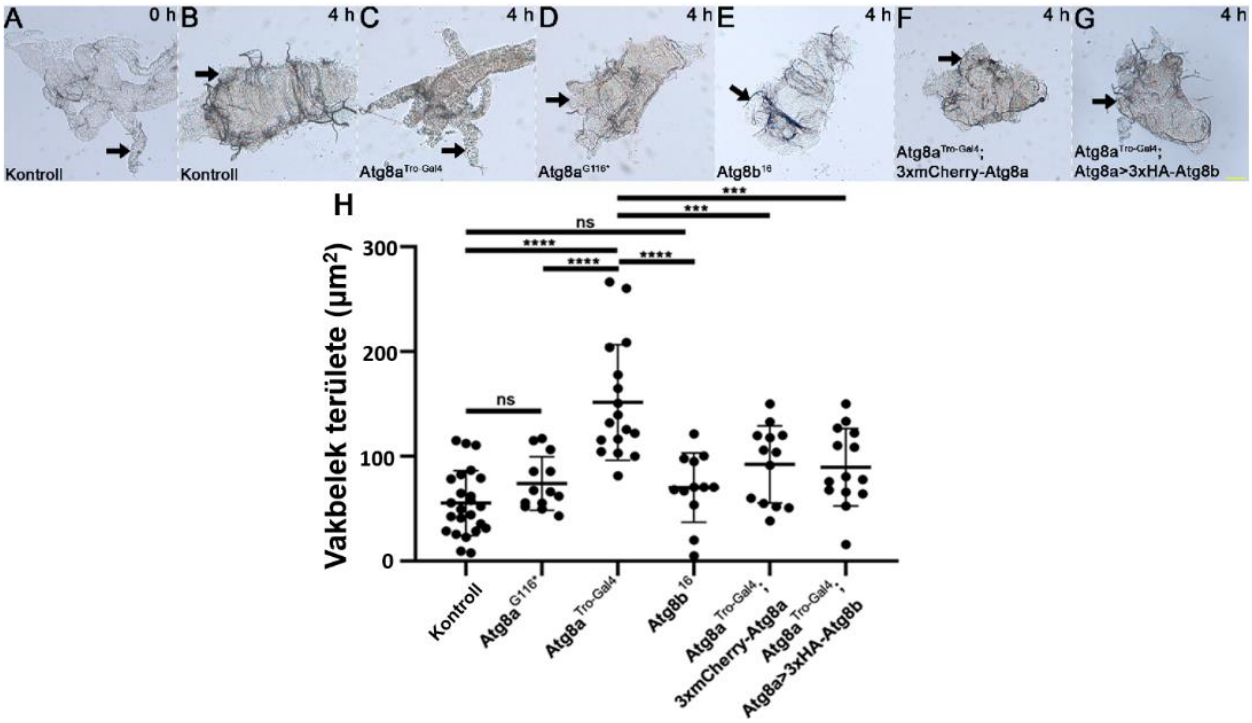
Ahhoz, hogy ezt *Drosophila melanogaster*-ben is megvizsgáljuk, késői báb stádiumú egyedekből agyat boncoltunk és elektronmikroszkóp segítségével megvizsgáltuk a neuronok ultrastruktúráját. Az *Atg8a*$^{Tro\text{-}Gal4}$ és *Atg8a*^{G116*} mutánsok esetében, dacára annak, hogy az autofágia erősen sérült bennük, megfigyeltünk benne autofág struktúrákat az idegsejtekben, továbbá megfigyeltünk aggregátumok is, amely az Atg mutánsok egyik jellemzője. Ezen felül végeztünk egy olyan mutáns klónanalízist zsírtestben, amiben az Atg18-Cherry-t, egy korai fagofór markert, használtunk (**14. ábra A-C**). Jól látható, hogy a klónsejtekben nem csökkent érdemben az Atg18-Cherry-pozitív struktúrák száma csak a mérete, ami szintén arra utal, hogy redukált mértékben, de fennmaradt a fagofórok és autofagoszómák biogenézise (**14. ábra D, E**).



14. ábra. Az Atg8a hiánya csökkenti, de nem szünteti meg teljesen az autofagoszómák képződést. (A) A vadtípusú imágó agy keresztmetszetén ritkán, de meg lehetett figyelni autofagoszómákat (fehér nyíl). (B) Az *Atg8a*$^{Tro\text{-}Gal4}$ és az *Atg8a*^{G116*} (C) allélok esetében szintén megfigyeltünk autofagoszómákat, de ezen felül fehérje aggregátumok is megjelentek a sejtekben (sárga nyílhegy). (D) Az Atg18-Cherry korai fagofór markerre pozitív struktúrák mérete az *Atg8a*^{G116*} mutáns zsírtest-klónsejtekben lecsökkent, de ezek teljesen nem tűntek el, hasonlóan az *Atg8a*$^{Tro\text{-}Gal4}$ mutáns klónokhoz (E). Skála mérete: 10 µm.

4.5 Az Atg8a és az Atg8b egyedfejlődésben betöltött szerepének vizsgálata

A *Drosophila melanogaster* mint modell egyik nagy előnye, hogy az egyedfejlődése gyors és alaposan feltárt. Ezt az előnyt kihasználva részletesebben kezdtük el vizsgálni, hogy az *Atg8a*$^{Tro\text{-}Gal4}$ allél által okozott késői báb letalitásnak milyen kézzelfogható, morfológiai megnyilvánulásai vannak. Ismert, hogy a *Drosophila* lárválís szervek egy jelentős része lebomlik a bábozódás folyamán. Ez a lebomlás tulajdonképpen egy ekdizon által szabályozott, ún. programozott autofágiával bekövetkező sejthalál/sejtzsugorodás, amely folyamat során lebomlanak az olyan nagyméretű szervek, mint a lárválís zsírtestek, a nyálmirigyek és a bél (Hu, Y. X., és mtsai, 2019).



15. ábra. Az *Atg8a* null allél egyedeiben gátolt a vakbelek zsugorodása. Az *Atg8a*$^{Tro\text{-}Gal4}$ null allél esetén a vakbelek (nyíl) szinte intaktak (C, H) összehasonlítva a kontrollal, illetve az Atg8a^{G116*} és az Atg8b^{16} allélokkal (B, D, E, H), amelyeknél jelentős zsugorodás figyelhető meg. Az *Atg8a*$^{Tro\text{-}Gal}$ allél fenotípusa menekíthető Atg8a-t és Atg8b-t kódoló transzgénekkel (F, G, H). n = 12-24 per genotípus, ****: $p < 0.0001$, ***: $p < 0.001$, ns: nem szignifikáns egy utas ANOVA teszttel (H). Skála mérete: 100 µm.

A gyomor után, a középbél kezdetén található vakbelek lebomlása a bábozódás kezdeti szakaszában, a fehér báb fázisban kezdődik és normál körülmények között 4 óra alatt szinte teljesen lezajlik (**15. ábra A, B, H**). Ezzel ellentétben az *Atg8a*$^{Tro\text{-}Gal4}$ null allél esetén a vakbelek lebomlása gátoltnak bizonyult (**15. ábra C, H**). Ugyanakkor az *Atg8a*^{G116*} lipidációra képtelen allél és az *Atg8b*^{16} null allél esetében a vakbelek degradációja nem lassult le

szignifikáns mértékben (**15. ábra C, D, H**). Érdekes jelenség, hogy az *Atg8a*$^{Tro\text{-}Gal4}$ ezen fenotípusát az *Atg8a*-t kifejező *3xmCherry-Atg8a,* valamint az *Atg8b*-t Atg8a promoterrel kifejező *Atg8a>3xHA-Atg8b* transzgénikus konstrukció egyaránt képes volt szignifikáns mértékben menekíteni (**15. ábra F, G, H**). A vakbelekhez hasonlóan a nyálmirigyek is autofágia-függő módon bomlanak le bábozódás után. Megfigyeléseink szerint az *Atg8a*$^{Tro\text{-}Gal4}$ allél esetén a vakbelekhez hasonlóan gátolt volt a nyálmirigyek lebomlása (**Függelék F2. ábra**).

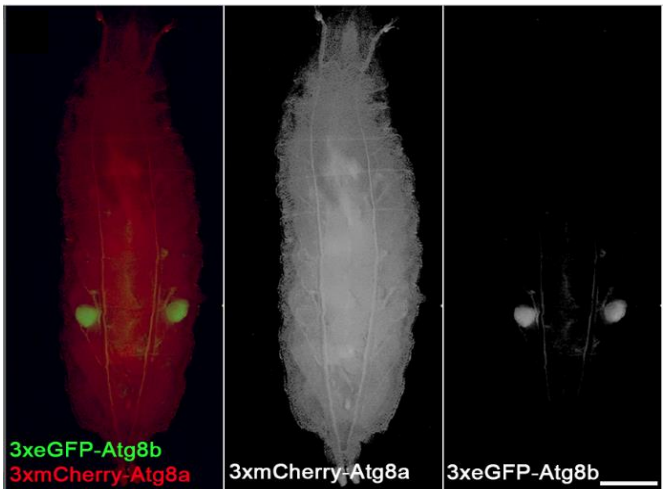
A bábokat vizsgálva hasonlóan nyilvánvaló fenotípust találtunk. Az *Atg8a*$^{Tro\text{-}Gal4}$ mutáns bábok mérete sokkal kisebb volt, valamint az anterior légzőcsövek – a kontrolltól eltérően – nem türemkedtek ki a bábból (**15. ábra**). Az *Atg8a*^{G116*} és az *Atg8b*^{16} mutáns bábok mérete nem különbözött a kontrolltól és légzőcsöveik (spirákulum) is a kontrollhoz hasonlítottak (**16. ábra**).

16. ábra. *Atg8a* hiányában a bábok fejlődési rendellenességeket mutatnak. Megfigyelhető, hogy az *Atg8a*$^{Tro\text{-}Gal4}$ bábok a kontrollhoz és a másik két bemutatott mutánshoz képest kisebb méretűek voltak és az anterior légzőcsövek nem türemkedtek ki a bábból (nyílhegy). Skála méret: 1 mm.

4.6 Az Atg8a és az Atg8b kifejeződési mintázata

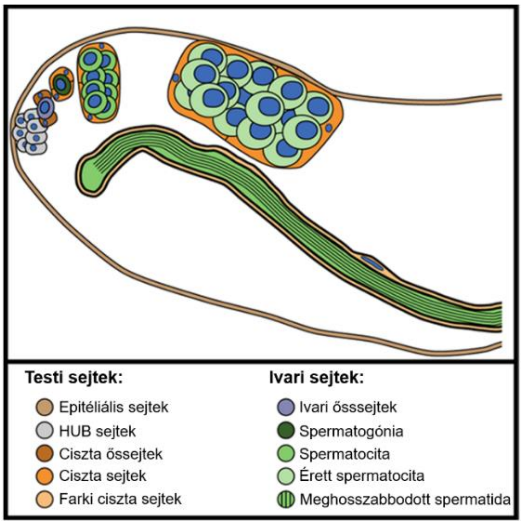
Hogy jobb betekintést nyerjünk az Atg8a és az Atg8b funkciójába, megvizsgáltuk azok kifejeződési mintázatát. Az Atg8a tanulmányozására egy előzőleg már leírt riportert, a 3xmCherry-Atg8a-t használtuk. Ez a konstrukció tartalmazza a teljes Atg8a-gént és promoter régióját, ami biztosítja, hogy a riporter konstrukció autentikusan ábrázolja a gén kifejeződési mintázatát. Ezen konstrukció alapján az Atg8a, a fontos szerepének megfelelően, minden szövetben és sejttípusban mutat kifejeződést (**17. ábra**). Készítettünk egy 3xeGFP-Atg8b riportert is, amelyet az *Atg8b* endogén promoterét helyeztük be az *Atg8b* kifejezése érdekében.

3xeGFP-Atg8b transzgénnek a kifejeződését kizárólag a lárvális és imágó herékben észleltük (**17. ábra**).

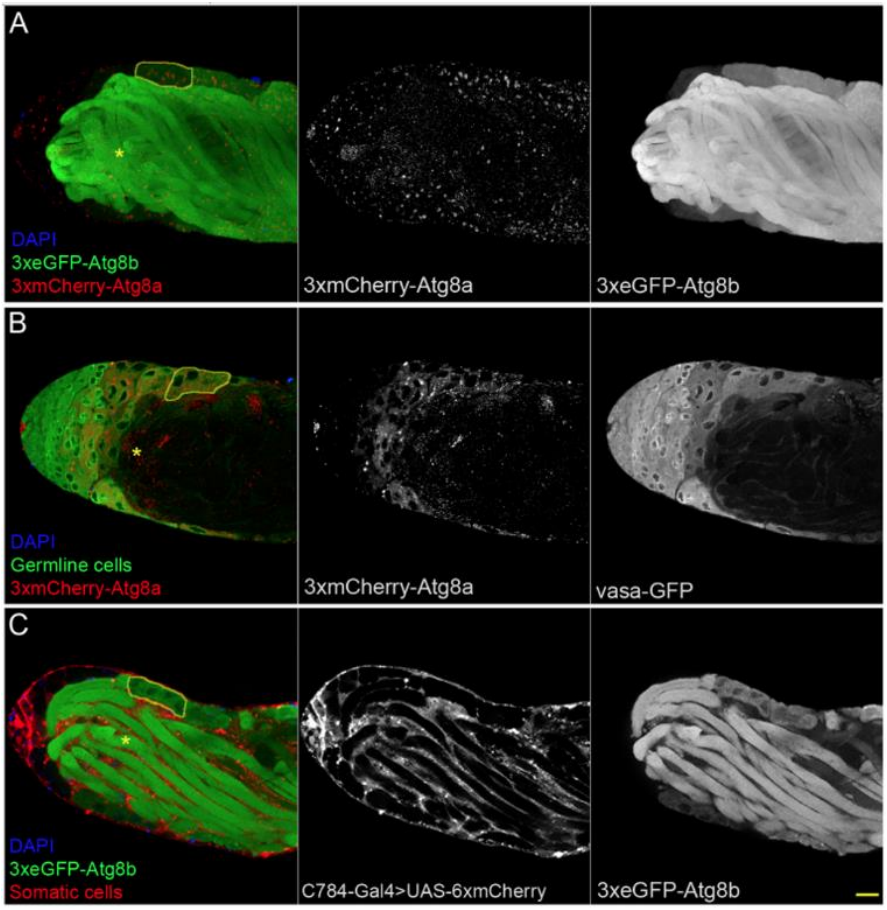


17. ábra. Az Atg8a-nak általános, addig az Atg8b csak a herékben mutat kifejeződést. Késői vándorlárvákban 3xmCherry-Atg8a (piros) gyakorlatilag a teljes szervezetben kifejeződött, míg a 3xeGFP-Atg8b (zöld) kizárólag a fejlődő lárvális herékben volt megfigyelhető. Skála mérete: 250 µm.

A teljes szervezetet érintő vizsgálatok eredményei alapján áttértünk az imágó *Drosophila melanogaster* heréjének a vizsgálatára. A herék apikális végét bemutató képek könnyebb értelmezésére, egy vázlatos ábrát készítettünk, amely bemutatja a here ezen részén előforduló főbb sejttípusokat. (**18. ábra**). A 3xmCherry-Atg8a kifejeződése, C784-Gal4 (ciszta sejt marker), vasa-GFP-hez (csíravonal marker transzgén) és Atg8b-hez hasonlítva, általánosnak nevezhető a herében, egyaránt jelen volt a testi és az csírasejtvonalakban (**19. ábra A, B; FüggelékF3. A**). Érdemes megjegyezni, hogy a riporter a testi eredetű HUB sejtekben erős halmozódást mutatott. A 3xmCherry-Atg8a-val ellentétben a 3xeGFP-Atg8b kizárólag a csírasejtvonalakban volt megfigyelhető. A GFP jel a korai 16 sejtes spermatocitákban jelent meg, és a késői megnyúló cisztákban is jól megfigyelhetően jelen volt (**19. ábra A, C; Függelék F3. ábra B.**). Ugyanakkor a testi eredetű ciszta sejtek mintázata tökéletesen komplementer volt az Atg8b kifejeződési mintázatával, továbbá nem fejeződött ki a szintén testi eredetű epitéliális sejtekben. Ellenben a hímivarsejtekben nagyon erősen halmozódott, a későbbi, megnyúlt spermatidákban is.



18. ábra. A frissen kikelt *Drosophila melanogaster* here (testis) apikális részének és szövettípusainak a sematikus ábrázolása.



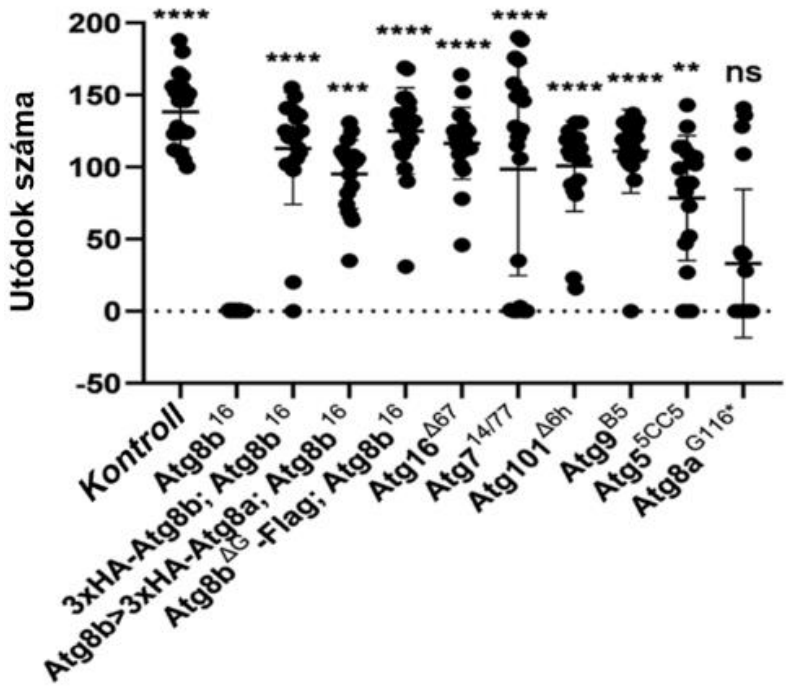
19. ábra. Az Atg8a és az Atg8b expressziós mintázata a frissen kikelt ecetmuslicák heréjének apikális részében. (A) Az Atg8a a 3xmCherry-Atg8a (piros) riporterrel vizsgálva azt látjuk, hogy ha eltérő mértékben, de a here minden sejttípusában kifejeződik a 3xeGFP-Atg8b (zöld, az Atg8b riportere) főleg az ivarvonalban fejeződik ki. (B) 3xmCherry-Atg8a és a vasa-GFP (csíravonal riporter) együttes kifejeztetése alapján nem csak az látszik, hogy az Atg8a csíravonalban is jelen van, hanem az is, hogy az epiteliális sejtekben és a ciszta sejtekben is kifejeződik, a szintén testi HUB sejtekben pedig halmozódást mutat. (C) A testi sejteket kijelölő riporterrel (C784-Gal4) jól látható, hogy az Atg8b (zöld) egyik testi sejtben sem mutat kifejeződést, kizárólag a csíravonalakban. Sárga vonallal a 16 sejtes ciszták, valamint sárga csillaggal a megnyúlt spermatidák vannak jelölve. Skála mérete: 200 µm.

4.7 Az Atg8b szerepe a hím egyedek fertilitásában

4.7.1 Az Atg gének szerepe a hím fertilitásban

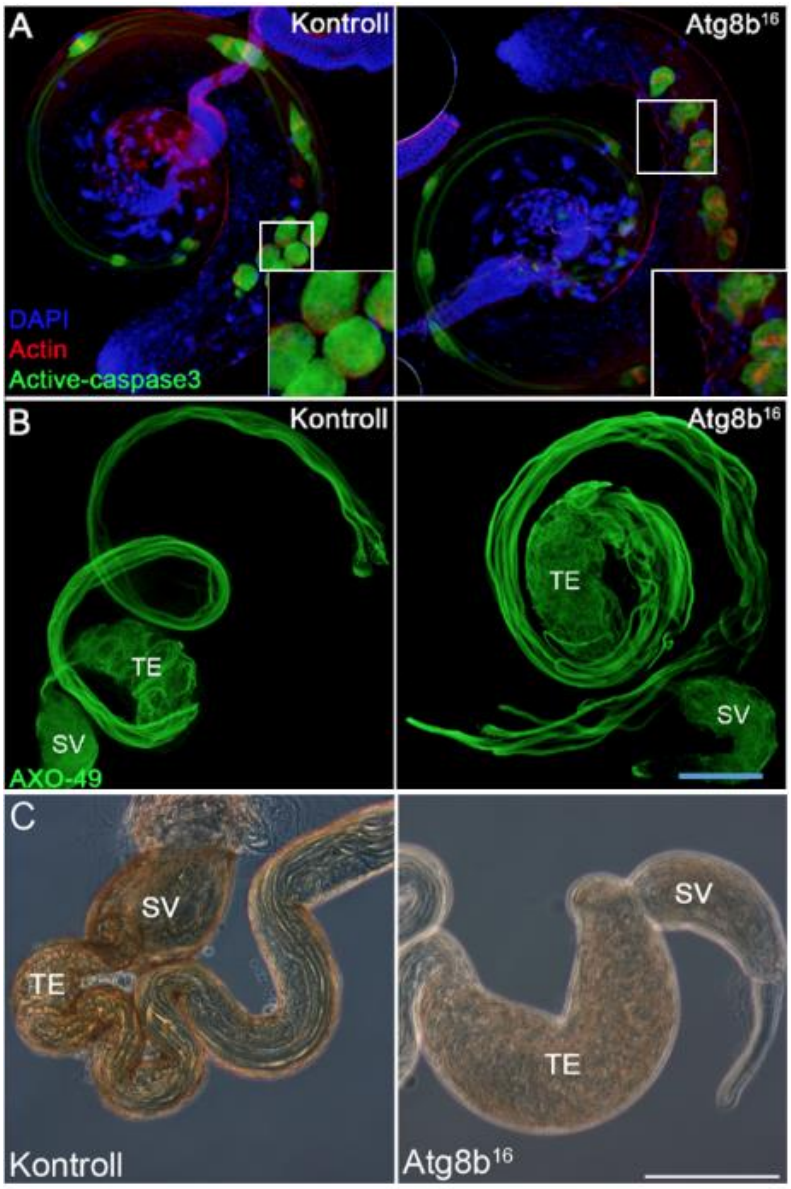
Bár megfigyelték már az Atg gének szerepét a spermatogenézisben, főleg RNS csendesítéses technikákkal, konkrét hatásukat a hím fertilitásra még nem vizsgálták. Mi elhatároztuk, hogy ezt a hiányosságot jól jellemzett null allélok felhasználásával pótoljuk. A vizsgálni kívánt Atg gének között igyekeztünk úgy választani, hogy az autofágiát befolyásoló főbb komplexek képviselve legyenek legalább egy-egy tagjukkal. A Vps34 lipid kináz komplex kivételével, ahol nincs egy életképes null allél, minden komplexben találtunk életképes null

allélt (az iniciáló komplexet az Atg101, a reciklizálót az Atg9 és a konjugáló komplexet az Atg7, Atg5, Atg8a, Atg16 gének reprezentálták). A fertilitási teszt eredményei alapján minden életképes Atg null allél fertilis az *Atg8b* null allél kivételével. Az összes Atg null allél szignifikáns mértékben mutatott nagyobb fertilitást az *Atg8b*^{16}-hoz képest, kivéve az *Atg8a*^{G116*}-ot, amelyet az alkalmazott teszt nem mutatott szignifikánsnak, mert a keresztezések felében nem volt egy utód sem, ami arra utal, hogy szemisteril (**20. ábra**). Ez részben azért lehetett, mert a mutáns törzs némi neuromuszkuláris zavart mutatott, ami esetenként ellehetetleníthette a párzást, de a törzs ennek ellenére homozigóta állapotban fenntartható, ami arra utal, hogy a mutáció nem okoz alapvető fertilitási hibát. Ezen vizsgálatsorozat keretén belül teszteltük az Atg8b-t kifejező transzgénikus menekítő konstrukciókat *Atg8b* null allél háttéren. Továbbá az endogén promoterrel rendelkező és Atg8b-t kódoló 3xHA-Atg8b, a C-terminális glicinjét elvesztő csonkolt Atg8b-t kifejező Atg8b$^{\Delta G}$-Flag konstrukció is menekítette az *Atg8b* mutánst. Egy másik konstrukció, az *Atg8b>3xHA-Atg8a*, melyet Atg8b promoterrel készítettük el, viszont az Atg8a gén átírására alkalmas. Az Atg8b>3xHA-Atg8a meglepetésünkre szintén képes menekíteni a hímsteril fenotípust.



20. ábra. Az Atg null allélok és az Atg8b transzgénikus menekítéseinek hím fertilitás tesztje. Az *Atg8b*^{16} szinte teljesen sterilnek bizonyult, de az Atg komplexeket reprezentáló Atg mutáns hímek fertilisek voltak, hasonlóan az *Atg8b*^{16} null allél hátterében tesztelt transzgénikus menekítő konstrukciókhoz.

4.7.2 Az *Atg8b* hiánya hímsterilitást okoz megfigyelhető morfológiai elváltozások nélkül

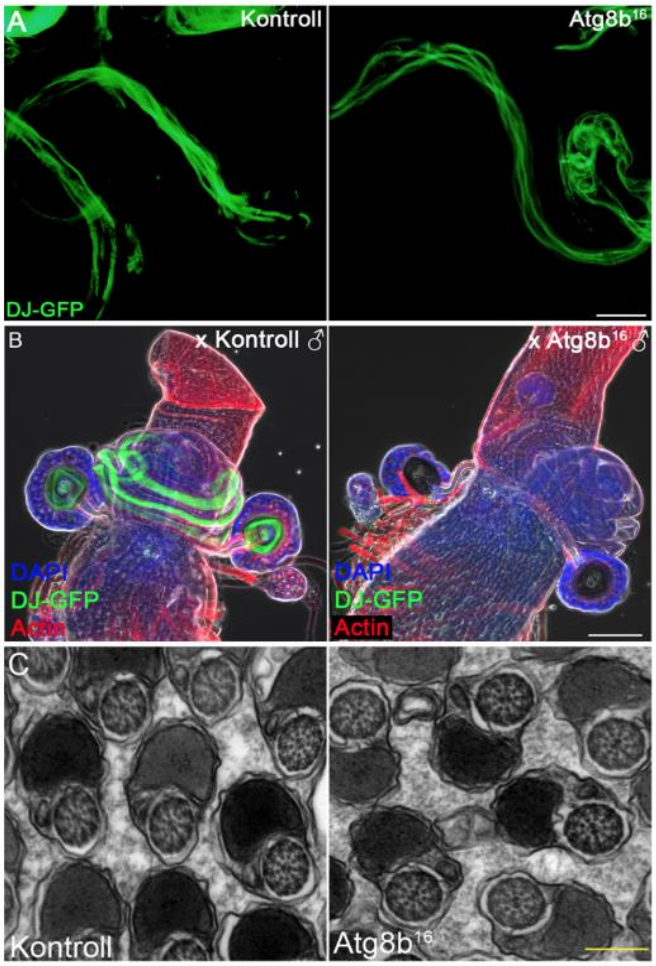


21. ábra. *Atg8b*^{16} here fenotípusai. (A) Az individualizációs folyamat az *Atg8b*^{16} mutánsokban normálisan zajlik, mivel az individualizációs komplex morfológiája (piros) hasonló a kontrollhoz, és a nem apoptotikus kaszpáz kaszkád aktív a keletkező „waste bag”-ekben (zöld). (B) Az érett axonéma tubulinok megfestésével látszik, hogy az *Atg8b* mutánsokban meghibásodott az érett spermium átjutása az ondóhólyagba (SV) és a spermiumok felhalmozódása figyelhető meg a here terminális epitéliumban (TE) a kontrollokkal összehasonlítva. Skála mérete: 100 µm. (C) Mutáns 10 napos herékben már natív mikroszkópos felvételeken is jól láthatóan kitágult a terminális epithélium a felhalmozódott spermiumoktól. Skála mérete: 100 µm.

Hogy megértsük az Atg8b mutáns hímek sterilitásának az okát, mikroszkópos elemzést végeztünk a kiboncolt heremintákon, aberrációkat, elváltozásokat keresve a jellegzetes fejlődési szakaszokon (Fabian, L. és Brill, J. A., 2012). A korai fejlődési szakaszban nem

figyeltünk meg rendellenességeket, mivel az elsődleges spermatocitákat tartalmazó 16 sejtes ciszták szabályosan képződtek és a meiózis a mutánsban szabályosnak tűnt (**Függelék F4. ábra**). A meiózis után a spermatidák elkezdenek megnyúlni, ami hosszúkás cisztákat eredményez mind a kontroll, mind a mutáns hímeknél, ezért ezt a folyamatot az *Atg8b* mutációja nem befolyásolja. A megnyúlás után a következő fejlődési szakasz az individualizáció.

Ennek során az individualizációs komplex (amely aktinban gazdag, kúp alakú citoszkeletális struktúrákból áll) a ciszta apikális végén alakul ki és megkezdi vándorlását a bazális vég felé, kialakítva a cisztikus hólyagot. A citoszolból származó komponensek többsége lebomlik és kiürül az úgynevezett „waste bag”-be, majd a folyamat végén kialakulnak az individualizálódott spermiumok (**21. ábra A**).



22. ábra. Az Atg8b^{16} spermiumai mozgásképtelenek, de nem mutatnak erre utaló morfológiai elváltozásokat. (A) A DJ-GFP kijelöli az érett spermiumok farki részét, *Atg8b* mutánsban és vadtípusban egyaránt. Skála: 100 µm. (B) Vadtípusú nőstény DJ-GFP transzgént hordozó hímmel való párosodás után megjelölt hímivarsejteket hordoz a ondótartályában és a spermatékájában. Skála: 100 µm. (C) Here keresztmetszeten végzett elektronmikroszkópos felvételen nem látszik jelentős ultrastrukturális morfológiai különbség az *Atg8b* mutáns és kontroll között. Skála: 100 nm.

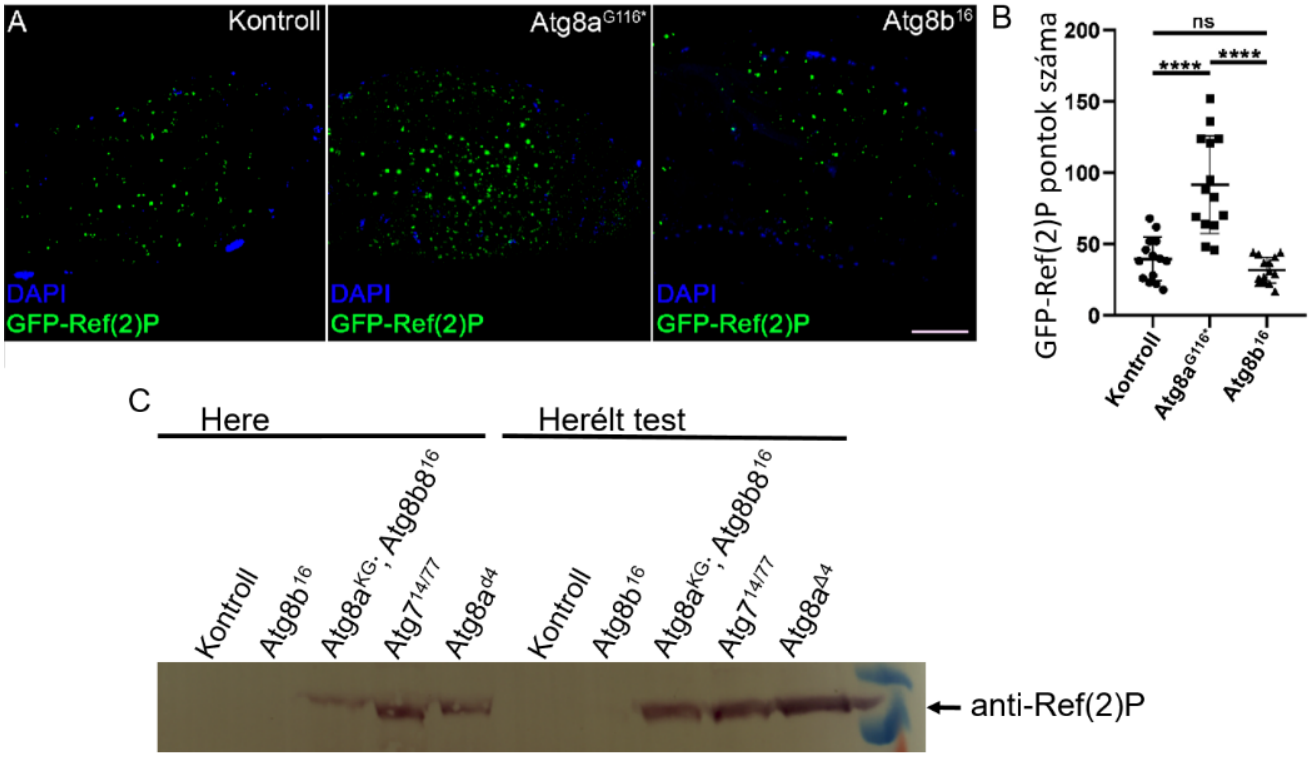
A spermatidák individualizáláshoz elengedhetetlen a proteázok általi irányított fehérjebontás és a nem apoptotikus kaszpáz aktivitás. A kaszpáz aktivitást anti-aktív kaszpáz-3 immunfestéssel tettük láthatóvá és a vándorló aktinkúpokat fluoroforral konjugált falloidinnel festettük (**21. ábra A**). Ennek alapján azt találtuk, hogy az *Atg8b* mutánsokban az individualizáció normálisan zajlik, az individualizációs komplex morfológiája hasonló a vadtípuséhoz, a nem apoptotikus aktív kaszpáz kaszkád jelen van a „waste bagben". Az individualizáció után a következő lépés az érett sperma feltekeredése és átvitele az ondóhólyagba. Ezt a lépést az anti poliglicilált tubulin (AXO49) antitesttel történő immunfestéssel tanulmányoztuk (**21. ábra B**). Ez a vizsgálat azt mutatta, hogy az *Atg8b* mutánsban normálisan kifejlődnek a spermiumok, de az ondóhólyagba történő megfelelő átjutása sérült. Ennek megfelelően az idős *Atg8b* mutáns hímek heréjének a disztális végén, a terminális epitéliumban felgyűlnek a hímivarsejtek, amely látható szervi elváltozást okoz (**21. ábra C**).

Annak tesztelésére, hogy a spermiumok eljutnak-e a nőstényekhez, DJ-GFP riporterrel jelöltük a hímivarsejteket, amellyel egyaránt jelöltük a kontrollt és az *Atg8b* mutáns spermiumokat egyaránt (**22. ábra A**). Ezeket a hímeket vadtípusú nőstényekkel kereszteztük és kiboncoltuk a nőstények spermium tároló szerveit. Ezek a kísérletek azt mutatták, hogy az Atg8b mutáns spermasejtek nem tudják elérni a velük párosított nőstények szeminális ondótartályát és spermatékáját (**22. ábra B**). Ezeket a jelenségeket jól magyarázza, hogy a kifejlett hímivarsejtek mozgásképessége rendkívül alacsony (**Függelékek F5. ábra**). Ennek ellenére transzmissziós elektronmikroszkópiás felvételek alapján úgy tűnik, hogy az *Atg8b* mutáns spermatidákba semmilyen ultrastruktúrális elváltozást nem szenvedtek el (**22. ábra C**). A spermiumok mozgását leginkább meghatározó a két mitokondrium származék, valamint az axonéma morfológiája teljesen ép, ami arra utal, hogy az Atg8b strukturális fehérjeként nem játszik szerepet strukturális fehérjeként a spermiogenezisben és a spermiumok működésében.

4.7.3 Az *Atg8b* hímsteril fenotípusa független az autofágia folyamatától

Előző kísérleteinkből már kiderült, hogy az Atg8b nem tölt be funkciót az autofágiában, ugyanakkor jelentős kifejeződést mutat a herékben. Bár az Atg8b utolsó, a többi homológjában a lipidálódásáért felelős glicinje nélkül, transzgénikusan kifejezve képes menekíteni az *Atg8b* mutáns hímsteril fenotípusát, ennek ellenére úgy gondoltuk, hogy érdemes lehet megvizsgálni közvetlenül a herékben is az autofágia aktivitását.

Ebben a kísérletben a zsírtest klónanalízis vizsgálatokból már ismert GFP-Ref(2)P szintjét vizsgáltuk herében, *Atg8a*, *Atg8b* mutáns és kontroll háttéren. Az eredmények kvantifikálása és statisztikai elemzése után azt találtuk, hogy csak az *Atg8a*^{G116*} allélban a GFP-Ref(2)P a kontrollhoz képest szignifikáns mértékben halmozódik fel, szemben az Atg8b mutánssal, amelyik nem tért el szignifikáns mértékben a kontrolltól (**23. ábra A, B**). Egy másik kísérletben a heréket kiboncoltuk, fehérjét izoláltunk belőlük és Ref(2)P ellenanyag felhasználásával Western bloton vizsgáltuk őket. Ebben a vizsgálatban az *Atg8b* mutáns a vadtípusú mintához hasonló mértékű Ref(2)P-t mutatott, úgy herében, mint a teljes szervezetben, míg a többi Atg mutáns (*Atg7*$^{14/77}$, *Atg8a*^{d4}, *Atg8a*^{KG07569}; *Atg8b8*^{16} kettős mutáns) herében is és a teljes szervezetben egyaránt halmozta a Ref(2)P-t (**23. ábra C**). Ezen eredmények arra utalnak, hogy az Atg8b a kifejeződésének a helyén sem tölt be autofágiával kapcsolatos funkciókat, tehát a fertilitásban betöltött szerepe ettől független lehet.



23. ábra. Az Atg8b mutációja herék szintjén sem okozza a Ref(2)P felhalmozódását. (A) A herék apikális részét vizsgálva azt találtuk, hogy a GFP-Ref(2)P pontok száma nagyon hasonló a kontrollban és az Atg8b^{16}-ban, míg az Atg8a^{G116*} allélban szignifikáns mértékben nő a Ref(2)P pontok száma. (B) Az adatokat egyutas ANOVA-val teszteltük le n = 14 genotípusonként, ****: $p < 0.0001$, ns: nem szignifikáns. Skála mérete: 50 µm. (C) Különböző herékből izolált fehérjeminták Ref(2)P ellenanyag alapú Western blottal vizsgálata esetén azt látjuk, hogy az Atg8b^{16}-ban azonos módon fejeződik ki a Ref(2)P, mint a kontrollban, szemben az Atg mutánsokkal, amelyek herében és a teljes szervezetben is erősen halmozza a Ref(2)P.

5. Eredmények megvitatása

5.1 A *Drosophila melanogaster* Atg8 homológjai és azok szerepe az autofágiában és az egyedfejlődésben

Az autofágia a sejt alkotóelemeinek lebontásával számos funkció betöltésében játszik esszenciális szerepet. Már a kezdetektől ismert volt, hogy az autofágia legfontosabb szerepe az egysejtű élesztőben a metabolikus stressz elleni védekezés éhezés esetén. Azonban többsejtű, komplexebb eukariótákban számos egyéb fontos szerepet tölt be. Ilyen fontos funkciója a meghibásodott makromolekulák és sejtszervecskék lebontása, mely hozzájárul a sejt homeosztázisának fenntartásához. Az emlősök idegsejtjeiben például, amelyek osztódás révén képtelenek a megújulásra, az autofágia jelentős szerepet játszik a sejtek hibás fehérjéinek eltávolításában. Hibája olyan idegrendszeri megbetegedésekhez vezet, mint az Alzheimer-, vagy a Parkinson-kór. Az autofágia központi génjei közül talán a legtöbb kérdés az Atg8 génnel kapcsolatban van, ennek a mélyebb megismerését tűztük ki célul *Drosophila melanogaster* modell segítségével.

Elsőként az Atg8 rovarokon belüli evolúcióját tanulmányoztuk, és azt a megfigyelést tettük, hogy bár a rovarok eredetileg (a *Caenorhabditis elegans*-hoz hasonlóan) két Atg8 homológgal rendelkeznek, a csoporton belül számos esetben megfigyelhető az egyik kópia elvesztése. A megmaradt kópia minden esetben az *Atg8a*, ami a gén élettani fontosságára is utal. Arra is felfigyeltünk, hogy a *Drosophila* nembe tartozó fajokban megjelent egy új Atg8 homológ, amely retrotranszpozíciós módon jött létre az *Atg8a*-t felhasználva mintaként. Ez az új homológ az Atg8b, ami 78%-os aminosav azonosságot mutat az Atg8a-val, ami nagyon magas aránynak számít. Érdemes azonban figyelembe venni, hogy a *Drosophila melanogaster* Atg8a a többi rovarfaj Atg8a-val rendszerint 90% körüli aminosav szekvencia egyezést mutat, ami arra utal, hogy az Atg8b elkülönülése már viszonylag előrehaladott, és egy új funkció betöltése felé mutat a fejlődése.

Az Atg8 homológok feladatainak jobb megismerése céljából mindkét génre készítettünk null allélt, az *Atg8a*-ra ugyanakkor előállítottunk egy misszensz mutánst is, amely esetén a fehérje utolsó glicinje hiányzik, ezért képtelen a lipidálódásra. Az elkészült új allélokon először az autofágia működését teszteltük le különböző mikroszkópos és biokémiai módszerekkel. Eredményeink szerint mindkét *Atg8a* allél esetén erősen gátolt az autofágia, míg az *Atg8b* génre készült null allélnál az autofágia folyamata zavartalanul végbemegy egyaránt testi és ivarvonali

sejtekben. Mivel előzetes információk alapján tudtuk, hogy az *Atg8b* főleg a herékben fejeződik ki, ezért ebben a szervben is megvizsgáltuk az autofágia legfontosabb szubsztrátjának tekintett Ref(2)P szintjét, és szintén azt találtuk, hogy az Atg8b-nek nincs hatása az autofágiára. Ezzel sikerült egy mai napig tévesen élő információt cáfolni, miszerint az *Atg8b*-nek szerepe van az autofágiában. Számos olyan Atg gén van, amely az autofágián felül szerepet játszik más folyamatokban is (Kiss és mtsai, 2020, Nagy és mtsai, 2017, Osawa és mtsai, 2019), ugyanakkor kísérleteinkkel azonosítottuk az első olyan Atg gént, amelynek nincs szerepe az autofágiában. Ez azt jelenti, hogy *Drosophila melanogaster*-ben csak egy autofág funkciót ellátó Atg8 homológ van, ami egyedi a többsejtű modellorganizmusokban, és ezzel az ecetmuslicát különösen alkalmas eszközzé teszi az autofágia és a hozzá kapcsolódó folyamatok vizsgálatára.

Ismert, hogy az élesztőben Atg8 hiányában nem figyelhetőek meg az autofág struktúrák, míg emlősökben Atg8 homológok hiányában is kimutatható egy erősen redukált autofágia és az azzal járó csökkent méretű fagofórok és autofagoszómák. *Drosophila melanogaster*-ben még nem vizsgálták, hogy milyen hatással van az autofágiára az Atg8 homológok hiánya. Felhasználva az új *Atg8a*$^{Tro\text{-}Gal4}$ null allélt és a lipidációra képtelen Atg8a^{G116*} mutánst fénymikroszkópos és elektronmikroszkópos módszerekkel vizsgáltuk meg a fenti kérdést. Azt figyeltük meg, hogy mindkét *Atg8a* mutánsnál az agyban és zsírtestben egyaránt előfordulnak autofágiához köthető struktúrák. Ugyanakkor azt is megfigyeltük, hogy az *Atg8a* mutáns imágók agyában gyakran jelennek meg fehérje-aggregátumok, ami ugyanakkor utal az autofágia mértékének a drasztikus csökkenésére is. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a *Drosophila*-ban az autofágia folyamata inkább az emlősökéhez hasonlít.

A *Drosophila* modell egyik hagyományos előnye, hogy egyedfejlődése meglehetősen jól jellemzett. Bábozódáskor a lárvák középbelén lévő vakbelek zsugorodni és bomlani kezdenek, ezzel ezek a szervek egyedi, kaszpázoktól független, autofágia függő programozott sejthalál modellként alkalmazhatóak. Korábban már vizsgálták, hogy az Atg gének hogyan hatnak erre a folyamatra, és arra jutottak, hogy a legtöbb Atg gén szükséges hozzá, beleértve az *Atg8a*-t, ugyanakkor az Atg8a lipidálásáért felelős kaszkád egyik tagjának a csendesítése sem gátolta a vakbelek zsugorodását (Xu és mtsai, 2015). A publikációban ezt azzal magyarázták, hogy az Atg8a képes lehet egy addig még ismeretlen, nem kanonikus módon is lipidálódni. Az általunk készített, lipidálódásra képtelen mutánsban szintén végbemegy a vakbelek lebomlása, míg a null mutánsunk esetében ez gátolt, ami arra utal, hogy az Atg8a-nak van egy lipidációtól független funkciója a folyamatban. Kitekintésként megjegyezném, hogy

pár hónapja megjelent egy közlemény, amiben az Atg8a transzkripciós szabályozó kofaktorként való funkcióját határozták meg (Jacomin és mtsai, 2020). Ebben a publikációban többek között leírják, hogy az Atg8a az indukált autofágia során serkenti többek között a többi Atg gén kifejeződését, ennek alapján felmerül, hogy a lipidálatlan Atg8a szintén betölthet hasonló funkciókat, amely kérdést érdemes lehet még tovább vizsgálni. Erre választ adhat, ha a vad típusú és a *Atg8a*^{G116*} allél *Atg8a* génjét egyaránt *in situ* fúzionáltatnánk N-terminálisan NES (Nuclear Export Signal) jellel. Ha az Atg8a lipidálódásra képtelen (tehát az autofágiában nem képes ellátni a szerepét) és a sejtmagba se képes bejutni, akkor érdemes lenne megvizsgálni, hogy okoz-e ez többlet fenotípust az egyedfejlődésben? Ugyan ezen új konstrukcióban érdemes lenne qPCR-el megnézni több érintett gén kifejeződési szintjét. Továbbá érdemes lenne megvizsgálni a bábozódást jelentősen befolyásoló ekdizon hormon hat-e az Atg8a potenciális transzkripciós kofaktor funkciójára.

Említésre méltó, hogy az *Atg8a*$^{Tro\text{-}Gal4}$ null allél fenotípusa menekíthető, nem csak az *Atg8a*-t kifejező transzgénnel, de az *Atg8b*-t kódoló transzgénnel is, ami arra utal, hogy az aminosav szekvencia eltérés még nem olyan mértékű, hogy az Atg8b ne tudná betölteni teljesen az eredeti funkcióit. Ugyanakkor azt is érdemes megjegyezni, hogy hiába menekíthetők az *Atg8a*$^{Tro\text{-}Gal4}$ autofágiához és egyedfejlődéshez kapcsolódó fenotípusai, az életképességi defektust nem sikerült egyik transzgénnel sem menkíteni. Továbbá érdemes lenne megvizsgálni, hogy a többi *Atg8a* allél (*Atg8a*^{d4}, *Atg8a*^{KG07569}, *Atg8a*^{G116*}) felhasználásával készült transzheterozigóta *Atg8a*$^{Tro\text{-}Gal4}$ vonalak milyen fenotípust mutatnak. Lehetséges, hogy a konstrukció által kifejezett Gal4 okozza a késői báb letalitást, ennek végleges tisztázására szükség lenne egy deléciós mutánsra, amelyben ki van ütve az *Atg8a* összes exonja.

5.2 Az autofágia és az Atg8b szerepe a *Drosophila melanogaster* hím fertilitásban

Emlősökben az autofágia több sejtbiológiai folyamaton keresztül is hat a hím egyedek fertilitására. *Drosophila melanogaster*-ben az autofágia hatása a spermatogenezisre még viszonylag ismeretlen. Egy nemrég publikált kutatás szerint az autofágiának jelentős szerepe van a ciszta őssejtek fenntartásában, ilyen módon autofágia hiányában idővel megfeleződik a ciszta sejtek száma a herében (Demarco és mtsai, 2020). Ellenben az autofágia tényleges hatását a hím fertilitásra itt sem vizsgálták. A mi eredményeink szerint az összes olyan, az autofágiában szerepet játszó Atg gén esetében, amelynek null allélja nem okoz letalitást, az imágók fertilisek, habár érzékeltünk némi visszaesést az utódok számában a mutáns hímek esetén. Ugyanakkor

nem mehetünk el szó nélkül amellett sem, hogy az *Atg8a*^{G116*} lipidációra képtelen allél szemi-sterilitást mutat. Esetükben megfigyeltük a tesztkeresztezésük során, hogy a keresztezések fele steril. Joggal feltételezhetjük, hogy az allélra jellemző renyheség (neuromuszkuláris zavarok, szárnyfejlődési hiba) okozhat kopulálásban problémát. Bár úgy tűnik ezen hímekben a spermiumok mozgásképessége a vad típusúhoz hasonló, érdemes lenne részeltesen megvizsgálni a mutáns őssejt niche morfológiája és működése szenvedett-e valamilyen elváltozást. Ugyanebben a tesztben az *Atg8b*^{16} null allél esetén nem találtunk utódokat, a hímek lényegében sterilek voltak.

Ennek okait először a gén kifejeződési mintázatában próbáltuk megtalálni endogén promoterrel rendelkező riporter konstrukciók felhasználásával. A teljes szervezetet vizsgálva azt találtuk, hogy az Atg8b kizárólag herékben fejeződik ki, szemben az Atg8a-val, amely az összes szövettípusban jól látható kifejeződést mutatott. A herékben tapasztalt kifejeződést részletesebben vizsgálva azt találtuk, hogy az Atg8b kizárólag csíravonal sejtekben figyelhető meg, a poszt-meiotikus 16 sejtes ciszták stádiumától az érett spermiumokig. Ennek ellenére a spermatogenezisben semmilyen látható morfológiai elváltozást nem észleltünk, a hímek steril fenotípusát a spermiumok mozgásképtelensége okozta.

Az *Atg8b*^{16} null mutáns, korábbi fázisban megfigyelhető, fejlődési hibát nem okozó, de a mozgásképesség erős redukálódásával járó fenotípus, bár nem egyedi, korántsem nevezhető szokványosnak. Egy EMS mutagenezis szűrés során, olyan mutáns vonalakat kerestek amelyek valamilyen módon hímsterilitást okoztak (Wakimoto és mtsai, 2004). Mindössze a találatok 19% volt olyan hímsteril mutáció, amelynek során ép hímivarsejtek jutottak az ondóhólyagba. Ezen mutánsok sterilitását is csak kis része okozta a hímivarsejtek mozgásképtelensége. A legtöbb ilyen fenotípus kategóriába eső mutáns spermiumai mozgásképesek voltak. Steril mivoltukat leginkább párzási viselkedésük meghibásodása, valamilyen spermium átviteli, vagy tárolási hibája, fertilizációs hiba, esetleg egy apai domináns letális mutáció okozta. Sajnálatos módon egy ilyen fenotípus nem alkalmas arra, hogy a gén funkciójáról közvetlen következtetést vonjunk le.

Azonban érdekes módon az *Atg8b* endogén promoterével rendelkező *Atg8a*-t kifejező konstrukció képes a hímek steril fenotípusának a menekítésére, bár kisebb mértékben, mint az *Atg8b*-t endogén módon kifejező konstrukciók. Ez nem csak arra utal, hogy az Atg8b evolúciós léptékben még nem távolodott el jelentősen az *Atg8a*-tól, de arra is rámutat, hogy az Atg8b ivari funkcióját elsősorban kifejeződési mintázata adja, valószínűleg géndózis függő módon hat és nem két fehérje aminosav szekvencia különbségéből következik. Ugyanakkor az Atg8b

herespecifikusan sem játszik szerepet az autofágiában, amit nem csak a már tárgyalt Ref(2)P alapú vizsgálatok támasztanak alá, hanem az a tény, hogy egy olyan konstrukció is menekíti az *Atg8b*^{16} null allél okozta sterilitását, amely endogén promoter mellett csonkolt, C-terminális végén lévő glicinjétől megfosztott, lipidálódásra képtelen Atg8b-t fejez ki. Ezt az eredményt az is erősíti, hogy az *Obscura* al-nembe tartozó *Drosophila* fajok már nem rendelkeznek ezzel a glicinnel.

Érdemes azt is megjegyezni, hogy a *Drosophila melanogaster*-ben már számos here specifikus génduplikálódást írtak le. Ezek közül számos gén hasonló funkciót tölt be, mint az eredeti változata. Ilyen az *e(y)2b* gén amely hasonló funkciót tölt be, mint az *e(y)2* eredeti gén (Krasnov és mtsai, 2005). Ugyanakkor szép számmal írtak le olyan duplikációkat, amelyek során az új, here specifikus gén egy új funkciót nyert (Assis és Bachtrog, 2013). Vizsgálataink alapján kijelenthetjük, hogy egy ilyen neofunkcionalizáció zajlott le az *Atg8b* esetén is.

Az Atg8b sejtbiológiai funkcióját jellegzetes morfológiai elváltozások hiánya és technikai korlátok miatt (a készült konstrukciók nem voltak alkalmasak tömegspektrometriás vizsgálatokra) nem tudtuk megtalálni, viszont a fehérje jelenléte a spermium-farkakban és a mutáns hímivarsejtek mozgásképtelensége valamilyen flagelláris, esetleg mitokondriális működéssel kapcsolatos szerepet sejtet.

5.3 Az eredményeink potenciális felhasználási területei

Az Atg8 géncsalád lipidációtól független szerepeiről már emlősökben is közöltek kutatási eredményeket. Nem lipidált LC3-at (egy emlős Atg8 paralóg) megfigyeltek intracelluláris *Chlamydia*-hoz kötődve, amely ilyen formában szükséges volt a baktérium szaporodásához. Ugyanakkor az autofágia gátlása segítette a *Chlamydia* növekedését (Al-Younes és mtsai, 2011). Az EDEMoszómák ER eredetű, kettős membránnal rendelkező vezikulák, amelyeket különböző dajkafehérjék (köztük az EDEM1) segítségével az endoszómákba vándorol, későbbi lebontás céljából. Ezen vezikulákat lipidálatlan LC3 molekulák borítják be (Olivari és mtsai, 2006). Érdekes módon, többek között a koronavírusok ezt az EDEMoszóma útvonalat eltérítve és felhasználva hoznak létre saját szaporodásukhoz kettős membránnal rendelkező vezikulákat (Reggiori és mtsai, 2010). Ezen előzmények alapján úgy gondolom, hogy a dolgozatomban bemutatott új genetikai eszközök fontos alap és alkalmazott kutatásokhoz járulhatnak hozzá.

A *Drosophila* nemnek számos olyan közeli rokona van, amely parazitaként valamilyen fertőző ágenst (vektor) hordoz. Ilyenek például a cecelegyek (*Glossina*), amelyek az álomkórt

okozó *Trypanosoma*-t terjesztik. Mivel nincs annotálva ezen fajok szekvenált genomja, ezért nem kerültek be az általunk vizsgált fajok közé, de a legtöbb, ismert szekvenciával rendelkező fajban két Atg8 homológ is felismerhető „blast" jellegű kereséssel, amelyekből az egyik nagyfokú azonosságot mutat a *Drosophila melanogaster Atg8b* szekvenciájával. Ha beigazolódna, hogy a cecelegyeknek hasonló funkcióval rendelkező Atg8b homológja van, akkor ez a gén egy kiváló célpont lehetne a populációjuk féken tartására tett próbálkozásokban.

5.4 A legfontosabb eredményeink rövid összefoglalása

- Megalkottuk a rovarok Atg8 gén-fajfáját, hogy rekonstruáljuk a gén evolúcióját.
- Létrehoztunk egy erőteljes genetikai eszköztárat, amely tartalmaz két null allélt az *Atg8a* és az *Atg8b* génekre, valamint egy lipidációra képtelen, csonkolt fehérjét kifejező *Atg8a* törzset, továbbá számos transzgénikus vonalat, amelyek ezen gének különböző változatait fejezik ki.
- Megállapítottuk, hogy csak az *Atg8a* játszik szerepet az autofágiában és az egyedfejlődésben, míg az Atg8b-nek kizárólag a hím fertilitásban van szerepe.
- Az *Atg8b* csak csíravonalban fejeződik ki, mutációja pedig erősen redukálja a spermiumok mozgékonyságát.
- Az Atg8b here ivarvonal szintjén betöltött, Atg8a-hoz képest megkülönböztető szerepének elsősorban nem aminosav szekvencia különbségbéli oka van, hanem génkifejeződésben különbözik az Atg8a-tól.
- Az Atg8b új funkciója már nem játszik szerepet az autofágiában herék szintjén sem.
- Az Atg8a-nak és az Atg8b-nek egyaránt van lipidációtól független, azaz poszt-transzlációs módosítást nem igénylő funkciója.

6. Irodalomjegyzék

Aizawa, S., Fujiwara, Y., Contu, V. R., Hase, K., Takahashi, M., Kikuchi, H., ... & Kabuta, T. (2016). Lysosomal putative RNA transporter SIDT2 mediates direct uptake of RNA by lysosomes. *Autophagy*, *12*(3), 565-578.

Al-Younes, H. M., Al-Zeer, M. A., Khalil, H., Gussmann, J., Karlas, A., Machuy, N., ... & Meyer, T. F. (2011). Autophagy-independent function of MAP-LC3 during intracellular propagation of Chlamydia trachomatis. *Autophagy*, *7*(8), 814-828.

Assis, R., & Bachtrog, D. (2013). Neofunctionalization of young duplicate genes in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(43), 17409-17414.

Bandyopadhyay, U., Sridhar, S., Kaushik, S., Kiffin, R., & Cuervo, A. M. (2010). Identification of regulators of chaperone-mediated autophagy. *Molecular cell*, *39*(4), 535-547.

Bento, C. F., Renna, M., Ghislat, G., Puri, C., Ashkenazi, A., Vicinanza, M., ... & Rubinsztein, D. C. (2016). Mammalian autophagy: how does it work?. *Annual review of biochemistry*, *85*, 685-713.

Betrán, E., Thornton, K., & Long, M. (2002). Retroposed new genes out of the X in Drosophila. *Genome research*, *12*(12), 1854-1859.

Bhattacharjee, A., Szabó, Á., Csizmadia, T., Laczkó-Dobos, H., & Juhász, G. (2019). Understanding the importance of autophagy in human diseases using Drosophila. *Journal of Genetics and Genomics*, *46*(4), 157-169.

Cao, Y., & Klionsky, D. J. (2007). Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein. *Cell research*, *17*(10), 839-849.

Csizmadia, T., Lőrincz, P., Hegedűs, K., Széplaki, S., Lőw, P., & Juhász, G. (2018). Molecular mechanisms of developmentally programmed crinophagy in Drosophila. *Journal of Cell Biology*, *217*(1), 361-374.

Cuervo, A. M., & Dice, J. F. (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*, *273*(5274), 501-503.

Darby, C. A., Stolzer, M., Ropp, P. J., Barker, D., & Durand, D. (2017). Xenolog classification. *Bioinformatics*, *33*(5), 640-649.

de Duve C, Foundation C.Ciba Foundation Symposium: LysosomeDe Reuck A, Cameron MP, eds. Little, Brown, 1963

De Duve, C., & Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. *Annual review of physiology*, *28*(1), 435-492.

De Duve, C., Pressman, B., Gianetto, R., Wattiaux, R., & Appelmans, F. (1955). Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochemical Journal*, *60*(4), 604-617.

Demarco, R. S., Uyemura, B. S., & Jones, D. L. (2020). EGFR Signaling Stimulates Autophagy to Regulate Stem Cell Maintenance and Lipid Homeostasis in the Drosophila Testis. *Cell Reports*, *30*(4), 1101-1116.

Diao, F., Ironfield, H., Luan, H., Diao, F., Shropshire, W. C., Ewer, J., ... & White, B. H. (2015). Plug-and-play genetic access to drosophila cell types using exchangeable exon cassettes. *Cell reports*, *10*(8), 1410-1421.

Fabian, L., & Brill, J. A. (2012). Drosophila spermiogenesis: big things come from little packages. *Spermatogenesis*, *2*(3), 197-212.

Fujita, N., Itoh, T., Omori, H., Fukuda, M., Noda, T., & Yoshimori, T. (2008). The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Molecular biology of the cell*, *19*(5), 2092-2100.

Fujiwara, Y., Furuta, A., Kikuchi, H., Aizawa, S., Hatanaka, Y., Konya, C., ... & Kabuta, T. (2013). Discovery of a novel type of autophagy targeting RNA. *Autophagy*, *9*(3), 403-409.

Ganley, I. G., Lam, D. H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., & Jiang, X. (2009). ULK1· ATG13· FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(18), 12297-12305.

Gao, F., Li, G., Liu, C., Gao, H., Wang, H., Liu, W., ... & Xia, W. (2018). Autophagy regulates testosterone synthesis by facilitating cholesterol uptake in Leydig cells. *Journal of Cell Biology*, *217*(6), 2103-2119.

Gatica, D., Lahiri, V., & Klionsky, D. J. (2018). Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nature cell biology*, *20*(3), 233-242.

Guo, T., Nan, Z., Miao, C., Jin, X., Yang, W., Wang, Z., ... & Deng, Q. (2019). The autophagy-related gene Atg101 in Drosophila regulates both neuron and midgut homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(14), 5666-5676.

Hanada, T., Noda, N. N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., ... & Ohsumi, Y. (2007). The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(52), 37298-37302.

Hansen, M., Rubinsztein, D. C., & Walker, D. W. (2018). Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nature reviews Molecular cell biology*, *19*(9), 579-593.

Hatakeyama, R., & De Virgilio, C. (2019). TORC1 specifically inhibits microautophagy through ESCRT-0. *Current genetics*, *65*(5), 1243-1249.

Hegedűs, K., Takáts, S., Boda, A., Jipa, A., Nagy, P., Varga, K., ... & Juhász, G. (2016). The Ccz1-Mon1-Rab7 module and Rab5 control distinct steps of autophagy. *Molecular biology of the cell*, *27*(20), 3132-3142.

Hegedűs, K., Takáts, S., Boda, A., Jipa, A., Nagy, P., Varga, K., ... & Juhász, G. (2016). The Ccz1-Mon1-Rab7 module and Rab5 control distinct steps of autophagy. *Molecular biology of the cell*, *27*(20), 3132-3142.

Hu, Y. X., Han, X. S., & Jing, Q. (2019). Autophagy in Development and Differentiation. In *Autophagy: Biology and Diseases* (pp. 469-487). Springer, Singapore.

Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., ... & Noda, T. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, *408*(6811), 488-492.

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.

Itakura, E., Kishi-Itakura, C., & Mizushima, N. (2012). The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell*, *151*(6), 1256-1269.

Jacomin, A. C., Petridi, S., Di Monaco, M., Bhujabal, Z., Jain, A., Mulakkal, N. C., ... & Jones, A. (2020). Regulation of Expression of Autophagy Genes by Atg8a-Interacting Partners Sequoia, YL-1, and Sir2 in Drosophila. *Cell reports*, *31*(8), 107695.

Jelani, M., Dooley, H. C., Gubas, A., Mohamoud, H. S. A., Khan, M. T. M., Ali, Z., ... & Khan, M. I. (2019). A mutation in the major autophagy gene, WIPI2, associated with global developmental abnormalities. *Brain*, *142*(5), 1242-1254.

Jiang, P., Nishimura, T., Sakamaki, Y., Itakura, E., Hatta, T., Natsume, T., & Mizushima, N. (2014). The HOPS complex mediates autophagosome–lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Molecular biology of the cell*, *25*(8), 1327-1337.

Juhász, G., Érdi, B., Sass, M., & Neufeld, T. P. (2007). Atg7-dependent autophagy promotes neuronal health, stress tolerance, and longevity but is dispensable for metamorphosis in Drosophila. *Genes & development*, *21*(23), 3061-3066.

Juhász, G., Hill, J. H., Yan, Y., Sass, M., Baehrecke, E. H., Backer, J. M., & Neufeld, T. P. (2008). The class III PI (3) K Vps34 promotes autophagy and endocytosis but not TOR signaling in Drosophila. *The Journal of cell biology*, *181*(4), 655-666.

Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, *30*(4), 772-780.

Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2015). Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. *Nature cell biology*, *17*(6), 759-770.

Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2018). The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *19*(6), 365-381.

Kim, M., Sandford, E., Gatica, D., Qiu, Y., Liu, X., Zheng, Y., ... & Kim, B. (2016). Mutation in ATG5 reduces autophagy and leads to ataxia with developmental delay. *Elife*, *5*, e12245.

Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., ... & Ohsumi, Y. (1999). Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *The Journal of cell biology*, *147*(2), 435-446.

Klionsky, D. J., & Ohsumi, Y. (1999). Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annual review of cell and developmental biology*, *15*(1), 1-32.

Kondapalli, C., Kazlauskaite, A., Zhang, N., Woodroof, H. I., Campbell, D. G., Gourlay, R., ... & Knebel, A. (2012). PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65. *Open biology*, *2*(5), 120080.

Krasnov, A. N., Kurshakova, M. M., Ramensky, V. E., Mardanov, P. V., Nabirochkina, E. N., & Georgieva, S. G. (2005). A retrocopy of a gene can functionally displace the source gene in evolution. *Nucleic acids research*, *33*(20), 6654-6661.

Kulkarni, A., Chen, J., & Maday, S. (2018). Neuronal autophagy and intercellular regulation of homeostasis in the brain. *Current opinion in neurobiology*, *51*, 29-36.

Landajuela, A., Hervás, J. H., Antón, Z., Montes, L. R., Gil, D., Valle, M., ... & Alonso, A. (2016). Lipid geometry and bilayer curvature modulate LC3/GABARAP-mediated model autophagosomal elongation. *Biophysical journal*, *110*(2), 411-422.

Lane, J. D., & Nakatogawa, H. (2013). Two ubiquitin-like conjugation systems that mediate membrane formation during autophagy. *Essays in biochemistry*, *55*, 39-50.

Lane, J. D., Korolchuk, V. I., Murray, J. T., Zachari, M., & Ganley, I. G. (2017). The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays in biochemistry*, *61*(6), 585-596.

Liu, X. M., Yamasaki, A., Du, X. M., Coffman, V. C., Ohsumi, Y., Nakatogawa, H., ... & Du, L. L. (2018). Lipidation-independent vacuolar functions of Atg8 rely on its noncanonical interaction with a vacuole membrane protein. *Elife*, *7*, e41237.

Lopez, A., Lee, S. E., Wojta, K., Ramos, E. M., Klein, E., Chen, J., ... & Ogryzko, N. V. (2017). A152T tau allele causes neurodegeneration that can be ameliorated in a zebrafish model by autophagy induction. *Brain*, *140*(4), 1128-1146.

Lőrincz, P., & Juhász, G. (2019). Autophagosome-lysosome fusion. *Journal of molecular biology*.

Lőrincz, P., Tóth, S., Benkő, P., Lakatos, Z., Boda, A., Glatz, G., ... & Scita, G. (2017). Rab2 promotes autophagic and endocytic lysosomal degradation. *Journal of Cell Biology*, *216*(7), 1937-1947.

Lystad, A. H., & Simonsen, A. (2019). Mechanisms and pathophysiological roles of the ATG8 conjugation machinery. *Cells*, *8*(9), 973.

Martinez, J., Almendinger, J., Oberst, A., Ness, R., Dillon, C. P., Fitzgerald, P., ... & Green, D. R. (2011). Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)-associated phagocytosis is required for the efficient clearance of dead cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(42), 17396-17401.

Martinez, J., Malireddi, R. S., Lu, Q., Cunha, L. D., Pelletier, S., Gingras, S., ... & Kanneganti, T. D. (2015). Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. *Nature cell biology*, *17*(7), 893-906.

Merényi, Z., Prasanna, A. N., Wang, Z., Kovács, K., Hegedüs, B., Bálint, B., ... & Nagy, L. G. (2020). Unmatched level of molecular convergence among deeply divergent complex multicellular fungi. *Molecular biology and evolution*, *37*(8), 2228-2240.

Mizushima, N. (2020). The ATG conjugation systems in autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, *63*, 1-10.

Nagy, L. G., Ohm, R. A., Kovács, G. M., Floudas, D., Riley, R., Gácser, A., ... & Lang, B. F. (2014). Latent homology and convergent regulatory evolution underlies the repeated emergence of yeasts. *Nature communications*, *5*(1), 1-8.

Nagy, P., Szatmári, Z., Sándor, G. O., Lippai, M., Hegedűs, K., & Juhász, G. (2017). Drosophila Atg16 promotes enteroendocrine cell differentiation via regulation of intestinal Slit/Robo signaling. *Development*, *144*(21), 3990-4001.

Nagy, P., Varga, Á., Kovács, A. L., Takáts, S., & Juhász, G. (2015). How and why to study autophagy in Drosophila: it's more than just a garbage chute. *Methods*, *75*, 151-161.

Nakamura, S., & Yoshimori, T. (2018). Autophagy and longevity. *Molecules and cells*, *41*(1), 65.

Narendra, D. P., Jin, S. M., Tanaka, A., Suen, D. F., Gautier, C. A., Shen, J., ... & Youle, R. J. (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol*, *8*(1), e1000298.

Nazarko, V. Y., & Zhong, Q. (2013). ULK1 targets Beclin-1 in autophagy. *Nature cell biology*, *15*(7), 727-728.

Nguyen, T. A., Smith, B. R., Tate, M. D., Belz, G. T., Barrios, M. H., Elgass, K. D., ... & Garnham, A. (2017). SIDT2 transports extracellular dsRNA into the cytoplasm for innate immune recognition. *Immunity*, *47*(3), 498-509.

Nguyen, T. N., Padman, B. S., Usher, J., Oorschot, V., Ramm, G., & Lazarou, M. (2016). Atg8 family LC3/GABARAP proteins are crucial for autophagosome–lysosome fusion but not autophagosome formation during PINK1/Parkin mitophagy and starvation. *Journal of Cell Biology*, *215*(6), 857-874.

Notte, A., Leclere, L., & Michiels, C. (2011). Autophagy as a mediator of chemotherapy-induced cell death in cancer. *Biochemical pharmacology*, *82*(5), 427-434.

Novikoff, A. B., Beaufay, H., & de Duve, C. (1956). Electron microscopy of lysosome-rich fractions from rat liver. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, *2*(4), 179.

Ohsumi, Y., & Mizushima, N. (2004). Two ubiquitin-like conjugation systems essential for autophagy. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 2, No. 15, pp. 231-236).

Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., & Ugene Team. (2012). Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, *28*(8), 1166-1167.

Oku, M., Maeda, Y., Kagohashi, Y., Kondo, T., Yamada, M., Fujimoto, T., & Sakai, Y. (2017). Evidence for ESCRT-and clathrin-dependent microautophagy. *Journal of Cell Biology*, *216*(10), 3263-3274.

Olivari, S., Cali, T., Salo, K. E., Paganetti, P., Ruddock, L. W., & Molinari, M. (2006). EDEM1 regulates ER-associated degradation by accelerating de-mannosylation of folding-defective polypeptides and by inhibiting their covalent aggregation. *Biochemical and biophysical research communications*, *349*(4), 1278-1284.

Osawa, T., Kotani, T., Kawaoka, T., Hirata, E., Suzuki, K., Nakatogawa, H., ... & Noda, N. N. (2019). Atg2 mediates direct lipid transfer between membranes for autophagosome formation. *Nature structural & molecular biology*, *26*(4), 281-288.

Pang, Y., Yamamoto, H., Sakamoto, H., Oku, M., Mutungi, J. K., Sahani, M. H., ... & Jia, H. (2019). Evolution from covalent conjugation to non-covalent interaction in the ubiquitin-like ATG12 system. *Nature Structural & Molecular Biology*, *26*(4), 289-296.

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 β accumulation in mice. *The Journal of clinical investigation*, *118*(6), 2190-2199.

Pircs, K., Nagy, P., Varga, A., Venkei, Z., Erdi, B., Hegedus, K., & Juhasz, G. (2012). Advantages and limitations of different p62-based assays for estimating autophagic activity in Drosophila. *PloS one*, *7*(8), e44214.

Port, F., Chen, H. M., Lee, T., & Bullock, S. L. (2014). Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(29), E2967-E2976.

Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J. E., Luo, S., Oroz, L. G., ... & Rubinsztein, D. C. (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nature genetics*, *36*(6), 585-595.

Reggiori, F., Monastyrska, I., Verheije, M. H., Calì, T., M.,... & Molinari, M. (2010). Coronaviruses Hijack the LC3-I-positive EDEMosomes, ER-derived vesicles exporting short-lived ERAD regulators, for replication. *Cell host & microbe*, *7*(6), 500-508.

Sánchez-Wandelmer, J., Kriegenburg, F., Rohringer, S., Schuschnig, M., Gómez-Sánchez, R., Zens, B., ... & Ungermann, C. (2017). Atg4 proteolytic activity can be inhibited by Atg1 phosphorylation. *Nature communications*, *8*(1), 1-10.

Sanjuan, M. A., Dillon, C. P., Tait, S. W., Moshiach, S., Dorsey, F., Connell, S., ... & Green, D. R. (2007). Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature*, *450*(7173), 1253-1257.

Santel, A., Blumer, N., Kampfer, M., & Renkawitz-Pohl, R. (1998). Flagellar mitochondrial association of the male-specific Don Juan protein in Drosophila spermatozoa. *Journal of cell science*, *111*(22), 3299-3309.

Schneider, J. L., Suh, Y., & Cuervo, A. M. (2014). Deficient chaperone-mediated autophagy in liver leads to metabolic dysregulation. *Cell metabolism*, *20*(3), 417-432.

Scott, R. C., Juhász, G., & Neufeld, T. P. (2007). Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Current Biology*, *17*(1), 1-11.

Scott, R. C., Schuldiner, O., & Neufeld, T. P. (2004). Role and regulation of starvation-induced autophagy in the Drosophila fat body. *Developmental cell*, *7*(2), 167-178.

Seppey, M., Manni, M., & Zdobnov, E. M. (2019). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness. In *Gene Prediction* (pp. 227-245). Humana, New York, NY.

Shang, Y., Wang, H., Jia, P., Zhao, H., Liu, C., Liu, W., ... & Li, W. (2016). Autophagy regulates spermatid differentiation via degradation of PDLIM1. *Autophagy*, *12*(9), 1575-1592.

Siddall, N. A., & Hime, G. R. (2017). A Drosophila toolkit for defining gene function in spermatogenesis. *Reproduction*, REP-16.

Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., ... & Czaja, M. J. (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, *458*(7242), 1131-1135.

Singh, T., Lee, E. H., Hartman, T. R., Ruiz-Whalen, D. M., & O'Reilly, A. M. (2018). Opposing action of hedgehog and insulin signaling balances proliferation and autophagy to determine follicle stem cell lifespan. *Developmental cell*, *46*(6), 720-734.

Szalai, P., Hagen, L. K., Sætre, F., Luhr, M., Sponheim, M., Øverbye, A., ... & Engedal, N. (2015). Autophagic bulk sequestration of cytosolic cargo is independent of LC3, but requires GABARAPs. *Experimental cell research*, *333*(1), 21-38.

Takáts, Sz., Glatz, G., Szenci, G., Boda, A., Horváth, G. V., Hegedűs, K., ... & Juhász, G. (2018). Non-canonical role of the SNARE protein Ykt6 in autophagosome-lysosome fusion. *PLoS genetics*, *14*(4), e1007359.

Takáts, Sz., Nagy, P., Varga, Á., Pircs, K., Kárpáti, M., Varga, K., ... & Juhász, G. (2013). Autophagosomal Syntaxin17-dependent lysosomal degradation maintains neuronal function in Drosophila. *Journal of Cell Biology*, *201*(4), 531-539.

Tsukada, Miki, and Yoshinori Ohsumi. "Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of Saccharomyces cerevisiae." FEBS letters 333.1-2 (1993): 169-174.

Wakimoto, B. T., Lindsley, D. L., & Herrera, C. (2004). Toward a comprehensive genetic analysis of male fertility in Drosophila melanogaster. *Genetics*, *167*(1), 207-216.

Wang, H., Wan, H., Li, X., Liu, W., Chen, Q., Wang, Y., ... & Zhao, X. (2014). Atg7 is required for acrosome biogenesis during spermatogenesis in mice. *Cell research*, *24*(7), 852-869.

Wang, Y., Liu, N., & Lu, B. (2019). Mechanisms and roles of mitophagy in neurodegenerative diseases. *CNS neuroscience & therapeutics*, *25*(7), 859-875.

Waterhouse, R. M., Seppey, M., Simão, F. A., Manni, M., Ioannidis, P., Klioutchnikov, G., ... & Zdobnov, E. M. (2018). BUSCO applications from quality assessments to gene prediction and phylogenomics. *Molecular biology and evolution*, *35*(3), 543-548.

White, E. (2012). Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nature reviews cancer*, *12*(6), 401-410.

White-Cooper, H. (2004). Analysis of Meiosis and Morphogenesis. *Drosophila Cytogenetics Protocols*, 45-75.

Winslow, A. R., Chen, C. W., Corrochano, S., Acevedo-Arozena, A., Gordon, D. E., Peden, A. A., ... & Brown, S. (2010). α-Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *Journal of Cell Biology*, *190*(6), 1023-1037.

Wirth, M., Zhang, W., Razi, M., Nyoni, L., Joshi, D., O'Reilly, N., ... & Mouilleron, S. (2019). Molecular determinants regulating selective binding of autophagy adapters and receptors to ATG8 proteins. *Nature communications*, *10*(1), 1-18.

Xu, T., Nicolson, S., Denton, D., & Kumar, S. (2015). Distinct requirements of Autophagy-related genes in programmed cell death. *Cell Death & Differentiation*, *22*(11), 1792-1802.

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.

Yim, W. W. Y., & Mizushima, N. (2020) Lysosome biology in autophagy. *Cell Discovery*, *6*(1), 1-12.

Yoshii, S. R., Kuma, A., Akashi, T., Hara, T., Yamamoto, A., Kurikawa, Y., ... & Mizushima, N. (2016). Systemic analysis of Atg5-null mice rescued from neonatal lethality by transgenic ATG5 expression in neurons. *Developmental cell*, *39*(1), 116-130.

Yuan, W., Tuttle, D. L., Shi, Y. J., Ralph, G. S., & Dunn, W. A. (1997). Glucose-induced microautophagy in *Pichia pastoris* requires the alpha-subunit of phosphofructokinase. *Journal of Cell Science*, *110*(16), 1935-1945.

Zappavigna, S., Luce, A., Vitale, G., Merola, N., Facchini, S., & Caraglia, M. (2013). Autophagic cell death: a new frontier in cancer research.

Zhang, J., Tripathi, D. N., Jing, J., Alexander, A., Kim, J., Powell, R. T., ... & Pandita, R. K. (2015). ATM functions at the peroxisome to induce pexophagy in response to ROS. *Nature cell biology*, *17*(10), 1259-1269.

7. Összefoglalás

Az autofágia egy evolúciósan erősen konzerválódott intracelluláris lebontó folyamat. A fő útvonala során egy membrán ciszterna keletkezik, amit fagofórnak hívnak (vagy izoláló membránnak), majd fokozatosan meghosszabbodik és körbe véve a citoplazma egy részét, bezáródik és kialakul belőle a kettős membránnal határolt autofagoszóma. Az autofagoszóma az egyetlen kizárólag autofágiához köthető sejtszervecske, amely végül, vagy endoszómával, és aztán lizoszómával fuzionál, vagy közvetlenül lizoszómával egyesül. Ez a katabolikus folyamat rendkívül fontos szerepet tölt be az eukarióta sejtekben, mivel a folyamat során ilyen módon lebomlanak és megújulnak a sejtek fehérjéi és sejtszervecskéi, ezért jelentős öregedést lassító hatása van, valamint hozzájárul az éhezés okozta stressz elleni védekezéshez. Ezen funkciói mellett az autofágiának jelentős szerepe van számos fiziológiai és kóros funkcióiban, beleértve a rákos megbetegedéseket, neurodegeneratív megbetegedéseket (Alzheimer-kór, Parkinson-kór, Huntington-kór), miopátiát, Crohn betegséget, szívbetegségeket, az immunitással kapcsolatos megbetegedéseket, gyulladási folyamatokat és az öregedést.

Az autofágiát főleg a TOR kináz komplex irányítja, valamint számos Atg fehérje komplex is részt vesz a szabályozásában, valamint a folyamatban is. Az Atg1 kináz komplex (emlősökben ULK1, 2; FIP200; Atg13; Atg101) iniciálja az autofágiát, többek között a Vps34 lipid kináz komplex tagjainak (Vps34, Vps15, Atg6 és Atg14, utóbbi leginkább a komplex autofágia specifikusságát biztosítja) a foszforilálásán keresztül. Ez a kináz komplex foszforilálja a membrán lipidet, úgy hogy létrehozza a foszfatidilinozitol-3-foszfátot (PI3P). Ez foszfolipid jelként szolgál a PI3P effektorok odavonzásához. Ilyen effektor az Atg18, amely az Atg2-vel alkotott komplexe részt vesz az Atg9 transzmembrán fehérje által jelölt vezikulák mozgatásában és ezáltal hozzájárul a fagofór biogenéziséhez. Egy másik fehérje komplex az Atg8 konjugációs komplex, amely szintén fontos szerepet töltenek be az autofágia folyamatában. Az Atg7 E1 enzimként funkcionál és aktiválja az Atg12 és az Atg8 ubikvitin-szerű fehérjéket. Az Atg12 fehérjét az Atg10 E2-szerű fehérje konjugálja az Atg5 fehérjére, amely dimerhez kapcsolódik egy Atg16-os fehérjére, amely komplex tovább multimerizálódhat és E3-szerű enzimként funkcionál. Eközben az Atg3 konjugálja az Atg8-at, majd az Atg12-Atg5~Atg16 komplex juttatja a fagofór foszfatidiletanolamin (PE) lipidjére. Az Atg8-nak fontos szerepe van a fagofór növekedésében és záródásában. Ugyanakkor fontos szerepe van a szelektív autofágiában, mint horgonyzó fehérje, amely az autofágia receptor fehérjéket (például p62/Ref(2)P) köti a fagofórhoz a receptor által megkötött szubsztrátokkal együtt. Ugyanakkor

az Atg8 eszközként szolgál a különböző megközelítésű kísérleti rendszerekben, mivel ez az egyetlen fehérje, amely stabilan köt az autofág struktúrákhoz a fagofór biogenézisétől a lizoszómában való lebomlásáig. Ugyanakkor az Atg8 számos funkciója és működési mechanizmusa nem teljesen tisztázott.

Bioinformatikai eszközökkel rekonstruáltuk a rovarok Atg8 homológjainak az evolúcióját. Azt találtuk, hogy a rovaroknak eredetileg két Atg8 homológja van, viszont abból az egyik több rovar csoportban eltűnik és csak az *Atg8a* maradt meg. A Drosophilidae család minden megvizsgált tagjában megtaláltunk egy viszonylag új, retrotranszpozíciós esemény során az *Atg8a*-t mintaként másolva keletkezett homológot, amelynek a *Drosophila melanogaster*-ben *Atg8b* a neve. A két génnek 78% aminosav szekvencia azonossága van.

Az autofágia egy széles körben vizsgált folyamattá vált az orvosbiológiai jelentőségének köszönhetően, de a vizsgálatához még számos genetikai eszköz hiányzik. CRISPR/Cas9 és „plug-and-play" inszerciós géncsapdázás technikával készítettünk, majd jellemeztünk egy-egy null allélt a két Atg8 homológra ($Atg8a^{Tro\text{-}Gal4}$, $Atg8b^{16}$), valamint CRISPR/Cas9 közvetítette homológ rekombinációval létrehoztunk egy lipidációra képtelen *Atg8a* homológot ($Atg8a^{G116*}$). Az új allélok segítségével először tisztáztuk az Atg8a és az Atg8b funkcióját az autofágiában. Mutáns mozaik zsírtestek vizsgálatával arra a következtetésre jutottunk, hogy mindkét *Atg8a* mutáns halmozza az autofágia specifikus szubsztrátját, a Ref(2)P-t, míg erősen lecsökken a savas kompartimentumok száma, ami az autolizoszómák számának csökkenésére utal. Ezzel ellentétben az Atg8b mutáns zsírsejtekben a Ref(2)P és a savas kompartimentumok száma egyaránt megegyezett a kontroll sejtekével. A Ref(2)P szintjét Western bloton is megvizsgáltuk, amely vizsgálat a zsírtest mozaikvizsgálat eredményeit erősítették meg, amiből azt a következtetést vontok le, hogy szemben több irodalmi adattal, az Atg8b nem játszik szerepet az autofágiában, *Drosophila*-ban kizárólag az Atg8a-nak van szerepe az autofágiában.

Vándorló lárvák középbelén található vakbelek bábozódás során visszahúzódnak és lebomlanak, ezért sajátos autofágia-függő programozott sejthalál modellként használhatók. Ezen a modellen azt találtuk, hogy az Atg8b null allél egyedeiben és az Atg8a lipidációs mutánsban nem sérül a vakbelek redukciójának a folyamata, viszont az *Atg8a* null allélban jelentősen sérül ez a folyamat. Ugyancsak tanulmányoztuk ezen allélok bábjainak a morfológiáját és azt figyeltük meg, hogy az Atg8b null allél egyedeinek és az Atg8a lipidációs mutánsok bábjain semmilyen morfológiai hiba nincs, míg az Atg8a null allélok bábjai kisebbek,

ráadásul hiányoznak a légzőcsövei. Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy az Atg8a rendelkezik egy lipidációtól független funkcióval, amelynek szerepe van az egyedfejlődésben.

Endogén promoterrel rendelkező riporterek felhasználásával tanulmányoztuk a két *Atg8* homológ kifejeződési mintázatát. Azt találtuk, hogy míg Atg8a a teljes szervezetben kifejeződik, addig az *Atg8b* kizárólag a herékben fejeződik ki, a harmadik stádiumú lárva szakasztól kezdve. Ezután értelemszerűen a felnőtt legyek heréiben vizsgáltuk meg ezen gének kifejeződési mintázatát, csíravonal sejteket jelölő *vasa-GFP* és szomatikus sejteket jelölő *C784-Gal4* riporter konstrukciókat. Azt találtuk, hogy az Atg8b a 16. stádiumú cisztákban fejeződik ki először és kizárólag a csíravonalban fejeződik ki, míg az *Atg8a* szomatikus és csíravonal sejtekben egyaránt kifejeződik.

Az *Atg8b* null allél, a kifejeződési mintázatának megfelelően, hímsterilitást mutat, amely egy egyedi jelenség az Atg gének között. Fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján azt találtuk, hogy az *Atg8b* mutáns heréje nem mutat semmilyen morfológiai és szerkezeti hibát, a spermatogenezis folyamata nem sérül. Ugyanakkor azt figyeltük meg, hogy az *Atg8b* mutánsok sterilitását a hímivarsejtjeinek a mozgásképtelensége okozza. Továbbá azt is igazoltuk, hogy az Atg8b-nek az autofágiában a herék szintjén sincs szerepe. Ezen felül a C-terminális glicinjétől megfosztott trunkált Atg8b-t kifejező konstrukció képes menekíteni az Atg8b mutáns steril fenotípusát, amely szintén arra utal, hogy az Atg8b-nek nincs szerepe az autofágiában. Érdekes módon az *Atg8b* mutáns hímsteril fenotípusát sikerült menekíteni egy olyan konstrukcióval, amely az *Atg8b* promoter segítségével *Atg8a*-t fejez ki. Ugyanakkor az Atg8a promoter segítségével *Atg8b*-t kifejeztető konstrukció szintén képes az *Atg8a* null allél fejlődésbiológiai fenotípusainak a menekítésére. Ezek a kísérletek arra utalnak, hogy a Drosophila két Atg8 homológja között még nincs akkora különbség, hogy ne legyenek képesek betölteni egymás szerepét, ami azt jelenti, hogy a funkcionális eltérésüket elsősorban a kifejeződési mintázatukból adódó különbség adja.

Ezen eredmények ismeretében elmondható, hogy a lipidálódásra képtelen Atg8 fehérjék az autofágia meghibásodásához vezetnek, ellenben ezen gének kiütése fejlődési rendellenességeket, valamint hímsterilitást okoz. Ezen fenotípusok mögötti mechanizmusok jobb megismeréséhez további kutatások szükségesek.

8. Summary

Autophagy is an evolutionarily conserved intracellular degradation process. During the main pathway of autophagy, a small cisterna, called isolation membrane (phagophore) elongates and surrounds a part of the cytoplasm to form a double-membraned structure, the autophagosome. Autophagosomes either fuse with late endosomes to form amphisomes, which then fuse with lysosomes, or they fuse directly with lysosomes themselves. This catabolic pathway plays a very important role in eukaryotic cells: the sustained turnover of macromolecules and organelles has an anti-aging effect, and it is essential for adaptation to nutrient-poor conditions such as starvation. Besides these functions, autophagy has many other physiological and pathological functions, including cancer progression, neurodegeneration (Alzheimer's disease, transmissible spongiform encephalopathies, Parkinson's disease, Huntington's disease), myopathy, Crohn's disease, cardiac disease, immunity, inflammation and aging.

Autophagy is mainly regulated by TOR complex, AMP kinase and multiple Atg protein complexes. In mammals, the Atg1 kinase complex (ULK1, 2, FIP200, Atg13, Atg101) initiates autophagy in part via phosphorylation of the Vps34 lipid kinase complex (Vps34, Vps15, Atg6 and Atg14, with the last subunit being responsible for the specificity of the complex in autophagy), which phosphorylates the membrane lipid phosphatidylinositol to create phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P). This phospholipid serves as a signal that recruits PI3P effectors such as Atg18 family proteins. The Atg18-Atg2 complex may also regulate the trafficking of vesicles positive for the transmembrane protein Atg9, which are also important for phagophore biogenesis. Another group of protein complexes which is important for the autophagy are the two ubiquitin-like conjugation systems. Atg7 acts as an E1-like enzyme that activates Atg12 and Atg8 in two distinct conjugation pathways. Atg12 and Atg8 are then covalently conjugated to the E2-like proteins Atg10 and Atg3. This is followed by conjugation of Atg12 to Atg5, which together bind to Atg16 to act as an E3 ligase for Atg8 conjugation to phosphatidylethanolamine (PE). This protein has an important role in the phagophore expansion and closure, moreover it functions as an anchor for autophagy receptors (for example p62/Ref(2)P). Therefore, the key role of Atg8 is to ensure the selectivity of autophagy. At the same time, Atg8 is one of the most important molecules in the autophagy research, because it is the established reporter for following autophagic structures. Although, other possible roles and mechanisms are not clear about the process.

Based on our bioinformatic analysis, we observed that insects initially had two Atg8 homologs, but the second Atg8 is lost in several insect groups. During evolution, *Drosophilidae* secondarily duplicated their *Atg8a* gene by a retrotransposition event to give rise to a new paralog: *Atg8b*. These two proteins have 78% amino acid sequence similarity.

Since autophagy is becoming a widely investigated topic thanks to its biomedical relevance, null mutants of these critical factors are needed for clear-cut genetic analyses. Using CRISPR/Cas9 and a 'plug-and-play' gene trapping technic, we generated and characterized two null alleles ($Atg8a^{Tro\text{-}Gal4}$, $Atg8b^{16}$) for both *Drosophila melanogaster* Atg8 genes and a lipidation-deficient missense allele ($Atg8a^{G116*}$) for *Atg8a*. Next, we analysed autophagic activity in the new *Atg8a* and *Atg8b* alleles using several staining methods, confocal microscopy and western blotting. Using mosaic fat body clone cells for both *Atg8a* mutants we observed reduced number of acidic compartments, and increased level of Ref(2)P (cargo specific for autophagy). In contrast, the Atg8b mutant fat body clones show similar level of acidic structures and Ref(2) level with the control cells. Our western blot experiments also confirm the increased Ref(2)P level in Atg8a mutants, but not in the Atg8b null alleles. Based on these results, we established that Atg8a is required for autophagy, whereas in contrast to the literature Atg8b does not play a role in autophagy.

Using gastric caeca in prepupae as an autophagy-dependent cell death model, we showed the Atg8a null allele plays an important role in this developmental process, but not the lipidation-deficient Atg8a allele and the Atg8b null allele. We also studied the morphology of the pupa in the different *Atg8* mutants. We observed that the *Atg8a* lipidation-deficient allele and the *Atg8b* null allele have similar morphology with the control pupa, but the *Atg8a* null allele shows size reduction and respiratory spiracle deficiency. This suggests that Atg8a has a lipidation independent role in the development process.

We also studied the expression pattern of *Atg8a* and *Atg8b* genes, using endogenous promoter-driven transgenic constructs. We found that the *Atg8a* is expressed in every cell type, but the *Atg8b* shows expression only in testis. We also tested the expression pattern of Atg8 homologs in testis using supplementary germline (vasa-GFP) and somatic cell markers (C784-Gal4) and found that Atg8b has only germline expression in contrast to Atg8a, which has a moderate general expression in the testis too.

Atg8b null allele –according to its expression pattern – shows male-sterile phenotype, which is unique among the Atg genes. Based on light- and electron microscopic approaches,

the male-sterile phenotype was not associated with visible ultrastructural lesion, and spermatogenesis was not affected. At the same time, based on our observations, the mutation caused immobile sperms. We also found loss of Atg8b causes male sterility without affecting autophagy. In addition, transgenic expression of non-lipidated Atg8b in the male germline is enough for fertility, which also confirms that Atg8b does not have role in autophagy process. Interestingly, the expression of *Atg8a* using *Atg8b* promoter is also able to rescue *Atg8b* mutant phenotypes. Similarly, the coding sequence of *Atg8b* driven by *Atg8a* promoter is able to rescue the developmental phenotypes of *Atg8a* mutants.

Consistent with these non-canonical functions of Atg8 proteins, loss of Atg genes required for Atg8 lipidation leads to autophagy defects but does not cause developmental disorders or sperm immobility which cause male sterility. More research is required to establish the underlying mechanism of these phenotypes.

9. Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt köszönetet szeretnék mondani Dr. Juhász Gábornak a bizalmáért és a témavezetői tevékenységéért. Dr. Horváth V. Gábornak a sok ötletéért, megtervezett és elkészített konstrukcióiért és kritikai hozzáállásáért. Dr. Maruzs Tamásnak, Dr. Szabó Áronnak a rengeteg ötletért, a technikai segítségért, a dolgozatom átnézéséért és emberségükért. Köszönöm Ürmösi Adélnak a sokféle segítségét a dolgozat alapjául szolgáló projektben. Köszönöm Dr. Kovács Attilának az elektronmikroszkópos munkákért. Köszönettel tartozom Dr. Kovács Leventének és Dr. Takáts Szabolcsnak, hogy megtanították és elmélyítették a *Drosophila melanogasterrel* kapcsolatos módszereket. Köszönet Arindam Bhattacharjee-nek a segítségéért a munkámban és az angol nyelven megírt szövegeim kijavításáért. Köszönöm Bozsó Szilviának és Pálfia Saroltának a sok asszisztensi munkát. Köszönöm minden régi és jelenlegi kollégámnak a segítségét és inspirációját. Kiemelt köszönet illeti Dr. Sinka Rität és Dr. Vedelek Viktort a *Drosophila melanogaster* here modellen végzett munkáikért. Köszönöm Dr. Merényi Zsoltnak, hogy elkészítette a dolgozatban is szereplő rovar törzsfát. Köszönet Leopold Anna Mária középiskolai tanáromnak és Dr. Csermely Péternek, amiért lelkesedésükkel és szaktudásukkal sokat motiváltak, hogy ezt a hivatást válasszam.

Köszönöm barátaimnak, hogy bátorítottak, kritizáltak és mellettem voltak. Külön köszönet Péderi Tamásnak, Varga Júliának, Fecske Nándornak akik nélkül ez a dolgozat talán soha nem készült volna el.

Ezúton szeretném megköszönni, szüleim Gáll Enikő és Jipa Viktor gondoskodását és mindennemű támogatását, nagymamámnak Gáll Piroskának és Jipa Jolánnak, hogy elvárások nélkül tudtak szeretni, nagyapáimnak Gáll Árpádnak és Jipa Ion-nak, hogy felnézhettem rájuk. Végül, de nem utolsó sorban feleségemnek Gagyi Kinga-Borbálának és lányomnak Jipa Lénának amiért kitartottak mellettem és annyi boldogságot adtak ezekben az években.

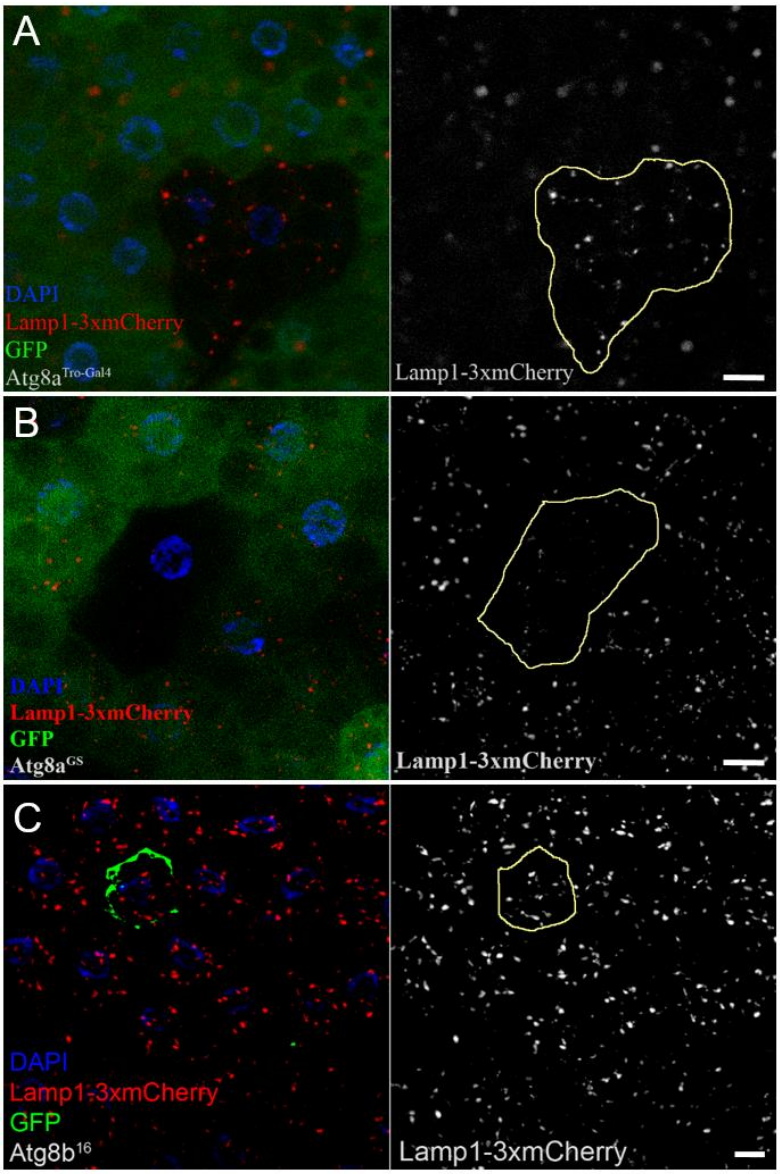
A doktorim során végzett munkát és a dolgozat megírását a következő pályázatok támogatták: Magyar Tudományos Akadémia [Momentum LP2014/2]; Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Hivatal [GINOP-2.3.2-15-2016-00035]; Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Hivatal [GINOP-2.3.2-15-2016-00032]; Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Hivatal [KKP129797].

10. Saját hozzájárulásom a munkához

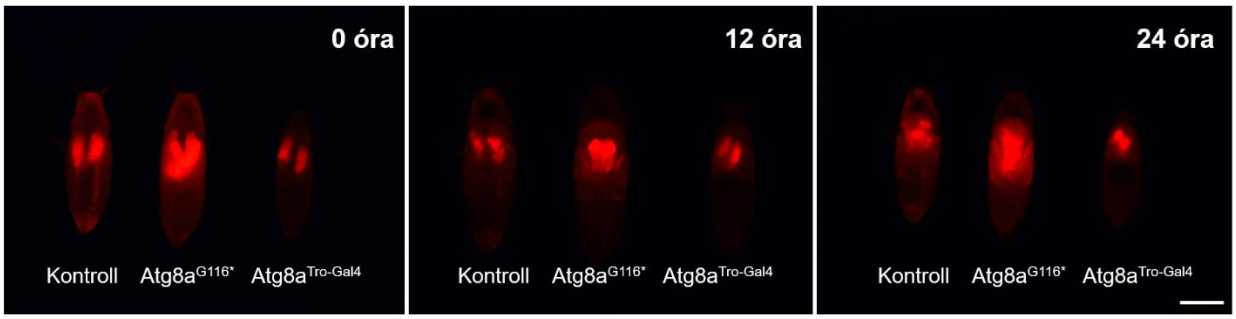
A disszertációmat többes szám első személyben írtam meg, ami egy tisztelgés a számos kollégának, akik hozzájárultak ehhez a munkához. Ennek ellenére a dolgozatomban leírt kísérletek és eredmények nagyobb része hozzám köthető. Ebben a fejezetben ezeket a munkákat tételesen is felsorolom:

- A három mutáns generálása, szűrése és vallidálása
- 3xeGFP-Atg8b plazmid létrehozása molekuláris biológiai módszerekkel
- Az összes transzgén előállításához szükséges plazmid injektálásra való előkészítése és tesztemésztése, valamint a transzgénikus jelölt ecetmuslica vonalak előállítása, a transzgénikus vonalak izolálása, stabil vonalakba való keresztezése és tesztelése
- *Drosophila* genetikai munkák
- FRT kromoszómákra történő rekombinálás és klóngenerálás
- Összes zsírtestes mikroszkópos felvétel
- Összes sztereomikroszkópos fölvétel és előkészítése
- Az elektronmikroszkópos minták előkészítése, fixálása és mosása, a here minták beágyazása gyantába
- Összes nem immunhisztokémiás technikával készült herefelvétel (kivéve a 22. A képeket)
- Fertilitásvizsgálatok
- Az összes dolgozatban szereplő Western blot kísérletek
- A dolgozatban szereplő összes kép szerkesztése
- Az összes mérhető kísérlet kvantifikálása és statisztikai kiértékelése

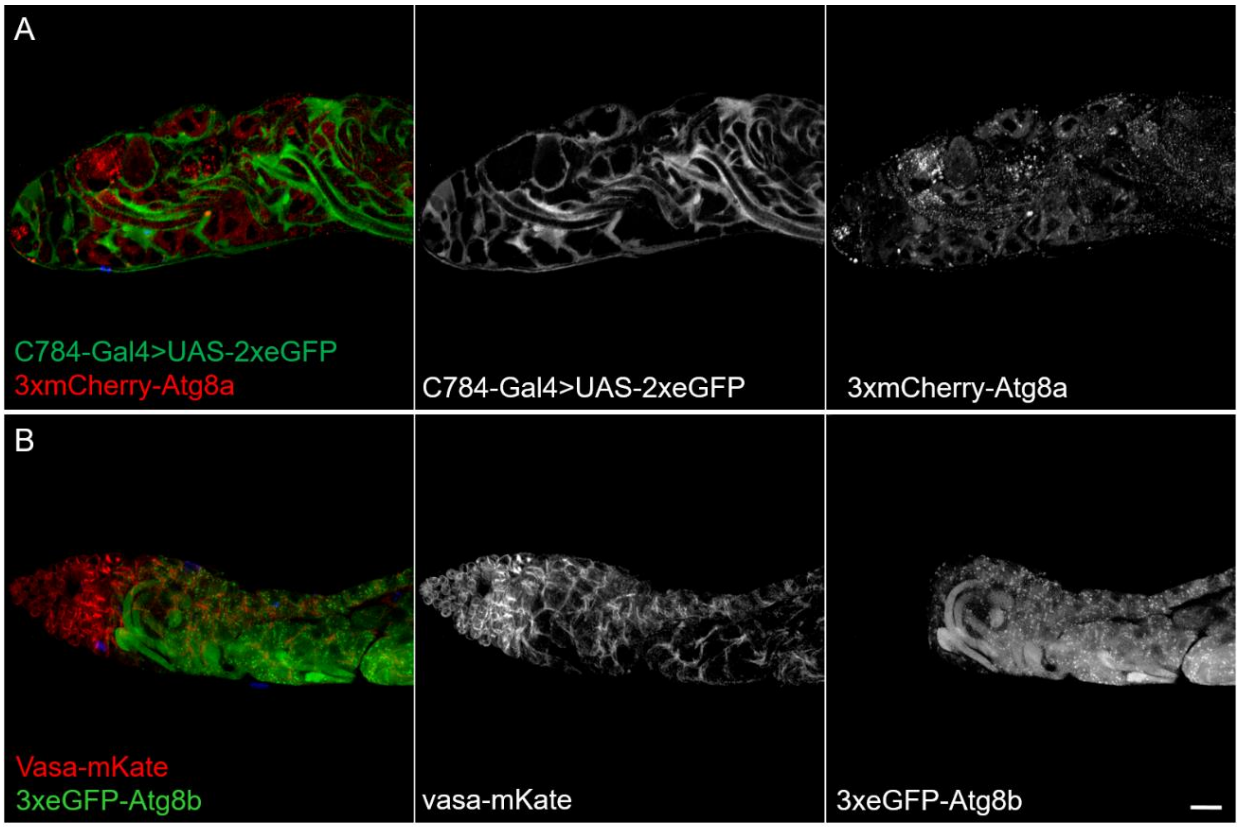
11. Függelék



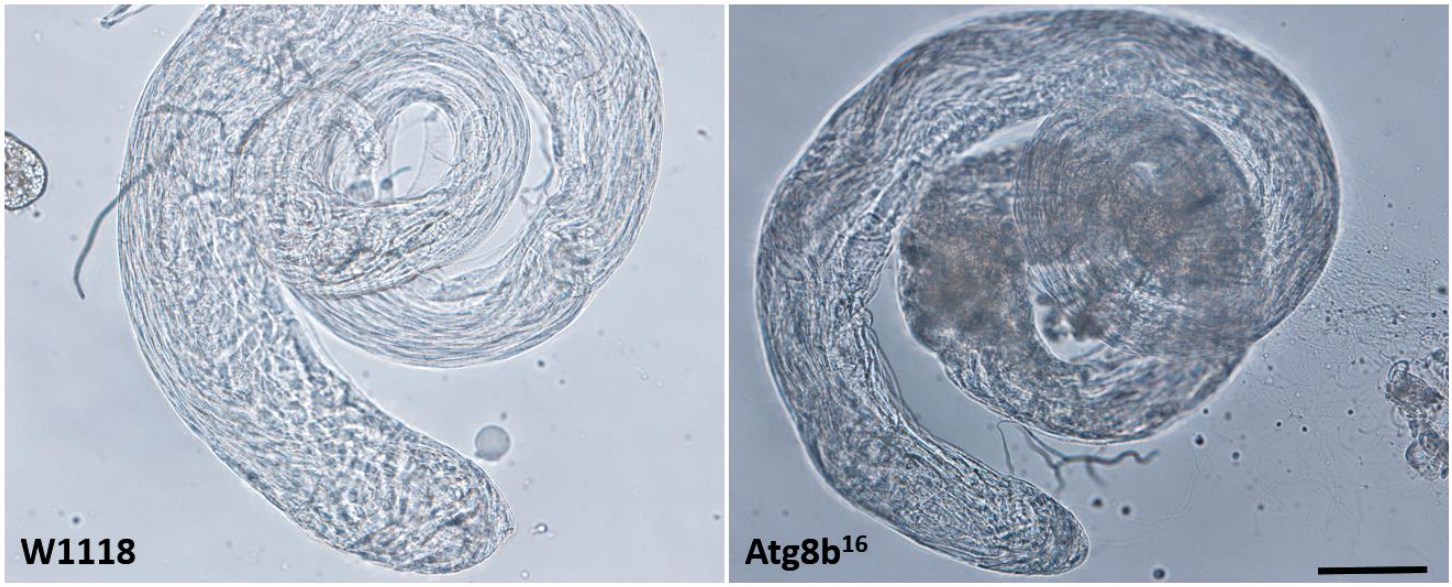
F1. ábra. Az *Atg8a* és *Atg8b* mutáns klónsejtek Lamp1-3xmCherry mintázata. (A, B, C) Az *Atg8a* mutáns klónsejtekben (zöld negatívan jelölt) szignifikáns módon lecsökken a Lamp1-3xmCherry pozitív struktúrák száma, míg az *Atg8b* (zöld pozitívan jelölt MARCM klónok) mutáns sejtekben nem változik Lamp1-3xmCherry pozitív struktúrák száma. Skála mérete: 10 µm.



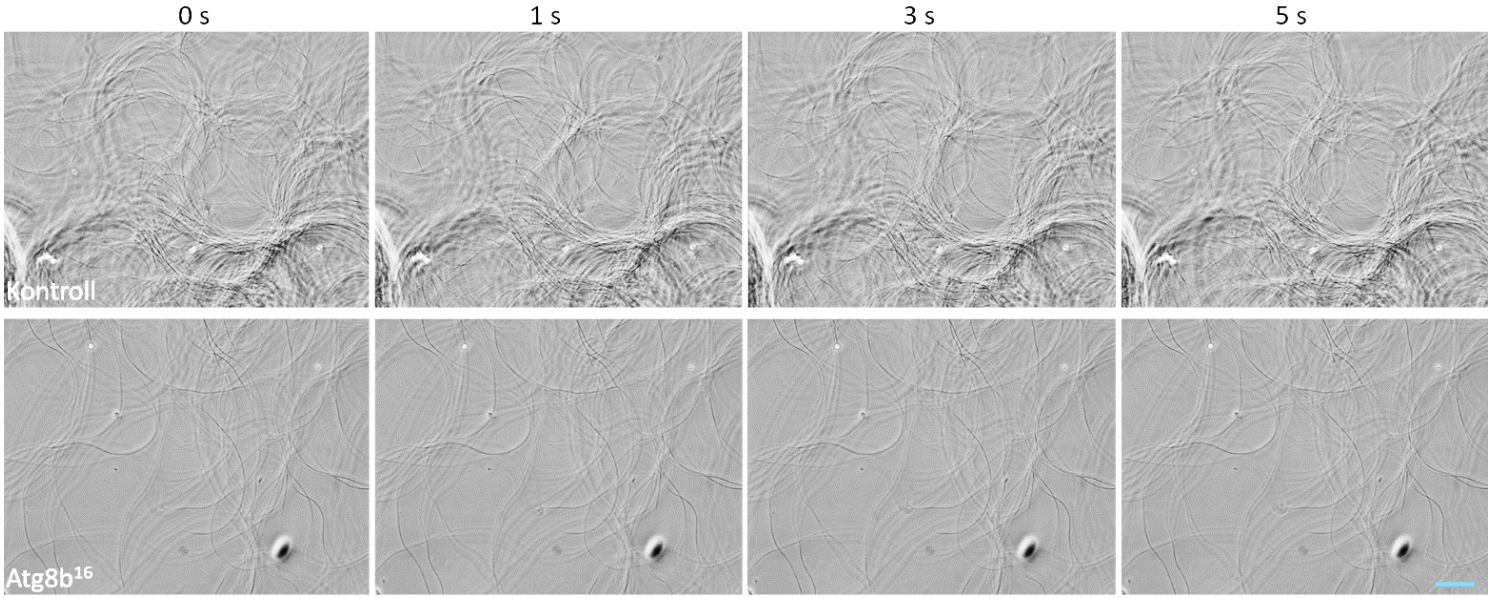
F2. ábra. Az Atg8a hiánya gátolja a nyálmirigyek programozott lebomlását. A Glue-Red riporterrel jelölt nyálmirigyek 24 óra után lebomlásnak indulnak, ellenben az *Atg8a$^{Tro\text{-}Gal4}$* null allél nyálmirigye intakt maradt, szemben az *Atg8a^{G116*}* mutánssal és a kontrollal. Skála mérete: 1 mm.



F3. ábra. Az Atg8a és az Atg8b expressziós mintázata a szomatikus és csíravonal specifikus sejtmarkerek mellett három napja kikelt ecetmuslicák heréjének apikális részében. (A) Az Atg8a (piros) részben megfigyelhető a ciszta sejtekben (zöld). (B) Az Atg8b (zöld) csak csíravonal (piros) sejtekben figyelhető meg. Skála mérete: 200 µm.



F4. ábra. Az Atg8b^{16} mutáns testis morfológája nem szenvedett észlelhető elváltizásijat. *W^{1118}* vadtípusú kontroll és az *Atg8b^{16}* mutánsok között nincs jelentős különbség a korai spermatogenézis szakaszokban, csak a terminális epitéliumban látható spermium felhalmozódás a mutáns herében. Skála mérete: 100 µm.



F5. ábra. Az Atg8b^{16} mutáns spermiumai mozgásképtelenek. Kontrollban megfigyelhető, hogy hímivarsejtek másodpercenként változtatják a pozíciójukat, míg az Atg8b^{16} mutánsok hímivarsejtjei szinte egyáltalán nem mozognak. Eredeti kontroll videó: https://youtu.be/sGFYpuaZ1_Q. Eredeti *Atg8b^{16}* videó: https://youtu.be/OnphOAstcEI. Skála: 50 µm.