A *Drosophila Atg9* autofágia gén szerepe az aktin citoszkeleton szabályozásában

PhD értekezés

Kiss Viktória

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

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar,
Biológia Doktori Iskola

ELKH - Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet

SZTE TTIK

Szeged
2020

A dolgozat alápját képező munka az alábbi támogatásokkal valósulhatott meg:

1. Magyar Tudományos Akadémia, Lendület Program, LP2014/2 (Dr. Juhász Gábor)
2. Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal:
   a. GINOP- 2.3.2-15-2016-00006 (Dr. Juhász Gábor)
   b. GINOP-2.3.2-15-2016-00032 (Dr. Juhász Gábor, Dr. Vilmos Péter és Dr. Mihály József).
   c. Nemzeti Agykutatási Program 2017-1.2.1-NKP-2017-00002 (Dr. Mihály József)
   d. Posztdoktori kiválósági program PD128623 (Dr. Szikora Szilárd) és PD128357 (Dr. Földi István)
3. European Molecular Biology Organisation, Short-term Fellowship (Kiss Viktória)
4. Magyar Tudományos Akadémia, Prémium posztdoktori kutatói program, PPD-222/2018 (Dr. Lőrincz Péter)

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék ... 5

1. Bevezetés ... 8

1. 1. Az ecetmuslica, mint genetikai modellrendszer ... 8

1. 2. Az autofágia vizsgálata és jelentősége ... 9

1. 2. 1. Az autofág gének ... 11

1. 2. 2. Az *Atg9* általános szerepe, szerkezete ... 12

1. 2. 3. Az autofág gének autofágiától független funkciói ... 14

1. 2. 4. Az autofágia szerepe a petefejlődésben ... 15

1. 3. A *Drosophila* petefészek ... 17

1. 3. 1. A petefészek általános felépítése és működése ... 17

1. 3. 2. A dajkasejt dumping jelensége ... 21

1. 3. 3. Az aktin hálózat szerveződése a dajkasejtekben ... 21

1. 3. 4. A határsejtek aktin szerveződése ... 25

2. Célkitűzés ... 27

3. Anyagok és módszerek ... 28

3. 1. A muslica fenntartása és a felhasznált törzsek ... 28

3. 2. Az *Atg9*-3xHA és az *Atg9*-3xmCherry konstrukciók elkészítése ... 28

3. 3. Ellenanyagok ... 28

3. 4. Az $Atg9^{B5}$ mutáns látrehozása ... 29

3. 5. Az ecetmuslicák kezelése ... 30

3. 5. 1. Élethossz teszt ... 30

3. 5. 2. Mászás teszt ... 31

3. 5. 3. Paraquat kezelés ... 31

3. 5. 4. Fertőzésteszt ... 31

3. 6. Ko-immunprecipitáció és Western blot ... 31

3. 7. Élesztő kettős-hibrid renszer (Y2H) ... 32

3. 8. GST kötési teszt ... 33

3. 9. Plazmidok készítése az S2R+ *Drosophila* sejtek transzfektálásához, a kolokalizációs tesztekhez ... 33

3. 10. S2R+ sejtek fenntartása és transzfekciója ... 33

3. 11. Primer embrionális neuron sejtkultúra készítése és immunhisztokémiai festése ... 33

3. 12. Az embrionális központi idegrendszer és az adult petefészkek immunhisztokémiai festése ... 34

3. 13. Konfokális mikroszkópia ... 35

3. 15. Statisztika ... 36

4. Eredmények ... 38
4. 1. Az *Atg9* autofágiával összefüggő vizsgálata *Drosophila*-ban ... 38
4. 2. A *Drosophila Atg9* szerepe a nőstények peteképzésében ... 42
4. 2. 1. Az *Atg9* hiánya drasztikusan rontja a nőstények termékenységét ... 42
4. 2. 2. Az *Atg9* és az aktin hálózat kapcsolata ... 45
4. 2. 3. Az *Atg9* és ismert aktin szabályozó faktorok genetikai interakciójának vizsgálata 48
4. 3. Az Atg9, az Ena és a profilin lokalizációjának kapcsolata ... 55
4. 3. 1. Az Atg9 kolokalizál az Ena-val és a profilinnel ... 55
4. 3. 2. Az *Atg9* szabályozza az Ena membránközeli elhelyezkedését ... 58
4. 4. Interakciós vizsgálatok ... 59
4. 4. 1. Élesztő kettős-hibrid teszt ... 59
4. 4. 2. Az Atg9 és a profilin interakciójának bizonyítása ko-immunprecipitációval és GST pull-down technikával ... 62
4. 5. Az Atg9 és az aktin regulátorok kapcsolata *in vitro* rendszerben - *Drosophila* S2 sejtes kísérletek ... 63
4. 6. Az *Atg9* aktin szabályozással összefüggő szerepe testi eredetű sejtekben ... 66
4. 6. 1. A határsejt klaszter vándorlásának vizsgálata ... 66
4. 7. Az *Atg9* szerepének vizsgálata az idegrendszer fejlődésében ... 68
4. 7. 1. *Ex vivo* vizsgálat izolált primer embrionális neuronokkal ... 68
4. 7. 2. Az *Atg9* idegrendszerfejlődésben betöltött szerepének vizsgálata *in vivo* ... 70
5. Diszkusszió ... 72
6. Saját hozzájárulásom a munkához ... 78
7. Köszönetnyilvánítás ... 79
8. Irodalomjegyzék ... 81
9. Összefoglalás ... 93
10. Summary ... 95

Rövídítésjegyzék

AP2 complex: clathrin adaptor protein 2 complex

BSA: Bovine serum albumin

***chic*:** chickadee, profilin coding gene

CNS: central nervous system

CTD: citoszólikus domén

Cas9: Cas9 nuclease

CLEM: Correlative Light and Electron Microscopy

CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeats

D/A: dorso-anterio

DAPI: 4′,6-diamidino-2-phenylindole

EndoA: Endofilin A

EGFR: epidermal growth factor receptor

***ena*:** enabled gén

Ena: Enabled fehérje

EVH1: Ena/VASP homology 1 domain

EVH2: Ena/VASP homology 2 domain

FasII: Fasciclin II

FCS: fetal calf serum

Flag: tag with peptide sequence DYKDDDK

flip: flipase enyzme

FP4 motif: D/E FPPPPXD motif in EVH1 domain of Ena

FRT: Flippase recognition target

Gal4: transcription activator

GFP: green fluorescence protein

GST: Glutathione S-transferase

HA: Haemagglutinin

Hts: Hu li tai shao protein

JAK/STAT: Janus kinase/signal transducers and activators of transcription

JNK: c-Jun N-terminal kinase

KASH: Klarsicht, ANC-1, Syne homology

LC3: Light chain 3

LINC complex: LInker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton complex

LRRK2: Leucine-rich repeat kinase 2

MARCM: Mosaic analysis with a repressible cell marker

mCherry: a member of the mFruits family of monomeric red fluorescent proteins (mRFPs)

Msp-300: Muscle-specific protein 300 kDa

MNNC: multinucleated nurse cell

MT: microtubule

***nos*:** nanos RNA-binding protein coding gene

Nup154: Nuclear pore complex protein Nup154

***osk*:** *oskar* mRNS

p38IP: p38 interacting protein

PAS: Pre-autophagosomal structure

PatJ: PALS1-associated tight junction protein

PCR: Polymerase chain reaction

PD: Parkinson's disease

PFN1: humán profilin 1

PI3K: foszfatidil-inozitol-3 kináz

Rab5 és Rab7: small GTP-ases

RC: ring canal

Ref(2)P: refractory to sigma P

p62: the *Drosophila* homolog of Ref(2)P

SH3: SRC Homology 3 Domain

***shg*:** *shotgun*

Shot: Short stop protein, a spectraplakin family member

slbo: slow border cells

TBC1D5: TBC1 domain family member 5

TMD: transzmembrán domén

TOR: Target of Rapamycin

dTRAF2: *Drosophila* Tumor necrosis factor receptor-associated factor 2

TRAPPC8: Trafficking Protein Particle Complex 8

TSC2: tuberous sclerosis complex 2

***tub*:** tubulin coding gene

UAS: Upstream activating sequence

Ulk1: Unc-51 like kinase 1

VNC: ventral nerve chord

ZIPK: Zipper interacting protein kinase

1. Bevezetés

1. 1. Az ecetmuslica, mint genetikai modellrendszer

Az ecetmuslicát (*Drosophila melanogaster*) Thomas H. Morgan kutatásai nyomán a XX. század elejétől kezdve használják biológiai kutatásokhoz. Kis testméret, gyors fejlődés, rövid életciklus, könnyű tenyészthetőség, alacsony fenntartási költség jellemzi a muslicát, mint genetikai modellállatot, így több más modellszervezettel szemben előnyöket élvez. Az ecetmuslica a rovarokhoz, azon belül a kétszárnyúak rendjébe (Diptera), szűkebben a *Drosophila* nemzetségbe és *Sophophora* alnemzetségébe tartozik. Teljes átalakulással (holometamorfózissal) fejlődik. Laboratóriumi körülmények között, 25°C-on az embriogenezis 24 óráig tart, majd a kifejlődött lárvák elkezdenek mozogni és táplálkozni. A lárva lét három lárvastádiumra osztható (L1, L2, L3), a stádiumok között a lárvák vedlenek. Az L3 48 óráig tart, ezen belül elkülönítünk táplálkozó és vándorló periódusokat. A vándorló lárva már nem táplálkozik, hanem előkészül a bábozódásra, száraz helyet keres. A lárvális nyálmirigy megnövekedett mennyiségű váladékával rögzíti magát, majd előbáb képződik belőle. A bábból 4 nap elteltével kel ki a felnőtt, adult egyed, amely a kikelést követően 8-12 órával már ivarérett. Ez a nagyjából fél napos intervallum alkalmas arra, hogy célzott keresztezésekhez szűz nőstényeket gyűjtsünk, ugyanis az ecetmuslica nőstények életük folyamán csak egyetlen egyszer párosodnak, a spermiumokat a spermatéka nevű szerveikben tárolják és egyesével adják hozzá a spermiumokat az érett petékhez még a petevezetékben (oviductus).

A *Drosophila* vizsgálatára óriási mennyiségű információ és genetikai, sejtbiológiai vizsgálómódszer áll rendelkezésre, így válhatott a sok évtized alatt az alapkutatások legkedveltebb modellállatává. Négy pár kromoszómája van, egy pár ivari kromoszóma (X, Y) és három pár autoszóma (2., 3. és 4.). A 4. kromoszóma kisméretű, szinte elhanyagolható az e kromoszómán található gének száma, így kutatásokban sem jellemző a használata. A teljes genom szekvenciáját 2000-ben tárták fel, a haploid genom mérete mintegy 175 Mb és megközelítőleg 15000 gént kódol. A genetikai kísérletek legfontosabb eszközei a balanszer kromoszómák, a fenotípusos markerek és hímekben a rekombináció hiánya. A balanszer kromoszómák, mint a neve is mutatja, kiegyensúlyozzák a genomot, többszörös inverziókat tartalmaznak, megakadályozva ezzel a meiózis során a rekombinációt. A balanszer kromoszómák a felismerésüket segítő domináns markert vagy markereket (pl. Curly oyster, Rosy, Drop, Tubby, Stubble, Sternopleural) és több recesszív markert (ebony, yellow, white) hordoznak. Előnyük továbbá, hogy homozigóta formában letálisak. Balanszer kromoszómák segítségével letalitást vagy sterilitást okozó mutációk is fenntarthatók törzsben.

Tekintve, hogy az alapvető sejtélettani folyamatok evolúciósan konzerváltak az élőlények között, és a muslica genetikai állományában megtalálható a humán megbetegedéseket okozó gének homológjainak jelentős része, a muslica kiváló modelljévé válhatott a magasabbrendűek sejtjeiben lezajló folyamatok megértését célzó kutatásoknak. Modellállatként használják a sejtváz kialakulásának, a neurodegeneráció és abból adódó betegségek (Parkinson kór, Huntington kór), a rák- és cukorbetegség kutatására, mitokondriális betegségek, az autofágia és még számtalan sejtanyagcsere folyamatának megértésére.

1. 2. Az autofágia vizsgálata és jelentősége

Az autofágia egy olyan dinamikus sejtélettani folyamat, amely biztosítja a sejt alkalmazkodását és túlélését a sejtet, illetve a szervezetet érő stresszhatás alatt, mint az éhezés, fertőzések, mérgezések. Ezen felül az autofágia kruciális szerepet tölt be az egyedfejlődés során is [1]. Az autofágiát sejtes önemésztésként is megtaláljuk a szakirodalomban, ugyanis e folyamat során a sejt elsősorban saját fehérjéit, fölöslegessé vált vagy sérült organellumait bontja le a lizoszómális rendszer segítségével. A lebontásra ítélt anyagok lizoszómába kerülési módjai alapján az autofágiának három fő csoportját különböztetjük meg: a makroautofágiát, a mikroautofágiát és a dajkafehérje-irányított autofágiát [2][3][4] (1. ábra). A makroautofágia során az autofagoszómába jut az emésztendő anyag (invaginació), majd savas lizoszómával egyesülve történik meg a lebontás. Mikroautofágia során közvetlenül emésztő lizoszómákba jutnak a lebontásra ítélt kompartmentumok. Dajkafehérje-irányított autofágia során azok a fehérjék, amelyek tartalmazzák a KFERQ pentapeptid motívumot, dajka fehérjékhez kötődnek, majd a chaperon fehérje segítségével egy másik membrán fehérjén keresztül kerülnek a lizoszóma üregébe, ahol lebomlanak. Dolgozatomban a makroautofágiával foglalkozom bővebben, melyre a továbbiakban csak szimplán autofágiaként hivatkozom.

Autofágia során, ahogy fentebb röviden kifejtettem, a sejt a lebontandó citoplazmarészletet kettős membránnal rendelkező vezikulákba, autofagoszómákba zárja. Az autofagoszómák lizoszómákkal fúzionálnak, majd a vezikula tartalma megemésztődik. Ezen folyamatban a lebontást a lizoszómák savas hidrolázai biztosítják. A sejt a lebontás után visszamaradó kisméretű molekulákat a makromolekuláris szintézisbe forgatja vissza vagy energiaforrásként használja fel.

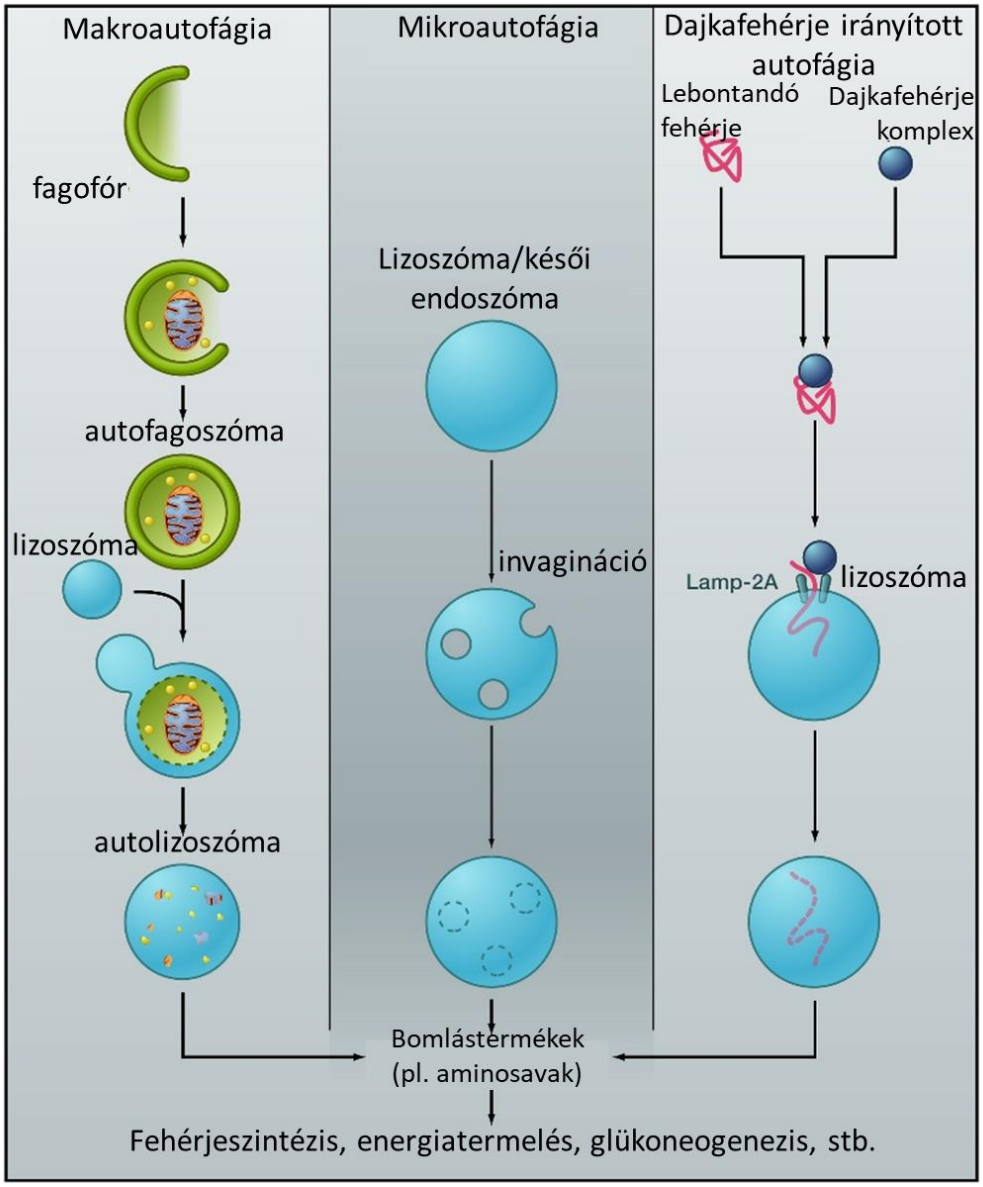
Ismert, hogy az autofágia egy erősen konzervált sejtélettani folyamat az egysejtű élesztőktől az ecetmuslicán át egészen az emberig, mind morfológiájában, mind pedig a folyamatban résztvevő fehérjéket, fehérje komplexeket tekintve. A *Drosophila* lárva teljesen

eltér testfelépítésében az adulttól. A metamorfózis a nyugvó bábállapotban történik meg, amikor a test szinte egészében újraszerveződik. Ebben a felbomlás-újraszerveződési folyamatban fontos szerepe van az autofágiának.

A sejtes önemésztés más élettani folyamatoknak is fontos szereplője, ilyen a sejtes homeosztázis fenntartása egészséges körülmények között vagy stressz hatására, amely lehet például éhezés. A *Drosophila*, mint modellrendszer másik előnye, hogy jól jellemzett, gyorsan növekvő poliploid lárválís szövetek is alkotják. Ilyen szövet a muslica lárva zsírtestje, amely habár raktároz lipideket, a legfontosabb funkciói ezen túl szénhidrátok-, aminosavak raktározása, valamint szükség esetén ezek hatékony és gyors felszabadítása a hemolimfába, s mint ilyen, az emlős májhoz, valamint a fehér zsírszövethez hasonló élettani funkcióval bír [5]. A lárválís zsírtest éhezés hatására (stressz-indukált autofágia) vagy a normális metamorfózis során beinduló (fejlődési autofágia) intenzív autofágia aktiválódást mutatnak, ezáltal biztosítva az osztódó és differenciálódó diploid sejtek anyag- és energiaszükségletét az imágóvá fejlődés lépcsőfokain. A lárválís zsírtestet elsősorban a tápanyagmegvonásra adott gyors válasza teszi az autofágia vizsgálatának legfőbb modelljévé.

Az autofágiának fontos szerepe van az éhezési válaszon túl az öregedési [6], neurodegenerációs folyamatokban, illetve az oxidatív stressz leküzdésében is, melyek szintén jól vizsgálhatóak *Drosophila* modellen. Kutatások során számos, az autofág folyamatokat szabályozó, ún. upstream szignálmolekulát, illetve az autofágia (Atg) fehérjékkel homológiát mutató faktorokat azonosítottak. Ezek a szabályozó faktorok nagyfokú konzerváltságot mutatnak a különböző fajok között és együttesen vázolják fel azt az összetett, autofágiával összefüggő mechanizmust, amely alapjául szolgál a humán betegségek muslica modellen történő tanulmányozásának is [7].

Az autofágia szabályozása szintén egy erősen konzervált mechanizmus az állatvilágban. Példaként csak néhány folyamatot említek: a sejtnövekedési útvonalak, valamint az inzulin/PI3K és TOR jelátviteli utak aktiválódása, amely gátolja az autofágiát. A növekedési faktorok hiánya, az éhezés, illetve az autofágiára hatást gyakorló kemikáliák, példaként említve a TOR kinázt gátló rapamicint, aktiválják az autofágiát.



1. ábra. Az autofágia három fő fajtáját, makro-, mikro- és dajkafehérje irányította autofágia mechanizmusát bemutató sematikus ábra. Adaptálva: Mizushima én mtsai [4]**.** A makroautofágia (bal oldal) során az autofagoszómába jut az emésztendő anyag, majd savas lizoszómával egyesülve történik meg a lebontás. Mikroautofágia (középső) során közvetlenül emésztő lizoszómákba jutnak a lebontásra ítélt kompartmentumok. Dajkafehérje közvetítette autofágia (jobb oldal) során bizonyos fehérjék dajkafehérjékhez kötődnek, majd a chaperone segítségével egy membrán fehérjén keresztül kerülnek a lizoszóma üregébe, ahol lebomlanak.

1. 2. 1. Az autofág gének

Az első géneket, amelyek az autofág folyamatokban nélkülözhetetlen szerepet betöltő fehérjéket kódolták, élesztő modellen végzett vizsgálatok során azonosították 1993-ban [8]. További kutatások rávilágítottak, hogy az *Atg* gének homológjai magasabbrendűekben is fontosak az autofagoszóma biogenezishez [9][10].

Az autofág folyamatokat az Atg fehérjék komplexekbe rendeződve bonyolítják le. Az első komplex, amely aktív az Atg1/ULK1 szerin-treonin kináz komplex, melyet a foszfatidil-inozitol-3 kináz III (PI3K(III)) komplex követ. Ezután két ubikvitin-szerű konjugációs rendszer, az Atg12 és Atg8 konjugációs komplex lép be a folyamatba. Ez a két rendszer az izoláló membrán, a fagofór növekedését segíti elő [11][12][4]. Az Atg12-vel ellentétben, amely csak a fagofóron van jelen, az Atg8 (*Drosophila* Atg8a, emlős Atg8/LC3) az izoláló membrán záródását követően létrejövő autofagoszóma-membránon is megtalálható. Ez lehetővé teszi, hogy az Atg12-komplex elemeinek jelölése (riporterfehérje-fúzióval vagy immunhisztokémiai kimutatással) az izoláló membránok, míg az Atg8a jelölése az izoláló membránok és autofagoszómák együttes azonosítására alkalmas (Mauvezin et al., 2015, Mauvezin et al., 2014, Klionsky et al., 2016). Kezdetben az Atg8a a növekvő izoláló membrán mindkét oldalán megtalálható, az autofagoszóma kialakulását követően a külső membránról lehasadva reciklizálódik, de a belső membránhoz asszociált Atg8a lizoszómával történő fúziót követően a degradációra ítélt anyagokkal együtt lebontásra kerül. Az ubikvitin molekulák által megjelölt, lebontásra ítélt fehérjék és organellumok a növekvő fagofór membránjához asszociálnak egy úgynevezett adaptor fehérjén, a ref(2)P-n (a p62 *Drosophila* ortológja, a továbbiakban ezt a nevet használom) keresztül [15]. A p62 egyidejűleg kötődik az ubikvitin molekulához és a növekvő fagofór membránjához kötődő Atg8a fehérjéhez, ezzel biztosítva a degradációra ítélt struktúrák pányvázását és bezáródását a majdani autofagoszómába. Ha sérül az autofágia folyamata, a p62 fehérje erőteljesen fölhalmozódik a sejtekben, mely fölhalmozódás detektálása az autofágia hibájának kimutatására használható [16][17][18][19].

1. 2. 2. Az *Atg9* általános szerepe, szerkezete

Az Atg fehérjék családjának egyetlen ismert, evolúciósan konzervált, transzmembrán doménnel is rendelkező tagja az Atg9, kutatások szerint membránrészletek, illetve lipidek szállításával segíti az autofagoszóma kialakulását [20]. Élesztő sejtekben a GFP-vel fuzionált Atg9 olyan kisméretű citoplazmatikus struktúrák membránjában helyezkedett el, amelyek a lipideket és membránrészleteket biztosítanak a fagofór összeszerelődéséhez. A citoplazmában a fagofórok összeszereléséhez összeállt fehérjék és növekedő membrán együttesen alkotják a pre autofagoszómális struktúrát (PAS - Pre-autophagosomal structure) [21][22]. Az autofagoszóma kialakulása során az Atg9 az Atg1 kináz komplex-szel együtműködve vesz részt a folyamatban [23][24][21][25][26]. Habár az autofágia nagy részben ismert sejtes működés, az Atg9 által kijelölt struktúráknak sem az identitása, sem a pontos szerepe nem tisztázott. Léteznek tanulmányok, melyek az Atg9-et a mitokondriumok közelében írták le [27], míg mások

kisméretű, mobilis citoplazmatikus sejtalkotókként azonosították az Atg9-pozitív struktúrákat, függetlenül a mitokondriumoktól [28][29]. Az Atg9 fehérje emlős homológjának (mAtg9) lokalizációjáról több információ is rendelkezésünkre áll, melyek szerint az Atg9 a transz-Golgi-ban, az endoszómák membránjában és a plazmamembránban helyezkedik el, az autofágia folyamatához ezekből a struktúrákból szállíthat membránrészleteket [30][31]. Az mAtg9 funkciója konzervált, *Drosophila*-hoz és élesztőhöz hasonlóan emlősben is esszenciális az autofágia folyamatának iniciációjában. Emlősben ismertek olyan közreműködő fehérjék, melyek szabályozzák az Atg9 térbeli és időbeli megjelenését, működését. Ezek a faktorok az Unc-51 like kinase 1 (Ulk1 - az Atg1 emlős homológja), a Zipper interacting protein kinase (ZIPK), a p38 interacting protein (p38IP), a Trafficking Protein Particle Complex 8 (TRAPPC8), a TBC1 domain family member 5 (TBC1D5), és a clathrin adaptor protein 2 complex (AP2 komplex) [32][33][34][35][21][20].

Szerkezetét tekintve az Atg9 egy többszörösen transzmembrán fehérje, hat darab transzmembrán domén (TMD) és négy darab citoszólikus domént (CTD) tartalmaz [36] (2. ábra). Az első citoszólikus domén (CTD1) az amino (N)-terminális végét tartalmazza a fehérjének, a negyedik (CTD4) a karboxi (C)-terminális véget. További funkcionális doméneket ezidáig nem azonosítottak. Irodalmi adatok megerősítik, hogy az Atg9 C-terminális doménje felelős az ismert kötőpartnerekkel történő interakciók kialakulásáért.

2. ábra. Az Atg9 fehérje sematikus ábrája. Hat darab transzmembrán- és négy darab citoszólikus doménje (CTD1, CTD2, CTD3, CTD4) van: az N- és C-terminális végeket tartalmazó doméneken kívül egy nagyobb és egy kisebb CTD.

Szakirodalmi adatok alapján egyelőre csak néhány, kísérletesen is bizonyított interakciós partnere ismert a *Drosophila* Atg9-nek. Nagy és mtsai. 2014-ben biokémiai módszerekkel igazolták, hogy az Atg18 és az Atg9 fizikai interakcióban állnak, illetve hogy Atg18 hiányában az Atg9 nem képes eljutni a p62 által kijelölt, lebontásra ítélt struktúrákat felhalmozó PAS-hoz [37]. Az Atg17 szintén igazolt interakciós partnere az Atg9-nek [25]. Kimutatták az Atg9 és egy endocitózisban szerepet játszó faktor, az Endofilin A (EndoA) és az EndoA foszforilációját végző LRRK2 kináz szerepét a Parkinson kór (Parkinson's disease - PD) kialakulásában [38].

Soukup és munkatársai a preszinaptikus membránoldalt vizsgálták, ahol az EndoA fehérjéről bizonyították be, hogy foszforilációja indukálja az autofagoszóma kialakulást, ezáltal a makroautofágiát, oly módon, hogy elősegíti az erős membrángörbületekkel rendelkező tubuláris vezikula-formációt, melyek igazoltan preautofagoszómális struktúrák és dokkolóhelyet jelentenek számos autofág fehérjének, például az Atg3-nak. A preautofagoszómális struktúrák jellemzően Atg9-pozitívak [39], továbbá Soukup és mtsai. muslica fejből származó fehérjelizátumot használva anti-tag ko-immunprecipitációval kimutatták, hogy az EndoA és az Atg9 egymás kötőpartnerei. Érdekes, hogy az EndoA a Parkin és a Synaptojanin fehérjékkel, mint PD kialakulásában szerepet játszó faktorokkal is interakcióban áll [40][41][42][43].

2013-ban publikált adatok alapján a JNK útvonal szabályozásában közreműködő Tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-vel (dTRAF2, az emlős TRAF6 *Drosophila* homológja) az Atg9 C-terminális doménjéhez kapcsolódik [44]. Szintén az Atg9 C-terminálisához kötődő fehérjeként azonosították a PALS1-associated tight junction proteint (Patj), amely a Tor kináz szignálútvonal egyik szabályozója [45]. Az itt felsorolt interakciókat a következő fejezetben részletezem.

1. 2. 3. Az autofág gének autofágiától független funkciói

Napjainkban egyre több tanulmány foglalkozik az autofágia folyamatában részt vevő fehérjék más, autofágiától részben vagy teljesen elkülönülő sejtfolyamatokban betöltött szerepével. Számos bizonyíték igazolja, hogy az Atg gének részt vesznek az idegrendszer működésében, gyulladásos folyamatokban, vagy jelátviteli útvonalak szabályozásában [16][45][44]. Érdekes eredmények láttak napvilágot 2016-ban kutatócsoportunkból, mely szerint az *Atg16* mutáns, ellentétben az autofágia más kulcsfaktorainak mutánsaival, jelentősen jobban tolerálja az etanol okozta szedációt. Úgy tűnik, az *Atg16* függetlenül az autofágiában betöltött szerepétől részt vesz az alkohol-tolerancia válasz kialakulásában. Teszi ezt pontosabban egy Corazonin (Crz) nevű neuropeptid szintjének szabályozásán keresztül [46]. A Crz egy speciális neuropeptid, a muslica agyban mindössze néhány neuroszekréciós sejt termeli, melyek igazoltan az alkoholra adott szedációs válaszban játszanak szerepet. Ebben a tanulmányban világossá válik, hogy az Atg16 ko-lokalizál az érintett sejtekben a Crz-nal, valamint, hogy *Atg16* hiányában számottevően lecsökken a Crz fehérje és mRNS szint is. Egy másik csoportunkból származó tanulmányból tudjuk azt is, hogy a *Atg16* hiánya hozzájárul a bél gyulladásos kórfolyamatainak kifejlődéséhez az intesztinális (bélben lezajló) *Slit/Robo* jelátviteli útvonalak szabályozásán keresztül [47]. Egy 2010-es humán fibroblaszt és HeLa sejteken végzett tanulmány szerint az *Atg12* és *Atg3*

egymással együttműködve hozzájárulnak a mitokondriális homeosztázis fenntartásához, negatívan szabályozva a mitokondriumok számát és fúzióját, együttműködésük hiánya pedig mitokondriális eredetű sejthalálhoz vezet [48].

Az elmúlt néhány évben több kutatás is napvilágot látott az *Atg9* autofágiától független funkcióinak vizsgálataival kapcsolatban. 2013-ban Tang és mtsai kísérletesen igazolták az *Atg9* kettős funkcióját a JNK (c-Jun N-terminal kinase) szignáltranszdukciós útvonal szabályozásában oxidatív stressz hatására kialakuló sejtválaszban *Drosophila* bél modellen. Meglepő módon az Atg9 heterodimert alkot a dTRAF2-vel és pozitív szabályozás útján hozzájárul a JNK útvonal aktiválódásához oxidatív stressz hatására, ezzel hozzájárulva az intesztinális őssejtek osztódásának szabályozásához. Biokémiai adatokat is szolgáltat Tang és munkatársainak 2013-as munkája arra vonatkozóan, hogy az Atg9 a C-terminális doménjén keresztül kapcsolódik a dTRAF2 faktorhoz. Továbbá az eredmények arra is rávilágítottak, hogy a reaktív oxigéngyökök (ROS) által indukált autofágia egy negatív visszacsatolással szabályozza a JNK útvonalat, *Atg9* hiányában sérül az autofágia folyamata és nem érvényesül a negatív szabályozás az érintett sejtekben.

A legfrissebb kutatások bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy az *Atg9* a Tor kináz útvonal antagonistájaként is funkcionál a *Drosophila* bélhám homeosztázisának fenntartásában, valamint a béltraktusban található őssejtek növekedésében. A Tor kináz útvonalról ismert, hogy serkenti a sejtnövekedést, illetve gátolja az autofágia folyamatát [45]. Részleteiben is megvizsgálták az *Atg9* szerepét a Tor útvonal szabályozásban. Biokémiai kísérletek alátámasztják, hogy az Atg9 interakcióba lép a Patj-vel, amely a tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) faktorhoz, a Tor egyik negatív regulátorához is kapcsolódik. Az Atg9 kötődik PatJ-TSC2 dimerjéhez, és hozzájárul a TSC2 stabilitásához, Atg9 fehérje hiányában pedig a TSC2 szintje drasztikusan lecsökken, megzavarva ezzel a Tor útvonal működését. Következésképpen elmondható, hogy az *Atg9* a Tor útvonal antagonistájaként működik a sejtnövekedés szabályozásában és a szöveti homeosztázis fenntartásában.

1. 2. 4. Az autofágia szerepe a petefejlődésben

Muslicában az autofágia központi szerepet tölt be a metamorfózis során, amikor a lárvális szövetek felbomlanak, hogy felépüljenek az adult szövetek, szervek és kifejlett ecetmuslicaként hagyhassa el az élőlény a bábot. Az autofágia szempontjából leginkább érintett szervek a lárvális- illetve adult zsírtest és a nyálmirigy, valamint az ovárium, amely szintén nagyon érzékeny az éhezés indukálta autofágiára [49][50][51][52]. Az oogenezis során a tápanyag

megvonása autofágiát indukál a petefészek sejtjeiben. A muslica nőstény tápláltsági állapotát ismert ellenőrző mechanizmusok szerint képes a petefészek érzékelni. Az első ellenőrző pont a peteérés nagyon korai szakaszában (szakaszokat lásd lentebb) történik. Míg normális körülmények között mind autofágia, mind apoptózis megfigyelhető a petefészekben, éhezés hatására fokozódnak [50][53][54][55]. Az oogenezis középső szakaszában (mid-oogenesis) is hasonló folyamatok játszódnak le tápanyagmegvonás hatására. Ebben a fázisban jól megfigyelhetőek az autofágia markerei a petefészek sejtjeiben. Ha az autofágia folyamata hibát szenved, az éhezés nem képes fokozott autofágiát indukálni a petefészek sejtjeiben, ellenben DNS fragmentálódás és apoptózis figyelhető meg [53][55][56][57]. Az éhezés-indukálta autofágia mellett az oogenezis során megjelenik a fejlődési autofágia is, amely mind a csírasejteket (germline stem cell, GSC), mind pedig a szomatikus eredetű follikuláris sejteket (follicle cell, FC) érinti. Az oogenezis késői fázisában a follikuláris sejtek elpusztulnak, a sejtmagjuk kondenzáltabbá válik, de nem mutatnak DNS fragmentációt, amely arra utal, hogy a follikuláris sejtek kaszpáz-független módon halnak el [50][58]. Azonban az irodalomból ismert, hogy a petefejlődés különböző stádiumaiban és különböző sejttípusaiban bekövetkező sejthalálok is autofágia-függő folyamatok [53][56]. Nezis és munkatársai demonstrálták, hogy az oogenezis végén bekövetkező dajkasejt halál során autofágia markerek halmozódnak föl a haldokló sejtekben. Továbbá azt is bebizonyították, hogy autofágiára mutáns (*atg1, atg13* vagy *vps34*) ivarvonal klónok (Germline clone, GLC) nem mutattak DNS fragmentálódást, a dajkasejtek magjai a peteérés befejezte után is jól detektálhatóak maradtak. Nezis és munkatársai megállapították, hogy az autofágia elengedhetetlen a *Drosophila* petefejlődés során [59]. Barth és munkatársai azonban később megcáfolták ezt, állították, hogy az ivarvonal sejtekben bekövetkező autofágia hiba nem gátolja az egészéges peték fejlődését és a nőstények termékenységét, anormális peték fejlődnek „maradvány" dajkasejt magok nélkül [50]. Továbbá, azt is igazolták, hogy abban az esetben, ha a follikuláris sejtekben hibás az autofágia, az ivarvonal sejtekben pedig sértetlen az autofágia folyamata, abnormális peték fejlődnek, tehát a normálisan működő autofágia a follikuláris sejtekben elengedhetetlen. Az eredményeket azzal magyarázhatjuk, hogy az autofág folyamatok elromlása feltételezhetően olyan útvonalakat gátol a szomatikus és az ivarvonal sejtek között, melyek a petesejt fejlődéséhez elengedhetetlenek [50]. Számos esszenciális útvonal ismert a peteérés folyamán, melyek a szóma és a csírasejtek között működnek [60]: a teljesség igénye nélkül említve az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR, Epidermal growing factor receptor) jelátviteli útvonal [61], valamint a Delta/Notch útvonal, amely felelős a poláris sejtek differenciációjáért, a mitózis szabályozásáért és a dajkasejtek endoreduplikációjának beindulásáért, továbbá az érett peték dorzális

nyúlványainak kialakulásáért [62][63][64]. Mind az EGFR mind pediga Delta/Notch útvonalakhoz elengedhetetlen az endocitózis és az endoszómális szállító folyamatok hibátlan lezajlása, hiszen a jelátviteli útvonalakban résztvevő molekulákat aktiválni, működésüket szabályozni szükséges, funciójuk betöltését követően pedig le kell bontani [65][66].

Barth és munkatársai 2012-ben felállítottak egy modellt, miszerint a hibás autofágia follikuláris sejtekben megemeli az egyik fontos jelátviteli útvonalban szerepet játszó receptor számát (Notch receptor), melyet a csírasejtektől érkező relatív alacsony mennyiségű ligand (Delta) nem képes kompenzálni, ez pedig rendellenes petefejlődéshez vezet [67]. Ez a modell magyarázatot adhat arra, hogy egyes autofágia gént érintő mutáció (*Atg3/Aut1, Atg5, Atg7, és Atg16*) homozigótaként életképes, az általános autofágia teszteken is egyértelmű az autofág folyamatok hibája (életképesség, sztressztűrés, p62 halmozódás, stb.), de az egyedek fertilisek [68][46]. Eddigi ismeretek alapján az egyetlen Atg gén, melynek *null* mutációja életképes, azonban a nőstények szinte teljesen sterilek, az *Atg9* [45][69].

1. 3. A *Drosophila* petefészek

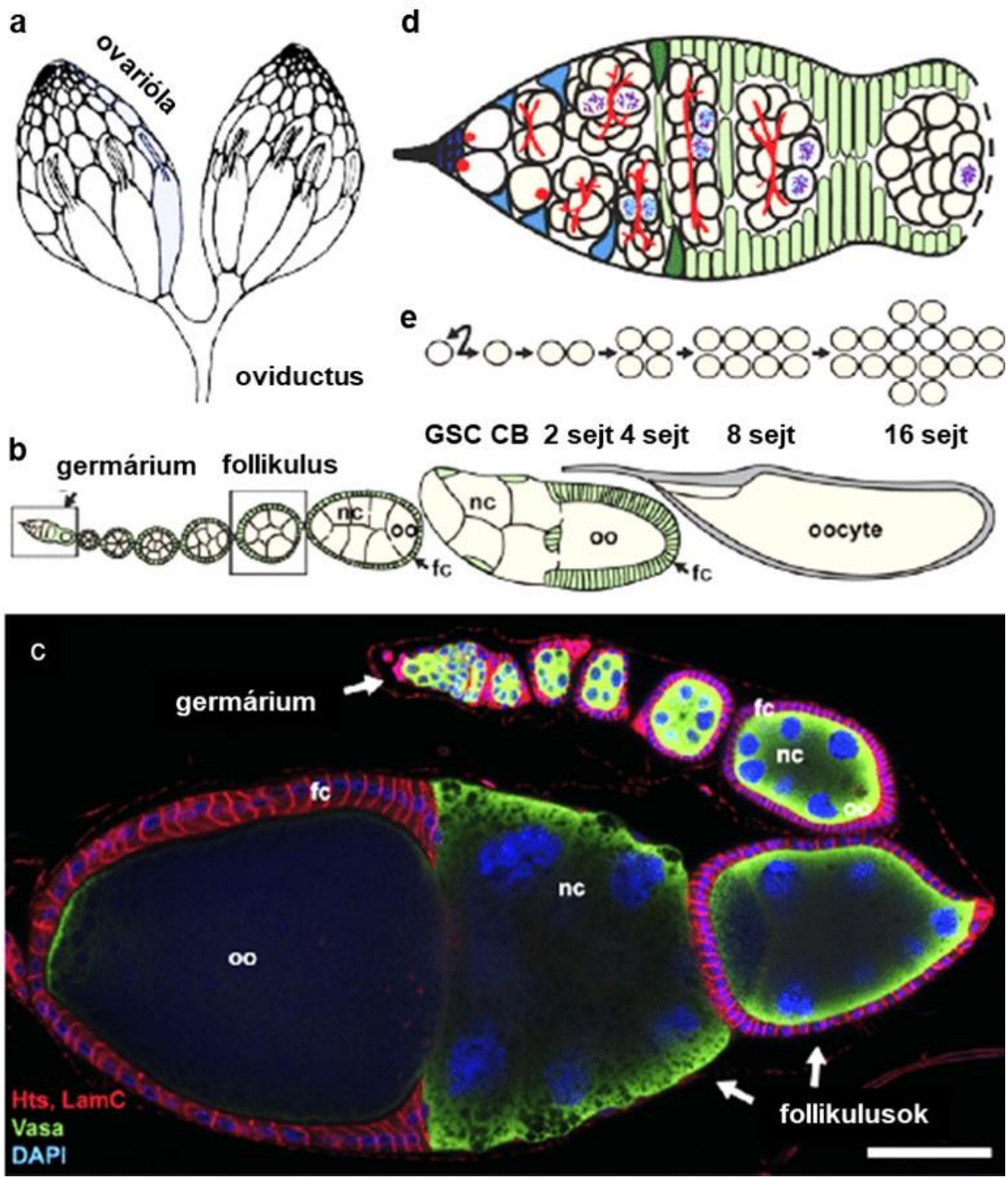
1. 3. 1. A petefészek általános felépítése és működése

A felnőtt muslica petefészke tulajdonképpen testének legnagyobb szerve, a potroh hátsó felében helyezkedik el és nagyjából a potroh felét elfoglalja (3. ábra). Páros szerv, izmos falú csövekből, ún. ovariólákból áll, amelyekben párhuzamosan fejlődnek a peték. Egy jól táplált nőstény petefészke huszonkettő ovariólát is tartalmazhat [70][71][72], habár ez a szám az egyes genotípusok között eltérést mutat [73][74]. Az ovariólák két különböző sejttípusból állnak: a csírasejtek, valamint a szomatikus eredetű sejtek. A szomatikus follikuláris sejtek, melyek a germáriumban található follikuláris őssejtekből (follicular stem cell - FSC) származnak, egy sejtsor vastagságban (follikuláris epitélium, FE) körülveszik a fejlődő petét és pozíciótól és stádiumtól függően, illetve külső, környezeti hatásra különböző típusú sejtekké differenciálódhatnak: poláris sejtek, határsejtek, stalk sejtek, stb. [75]. A különböző típusú follikuláris sejtek közül egyesek a fejlődési stádiumnak megfelelő faktorokat, például *ecdyson* szteroid hormont termelnek, támogatva ezzel a peteérést (oogenezis), mások a majdani pete burok kialakításáért felelnek, egyesek a petefejlődés végén az apoptotizáló tápláló sejtek maradványait is „felfalják”, megint mások a hímivarsejtnek belépést biztosító mikropílust alakítják ki [76]. Az ovariólák anterior végében található a germárium (3. ábra), melyben 2-3 csíravonal őssejt ül [77]. Az őssejtek folyamatosan, mitózissal osztódnak oly módon, hogy míg az őssejtek a germárium csúcsában maradnak, addig a cisztoblaszt (cystoblast, CB) leánysejtek

továbbhaladnak az ovarióla poszterior vége irányába, miközben elkezdődik a differenciálódásuk, osztódnak és négy osztódás után kialakítják a tizenhat sejtes cisztákat A CB-ok osztódása nem tökéletes osztódás, eredményeként 16 sejtet meghatározott számú (15 darab) citoplazmahíd köti össze, amelyek az oogenezis végéig fennmaradnak (3. ábra, e). A sejtek közötti kapcsolatban részt vesz egy aktin- és Hu li tai shao fehérjében gazdag, mikrotubulusok (MT) és membránhatárolt organellumok alkotta képződmény, a centroszómákból kiinduló fuzóma is [78]. A sejtek közötti plazmaösszeköttetés helyét a plazmamembrán aktin-gazdag, speciális, gyűrű-szerű képződménye, az ún. gyűrűcsatorna (ring canal - RC) biztosítja. A negyedik osztódás befejeződését követően két olyan sejt lesz a cisztában, melyeknek 4 plazmaösszeköttetése lesz, a többi sejtnek kevesebb. A két legtöbb összeköttetéssel rendelkező sejt közül az egyik fejlődik tovább petesejtté, a maradék 15 sejt tápláló funkciót lát el, melyeket dajkasejteknek (nurse cell - NC) nevezzük.

Ahogy a 16 sejtes ciszta elhagyja a germáriumot, megtörténik az enkapszuláció (a follikuláris sejtek körbezárják a cisztát) és kialakul a petekezdemény, melyet petekamrának is nevezünk. A *Drosophila* oogenezisét először R.C. King és munkatársai vizsgálták és először írták le a mai napig is ismert 14 fejlődési stádiumot is [79]. A stádiumokat a dajkasejtek és a petesejt számos speciális tulajdonsága, valamint egy jellegzetes vándorló, follikuláris eredetű sejtcsoport, a határ- vagy határsejtek (border cell – BC) vándorlási stádiuma alapján határozták meg [79]. Az első kilenc stádium alatt lezajlik a petesejt differenciációja, a follikuláris sejtek differenciációja, valamint a dajkasejtek és a petesejt térfogatnövekedése. A follikuláris sejtek osztódása a 7. stádiumban befejeződik. A 8. stádium legfontosabb eseménye az ún. vitellogenezis elindulása, a petesejt körüli vitellin- és korion burkok kialakulásának kezdeti lépései, mellyel párhuzamosan a petesejt is elkezdi fölvenni a szik anyagát [80]. A 9. stádiumban a már említett határsejtek (6-10 sejt) vándorló sejtekké differenciálódnak, majd körbeveszik a petekamra anterior végében ülő két poláris sejtet, és megkezdik vándorlásukat a dajkasejtek között. A 10. stádiumig befejezik a vándorlást, elérik a petesejt anterior határát, majd ezen a határvonalon a petesejt dorzo-anterior (D/A) pólusához közel húzódnak. Rögzítik magukat és a poláris sejteket a D/A pólus közelében, ezzel egyidejűleg a petesejt sejtmagja szintén a petesejt dorzo-anterior (D/A) pólusához húzódik. Ezen a póluson a határsejtek elkezdik a mikropílus kialakítását, amely a hímivarsejt belépési helye lesz. A határsejtekkel érkező anterior poláris sejtek a poszterior póluson található poláris sejtekkel együtt a petesejt számára a megfelelő polaritás kialakulásáért felelős faktorokat termelnek.

A 10. stádium végén indul egy fontos esemény, az ún. dumping, amely során a dajkasejtek plazmaanyagukat átpréselik a petesejtbe, amelynek megnő a térfogata és nagymennyiségű tápanyagot, maternális RNS-t, organellumokat és fehérjét halmoz föl magában ezáltal [81]. Az átpréselést a dajkasejtek a membrán alatt húzódó kortikális aktin-hálózatuk kontrakciójával érik el [82], a plazmaagyag továbbítása pedig a gyűrűcsatornákon keresztül valósul meg nagyon gyors ütemben, mindössze 30 perc alatt [83]. A dajkasejtekből csak a sejtmag, aktin kábelek és némi citoplazma marad hátra (Spradling, 1993). A 11. stádiumtól kezdődően a dajkasejtek megkezdik létük utolsó fázisát, a degenerációt, felkészülve az apoptózisra. Ugyanebben a stádiumban a dorzálisan elhelyezkedő follikuláris sejtek kialakítják a páros dorzális nyúlványt (dorsal appendage), melyek később, a 14. stádium végére érik el végső hosszúságukat [79]. A 14. stádiumban, amikor a petesejt eléri a végső méretét, valamint a petét határoló burkok fejlődése is befejeződik, a dajkasejtek elhalnak, fragmentálódnak, a törmelékeiket pedig a follikuláris sejtek fagocitálják, végül pedig a follikuláris sejtek egy része is elpusztul [79]. Az oogenezis folyamata és a 14 stádium szabályozása folyamatos interakciót igényel a szomatikus- és csíravonal sejtek között. Elengedhetetlen például az agy és a zsírtest által végzett szabályozási mechanizmusok pontos zajlása a petefejlődés során [84][76]. Az agy hormonokat, például *sex peptid*-et, a corpora allata *juvenile* hormont termel, szabályozva ezzel a petekamra fejlődését [85]. Végül a zsírtest termeli és a follikuláris sejtek továbbítják a heamolimpha-ból a szik anyagát alkotó proteineket, melyeket a petesejt a vitellogenezis során vesz föl és ún. szik (yolk) granulumokban (módosult késői endoszómák) tárolja [86][84]. Összességében elmondható, hogy a peteérés egészséges lezajlásához több szerv és sejttípus összehangolt működésére van szükség.



2. ábra. A *Drosophila* petefészek felépítése és a pete fejlődésének főbb stádiumai [87]**.** A *Drosophila* petefészek páros szerv, amely ovariólákból áll és a két fél a közös oviductus-ban találkozik (a). Az ovariólák anterior végén található a germárium, majd a fejlődés előrehaladtával a petekezdemények petekamrákká fejlődnek és növekedve haladnak az ovariólák poszterior végének irányába, az oviductus felé (b). A Vasa (zöld) egy ivarvonal sejt-specifikus fehérje, a csírasejteket jelöli, a Hts és a LaminA (LamA) (piros) membrán-asszociált fehérjék, a DAPI (kék) a kromatinhoz kötődik, így a sejtmagok anyagát jelöli ki. oo=oocita, nc=dajkasejt (nurse cell), fc=follikuláris sejt (c). A germárium felől találhatóak az ivarvonal őssejtek, amelyek osztódása révén keletkeznek a cisztoblasztok, amelyek fuzómákkal (piros vonalak) vannak összeköttetésben (d). Megfigyelhető még számos sejttípus a germáriumban: sapkasejtek (cap cells, sötétkék), kísérő sejtek (escort cells, világoskék), ivarvonal őssejtek (fehér), cisztoblasztok és cisztociták (halványsárga), follikuláris őssejtek (sötétzöld), follikuláris sejtek (világoszöld) (d). Négy mitótikus osztódást követően a 16 sejtes ciszta elhagyja a germáriumot, majd osztódás nélküli mennyiségi- és minőségi változásokon megy keresztül (c, e).

1. 3. 2. A dajkasejt dumping jelensége

A *Drosophila* oogenezis során kétféle transzportot különíthetünk el: aktív- és passzív transzportot, azaz a szelektív- és a non-szelektív anyagáramlást. Aktív transzportról beszélünk elsősorban a 10. stádiumig, amikor mikrotubulusok (MT)- és motorfehérjék által vezérelt módon szabályozó faktorok, mRNS-ek aktívan mozognak és jutnak el a petesejtbe a dajkasejtekből a gyűrűcsatornákon keresztül [88][89][90][91], valamint a petesejten belül keletkezett mRNS-ek a petesejt megfelelő régiójába. A MT hálózat az ún. mikrotubulus szervező központból (microtubule-organizing center) indul. Ez a központ a petesejt poszterior pólusán található, itt történik meg a MT-ok nukleációja, melyek a petesejtből növekednek az anterior vég irányába, keresztül a dajkasejteken [92][93]. MT átrendeződés szabályozó faktorok rögzítését segíti, például a *gurken* (*grk*) mRNS megfelelő elhelyezkedését szabályozza a petesejt D/A pólusán [61], valamint az *oskar* (*osk*) mRNS transzportját a petesejt poszterior pólusára [94].

A *Drosophila* petekamrákban a 10. stádiumot követően megvalósuló passzív transzport olyan sejtanyag áramlás, amely a dajkasejtek kortikális aktin hálózatának összehúzódása révén alakul ki. Passzív transzport alatt válogatás nélkül, a dajkasejtek szinte teljes citoplazma tartalma átpréselődik a gyűrűcsatornákon keresztül a petesejtbe. Ez a jelenség a fentebb említett dajkasejt dumping [95][96]. A dumping nagyon gyors és intenzív aktin-myosin-függő folyamat, megközelítőleg ötszörösére nő a citoplazma áramlás sebessége az aktív, szelektív transzport alatt tapasztalthoz képest. A fokozott plazmaanyag áramlást létrehozó kortikális aktin összehúzódás egyben nagy nyomást helyez a dajkasejtekre. A dajkasejtek aktin-függő mechanizmussal akadályozzák meg, hogy hatalmas sejtmagjaik a gyűrűcsatornákhoz nyomódjanak és meggátolják ezzel az anyagáramlást. Leggyakrabban, ha a dumping hibát szenved, az az aktin szerveződés nem megfelelő szerveződéséhez köthető, hátterében a kortikális aktin rendellenes kialakulása, valamint gyengűlő vagy akár szétszakadó plazmamembrán állhat. Ezek a hibák az anyagáramlás elakadásához vezethetnek. A dajkasejteknek tehát speciális aktinszervező mechanizmusokkal kell felkészülniük a peteérés normális lezajlásához.

1. 3. 3. Az aktin hálózat szerveződése a dajkasejtekben

A *Drosophila* ovárium csíravonal sejtjeiben három féle aktin-szerveződést írtak le: a gyűrűcsatorna aktin (Hu li tai shao ring canal specific proteint, hts-RC-t tartalmaz), a kortikális aktin háló és az aktin kábelek. Ahogy fentebb említettem, a gyűrűcsatorna egy aktinban gazdag membránképződmény, biztosítja a folyamatos és közvetlen kapcsolatot az ivarvonal sejtek között. Elektron mikroszkópos (EM) felvételeken egy elektro-denz régió figyelhető meg a gyűrű

külső szegélyének közelében (fehérjegazdag terület), valamint a belső szegélyénél F-aktin (filamentáris forma) található [97][98]. A follikuláris sejtek határán, valamint a dajkasejt – petesejt közötti membrán környéke gazdag F-aktinban minden fejlődési stádiumban, az aktin filamentumok párhuzamosan futnak a sejtek membránjával [99]. A 10. stádiumot megelőzően a petesejtben a citoplazmás aktin háló szabálytalan kötegeléssel rendeződik. A 10. stádium első felében (10 A stádium) az aktin háló átrendeződik és a kortex mentén egy vékony, de rendezett aktin hálózatot formál. Ez a dinamikus aktin átrendeződés két formin típusú fehérje, a Cappucino és a Spire közreműködésével valósul meg. Mintkét forminnak van MT-kötő aktivitása is [100][101], ebből következően ez az átszerveződés a MT hálózathoz is nagymértékben kötődik [100][101][102][103]. Jellegzetes az F-aktin átrendeződése a gyűrűcsatornák környékén a 6-10. stádiumban. Ekkor kosárra emlékeztető aktin filamentum-csoportosulás figyelhető meg, amely a dajkasejtek citoplazmájába hosszan benyúlik [99].

A 10. stádiumtól kialakuló, polarizált F-aktin filamentumokból felépülő, robosztus aktinkábelek a csírasejtekben megfigyelt aktin szerveződés fentebb említett harmadik típusa. A citoplazmatikus aktin kábelek kialakulása számos aktint szabályozó faktor jelenlétét igényli: többek között Enabled (Ena vagy Ena/VASP, the *Drosophila* homolog of VASP, vasodilator-stimulated phosphoprotein) [104], profilin [82], Fascin [105], Villin (*Drosophila quail*; [95] és Filamin [106].

A *Drosophila* oogenezis során a dajkasejtekben összeszerelődő aktin kábeleknek a funkciójuk elsősorban a dumping alatt a hatalmas, politén dajkasejtmagokat rögzítsék oly módon, hogy a sejthez tartozó minden gyűrűcsatornától távol tartsák azokat. Az aktin kábelek a plazmamembrán felől befele, a mag irányába nőnek. A plusz (+) végük a plazmamembránba nyomódik, apró invaginációkat, nyúlványszerű struktúrát kialakítva ezzel [107][81][82]. Habár nagyon korai kutatások alapján tudjuk, hogy fixált petefészek mintákban ezeket a kábeleket szegmentált képződményekként írták le [99][82], és bár megalkották a „tűzlétra” modellt a filamentumok növekedésére és rövidülésére [81], azonban legújabb immunfestési- és live imaging technológiára alapuló kutatások az aktin kábeleket filopódia-like struktúrákként határozzák meg [107]. A filopódium-szerű képződmények hasonlóak filopódiumokhoz, mikrovillusokhoz, sztereocíliákhoz [108]. A nyúlványokba futó aktin filamentumok aszimmetrikus polimerek, amelyek a pozitív végükön (barbed end) történő monomer-beépülések nyomán növekednek. Minden kábel, azon a ponton, ahol a membránnal találkozik (és kialakítja a filopódium-szerű struktúrát), kapcsolatban áll az ún. filopódium tip-komplex egyik tagjával, az Ena aktin citoszkeleton szabályozó fehérjével. Az Ena az aktin polimerizációt elősegíti a

kábelek pozitív, membránba nyomódó végein [104]. Az Ena önmagában is képes az aktin monomer (G)- és filamentáris (F) formájának kötésére C-terminális Ena/VASP homology 2 (EVH2) doménjén keresztül (Bachmann et al., 1999, Van Troys et al., 1996). Továbbá képes kötni az aktin monomer - profilin komplexet is, ezáltal elősegíti az aktin monomerek eljutását a pozitív véghez [111]. Az Ena képes homo-tetramerizálódni (szintén az EVH2 doménjén keresztül) és az aktin filamentumokat kábelekké kötegeli a filopodium-szerű nyúlványokban [112]. Az Ena prolinban gazdag centrális szekvenciájával más szabályozó fehérjékkel, scaffold proteinekkel, kinázokkal lép interakcióba, valamint a már említett profilinnel, illetve SH3 és WW domént tartalmazó egyéb fehérjékkel [113][114][115][116]. A profilin, amely önmagában önálló SH3 domén fehérjének minősül, prolin-gazdag régiókhoz kötődik [117]. A profilin G-aktint köt és biztosítja az monomereket az aktin filamentumok polimerizációjához [118]. Az aktin szabályozás további fehérjéi, a Capping proteinek (*cpa* és *cpb*) az Ena antagonistáiként funkcionálnak, G-aktinhoz kötődésük (cap-pelés vagy capping) megakadályozza további monomerek kapcsolódását a pozitív véghez, ún. capping aktivitással rendelkeznek (Wear & Cooper, 2004, Cooper & Sept, 2008).

Amint az aktin kábelek elérik a magmembránt, deformálják azt, feltételezhetően erőt fejtenek ki rá, és nem egyszerűen csak kitámasztják a magot [107]. Az azonban még nem teljesen tisztázott, hogy a dajkasejtekben kialakuló kábelek hogyan kapcsolódnak pontosan a magmembránhoz. Általános jelenség az aktin filamentumok kapcsolódása a LINC komplex-hez (LInker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton complex) [121], bár ez nem tűnik lényegesnek a kábelek funkciója tekintetében, annak ellenére, hogy a komplex egyik tagja, a KASH domén protein Msp-300 erősen feldúsul a kábelek és a külső magburok találkozásánál [107]. Más aktin-kötő fehérjék is előfordulnak a magmembrán környékén, ilyen a spectraplakin család fehérje, a Shot, illetve a Hts-RC fehérje, amelynek potenciálisan aktin-kötegelő és capping aktivitása is van, az aktin crosslinker filamin protein, a Cheerio [107], és végül az aktin kötegelést végző Fascin [122]. Meglepő módon a Fascin külső magmembrán lokalizációja Msp-300-függő [123]. Egyes kutatások arra irányulnak, hogy megfejtsék a magmembrán, pontosabban a nukleopórusok és az aktin citoszkeleton kapcsolatát. A Nup154 nucleoporin protein mutációja például zavart okoz a gyűrűcsatorna kialakulásában, a csatornák átjárhatatlanokká válnak [124], habár az aktin kábelek fejlődését nem zavarja.

Ahogy fentebb írtam, az aktin kábelek pozitív, azaz növekvő vége a plazmamembránba nyomódik, a hossz mégis befelé, a sejtmag felé növekszik. Ez különbözik általában véve a klasszikus filopódiumok esetében történő aktin filamentum növekedés irányától, és ez a

különleges polarizáltság feltételezhetően szigorúan szabályozott. Ez a szabályozás részben az adherens junction (sejt-sejt kapcsolódás) és E-cadherin-en (a *Drosophila shotgun, shg* gén kódolja) keresztül valósul meg. *shg* mutáns muslicában az aktin kábelek nem érik el a nukleuszt, sőt, párhuzamosan növekednek a plazmamembránnal. Ezekben a mutánsokban értelemszerűen a rendellenes aktin kábelek nem képesek pozícionálni és távol tartani a gyűrűcsatornáktól a dajkasejt magokat, így a citoplazma anyaga nem képes a petesejtbe átjutni [107]. A nem megfelelően lezajló dajkasejt dumping eredménye teljes vagy részleges sterilitás, valamint az ún. dumpless fenotípus, amely a vad típustól kisebb, kerekebb petét eredményez [82].

A Capping proteinek, valamint a velük antagonista működésű Ena funkciójának kiesése is erőteljesen dumpless fenotípust eredményez [125][126]. Gates és munkatársai immunhisztokémiat vizsgálataik nyomán készült képekkel demonstrálták az Ena pontozott, membrán közeli és aktin kábel pozitív végéhez asszociált lokalizációját dajkasejtekben. Vizsgálták az *ena* több alléljét is (*ena*^{23}, *ena*^{210}, *ena*^{46}) a dumpless fenotípus súlyosságának meghatározásakor, melyek közül az *ena*^{23} és az *ena*^{46} megközelítőleg azonos erősségűnek bizonyult. Az *ena*^{210} allél egy missense mutációt hordoz az N-terminális EVH1 doménben megakadályozva ezzel az Ena és egyes kötőpartnereinek (FP4 motif binding partners, Zyxin) az interakcióját [127]. Az *ena*^{23} csonkolja az EVH2 domént, eltávolítva a homotetramerizációért felelős szekvenciát, de meghagyja az Ena aktin-kötő képességét. Az *ena*^{46} szintén az EVH2 domént érinti, annak kezdeti szakaszánál csonkolja a fehérjét, és habár kis mennyiségben, de kimutatható a csonkolt fehérje jelenléte, az allél pedig tulajdonképpen *null* allélként viselkedik [128]. Gates és munkatársai kimerítően járták körül az Ena diszfunkcionális alléjeinek hatását a *Drosophila* oogenezisben. A dumpless fenotípus sejtszintű hátterét, a rendellenes aktin-szerveződést és a részleges- vagy teljes plazmamembrán hiányt is demonstrálták phalloidin festés és DE-Cadherin (membránfehérje) ellenanyagos festésével. A plazmamembránok felbomlásával Ena funkció-kiesés esetében fúzionálnak a dajkasejtek, valamint az aktin filamentumok kialakulása és kábelekké szerveződése késve, a 10. stádium után kezdődik csak el, ellentétben a vad típussal. A dajka sejtek fúziójának eredményeként több sejtmagot tartalmazó sejtek (multi-nucleated nurse cell) keletkeznek. Továbbá megmutatták egy nagyon szép és jellegzetes példáját annak, hogy mi történik a gyűrűcsatornákkal abban az esetben, ha a kapcsolódó plazmamembrán felbomlik: a szabad gyűrűcsatornák a citoplazmába kerülnek, esetleg több „elúszó” gyűrűcsatorna aggregátumot képez a citoplazmában.

Más aktin citoszkeletont szabályozó faktor hiánya vagy mutáns allélja is hibás dumping-ot eredményez. Egyik ilyen faktor a *chickadee* (*chic*, a profilin fehérjét kódoló gén), melynek

több mutáns allélje is létezik (*chic*^{221}, *chic*^{1320}, stb), ezek közül több erősebb alléljét is vizsgálták, melyek kombinációban, transzheterozigótaként életképes egyedeket, de nőstény-steril fenotípust okoznak [82]. Irodalomból ismert, hogy a *chic* hiánya tönkre teszi a kortikális aktin hálózatot, phalloidin-re pozitív (F-aktin tartalmú) sub-kortikális aktin aggregátumokat eredményez és az aktin kábelek szerveződését is megzavarja [129][130][82]. A *Drosophila* ováriumban a kortikális aktin hálózat helytelen kialakulását phalloidin festéssel szintén lehetséges detektálni. Ebben az esetben a Phalloidin festés egy másik prominens fenotípusra világított rá, mégpedig a kortikális aktin hálózat hiányával együtt a dajkasejtek között határoló membránok is sérülnek, egyes esetekben teljesen hiányoznak, dajkasejt összeolvadást és multinukleált dajkasejteket (multinucleated nurse cell, MNNC) eredményezve [130]. Az aktin kábelek diszfunkciója miatt hiányzó membránok, illetve a rendellenesen fejlődött kortikális aktin hálózat gátolja a megfelelő anyagtranszportot a dumping alatt, amely eredményeként születnek meg a jobbára steril, dumpless peték [131][126].

1. 3. 4. A határsejtek aktin szerveződése

A határsejtek (border cell) genetikailag hatékonyan manipulálható modellrendszert jelentenek a kollektív sejtvándorlás tanulmányozását végző kutatóknak [132]. Ezek a vándorló sejtek, ahogy fentebb említettem, szorosan egymás mellé, csoportba rendeződnek a follikuláris sejtek rétegében, és a 9. stádiumban elindulnak a petekamra anterior végéből és a 10. stádiumra elérik a petesejt anterior határvonalát. Több fontos feladatot is ellátnak, egyrészt magukkal viszik (a klaszter közepébe „csomagolt”) passzív anterior poláris sejteket, másrészt kialakítják a mikropílust, amely a hímivarsejt belépési helye az érett petén. Ebből az következik, hogy ha a határsejtek nem érik el a végső pozíciójukat, tehát a vándorlás folyamata nem teljes, a pete megtermékenyíthetetlen lesz. Ahhoz, hogy migráló sejtként működjenek, nyúlványokat kell növeszteniük, melyekkel a dajkasejtek között képesek a cél felé haladni. A nyúlványnövekedéshez gyors aktin citoszkeleton átrendeződésre van szükség, melynek a határsejtek esetében több jelátviteli útvonal is a szabályozója (Hippo, JNK, JAK/STAT) [133][134][135][136]. Ismert, hogy az aktin szabályozó faktorainak hiánya vagy funkcióinak zavara (gyakran jelátviteli utakon keresztül) megváltoztatja a nyúlványnövekedést, ezáltal pedig megzavarja vándorlást. Ismert, hogy az Ena funkciójának kiesése gátolja az F-aktin kialakulást, míg az Ena túltermelése (overexpressziója) fokozott F-aktin polimerizációt eredményez [125]. Ezekkel a funkciókkal párhuzamosan az Ena hiánya gátolja a határsejtek nyúlványnövekedését, míg túltermelése „kontrollálatlan” filopódium-képződéshez vezet [125]. A nyúlványnövekedés

gátlása, vagy a túlzott nyúlványnövekedés hasonló eredménnyel jár: a határsejtek vándorlása befejezetlenné válik, így a nőstények termékenysége jelentősen romolhat.

2. Célkitűzés

1. Az *atg9 null* mutáns *Drosophila* törzs létrehozása *(Jipa András segítségével, SZBK, Genetikai Intézet)*.
2. Az *atg9 null* mutáció igazolása genetikai és molekuláris biológiai módszerekkel *(közös eredmények Jipa Andrással)*.
3. Az *atg9* mutáns autofágiával kapcsolatos és általános fenotípusváltozásának vizsgálata *(Jipa András nyomán)*.*Atg9* szerepének vizsgálata a kifejlett egyedek petefészkében.
4. Az *Atg9* szerepének vizsgálata az aktin citoszkeleton szerveződésében (*közös eredmények Szikora Szilárddal, SZBK Genetikai Intézet*).
5. Az Atg9 és az aktin-szerveződést szabályozó Ena és profilin fehérjék interakcióinak vizsgálatai *(közös eredmények, közreműködött: Dr. Varga Kata, Dr. Simon-Vecsei Zsófia, Dr. Maruzs Tamás, SZBK, Genetikai Intézet; ELTE, TTK, Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék)*.

3. Anyagok és módszerek

3. 1. A muslica fenntartása és a felhasznált törzsek

A felhasznált muslica törzsek és keresztezések standard kukorica-alapú és élesztő tartalmú agar táptalajon voltak tartva. A kísérletekhez 3-5 napos jól táplált (kísérlet előtt 24 h extra élesztős etetés) nőstényeket használtunk föl, kivéve, ha a protokoll másként rendelte. Az alábbi muslica törzseket használtuk föl kísérleteinkhez: *Atg9*^{B5}, *Atg9*^{B5}; Atg9-3xHA, *Atg9*^{B5}; *Atg9*-3xmCherry, Df(2R)ED2487, slbo-Lifeact-GFP, *ena*^{23}, *chic*^{221}, nos-Gal4, tub-Gal4 (Bloomington Stock Center), tub-GFP-p62, saját genomikus promóterrel rendelkező 3xmCherry-Atg8a, Atg5^{5CC5} and previously described stocks for generation of mosaic animals [137]. A dupla-mutáns vonalakataz *Atg9*^{B5} allélt a *chic*^{221} vagy *ena*^{23} alléleket felhasználva klasszikus rekombinációs technika segítségével hoztuk létre.

3. 2. Az *Atg9*-3xHA és az *Atg9*-3xmCherry konstrukciók elkészítése

Az elsődlegesen menekítésre szánt *Atg9*-3xHA és -3xmCherry konstrukciók az *Atg9* saját genomikus promóterét tartalmazzák. Az *Atg9*-3xHA transzgén elkészítéséhez vad típusú muslicából származó genomi DNS preparátumot használtunk, melyből PCR segítségével fölamplifikáltunk egy 3153 bp hosszúságú DNS szakaszt, amely teljes egészében tartalmazta az *Atg9* genomikus régióját saját promóterével együtt. A PCR-hez használt oligonukleotid primerek, melyek a további munkához alkalmas restrikciós hasítóhelyeket is tartalmazták az alábbiak voltak:

5’ – CCTCACTCGACATACCGCCGTCCGCGCGGCGCCGGCG -3’ és

5’- GCGGCCGCATGGCGCGCCTGAGCGGATGCTACCCAAAAGC- 3’.

A primerek által az *Atg9* szekvenciájához hozzáadott restrikciós hasítóhelyeket (AscI hasítóhely) fölhasználva pGen-3xHA vektor Multi Cloning Site (MCS) régiójába építettük be a PCR-rel apmlifikált szakaszt (AscI fragmentum). Eredményként 3xHA címkével (tag-gel) összeépített *Atg9*-et tartalmazó plazmidot kaptunk (*Atg9*-3xHA) [138]. Az elkészült *Atg9*-3xHA kontrukcióból kiemelt AscI kazettát beépítettük a 3xmCherry címkét tartalmazó vektorunkban (gen-3xmCherry) [139], létzerhozva a gen-*Atg9*-3xmCherry konstukciót. A transzgénikus muslica törzseket a konstrukciók beinjektálásával a BestGene cég állította elő.

3. 3. Ellenanyagok

Az elsődleges ellenanyagok, melyeket kísérleteinkhez fölhasználtunk a következők voltak: patkány anti-Atg9 (WB 1:300) [139], patkány anti-HA (IF 1:150, WB 1:1,500, Roche, 11867431001), egér anti-tubulin (1:2,000, DSHB, AA12.1), egér anti-Ena (IF/WB 1:40, DSHB, 5G2), egér anti-profilin (IF 1:10, DSHB, chi1J), patkány anti-DE-cadherin (IF 1:10, DSHB, DCAD2) patkány anti-aktin (WB 1:5,000, Babraham Technix, BT-GB-237P), egér anti-Flag M5 (WB 1:1,000, Sigma, F4042), egér anti-Fasciclin II ellenanyag (1:500, DSHB, 1D4). A következő másodlagos ellenanyagokat használtunk: kecske anti-egér Alexa Fluor 488 (A-11001), kecske anti-egér Alexa Fluor 546 (A-11003), kecske anti-egér Alexa Fluor 660 (A-21055), kecske anti-patkány Alexa Fluor 488 (A-11008), kecske anti-nyúl Alexa Fluor 546 (A-11010), kecske anti-nyúl Alexa Fluor 660 (A-21074), kecske anti-patkány Alexa Fluor 488 (A-11006), kecske anti-patkány Alexa Fluor 546 (A-11081) (Invitrogen termékek) és biotinilált kecske anti-egér ellenanyag (1:500, Jackson, 115-065-003). A ko-immunprecipitációs teszthez monoklonális egér anti-HA konjugált agaróz gyöngyöket (Sigma, A2095) és egér monoklonális anti-FLAG (M2) konjugált mágneses gyöngyöket (Magnetic Beads, Sigma, M8823) használtunk. (IF=immunfluoreszcens festéshez használt hígítási arány, WB=western blothoz használt hígítási arány)

3. 4. Az *Atg9*^{B5} mutáns létrehozása

Az *Atg9*^{B5} mutáns allélt CRISPR/Cas9-közvetített genom-szerkesztéssel hoztuk létre dupla guide RNS-ek (gRNS) használatával egy korábbi munkában már közölt módon [16]. A gRNS-ek szekvenciái pCFD4 vektorba [140] klónoztuk Gibson Assembly Master Mix (New England Biolabs) segítségével. Az oligonukleotidok szekvenciái BbsI restrikciós endonukleáz hasítóhelyet tartalmaztak:

Atg9_1 forward:5’TATATAGGAAAGATATCCGGGTGAACTTCGTGAGGTAATCACGGTATGGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG -3’

Atg9_2 reverse:5’ATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACCATATCAACTACCGCTCCCTCGACGTTAAATTGAAAATAGGTC-3’

A mutagenezis lépéseit követően (injektálás, szelekció) a feltételezhetően *Atg9* mutációt hordozó, életképes jelölteket Df(2R)ED2487 deficienciát (nagyméretű deléció, amely az *Atg9* gént is érinti) hordozó legyekkel kereszteztük párkeresztezésben (1 jelölt hím x 3-5

Df(2R)ED2487 nősény). Az utódok közül a feltételezett hemizigótákat (*Atg9* mutációt és Df(2R)ED2487-et egyszerre hordozó egyedek) vizsgáltuk. Western blottal ellenőriztük, hogy a jelöltekben halmozódik-e a szelektív autofágia adaptor fehérje, a Ref(2)P/p62, valamint PCR segítségével *Atg9*-re specifikus primerekkel ellenőriztük az esetleges deléciókat (kisebb méretű termék jelenléte), végül a jelölteket DNS szekvenciameghatározással is igazoltuk. Az $Atg9^{B5}$ allél egy 2464 bp méretű deléciót hordoz a második kromoszóma jobb karján, kiejtve az *Atg9* genomikus szakaszának jelentős részét.

$Atg9^{B5}$ MARCM szomatikus mutáns klónokat generáltunk hősokk indukcióval,. A klóngenerálás első lépése, hogy az $Atg9^{B5}$ mutációt egy FRT42B rekombinációs helyet tartalmazó kromoszómára helyeztük, majd ezeket a legyeket kereszteztük hsFlp; QUAS-Tomato FRT42B; ET49-QF, tub-QS vagy hsFlp; QUAS-mCD8-GFP FRT42B; ET49-QF, tub-QS vonalakkal. Az utódok (2-4 órás embriókat) 37°C-os vizes fürdőben hősokkoltuk egy órán keresztül. A lárvákat standard 25°C-on tartottuk 3 napig, majd 20% szukróz oldatban 3 órán keresztül éheztettük őket boncolás előtt, majd az *Atg9* mutáns klónokat tartalmazó lárvák zsírtestjeit vizsgáltuk.

Az *Atg9* mutáns ivarvonal klónokat hordozó nőstények létrehozásához a hsFlp; QUAS-mCD8-GFP FRT42B/CyO genotípusú hímeket, és az ivavonal-specifikusan működő ovoD1 FRT40A/CyO nőstényeket összekereszteztük Erica M. Selva and Beth E. Stronach által közölt protokoll mintájára [141]. A harmadik stádiumos vándorló lárva állapotú utódokat hősokkoltuk (37°C, 1 óra), kikelésük után egyenes szárnyú (nem CyO) QUAS-mCD8-GFP FRT42B/ovoD1 FRT40 genotípusú szűz nőstényeket gyűjtöttünk. A nőstényeket vad típusú (w^{1118}) hímekkel kereszteztük, majd 3-5 naposan kiboncoltuk a petefészkeiket. Az mCD8-GFP (zöld fluoreszcens fehérje) elvesztése jelezte azokat a petekezdeményeket, amelyekből a hősokk hatására egyidejűleg az *Atg9* is kivágódott. A GFP-t termelő ivarvonal sejtek kontroll, *Atg9*-re nézve vad típusú sejtek voltak.

3. 5. Az ecetmuslicák kezelése

3. 5. 1. Élethossz teszt

Genotípusonként 30 frissen kelt hímeket használtunk, melyeket vízszintesen tartott csövekbe helyeztünk (a legyek táptalajba történő beleragadásának elkerülése végett), majd naponta új táptalajra raktuk őket és számoltuk az elhullást. A teszt minden genotípusnál addig tartott, amíg az utolsó muslica elpustult. Genotípusonként három párhuzamos tesztet végeztünk. Az adatokat grafikonon összegeztük.

3. 5. 2. Mászás teszt

Kiválasztottunk 10-10 azonos életkorú, fiatal egyedet a választott genitípusú egyedek közül, melyeket genotípusonként 250 ml-es mérőhengerekbe tettünk. A fiolák tetejét parafilmmel fedtük le, ami átereszti a fényt. Fölülről megvilágítottuk a fiolákat, mellyel a muslicákat a fény irányába történő mászásra ösztönöztük. A fiolák aljára „ráztuk le" a muslicákat, majd 5 percen keresztül figyeltük a mászási képességeiket, melyet kamerafelvételek segítségével elemeztünk. Minden genotípus esetében háromszor ismételtük meg a tesztet. Adataink közül a muslicák sebességét tüntettük föl grafikonon, azaz, hogy másodpercenként millimétermen mérve mekkora távolságot képesek megtenni (mm/s).

3. 5. 3. Paraquat kezelés

Paraquat kezeléshez 30 mM paraquat oldatot használtunk a hímek tápjába keverve, majd naponta kétszer, reggel és este friss, paraquat-tartalmú táptalajra tettük a muslicákat, és számoltuk az elhullást, illetve az élő állatokat.

3. 5. 4. Fertőzésteszt

A fertőzésteszthez *Pseudomonas aeruginosa* PA14-es törzsét használtuk, melyet LuriaBertani (LB) folyékony táptalajon tenyésztettünk 5% szacharóz hozzáadásával 37°C-on. A fertőzési eljárást egy korábbi publikáció alapján alakítottuk ki [142]. A kísérlethez egyenlő számban használtunk föl nőstényt és hímet egyaránt. A fertőzéshez egy napos felnőtt muslicákat használtunk, melyeket a tesztet megelőzően 3 órán át éheztettünk. Ezt követően a muslicákat olyan fiolába helyeztük, amelyben egy 2,5×3,5 cm területű, 900 µl PA14-el fertőzött LB oldatottal átitatott Whatman pappír volt a táptalaj felszínére fektetve. A baktériumos táptalajt hetente kétszer cseréltük, míg a halott ecetmuslicákat naponta megszámoltuk, tíz napon át. Az adatokat Kaplan–Meier túlélési teszttel elemeztük.

3. 6. Ko-immunprecipitáció és Western blot

Western blot kísérleteinkhez felnőtt legyekből készített teljes fehérje lizátumot használtunk [143]. 1xLaemmli mintafuffer:PBS (1:1) oldatban 5 percig forraltuk a muslicákat, majd homogenizáló pálcával szabadítottuk ki a test sejtjeinek tartalmát. Ez után 5 percig ismét forraltuk, majd 5 percig 13000 rpm fordulaton cetrifugáltuk a mintákat. A fehérjéket tartalmazó felülúszót áthelyeztük üres csövekbe. A mintákból azonos térfogatokat vittünk fel denaturáló poliakrilamid gélre (SDS-PAGE), majd speciális oldatot, desztillált vízben oldott 25 mM Tris base, 200 mM Glycine, 0,05% SDS (nátrium dodecil-szulfát) puffert, azaz futtató puffert

használtunk a gélelektroforézishez. A gélről Immobilon-P PVDF membránra (Millipore) transzferáltuk a fehérjéket transzfer puffer közegben (25 mM Tris base, 200 mM Glycine, 10% metanol). A membránokat szobahőmérsékleten 2 órán keresztül blokkoló pufferben [TBST puffer 25 mM Tris base pH 7,5-re állítva HCl-el, 0,9% NaCl, 0,1% Tween 20) + 5% zsírszegény tejpor] inkubáltuk.Tris . Az ellenanyagokat a megfelelő hígításban, blokkoló puffer:TBST 1:1 arányú oldatában használtuk. Az elsődleges ellenanyagokat egy éjszakán át, 4°C-on, a másodlagos ellenanyagokat szobahőmérsékleten 1 órán keresztül alkalmaztuk, köztük 3x 10 perc mosási lépések következtek 1x TBST pufferben. A membránt ún. előhívó folyadékkal kezeltük, amely100 mM Tris base, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl2, 0,05% Tween 20 (pH 9,5), és 1:50 hígított NBT-BCIP-ből áll (nitro blue tetrazolium chloride és 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate; törzsoldat: Sigma, 72091). Ko-immunprecipitációs teszteket kétféle affinitás mátrixszal végeztük, anti-HA-konjugált agaróz és anti-Flagmágneses agazóz gyöngyökkel (Sigma-Aldrich, A2095) (Lőrincz et al., 2016a).

3. 7. Élesztő kettős-hibrid renszer (Y2H)

Az *Atg9* CTD1 (1-351 bp), CTD2 (580-1002 bp) és CTD4 (1618-2538 bp) citoszólikus domének kódoló DNS szekvenciákat a már korábban leírt *Atg9*-3xHA-t tartalmazó vektorból nyertük. A *chic* szekvenciáját az EST LD15851 (DGRC) klónból, az Actin 5C szekvenciája az EST RE02927 (DGRC) klónból, az Ena/VASP szekvenciája pedig az LD23655 (DGRC) klónból származik. A szekvenciákat PCR segítségével amplifikáltuk a megfelelő primerek használatával. Az *Atg9* citoszólikus doménjeit pGADT7 vektorba, az Actin 5C, a *chic* és az *ena* kódoló szekvenciáit pGBKT7 vektorba klónoztuk, a vektorokkal pedig az AH190 kompetens élesztő sejteket transzformáltuk. Szintetikus (Synthetic Defined (SD)) tápoldatotot használtunk az élesztő sejtek növesztéséhez, amelybe megfelelő aminosavakat, triptofánt (W), leucint (L), hisztidint (H) és alanint (A) adtunk. Ahhoz, hogy elrontsuk a profilin prolin-gazdag régiókhoz való kötődését, a harmadik triptofánját (W3) kódoló szekvenciát alanint kódoló szekvenciára cseréltük PCR mutagenezis segítségével az alábbi oligonukleotid primerek felhasználásával:

forward: 5’ - ATATGAATTCATGAGCGCGCAAGATTATGTGGACAACCAACTC – 3’;

reverse: 5’ – ATATGTCGACACTAGTACCCGCAAGTAATCAGATAATCTCC – 3’.

A PCR terméket pGBKT7 vektorba klónoztuk. A kísérletek teljeskörű elvégzése végett az *Ena/VASP* kódoló szekvenciáját pGADT7 vektorba is beklónoztuk. Az eredmények részben külön jelöltem ennek a vektornak a haszánálatát. A szelekciókhoz használt táptalajból

triptofánon és leucinen kívül hisztidin és/vagy alanin aminosavak is hiányoztak (-WLA, -WLH, vagy -WLHA).

3. 8. GST kötési teszt

GST-profilin rekombináns fehérje termeléséhez megfelelő rekombináns plazmid létrehozásához a profilint kódoló *chic* gén CDS szekvenciáját pETARA vektorba klónoztuk. Kontrollként GST rekombináns fehérjét termeltettük meg baktériumokban, majd tisztítottuk a affinitás mátrixon. A GST-profilint és a GST-t külön immobilizáltuk Glutathione Sepharose gyöngyökhöz (GE Life Sciences, 17075604), 5% BSA oldatban blokkoltuk a gyöngyök felszínét, majd a mátrixot *Atg9*-3xHA fehérjét expresszáló 3-5 napos nőstény legyekből készült teljes fehérje-extraktummal inkubáltuk. Végül a gyöngyökről eluált fehérje mintákat Western blot-tal ellenőriztük anti-HA ellenanyagot használva.

3. 9. Plazmidok készítése az S2R+ *Drosophila* sejtek transzfektálásához, a kolokalizációs tesztekhez

In vitro DNS rekombinációs technikát alkalmazva az alábbi öt különböző pUAS plazmidot készítettük el: pUASp-GFP-*Atg9*, pUASp-GFP-CTD4, pUASp-GFP-KASH, a pUASp-GFP-*Atg9*-KASH és a pUASp-GFP-CTD4-KASH, valamint a pUASp-GFP-CTD1 és a pUASp-GFP-CTD1-KASH.

3. 10. S2R+ sejtek fenntartása és transzfekciója

Az S2R+ *Drosophila* sejt vonalat (*Drosophila* Genomics Resource Center) 25°C-on Schneider's *Drosophila* médiumban (Lonza) növesztettük, melyet 10% magzati szarvasmarha szérummal (Fetal Bovine Serum, Biowest) és 1% antibiotikum koktéllal (Penicillin-Streptomycin, Lonza) egészítettünk ki. Az előző fejezetben részletezett vektorok és egy segítő (helper) MT-Gal4-et (metallothionein-Gal4) tartalmazó vector (plusz Effectene - Qiagen) transzfekcióját követő második napon 1.8x105 sejt/lyuk (24-lyukú lemezen) sejtsűrűségnél a sejteket 24 órán keresztül 1 mM $CuSO_4$ oldattal kiegészített tápoldatban inkubáltuk, ezáltal indukáltuk a GFP-fúzionált fehérjék expresszióját.

3. 11. Primer embrionális neuron sejtkultúra készítése és immunhisztokémiai festése

Dechorionizált ~16 órás embriókat homogenizáló pálcákkal Schneider's tápoldatban 20%-os hőinaktivált FBS-sel, 2 µg/mL inzulinnal és penicillin-streptomycin antibiotikum koktéllal (Lonza) kiegészítve feltártuk. A szétzúzott embriótörmelékekkel teli, homogenizált oldatot szobahőn 4 percig centrifúgáltuk (380x*g*). Az élő sejteket tartalmazó csapadékot felszuszpendáltuk friss médiumban, majd a sejtszuszpenziót cseppenként üveg fedőlemezekre osztottuk szét és ún. függőcseppes technikával, nedves kamrában 27°C-on inkubáltuk, növesztettük őket. A neuron sejt kultúrát 6 óra inkubációt követően fixáltuk: első lépésben 1 perce citoszkeleton pufferben (citoszkeleton puffer, CP: 10 mM PIPES, pH 7, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 5 mM glükóz and 5 mM MgCl2) inkubáltuk 0.3% (v/v)-os glutaraldehyde-del és 0.25% (v/v)-os Triton X-100-zal kiegészítve. Az ún. utó-fixálási lépésben 15 percen keresztül 2% (v/v) glutáraldehid tartalmú CP-ben inkubáltuk a mintákat (Xu et al., 2012). A mintákat gyorsan, egymás után 2-3x CP-vel mostuk, majd blokkoló pufferben (5% w/v goat szérum, 0.2% v/v Triton X-100 CP-ben) 30 percen keresztül permeabilizáltuk és blokkoltuk. A mintákat ellenanyagokkal immunfestettük, majd ProLong Gold anti-fade mounting oldat (Life technologies, P36930) felhasználásával előkészítettük konfokális mikroszkópiára.

3. 12. Az embrionális központi idegrendszer és az adult petefészkek immunhisztokémiai festése

Az embriók ventrális idegkötegének (ventral nerve cord, VNC) előkészítésének módja immunfestésre egy korábbi munkában részletesen megtalálható [116]. Röviden, 16-17. stádiumú, fixált embriókat anti-Fasciclin II ellenanyaggal inkubáltuk, majd biotinilált anti-egér ellenanyaggal kezeltük, mely ellenanyagot DAB-bal (3,3′-Diaminobenzidine Liquid Substrate System, Sigma) követtük. A mintákat Vectastain ABC-be (Vector Laboratories, SK-6604) ágyaztuk, majd fedőlemezzel lefedtük, végül láthatófénynél, mikroszkóp segítségével fotóztuk.

A muslica ováriumokat 1xPBS-ben preparáltuk, majd 20 percig fixáltuk PBS-ben 4%-ra hígított paraformaldehid oldatban, szobahőmérsékleten. A fixálást követően, PBT-ben (PBS-ben 0,5% Triton X-100) mostuk a mintákat 3x10 percig. A mosás után a mintákat szobahőn egy órán át blokkoltuk 1% BSA+5% FCS-t tartalmazó PBT-ben (PBTN). A mintákat éjszakán keresztül 4°C-on inkubáltuk az elsődleges ellenanyagokkal (csövenként 200 µl PBTN-ben, elsődleges ellenanyag a megfelelő hígításban). A következő napon a mintákat 3x10 percig mostuk PBT-ben szobahőmérsékleten, majd fluoreszcensen jelölt másodlagos ellenanyago(ka)t 1:200-hoz hígításban (szükség esetén a phalloidint 1:40-hez) tartalmazó PBTN-ben inkubáltuk szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül. A másodlagos ellenanyagos inkubációnál figyeltünk arra,

hogy minták végig sötétben legyenek. Az inkubációt követően közvetlenük 1:2500 DAPI (Invitrogen, D1306) tartalmú PBS-ben 15 percig tároltuk a mintákat, majd 3x10 perces mosás következett PBT-ben, szobahőmérsékleten, sötétben tartava a mintákat. F-aktin festéséhez fluoreszcensen jelölt phalloidint használtunk: Alexa Fluor 488 Phalloidin (Invitrogen, A12379) Alexa Fluor 546 Phalloidin (Invitrogen, A22283). A mintákat az utolsó mosást követően 30 µl Vectashield Antifade Mounting Medium-ban (VECTOR Laboratories, H-1000) tárgylemezre vittük föl, majd 24x24 mm fedőlemezzel fedtük be és a fedőlemezt légmentesen lezártuk lakkal.

A kolokalizációs vizsgálatokhoz a vándorló (L3 stadium) lárvák nyálmirigyét preparáltuk jéghideg PBS-ben, majd azonnal 4% formaldehid-PBS-ben fixáltuk a szöveteket 30 percen keresztül, lassan mozgatva, billegtetve az edényt. PBT-ben történő (3x20 perces) mosást követően PBTN-ben blokkoltuk 1 órán keresztül, majd anti-FLAG elsődleges ellenanyagot (1:200) tartalmazó PBTN-ben inkubáltuk a mintákat 4°C-on, éjszakán át. Következő napon, az elsődleges ellenanyag kimosását követően a másodlagos ellenanyaggal szobahőn 1 órán keresztül inkubáltuk a mintákat. A fixálási (permeabilizálás), a mosási és blokkolási folyamatokat szobahőmérsékleten végeztük, a standard protokoll szerint. A mintákat az utolsó mosást követően ~30 µl Vectashield Antifade Mounting Medium cseppben tárgylemezre vittük, majd a megfelelő preparálást után 24x24 mm fedőlemezzel fedtük le, majd a fedőlemezt légmentesen lezártuk lakkal.

3. 13. Konfokális mikroszkópia

Az S2 sejtek kerek üveg fedőlemezre nőttek rá, amelyen megtörtént a fixálás és az immunfestés is. A rögzítés Fluoromount G-vel (Thermo Fisher Scientific, 00-4958-02) történt. A képeket Leica TCS SP5 konfokális mikroszkóppal készítettük a mikroszkóp 63.0x1.40 olajos objektívjével.

A primer embrionális neuronok és a citoplazmás áramlás felvételeihez Olympus Fluoview FV1000 mikroszkópot használtunk.

A Lysotracker festéshez, *Drosophila* lárvális zsírtestet boncoltunk 4 órás éheztetést követően, 100 µM Lysotracker Red-et (Invitrogen, L7528) tartalmazó PBS oldatban inkubáltuk, majd 5 perces DAPI:PBS (1:2500) inkubáció következett. A mintákat PBS:Glicein (1:1) keverékbe ágyaztuk és azonal a mikroszkóppal vizsgáltuk.

A kisebb nagyításokat zsírtest, embrionális ventrális idegkötegek és petekamrák esetében Zeiss AxioImager M2 mikroszkóppal készítettük, amelyhez tartotik egy ApoTome 2 grid confocal module kiegészítés, valamint egy ORCA-Flash4.0 LT sCMOS kamera (Hamamatsu). A nagyobb nagyítású képek elkészítéséhez Leica SP5 mikroszkópot, valamint Zeiss LSM800 mikroszkópot használtunk (aktin kábel hálózat a petekamrákban).

3. 14. CLEM: 3D Correlative Light- and Electron Microscopy

Az *Atg9*-3xmCherry pontos, az ultrastruktúra szintjén meghatározható lokalizációjának vizsgálatához 3 napos, jól táplált nőstények 10-15 db petefészkét preparáltuk, majd ágyaztuk be lowicryl gyantába az ún. nagy nyomású, 'freeze-substitution' technológiával [144]. A beágyazás megfelel a 3D Correlative Light and Electron Microscopy (CLEM) technikai követelményeinek. Ez a vizsgálat az EMBL (European Molecular Biology Laboratory) Electron Microscopy Core Facility laboratóriumában készült Heidelberg-ben, a Kukulsky és munkatársai által készített munkában részletezett metódus szerint [145].

3. 15. Statisztika

Minden kísérletet legalább egyszer megismételtünk és a kísérleteket legalább 9 különböző egyed/genotípus bevonásával értékeltük ki. Minden adatpontot minden esetben bevontunk a értékelésekbe. A primer embrionális neuronok vizsgálatában a sejtek random választottuk ki a mutáns- illetve kontroll neuron sejteket tartalmazó tárgylemezekről. Minden elkészült képen igyekeztünk egyedi sejteket fotózni, melyeknek teljes axon-, illetve filopódiumhálózata fókuszsíkba került. A fókuszsík megválasztásánál arra törekedtünk, hogy minden axon és filopodium teljes hosszúságában, élesen kirajzolódjon, ezáltal mérhető, számolható legyen. A határsejtek viszagálatakor a klaszter nagyobb, háromdimenziós kiterjedése és a nagy (8-12) sejtszám miatt több fókuszsíkot alkalmaztunk. A különböző genotípusok vizsgálatakor az eredmények validitását azonos beállítások használatával és a fotózott struktúrák véletlenszerű kiválasztásával biztosítottuk.

A számszerűsített adatok GraphPad Prism 5 vagy SPSS 21 (IBM) statisztikai programokkal kerültek kiértékelésre, hasonlóan korábbi munkákhoz [146][147]. Variancia analízist minden esetben az SPSS vagy GraphPad programokkal végeztük az adatkészletek összehasonlító analíziseit megelőzően. A variancia értéke megegyezett az összehasonlított csoportok között, kivéve abban az esetben, amikor U vagy Kruskal-Wallis tesztet használtunk. Kétoldalú, kétmintás 'unpaired' t tesztet használtunk két minta összehasonlításánál (26. c ábra,

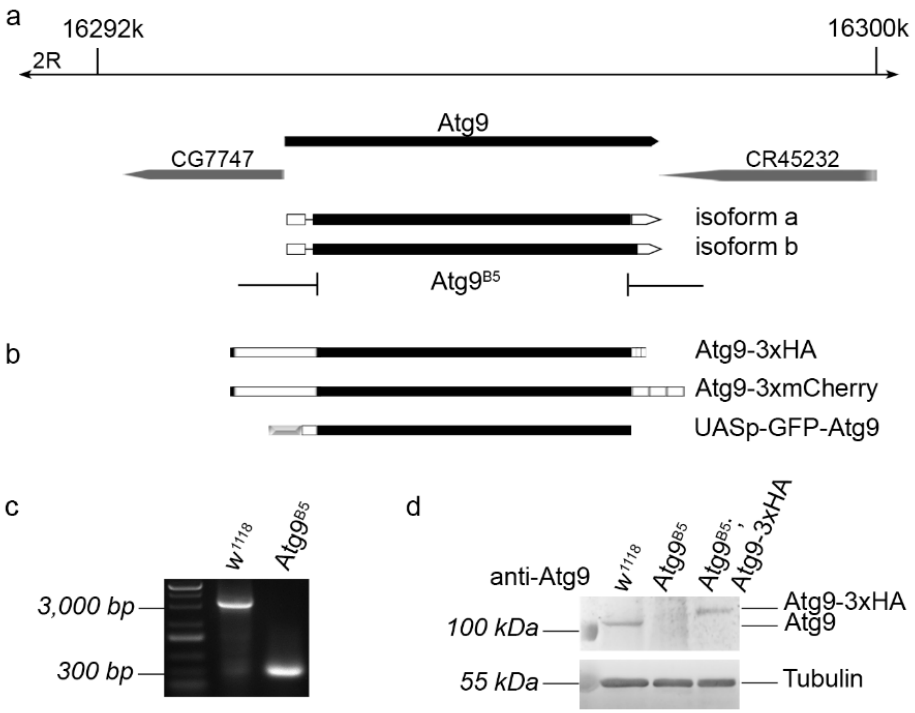
16. a ábra) és one-way ANOVA analízist Bonferroni korrekcióval kiegészítve a többszörös mintaszámok összehasonlításánál (7. c ábra) abban az esetben, ha az adatok normál eloszlást mutattak. Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk nem normál eloszlású adatok esetében, többszörös mintaszám összehasonlításakor (8. a ábra, 15. ábra). Egy esetben használtunk Mann-Whitney U tesztet, amikor két adathalmazt vetettünk össze, azonban az egyik adathalmaz nem normál eloszlású adatokat tartalmazott (16. b ábra). A dumpless peték gyakoriságának és határsejtek defektusainak statisztikai kiértékeléséhez Fisher's exact tesztet használtunk (8. b ábra, 21. ábra), hasonlóan más munkákhoz [148].

A hibavonalak az átlagos szórásokat jelölik (standard error of the mean, ±SEM) az oszlopdiagramokon. A box plot-okban (16. ábra), a kék és sárga jelek az adathalmaz azon részét jelölik, amelyek a felső és also kvartilisek közé esnek; a mediánt egy horizontális fekete vonal jelzi, az átlagot pedig a boxokban található 'x'. Pontos n számok és p értékek a képleírásokban található (azonban fontos tudni, hogy a Kruskal-Wallis teszt esetében az SPSS software nem adott pontos p értékeket, ha a p értéke 0.001-nél kisebb volt).

4. Eredmények

4. 1. Az *Atg9* autofágiával összefüggő vizsgálata *Drosophila*-ban

CRISPR/Cas9 technológia segítségével létrehoztunk számos, különböző méretű deléciót célzottan a *Drosophila* 2. kromoszómájának jobb karján (2R), az *Atg9* gént lefedő szakaszon belül. A mutagenezis során kisebb, illetve nagyobb szakaszokat távolítottunk el az *Atg9* gén kódoló szekvenciájából. A p62 fehérje szintjének megemelkedésére szelektálva, illetve a szekvenciameghatározást követően kiválasztottuk a B5 számmal jelölt legnagyobb deléciót (4. a ábra). Az $Atg9^{B5}$ allélt létrehozó deléció egy rövid, az Atg9 funkcióját betölteni nem képes peptidszakaszt eredményez, amelyben a fehérje N-terminálisának első öt aminosava megmarad. PCR-rel igazoltuk a 2464 bp nagyságú deléciót a második kromoszóma jobb karján (4. c ábra. Western blot analízis segítségével a teljes hosszúságú Atg9 fehérje hiányát is igazoltuk (4. d ábra,). További vizsgálatainkhoz két menekítő konstrukciót készítettünk, amelyek saját, genomi promótere által meghajtott *Atg9* transzgént tartalmaztak és C-terminálisan 3xHA (*Atg9*-3xHA) illetve 3xmCherry (*Atg9*-3xmCherry) címkékkel voltak ellátva (4. b ábra). Menekítő konstrukcióink segítségével létrehoztunk transzgenikus muslica vonalakat, melyek tanulmányozása által igazoltuk, hogy mindkét *Atg9* transzgén helyreállította az *Atg9* hiányában bekövetkező autofágia defektust. Az autofág folyamatok helyreállását a p62 szint normál szintre csökkenésével tudtunk igazolni (6. d ábra). A sikeres menekítési kísérletek bizonyították, hogy az általunk létrehozott $Atg9^{B5}$ allél az *Atg9* gén jelentős részének kiesését, és az *Atg9* ismert funkcióinak kiesését eredményezte, így kimondhattuk, hogy az $Atg9^{B5}$ egy *null* mutáció.

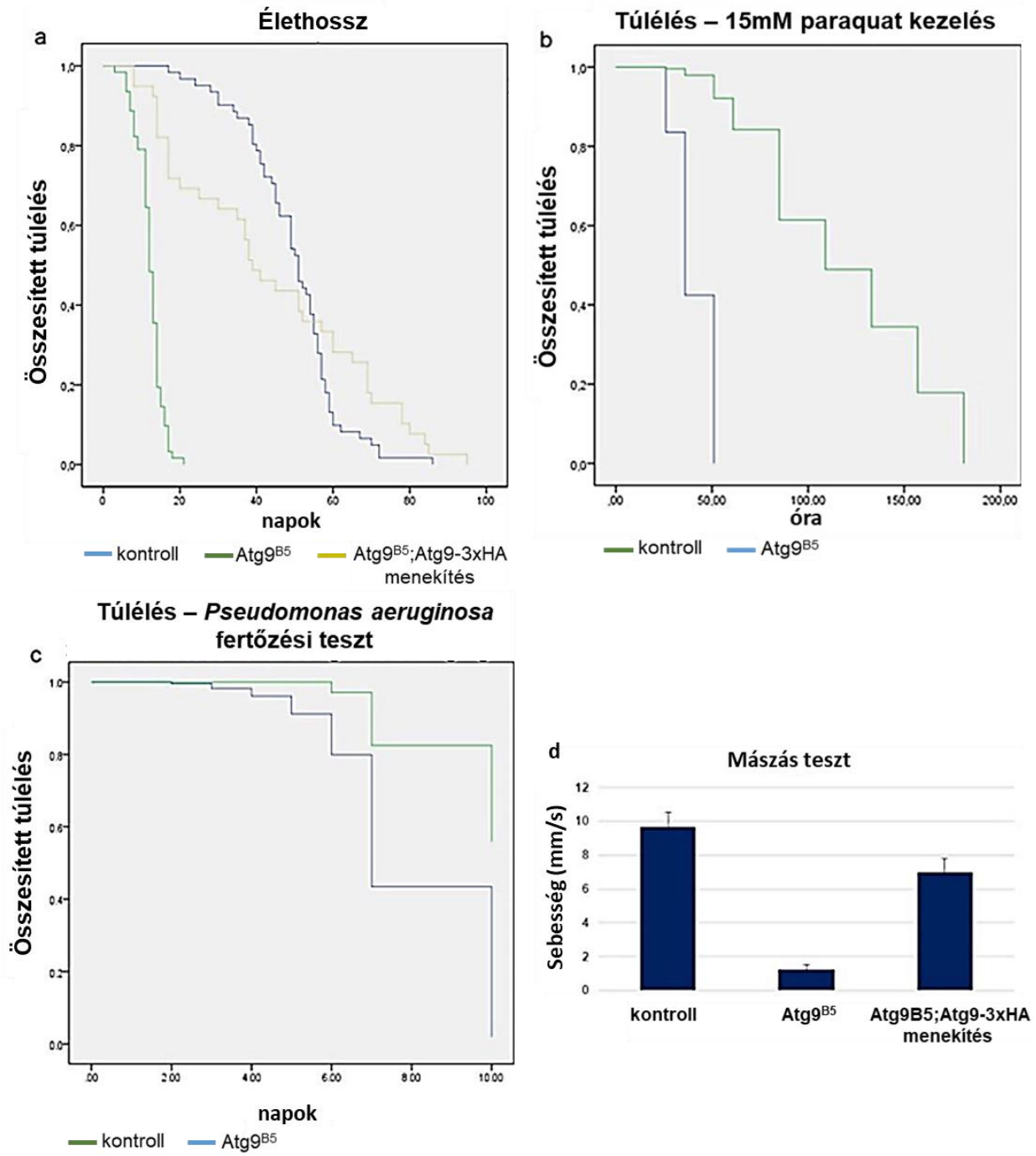


4. ábra. Az *Atg9 null* mutáns létrehozása és validálása. Az *Atg9*^{B5} allél generálása CRISPR/Cas9 alkalmazásával megközelítőleg a *Drosophila Atg9* teljes kódoló régióját eltávolította (a). Két *Atg9* transzgenikus vonalat készítettünk a C-terminálison fúzionált 3xHA vagy 3xmCherry címkékkel, az *Atg9* saját, genomikus promóterével hajtva (b), valamint készítettünk egy UASp-GFP-*Atg9* indukálható plazmidot *Drosophila* S2 sejtek transzfekciójához (b). Az Atg9 deléciót PCR-rel igazoltuk (c), az Atg9 fehérje hiányát pedig az általunk létrehozott α-Atg9 ellenanyagot használva Western blot segítségével (d).

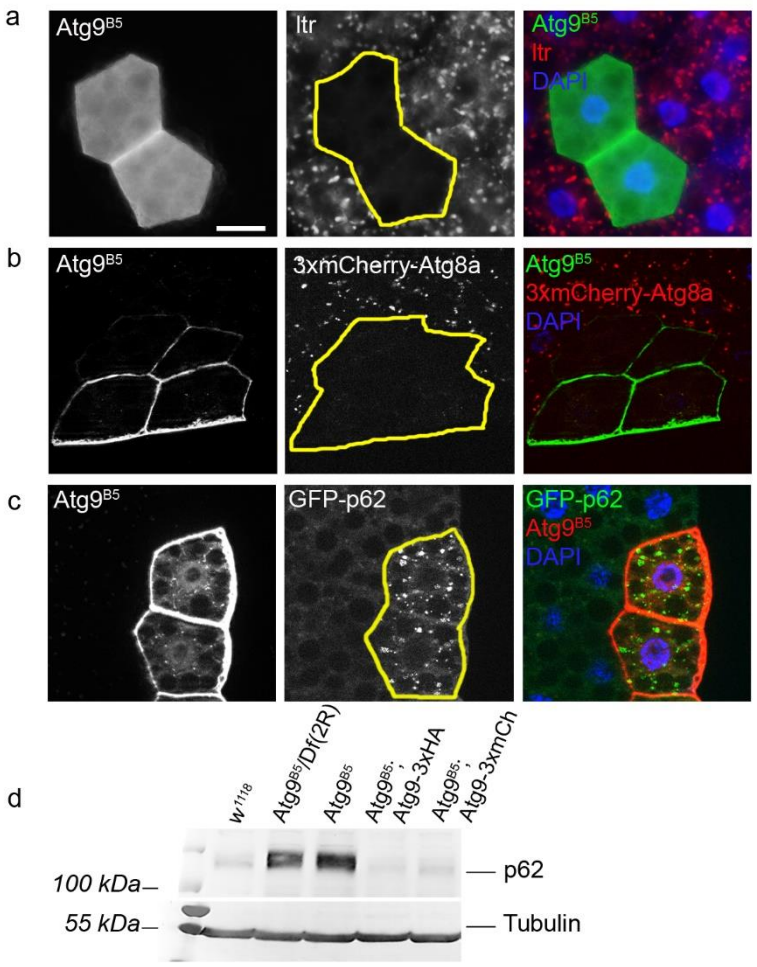
Fenotípus szempontjából a homozigóta *Atg9*^{B5} és a hemizigóta *Atg9*^{B5}/D(2R) adultak hasonlóságokat mutattak: habár morfológiailag egészségesnek tűntek, szemi-letálisak voltak, azaz csökkent a termékenységük (5. a ábra), oxidatív stresszre és fertőzésekre érzékenyebbeknek bizonyultak, mint a vad típusú vagy a menekített legyek (5. b, c ábra) és erősen romlottak a neuromuszkuláris funkcióik mászási tesztekben (5. d ábra). Ahhoz, hogy sejtek szintjén igazolhassuk, hogy az általunk létrehozott *Atg9*^{B5} allél zavart okoz az autofágia folyamatában, további módszereket alkalmaztunk. Szomatikus klónanalízis során hősokk által indukáltunk *Atg9* mutációt hordozó sejteket muslica lárvákban, majd a vizsgált zsírtesteket éheztetett, harmadik stádiumos, vándorló lárvákból nyertük. A szomatikus mozaik- vagy klónanalízisnek az előnye, hogy az indukció hatására keletkező mutáns sejt és utódai hordozzák a mutációt, továbbá expresszálják a szelekcióhoz szükséges jelölő/tudósító fehérjét. Azok a sejtek voltak a kontroll sejtek, melyekben a korai hősokk hatására nem történt meg a célzott gén kiütése és megmaradt a jelölő-fehérje expressziója. Az autofág struktúrák autofágia-specifikus jelölők általi nyomon követésére általánosan elfogadott rendszer az autofágia kutatásában, ehhez pedig

az egyik legjobb szövet a lárvális zsírtest. Az autofágia defektusainak követéséhez különböző jelölőket használtunk (savas sejtalkotók festése, Atg8a követése, p62 halmozódás). Először a savas organellumok, lizoszómák és autolizoszómák jelenlétét mutattuk ki Lysotracker festés segítségével. A lizoszomotropizmus egy régóta ismert jelenség, mely azt jelenti, hogy a savas beltartalmú sejtorganellumok képesek a gyenge bázikus vegyületeket a lumenükben felhalmozni. Ma már léteznek olyan vegyületek, amelyek megbízhatóan alkalmasak a sejten belüli savas organellumok szelektív kimutatására. A Lysotracker festék alapváza egy gyengén bázikus vegyület, amely neutrális pH-jú közegben csak részlegesen protonálódik, amely így megengedi a festékmolekulák átjutását mind a plazmamembránon, mind pedig a különböző sejtorganellumokat határoló membránokon. Amennyiben egy organellum savas beltartalmú (lizoszómák, autolizoszómák), úgy a bejutó Lysotracker festék teljes mértékben protonálódik, és emiatt elveszti a penetrációs képességét, tehát az organellum lumenében reked. A Lysotracker festékek általában fluorofór-kapcsoltak, így a jelölés fluoreszcens mikroszkópiával ellenőrizhető.

Éhezés-indukálta autofágia során megnőtt mind a száma, mind a mérete a savas kompartmentumoknak. Ha azonban az autofágia folyamata gátolt, nem, vagy csak részlegesen alakulnak ki autofág struktúrák (fagofór, autofagoszóma, autolizoszóma). Esetünkben, a lárvális zsírtestekben indukált *Atg9* mutáns sejtekben (GFP-texpresszáló sejtek) Lysotracker festéssel (Lysotracker red) nem detektáltunk savas organellumokat, ellentétben a környező, GFP-t nem expresszáló kontroll sejtekkel (6. a ábra). Továbbá a mutáns, zöld sejtekben nem volt kimutatható a 3xmCherry-Atg8a, amely a kontroll sejtekben az autofág struktúrákat egyértelműen kijelölte (6. b ábra). Végül a p62 szelektív autofágia receptor fehérje eloszlását ellenőriztük az *Atg9*-hiányos lárvák zsírsejtjeiben. A p62 fehérje erős halmozódása volt megfigyelhető az *Atg9* mutáns sejtekben, ellentétben a környező kontroll sejtekkel (6. c ábra). A p62 fehérje felhalmozódását Western blottal is igazoltuk (6. d ábra). A p62 fehérje szintjének vizsgálatakor megállapítottuk, hogy *Atg9* hemi- és homozigóta mutáns legyekben felhalmozódik a p62, míg vad típusú kontrollban és az *Atg9* menekítős vonalaiban (*Atg9*-3xHA és *Atg9*-3xmCherry) a vad típusú kontroll (w^{1118}) legyekhez hasonlóan, kis mennyiségben van jelen. Az eredményeket összesítve elmondhatjuk, hogy az *Atg9* mind a szelektív, mind pedig a stressz-indukálta autofágiában fontos szerepet játszik, hiányában az irodalomból jól ismert autofágia-specifikus defektusok alakulnak ki, melyeket *Atg9* transzgén kifejezésével menekíteni lehet.



5. ábra. Az *Atg9^{B5}* mutánsok autofágiával összefüggő vizsgálatai. *Atg9* hiányában csökken a muslicák élethossza (a), a mutáns legyek paraquat kezelés hatására gyorsabban pusztulnak el (b) és rosszabbul tolerálják a *Pseudomonas* fertőzést (c). *Atg9^{B5}* mutáció hatására az állatok mozgási képességei is jelentősen romlanak mászás tesztben (d). Minden tesztben a kontroll vad típusú (w^{1118}) és/vagy *Atg9*-3xHA menekítő vonal volt.



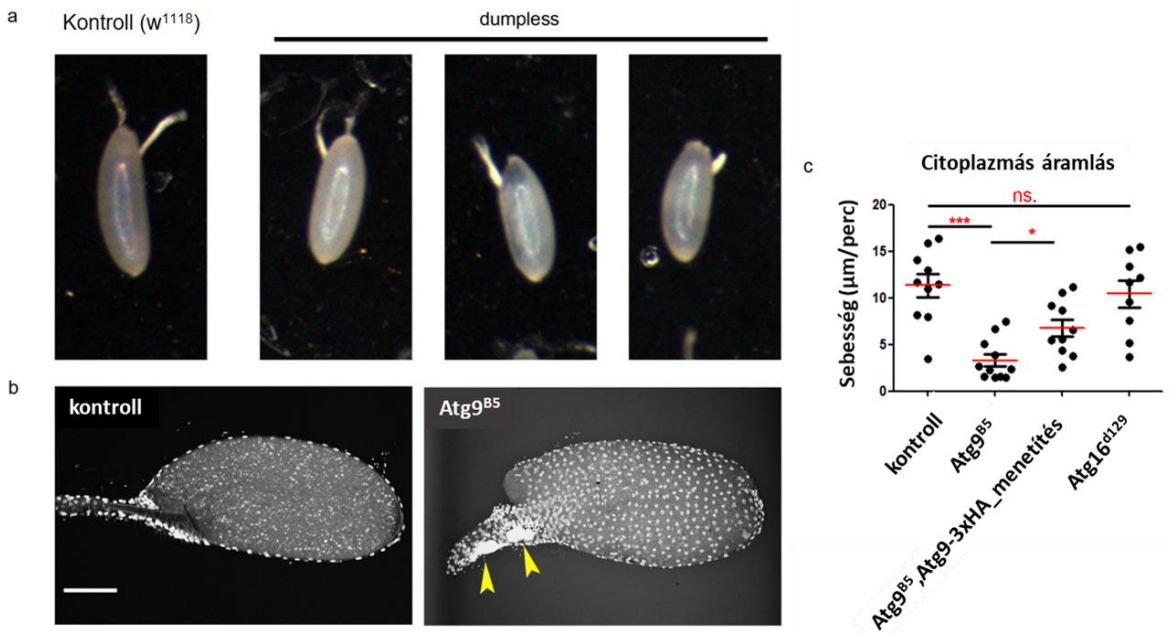
6. ábra. Az *Atg9* autofágiában betöltött szerepének igazolása. *Atg9* mutáns lárvális zsírsejteket (zöld, GFP – a, b; piros, mTomato – c) indukáltunk autofágia tekintetében vad típusú lárvákban. Éhezés indukálta, Lysotracker festésre pozitív autolizoszómák (a) és Atg8a-3xmCherry pozitív általános autofág struktúrák (b) összeszerelődése erősen gátolt *Atg9* hiányában összehasonlítva a környező szomszédos sejtekkel. *Atg9 null* mutáns sejtekben jól táplált állapotban erős fölhalmozódást mutat a konstitutív tubulin promóterrel meghajtott GFP-p62 transzgén (c). Western blottal teljes muslicákból származó fehérje preparátumokból is egyértelműen kimutatható a p62 fehérje felhalmozódása *Atg9* hiányában (*Atg9*^{B5}/Df(2R); *Atg9*^{B5}) amelyet *Atg9* transzgén (*Atg9*-3xHA és *Atg9*-3xmCherry) segítségével menekíteni lehet (d). *w*^{1118}: vad típusú kontroll; Scale bar: a-c: 20 µm.

4. 2. A *Drosophila Atg9* szerepe a nőstények peteképzésében

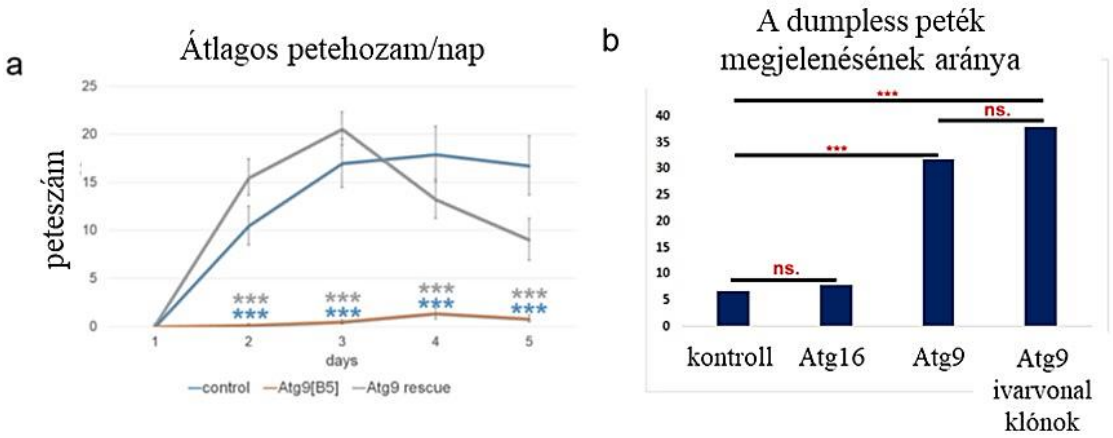
4. 2. 1. Az *Atg9* hiánya drasztikusan rontja a nőstények termékenységét

Annak ellenére, hogy az *Atg9*^{B5} mutáns állatok, más *Atg* mutánsokhoz hasonlóan életképesek, homozigóta törzset nem tudtunk fönntartani stabilan, több generáción keresztül. A rövid élethosszt, a neurodegenerációból adódó mozgási defektusokat, illetve a csökkent stressz-toleranciát más kutatócsoport is leírta [45], mindezek azonban nem magyarázták a homozigóta törzs fenntartásának nehézségeit. Megvizsgálva az *Atg9*^{B5} mutáns adultak termékenységét azt

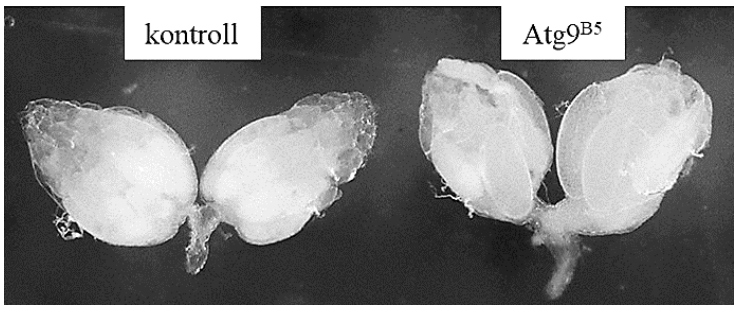
tapasztaltuk, hogy míg a hímek szaporodóképesek, addig a nőstények nem, vagy csak nagyon kevés petét produkáltak abban az esetben, ha vad típusú hímekkel kereszteztük őket (8. a ábra). A csökkent peterakási képességet az *Atg9*-3xHA transzgenikus vonal menekítette (8. a ábra), malamint megvizsgáltuk az *Atg9*-3xmCherry transzgenikus vonalat, amelyben szintén helyreállt a termékenység (nem közölt adat). Vizsgálatainkban a továbbiakban a petefészek tanulmányozására koncentráltunk, hiszen korábbi munkákból tudható, hogy más, homozigótaként életképes Atg mutánsnál, (például *Atg7* vagy *Atg16*) nem figyelhető meg termékenységcsökkenés [68][46]. Eredményeink azt sugallták, hogy az *Atg9* eddig ismeretlen módon, specifikusan járul hozzá a muslica nőstények peteképződéséhez. Megvizsgáltuk az $Atg9^{B5}$ nőstények petefészkének morfológiáját. Bár a petefészkek méretükben és alakjukban nagyon hasonlítottak a vad típusú nőstények petefészkeire, a mutánsok petefészkében feltűnően sok 14. stádiumot elért, de le nem rakott pete halmozódott föl (9. ábra). Összehasonlítottuk a kevés lerakott pete méretét és alakját a vad típusú nőstények petéivel, és azt tapasztaltuk, hogy a mutáns nőstények petéi gyakran kisebbek és kerekebbek voltak (7. a ábra, 8. b ábra). Igaz ez abban az esetben is, amikor a peték *Atg9* mutáns ivarvonal klónokból származtak, amely igazolta az *Atg9* ivarvonal-specifikus funkcióját (8. b ábra). Ez a fenotípus az irodalomban már jól körülírt, úgynevezett dumpless pete, amely a petefejlődés során lejátszódó dumping folyamatának meghibásodásához köthető elsősorban. A normál módon lezajló peteképződés végén a dajkasejtek apoptózissal elhalnak, majd az utánuk maradó sejttörmelékeket a petekezdeményt burkoló follikuláris sejtek fagocitálják. A hibás dumping zavart okozhat a dajkasejtek halálában, így előfordulhat, hogy visszamarad néhány dajkasejt. Ezeket a visszamaradó dajkasejteket a sejtmagok festésével lehet detektálni (PNCN – persistent nurse cell nuclei). DAPI festést alkalmazva igazoltuk, hogy az $Atg9^{B5}$ nőstények petefészkeiben felhalmozódott, 14. stádiumot elért peték közel 40%-ában kimutathatóak voltak a visszamaradt dajkasejtek magjai (7. b ábra). Egy másik módszerrel szintén megvizsgáltuk a hibás dumping folymatát. A dumping során a dajkasejtekben keletkező nyomás áramlást hoz létre a petesejtben (cytoplasmic streaming). A petesejtben lévő ún. szik (yolk) granulumok mozgásának monitorozása lehetővé teszi az áramlás sebességének a kiszámítását. Ez alapján megállapítottuk, hogy a vad típusú kontrollhoz viszonyítva az $Atg9^{B5}$ mutáns petesejtekben az áramlás jelentősen lelassult, azonban az *Atg9*-3xHA transzgénnel ez a lassulás menekíthető (7. c ábra). Az $Atg16^{d129}$ [46] mutáns petesejtekben nem mutattuk ki a cipolazma áramlás megváltozását (7. c ábra). Mindez arra mutat rá, hogy *Atg9* hiányában a dajkasejtek kortikális aktin hálózata által generált nyomás kisebb, mely fakadhat a kortikális aktin háló instabilitásából, rendezetlenségéből.



7. ábra. Az *Atg9* hiánya dumpless petéket eredményez. A dumpless peték kisebbek, kerekebbek, mint az egészséges, vad típusú (w^{1118}) kontroll pete (a). A dumping hibájának az egyik megnyilvánulása a 14. stádiumban is DAPI festéssel jól detektálhatóak a dajkasejt magok (b). *Atg9* hiányában (n=11) jelentősen csökken a citoplazma áramlás vad típusú (w^{1118}, n=10) és autofág ($Atg16^{d129}$ n=9) kontrollokkal összehasonlítva, az *Atg9*-3xHA menekítés (n=10) képes volt ezt a lassulást menekíteni (c).



8. ábra Az *Atg9* hiányában bekövetkező termékenységcsökkenés ábrázolása grafikonon. *Atg9* hiányában a muslica nőstények jelentősen kevesebb petét raknak vad típusú kontrollhoz és az *Atg9*-3xHA menekítéshez viszonyítva (a). Kruskal–Wallis test, n = 20/genotípus, ***p < 0.001. A lerakott peték között míg vad típusban és *Atg16* mutánsban elenyésző, ~5% a dumpless peték aránya, $Atg9^{B5}$ mutáns (~30%) és *Atg9* mutáns csírasejtekből származó peték (~37%) között jelentősen megnőtt a dumpless peték aránya. Fisher's exact teszt p = 0.794 (vad-*Atg16*), p =0.0000084 (vad-Atg9), p = 0.00005 (*Atg16*-*Atg9*) (b).



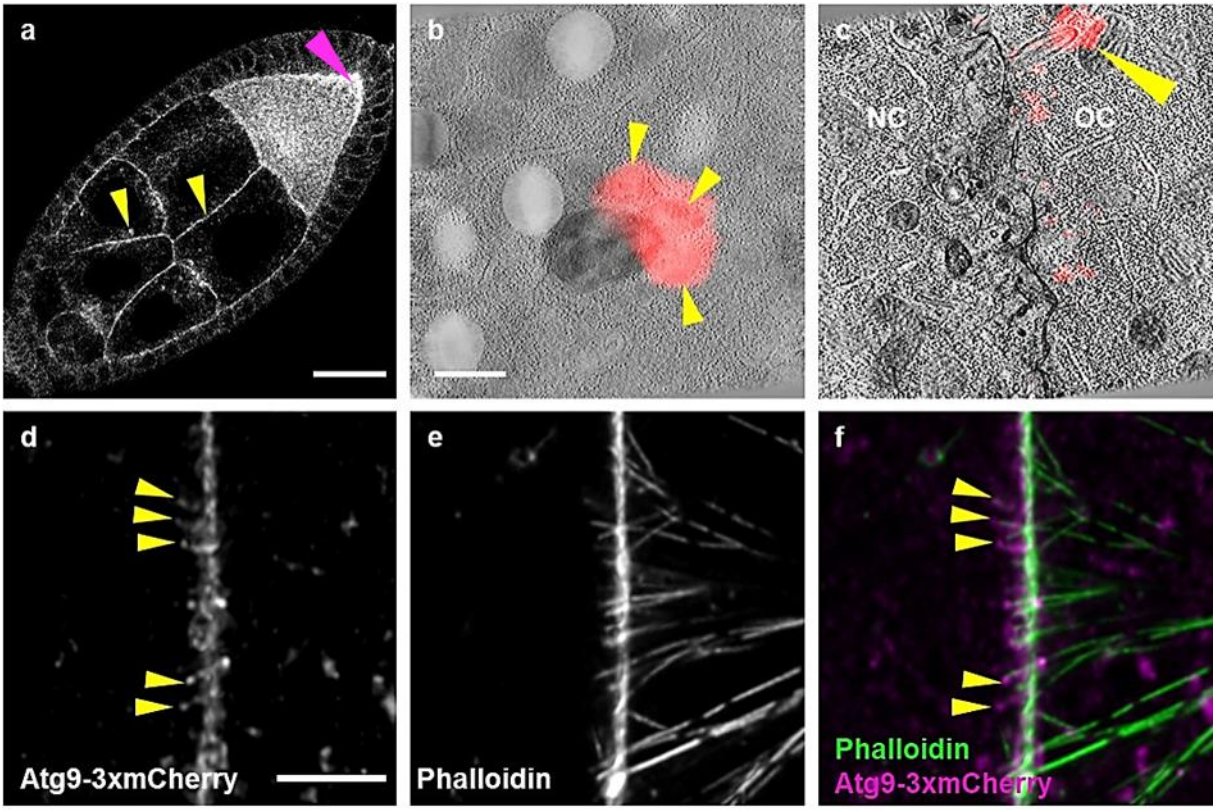
9. ábra. Az *Atg9^{B5}* mutáns nőstények petefészkének morfológiája. Az *Atg9^{B5}* mutáció hatására nem válnak csökevényessé a petefészkek (jobb oldal), összehasonlítva a vad típusú kontrollal (bal oldal). A két petefészek egyszerre, egymás mellett volt fotózva.

4. 2. 2. Az *Atg9* és az aktin hálózat kapcsolata

Az *Atg9*-3xmCherry transzgén alkalmasnak tűnt az Atg9 lokalizációjának tanulmányozására. Konfokális mikroszkópiával igazoltuk az Atg9 fehérje jelenlétét az ivarsejtekben. Nagyfelbontású fluoreszcens felvételen látható, hogy az Atg9 a citoplazmában elszórva, „pöttyözött" mintázatot mutat, míg a membrán mentén mindenhol jelen van, mintegy a sejtmembrán markereként. Jellemzően a gyűrűcsatornák környékén feldúsul az Atg9, illetve izgalmas felfedezés volt az Atg9 felhalmozódása a petesejt „csúcsi részében", az ún. poszterior pólusán. Ez utóbbi megfigyelés azért is volt érdekes, mert a poszterior póluson halmozódnak föl azok a faktorok, amelyek a későbbi embrió polarizáltságát meghatározzák (10. a ábra). Ilyen faktor az *osk* mRNS. Megvizsgáltuk az *osk* mRNS mintázatát az *Atg9^{B5}* petekamrákban, de az *osk* poszterior lokalizációját nem befolyásolta az Atg9 hiánya, így a kutatást ebben az irányban folytattuk.

3D Korrelatív Fény- és Elektron Mikroszkópia (CLEM - Correlative Light and Electron Microscopy) segítségével az *Atg9*-3xmCherry transzgént kifejező ivarvonal sejtekben megállapítottuk, hogy az Atg9 a citoplazmában kisméretű vezikulákhoz, mint korai- vagy késői endoszómák, multivezikuláris testek (MVB – Multivesicular Body) és emésztő lizoszómákhoz, illetve elszórva endoplazmás retikulumhoz kötődött (10. b ábra). A sejtmembránra fókuszálva megfigyeltük, hogy az Atg9 jelen volt a gyűrűcsatornákat létrehozó membránok hajlataiban (nem közölt adat), illetve olyan ujj-szerű membránstruktúrákban, amelyek feltételezhetően párhuzamos aktin-kötegeket tartalmaztak (10. c ábra). A dajkasejtek a 10B stádiumtól jellegzetes aktin hálózatot fejlesztenek, amely jól strukturált, a sejtmembrántól a sejtmag hártyáig tartó aktinkötegekből, ún. aktin kábelekből áll. Ezeknek az aktin kábeleknek a sejtmembrán felőli ún. pozitív („+") végüknél találhatóak az összeszerelési pontjaik. Az aktin kábelek feladata elsősorban a sejtmag megtámasztása és a gyűrűcsatornáktól történő távoltartása a dumping során. A keletkező nyomás hatására a sejtmembránba ujj-szerűen benyomódnak a kábelek „+" végei kialakítva ezzel az ún. filopódium-szerű aktin-gazdag nyúlványokat (filopodia-like actin-

rich protrusion). A petekamra érettségi stádiuma alapján a 10. c ábrán (11. stádium) ez a membrán nyúlvány szerkezetében megfelelhetett egy aktin-gazdag nyúlványnak. Elektron mikroszkópiával tehát az ultrastruktúra szintjén is igazolódni látszott, hogy az Atg9 a membránhajlatokban, hajtű-szerű membránnyúlványokban van jelen, melyek feltételezhetően aktin kábelek benyomódása révén keletkeztek.

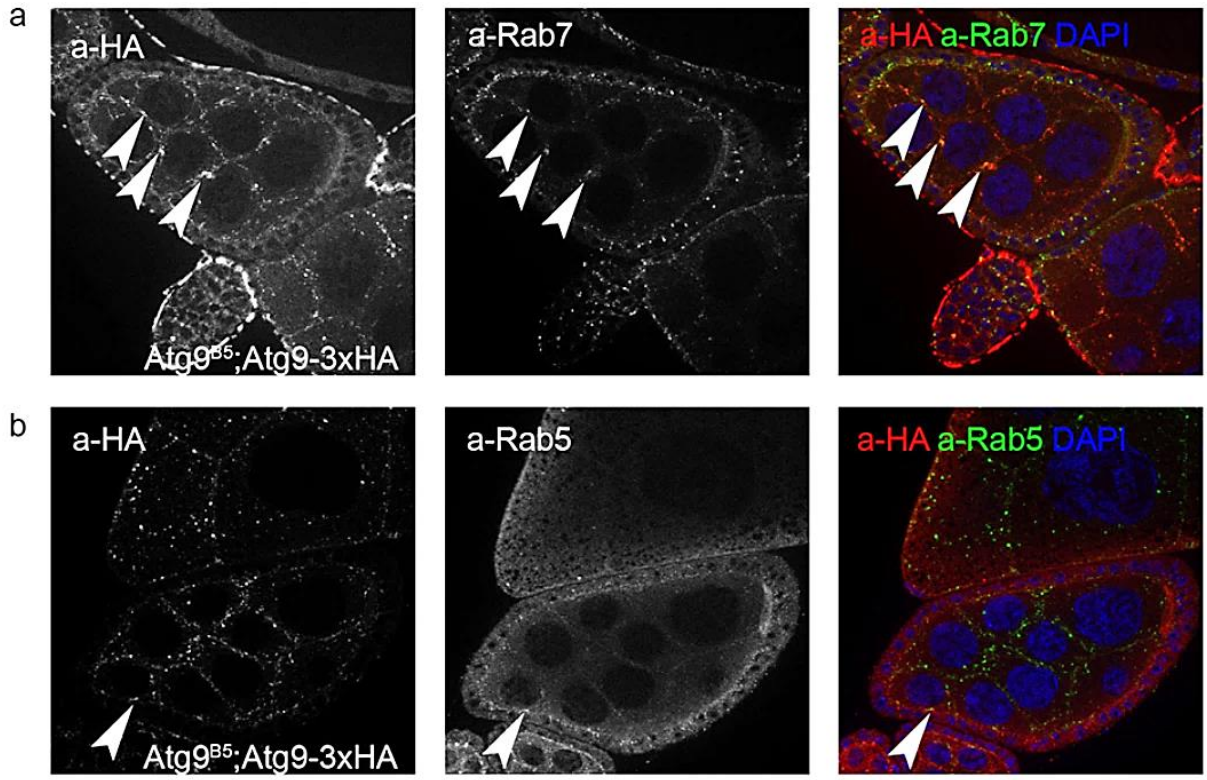


10. ábra. Az Atg9 szubcelluláris lokalizációja *Drosophila* petefészekben. Az Atg9 a petekamrákban kisméretű citoplazmikus struktúrákhoz kötődik, illetve a plazmamembránhoz (sárga nyílfejek), valamint a petesejt poszterior pólusán halmozódik fel (magenta nyílfej) (a). CLEM analízis megmutatta, hogy a dajkasejtek citoplazmájában elsősorban kisméretű vezikulákhoz (lizoszómák, endoszómák) kötődik az Atg9 (sárga nyílfejek) (b), valamint a plazmamembrán mentén, szinte mindenhol előfordul, de jellemzően ott nagyobb mennyiségben, ahol meredek, erős membrángörbületek vannak, egyesekbe párhuzamos mintázatú, aktin kötegekre emlékeztető képződmény is belefut (sárga nyílfej) (c). Phalloidin festés szintén igazolja, hogy az Atg9 jellemzően az aktin kábelek sejtmembránba nyomódó részét közrefogó membránban van jelen (d-f). Scale bar: a: 50 µm, b-c: 150 nm, d-f: 5um.

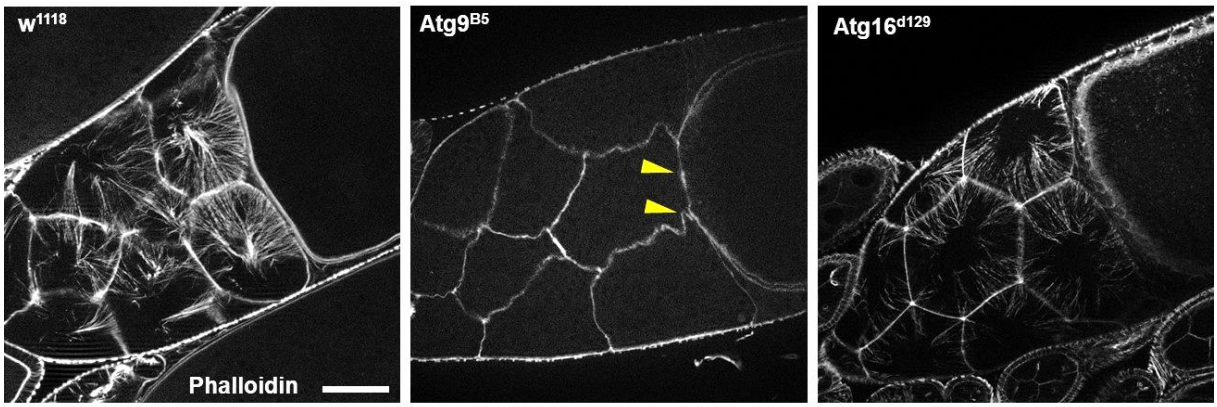
Ezt követően, phalloidin festéssel láthatóvá tettük az aktin kábeleket azokban a stádiumokban, amelyekben egészséges, jól táplált nőstény esetében a kábelek már kialakultak (>10B stádium). Megvizsgáltuk a membránban elhelyezkedő *Atg9*-3xmCherry és az aktin kábelek „+” végének viszonyát. Azt tapasztaltuk, hogy az Atg9 a membrán azon részeihez lokalizálódik, ahol a kábelek benyomódnak és kialakítják az aktin-gazdag, ujj-szerű

nyúlványokat (10. d-f ábra). Ez a megfigyelés újabb bizonyítékot szolgáltatott az *Atg9* és az aktin hálózat kapcsolatára.

Ismert, hogy a korai és késői endoszómák egyaránt előfordulnak a citoplazmában és a membránközeli régiókban is, ezért immunfestéssel ellenőriztük, hogy az Atg9 és különböző endoszóma-specifikus markerek mintázata milyen mértékben fed át a petekamrákban. Atg9-3xHA és Rab5 (korai endoszóma) (11. b ábra), valamint Atg9-3xHA és Rab7 (késői endoszóma) (11. a ábra) kettős festésekkel igazoltuk, hogy kis mértékben van átfedés az Atg9 és az endoszóma markerek mintázatai között. Ezek a megfigyelések felvetették bennünk a kérdést, hogy az *Atg9* hiányában kialakuló gyenge petézés következhet-e az endoszóma rendszer működésének megváltozásából?



11. ábra. Az Atg9 és a korai- valamint késői endoszóma markerek kolokalizációja. Az Atg9 fehérje lokalizációjának összehasonlítása a Rab7 (a), valamint a Rab5 (b) fehérjék mintázatával (fehér nyílfejek) muslica petekamrában.



12. ábra. Az aktinhálózat vizsgálata *Atg9 null* és kontroll petekamrákban. Azonos stádiumokban (>10 stádium) lévő vad típusú és autofágia deficiens (*Atg16*^{d129}) kontrollok aktinhálózatához viszonyítva az *Atg9*^{B5} mutáns nőstény petekamrájában az aktin kábelek kialakulása késik, csak néhány vékony aktin filamentum kezdemény figyelhető meg (sárga nyíl). Scale bar: 20 µm.

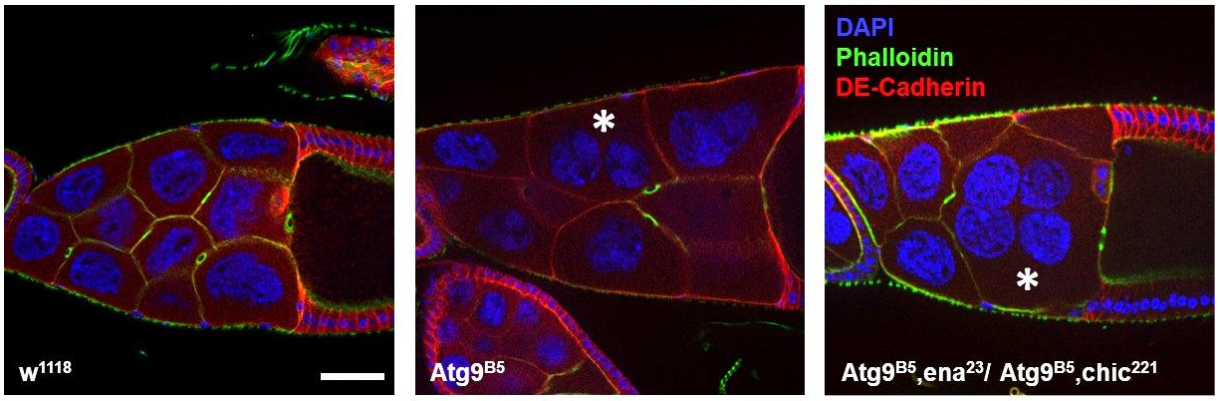
Annak érdekében, hogy a lehetséges strukturális eltéréseket körbejárjuk, egyszerű Phalloidin festéssel vizsgáltuk meg a petekamrákban az aktin hálózat állapotát. Kontrollként a *white*^{1118} (vad típus) és az *Atg16*^{d129} autofágia mutáns törzset használtuk. A kontrollok kiválasztásánál ennél a kísérletnél is fontos szempont volt, hogy termékeny legyen a nőstény. Az előző kísérlethez hasonlóan olyan stádiumot választottunk, amelyikben már várhatóan kialakulnak az aktin kábelek (10B-11). Megfigyeléseink alapján, míg a vad típusú és az autofágia kontrollban jól strukturált aktin kábelek húzódtak a plazmamembrán és a dajkasejtek magjai között, addig az *Atg9*^{B5} mutánsban éppen csak megkezdődött az aktin kábelek kialakulása (12. ábra). Későbbi stádiumokban (12-14. stádiumok) a kábelek a kontrollokhoz már nagyon hasonlóak voltak. Eredményeink azt mutatták, hogy ellentétben az *Atg16*^{d129} mutánssal, ahol nem volt figyelhető eltérés az aktin hálózat formálódásában a vad típusú kontollhoz képest, az *Atg9* hiányában az aktin kábelek kialakulásában késés következett be. Megfigyeléseinkből arra következtethettünk, hogy az *Atg9* hiánya autofágia-független módon befolyásolta az aktin kábelek kialakulását dajkasejtekben. Az egyértelmű aktin hálózat változások miatt kísérleteinket a továbbiakban az aktin citoszkeletonra fókuszálva terveztük meg, és az endoszómális rendszert nem vizsgáltuk részletesebben az *Atg9*^{B5} nőstényekben.

4. 2. 3. Az *Atg9* és ismert aktin szabályozó faktorok genetikai interakciójának vizsgálata

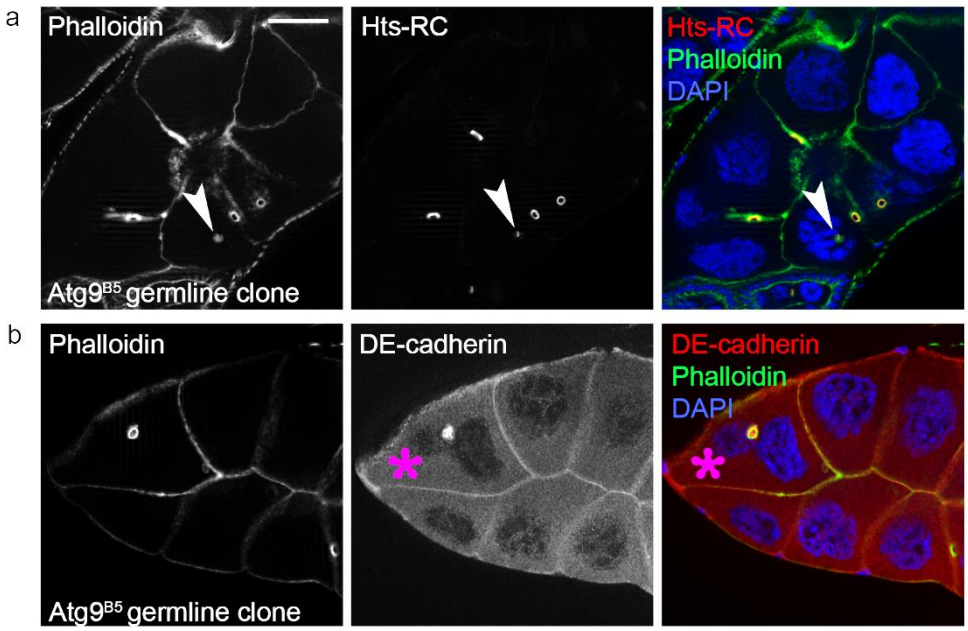
Az aktin kábelek kialakulásában az ún. tip complex játszik szerepet. A tip complex fehérjéi a polimerizálódó kábelek plazmamembránba nyomódó „+” végeihez lokalizálódnak. Az, hogy az Atg9 szintén az aktin kábelek „+” végeinél helyezkedik el, hiányában pedig az aktin

kábelek kialakulása zavart szenved, fölvetette azt az elképzelésünket, hogy az Atg9 és a tip complex fehérjéi kölcsönhatásban állhatnak egymással. A tip complex egyik tagja az Ena/VASP (Ena), amely immunhisztokémiai tesztek eredményei szerint a kábelek membránba benyomódott végein, pontszerűen helyezkedik el [125], hasonlóan az Atg9 plazmamembránhoz köthető mintázatához (10. d-f ábra). A profilin szintén az aktin polimerizáció egyik szabályozó fehérjéje, és kötőpartnere az Ena-nak. A profilin felelős az aktin monomerek szállításáért az aktin filamentumok polimerizálódó („+”) végeihez, négy darab Ena pedig homotetramert alkotva összefogja, kötegeli a polimerizálódó filamentumok végeit a membrán közvetlen közelében. Egyes tanulmányok szerint az Ena támogatja az aktin polimerizációt végző formin-típusú fehérje funkcióját is. Ahhoz, hogy megvizsgálhassuk, van-e kölcsönhatás az Ena-profilin-Atg9 hármasa között a dajkasejtekben végbemenő aktin hálózat kialakulása során, az irodalomból már ismert *ena*, illetve *chic* ismert mutáns alléljeinek vizsgálatából ismert fenotípusokra fókuszáltunk. Mind az *ena*-nak, mind pedig a *chic*-nek számos mutáns allélje létezik, melyek enyhébb vagy súlyosabb zavart okoznak az aktin hálózat kialakulásában *Drosophila* oogenezis során. Az egyik ilyen ismert elváltozás a dajka sejtek plazmamembránjainak felbomlása, amelynek elsődleges oka a kortikális aktin hálózat és a plazmamembrán destabilizálódása. Ezt a defektust a kortikális aktin hálózat jelölésével (phalloidin festés), valamint a dajkasejt membrán specifikus, immunhisztokémiai festésével (DE-cadherin ellenanyag) lehet igazolni. A határoló membránok eltűnése a dajkasejtek összeolvadását eredményezi, anélkül, hogy a dajkasejtekhez köthető 15 nagy, politén sejtmagok száma megváltozna. Ez a jelenség magyarázza a többmagvú, ún. multinukleált (kettő vagy több sejtmaggal rendelkező) dajkasejtek megjelenését. Megvizsgáltuk, hogy az *Atg9*^{B5} mutáns petefészkekben előfordulnak-e multinukleált dajkasejtek. Phalloidin festéssel és DE-Cadherin ellenanyagos jelöléssel igazoltuk, hogy a petekamrák megközelítőleg 30%-ában megtörtént a dajkasejt-fúzió (mind a kortikális aktin, mind a DE-cadherin hiányzik a magok között), ellentétben a vad típusú kontrollal, ahol nem tapasztaltunk fúziót (13. ábra). Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a többmagvú sejtek valóban fúzió eredményei-e, vagy más jelenség, például korai, osztódási (citokinezis) probléma okozza a rendellenes sejteket. Megszámoltuk az érintett petekamrákban elhelyezkedő ivarvonal sejtek sejtmagjainak számát és azt tapasztaltuk, hogy a petesejttel együtt minden petekezdemény 16 sejtmagot tartalmazott (1 petesejt és 15 dajkasejt mag). További megfigyelések is megerősítették a fúzió tényét. Az egyik, hogy nagyon fiatal petekamrákban (<6 stádium) egyáltalán nem, vagy csak elvétve fordult elő rendellenes, többmagvú dajkasejt. Mindez bizonyította, hogy a nagyméretű, többmagvú dajkasejtek idősebb stádiumokban bekövetkező dajkasejt fúzió eredményei. A másik jelenség, ami gyakran kíséri a dajkasejt-fúziót, számszerűsíthető és egyben szintén az *ena* és *chic*

funkcióvesztést jellemezheti, az a gyűrűcsatornák eltűnése, esetleg több, a membrántól elszakadó gyűrűcsatorna aggregálódása. A Hts-RC (Hu li tai shao ring canal fehérje) immunfestése kizórólag a gyűrűcsatornákat jelöli ki, így könnyen meg lehet számolni az egy petekamrán belül elhelyezkedő gyűrű-szerű képződményeket. Normál módon fejlődő petekamrákban, így a vad kontrollban is 15, a membránhoz kapcsolódó, Hts-RC és aktin festésre is pozitív gyűrűcsatorna számolható. *Atg9* hiányában csökkent az egyedi gyűrűcsatornák száma (14. ábra), míg az autofágia kontroll, *Atg16*^{d129} mutáns petekamrák esetében sem a fúziós fenotípust, sem csökkent gyűrűcsatorna számot nem figyeltünk meg (14. ábra). Eredményeink alapján elmondható, hogy az *Atg9* hiányában sérül a kortikális aktin hálózat és a plazmamembrán stabilitása, autofágia-független módon járul hozzá a dajkasejtekben zajló aktin hálózat kialkulásához és feltételezhetően részt vesz annak fenntartásában, stabilizálásában .



13. ábra. Az *Atg9* genetikai interakciója a *chic*-kel és az *ena*-val. Phalloidin és α-DE-cadherin ellenanyagos festés alapján látható, hogy *Atg9* hiányában (n=131) megjelennek fúzionált dajkasejtek (középső kép), az *Atg9* hiánya kombinálva a *chic* és az *ena* egy-egy kópiájának együttes hiányával (n=231) pedig a dajkasejt fúziót még inkább súlyosbítja, több sejtet érint egyszerre a fúzió (jobb oldali kép). A fehér csillag minden esetben a többmagvú dajkasejteket jelöli.

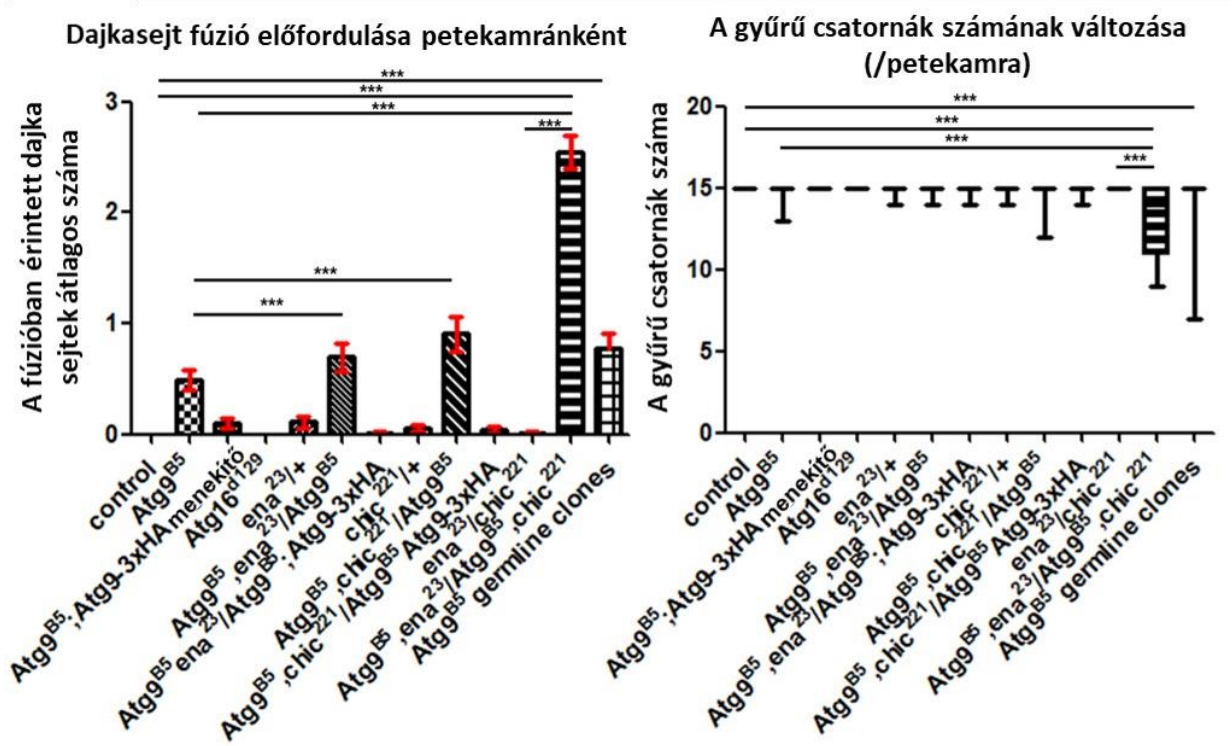


14. ábra. Az *Atg9* hiányának hatása a gyűrűcsatornák és a plazmamembrán integritására *Atg9^{B5}* csíravonal klónokban. Ha csak az ivarvonal sejtekben hiányzik az *Atg9* (*Atg9^{B5}* ivarvonal klónok), hasonlóan az *Atg9^{B5}* mutáns petekamrákhoz, deformálódnak vagy eliminálódnak a gyűrűcsatornák (a) (fehér nyílfej), valamint a plazmamembrán egyes helyeken teljesen eltűnik, dajkasejt fúziót eredményezve (b) (lila csillag). Scale bar: a, b: 50 µm.

Ahhoz, hogy kimondhassuk, hogy az *Atg9* az előbbiekben fölvezetett aktin szabályozó faktorokkal együttműködve vesz részt az aktin hálózat szabályozásában, genetikai interakciós teszteket végeztünk. Kiválasztottunk két, az irodalomban jellemzett *null* allélt az *ena*-ra (*ena^{23}*) és a *chic*-re (*chic^{221}*), melyek homozigóta formában letalitást okoznak, heterozigótaként azonban vad típusúnak tűnnek és fertilisek. Ezt követően kettős mutáns vonalakat hoztunk létre, tehát az *Atg9^{B5}* allélt kombináltuk az *ena^{23}* és a *chic^{221}* allélekkel. Mindhárom gén a második kromoszómán helyezkedik el (*Atg9* és *ena* a jobb, *chic* a bal karon), ezért az allélek kombinálása és kettős mutáns vonalak létrehozása *in situ* rekombinációs technikával valósult meg (lásd Anyagok és módszerek fejezet). A genetikai interakciós tesztekhez kontrollként használtuk az *ena^{23}*, illetve a *chic^{221}* allélekre heterozigóta nőstényeket (*ena^{23}*/+ és *chic^{221}*/+), illetve ezen két mutáns allélre egyszerre heterozigóta muslicákat (*ena^{23}/chic^{221}*). Mindezeken túl olyan genotípusú állatokat is létrehoztunk, melyekbe keresztezésekkel *Atg9*-3xHA menekítő transzgént is bevittünk, hogy igazoljuk, az *Atg9* hiánya okozza a várt elváltozásokat a nőstények petefészkeiben. A rekombináció sikerességét az *ena* és *chic* allélek követésére alkalmas szemszín markereket használtunk (*white*, fehér szemszínt okozó háttéren piros szemszínt okozó domináns marker), az *Atg9^{B5}* mutáció meglétét pedig PCR teszttel igazoltuk.

Mint fentebb leírtam, az *Atg9* hiánya kis mértékben vezetett a dajkasejtek összeolvadásához (ritkán és csak kevés dajkasejtet érintett fúzió, petekamránkét 1-1 szomszédos sejtet). Hasonló tendencia volt megfigyelhető az ena^{23}/+ és $chic^{221}$/+ nőstények esetében is, melyek esetében szintén ritkán láttunk enyhe (1-1 szomszédos sejtet érintő) fúziós fenotípust. Abban az esetben, ha $Atg9^{B5}$ mutáns nőstényekből elvettünk egy kópiát vagy a *chic*-ből vagy az *ena*-ból ($Atg9^{B5}$,ena^{23}/$Atg9^{B5}$ és $Atg9^{B5}$,$chic^{221}$/ $Atg9^{B5}$), mindkét esetben jelentősen megnőtt a multinukleált dajkasejtek száma (14. ábra). Mindkét esetben a súlyosbodott fenotípust a Atg9-3xHA transzgén menekítette. A *chic* és *ena* mutáns allélekre egyszerre heterozigóta nőstények (ena^{23}/$chic^{221}$) dajkasejt fúzió tekintetében a vad típushoz hasonlítottak, azonban, ha $Atg9^{B5}$ mutációra homozigóták voltak ($Atg9^{B5}$,ena^{23}/$Atg9^{B5}$,$chic^{221}$) a nőstények, miközben a *chic* és *ena* mutáns allélekre heterozigóták voltak, a dajkasejt fúziók száma szignifikánsan megnőtt, és jellemzően a fúzió kettőnél több dajkasejtet érintett petekamránként, tehát súlyosbodott a fenotípus, ha az *Atg9* is hiányzott a sejtekből (15. ábra). Ahhoz, hogy bebizonyítsuk, hogy a fúziós fenotípus *Atg9*-függő, illetve, hogy sejtautonóm módon alakult ki, megvizsgáltuk a már korábban leírt ivarvonalsejt klónokat hordozó nőstények petefészkét. Kimutattuk, hogy az *Atg9* hiányos petekamrákban az $Atg9^{B5}$ mutáns nőstények petekamráiban megfigyelt mértékben és súlyossággal láthatóak dajkasejt fúziók. Kontrollként az egy azon petefészekben lévő vad típusú petekamrákat használtuk, melyekben a korábban vizsgált vad típushoz hasonlóan nem tapasztaltunk fúziót.

A fúzión átesett dajkasejtekkel szorosan összefüggő jelenséget, a gyűrűcsatorna szám csökkenést is megvizsgáltuk a már említett mutánsainkban. A dajkasejt fúziónál tapasztalt tendencia némileg megváltozott, hiszen szignifikáns csökkenést csak a legsúlyosabbnak gondolt allélkombinációban ($Atg9^{B5}$, ena^{23}/$Atg9^{B5}$,$chic^{221}$), valamint az $Atg9^{B5}$ ivarvonal klónok esetében láttunk (15. ábra). Erre a legvalószínűbb magyarázat az, hogy míg a kortikális aktin-hálózat, valamint a membránok eltűnése jól látható defektust okozott a dajkasejtek szintjén (lásd fúzió) addig a gyűrűcsatornák gyakran nem eliminálódtak a membránok szétesésével, hanem a citoplazmában "úszva" sokáig detektálhatóak maradtak Phalloidin festéssel és Hts-RC ellenanyagos jelöléssel. Gyakran keletkeztek gyűrűcsatorna aggregátumok is, amelyeket kettő vagy több Hts-RC-pozitív, torz gyűrű alkothatott. Ezekben az esetekben, ha nem lehetett egyértelműen megszámolni, hogy hány gyűrű alkotja, egynek számoltuk. Az ivarvonal klónok esetében bár szignifikánsan csökkent a gyűrűcsatornák száma, ez elsősorban kiugró értékekkel volt magyarázható, a legtöbb petekamrában az $Atg9^{B5}$ mutáns nőstények petekamráiban tapasztalt, enyhe gyűrűcsatorna szám csökkenés volt a jellemző.

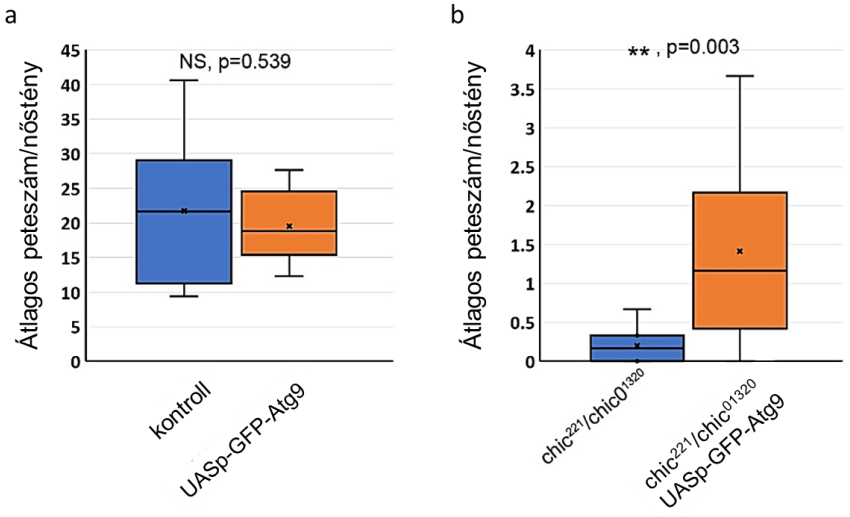


15. ábra. A dajkasejt fúzió és gyűrűcsatorna-vesztés előfordulásának, súlyosságának statisztikai kiértékelése. Mindkét fenotípus számolásához 9 vagy annál későbbi stádiumú petekamrákat vizsgáltunk meg. A dajkasejtek fúziójánál a fúzió által érintett dajkasejtek számát ábrázoltuk petekamránként. A vizsgálatba bevett genotípusok: *ena*^{23}/+ (n = 92), *chic*^{221}/+ (n = 124), *ena*^{23}/*chic*^{221} (n = 129), *Atg*^{16d129} mutáns (n = 80), *Atg9*^{B5} mutáns önállóan, kombinálva *ena*^{23} (n=150) vagy *chic*^{221} (n=97) egy kópia hiányával, *Atg9*^{B5};*Atg9*-3xHA menekítés (n=118). A gyűrűcsatornákat Hts-RC immunfestéssel vizualizáltuk. Vad típusban (n=97) nem figyelhető meg gyűrűcsatorna vesztés, csak ritkán látható *Atg9*^{B5} mutáns petekamrákban (n=108) és *Atg9* mutáns ivarvonal klónokban is csak elvétve (n=100). *Atg9*^{B5} mutáció kombinálva *ena*^{23} (n=44) vagy *chic*^{221} (n=67) egy kópia hiányával szintén enyhe fenotípust eredményez. ena^{23}/*chic*^{221} (n = 81) nem befolyásolja a gyűrűcsatornák számát, azonban az *ena* és a *chic* egy kópiájának szimultán hiánya *Atg9*^{B5} mutáns háttéren (n=34) szignifikánsan megnöveli a gyűrűcsatorna elvesztésének gyakoriságát. Kontrollként *ena*^{23}/+ (n=93), *chic*^{221}/+ (n=94), *Atg16*^{d129} (n=88), *Atg9*^{B5};*Atg9*-3xHA menekítés (n=110) volt használva. A statisztikai analízist Kruskal-Wallis teszttel végeztük, **p = 0.001, ***p < 0.001.

A kiválasztott *ena*^{23} és a *chic*^{221} mutációk *null* allélekként viselkednek, róluk funkcionális fehérjetermék nem keletkezik, és homozigóta formában korai letalitást okoznak. A genetikai interakciós teszteket elsősorban az életképességre vonatkozóan kezdtük el. Arra voltunk kíváncsiak, hogy az Atg9 túltermelése képes-e menekíteni az *ena* és *chic null* allélek homozigóta formában okozta korai embrió halálozást. Terveink szerint *ena*^{23}/*ena*^{23};*Atg9*-3xHA illetve *ena*^{23}/*ena*^{23};UASp-*Atg9*-GFP törzseket szerettünk volna létrehozni és ugyanezt megismételni *chic*^{221} homozigóta kondícióban is. Az indukálható UASp-*Atg9*-GFP transzgén expresszióját a testi sejtekben kifejeződő tub-Gal4 driverrel indukáltuk. Kísérletünk nem eredményezte a várt genotípusú muslicákat, amely azt igazolja, hogy az Atg9 túltermelése nem volt képes sem az

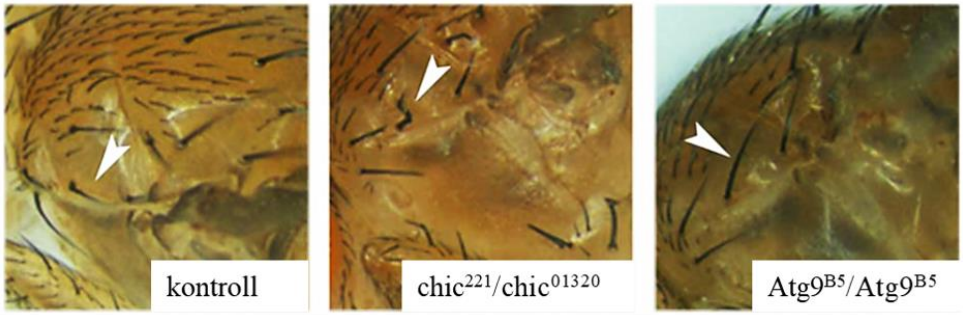
ena, sem a *chic* hiányából adódó letalitást menekíteni, tehát az eredmények nem támasztották alá az *Atg9* megkerülhetetlen szerepét sem az *ena*, sem a *chic* hiányának enyhítésében.

Az irodalmi adatokat tanulmányozva olyan hipomorf hatású alléleket kerestünk, amelyek ugyanazon gén *null* alléljeivel megengedik, hogy életképes felnőtt állatok fejlődjenek, de jól körülírható mutáns fenotípussal rendelkeznek. A *chic* egyik hipomorf alléljét ($chic^{01320}$) használtuk további vizsgálatokhoz, amely homozigótaként életképes és fertilis, $chic^{221}$ alléllel kombinálva szintén életképes, a nőstények azonban csökevényes petefészkekkel rendelkeznek és terméketlenek [130]. A kiválasztott *chic* allélek heteroallélikus kombinációban teljes sterilitást okoztak mind a nőstényekben, mind pedig a hímekben. A nőstények nagyon ritkán produkáltak petéket, amelyek fejlődése nagyon nagy mértékben defektusos volt, szikanyag csak nagyon kis mennyiségben került a petébe, egyértelműen alkalmatlanok voltak a megtermékenyítésre. A $chic^{221}/chic^{01320}$ genotípusú legyekben ivarvonal-specifikusan (nos-Gal4) indukáltuk az *Atg9*-GFP transzgén kifejeződését, mintegy túltermelve az *Atg9*-et a petefészekben. Habár a termékenységet nem állította helyre az extra mennyiségű Atg9, a lerakott peték továbbra is terméketlenek voltak, a lerakott peteszerű képletek száma enyhén megemelkedett (16. ábra) és a szikanyag látszólag több volt ezekben a petékben. A nőstények rövid élethossza és rossz általános fizikai állapota nem tette lehetővé a hibás fenotípus dokumentálását, így a petékről nem készültek képek.



16. ábra. Az GFP-*Atg9* túltermelése részlegesen képes menekíteni a *chic* hiányában fellépő súlyos peterakási defektusokat. A GFP-*Atg9* *nos*-Gal4-es, ivarvonal specifikus túltermelésének nincsen hatása a peterakásra összehasonlítva a kontroll nőstényekkel (csak *nos*-Gal4 drivert hordozók) (a). A *chic* mutáns életképes, de terméketlen nőstények ($chic^{221}/chic^{01320}$) nagyon kevés, rendellenes petét raknak, az Atg9 ivarvonal specifikus túltermelése azonban képes a peterakást enyhén javítani.

Szerettük volna megvizsgálni, hogy a testi sejtekben van-e hatása az *Atg9*-nek a *chic* transzheterozigóták fenotípusaira. Ezt úgy értük el, hogy *chic*^{221}/*chic*^{01320} genotípusú legyekben *tub*-Gal4 driverrel hajtottuk meg az UASp-GFP-*Atg9* transzgént. A *chic*^{221}/*chic*^{01320} genotípusú legyek nagyon jellegzetes szőr-fenotípussal rendelkeznek, ugyanis a pleuralis lemez szőrei (főleg a notopleura – oldalsó rész szőrei) vastagabbak, megtörnek és ritkán elágaznak (17. ábra). Az Atg9 túltermelése azonban nem szűntette meg a szőr defektusokat, tehát a testi sejtekben nem tudtuk igazolni, hogy többlet Atg9 fehérjével pótolni lehet a kieső *chic* funkcióit. Kimutattuk azt is, hogy önmagában az *Atg9* hiánya sem okoz a *chic* allélekre jellemző, szőrt érintő elváltozásokat (17. ábra). Eredményeinkből elmondható tehát, hogy az Atg9 túltermeléssel részben sikerült javulást elérni a *chic* hiányából eredő petézési rendellenességekben, ez az eredmény azonban nem igazolta egyértelműen az *Atg9* és a *chic* interakciójának *in vivo* relevanciáját.



17. ábra. Az *Atg9* szőrnövekedésre gyakorolt hatása a notopleura szőreinek növekedésére. A *chic* hiánya jellegzetes szőrnövekedési defektust okoz (középső kép – *chic*^{221}/*chic*^{01320}), fehér nyíl. Ez a defektus nem figyelhető meg sem vad típusnál (baloldali kép), sem *Atg9* hiányában (jobboldali kép)

4. 3. Az Atg9, az Ena és a profilin lokalizációjának kapcsolata

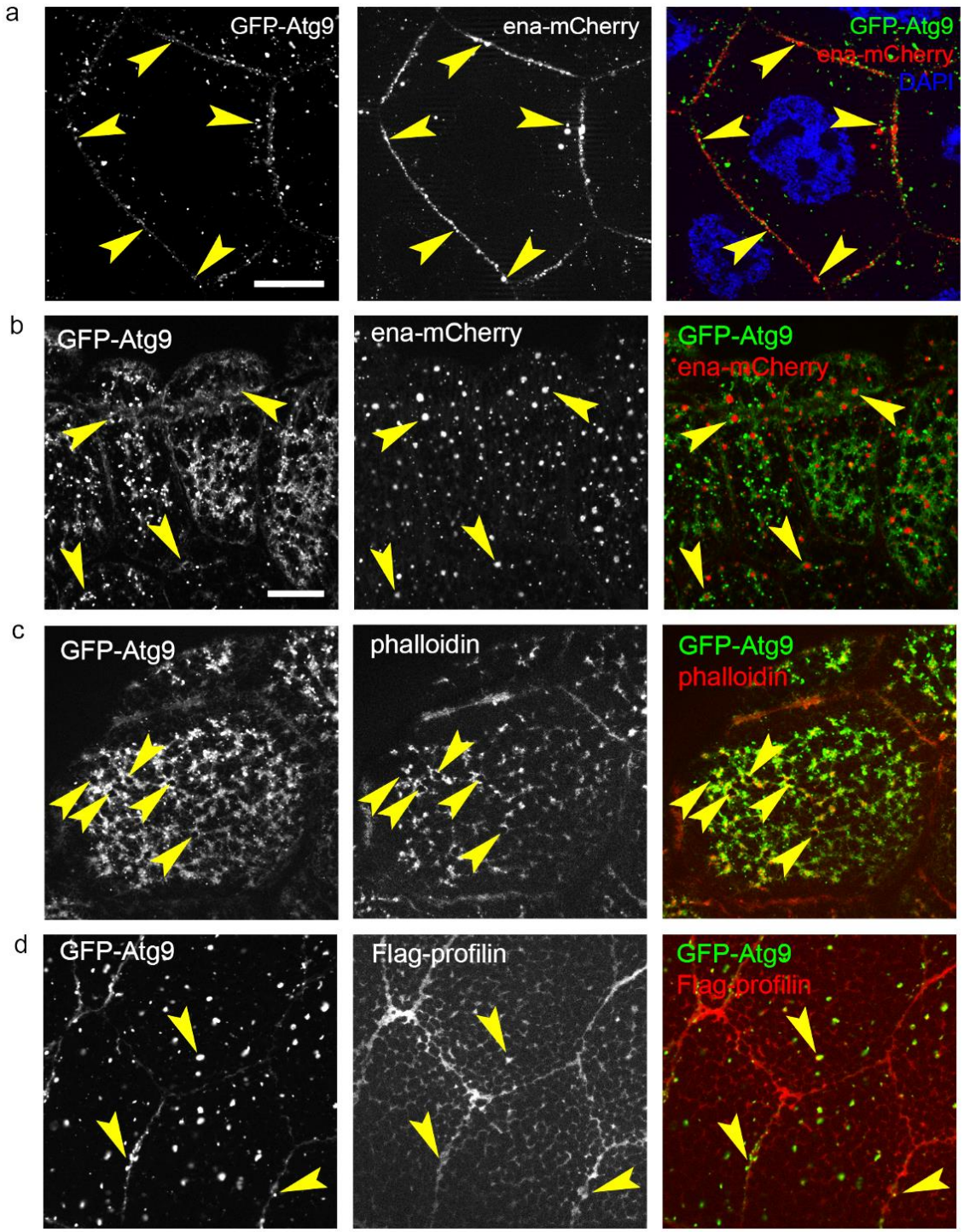
4. 3. 1. Az Atg9 kolokalizál az Ena-val és a profilinnel

A genetikai interakciók vizsgálatának eredményei azt sugallták, hogy az Atg9 ismert aktin-szabályozó fehérjéken, az Ena-n és a profilinen keresztül szerepet játszik a muslica dajkasejtek aktin hálózatának kialakításában. A továbbiakban kíváncsiak voltunk arra, hogy az *Atg9* hiánya befolyásolja-e az Ena és a profilin lokalizációját. Az UASp-GFP-*Atg9* és 3xmCherry-vel fúzionált *ena* transzgéneket (UASp-*ena*-mCherry) egyszerre kifejező muslica vonalakat használtunk. Mindkét transzgén kifejeződését *nos*-Gal4 driverrel egyszerre indukáltuk csírasejtekben. Mind az Ena, mind pedig az Atg9 pontszerű struktúrákat jelölt ki jellemzően a membránhoz közel, illetve az Atg9 a membránt bár gyengén, de közvetlenül is kijelölte (10. d-f ábra). Fluoreszcens mikroszkópos képeken az is megfigyelhető volt, hogy gyakran az Ena és az

Atg9 egymás közvetlen közelében helyezkedik el a sejtmembránhoz közeli régióban, valamint számos membránközeli pont volt mindkét fehérjére pozitív (18. a ábra). Eredményeink tovább támogatták azt a feltételezésünket, miszerint az *Atg9* és az e*na* együtt vehetnek részt az aktin hálózat kialakításában, hiszen azon a helyen mutatnak kolokalizációt, ahol az aktin kábelek és a kortikális aktin hálózat összeszerelődik.

Kíváncsiak voltunk arra, hogy a lokalizációs mintázatok az Atg9 és az aktin regulátor fehérjék között a muslica más szöveteiben is megfigyelhetőek-e. Ennek a kérdésnek a megválaszolására más, immunhisztokémiában jól használható, a csírasejtekhez hasonló nagy, politén sejtmagokkal rendelkező sejteket vizsgáltunk meg. Ilyen sejteket tartalmaz a felnőtt petefészken kívül (dajkasejtek) a lárvális nyálmirigy is. Nagyon érdekes megfigyelés volt, hogy az Ena és az Atg9 elsősorban a nyálmirigysejtek bazális felszíneihez közel található, fészekhez hasonló struktúrákban helyezkedtek el. Ezek az Atg9-gazdag "fészek" képződmények nagy mennyiségű Ena fehérjét tartalmaztak, a fészkek pedig mintegy hálózatban, egymással összeköttetésben helyezkedtek el (18. b ábra). Még érdekesebb volt az a megfigyelés, hogy ezek az Atg9-gazdag "fészkek" F-aktin-t tartalmaztak (18. c ábra). Habár azonosítani nem tudtuk ezeket a képleteket, leginkább sejtek összekapcsoló struktúráinak tűntek, ha figyelembe vesszük, hogy nagyon közel helyezkedtek el a sejtek bazális felszíneihez.

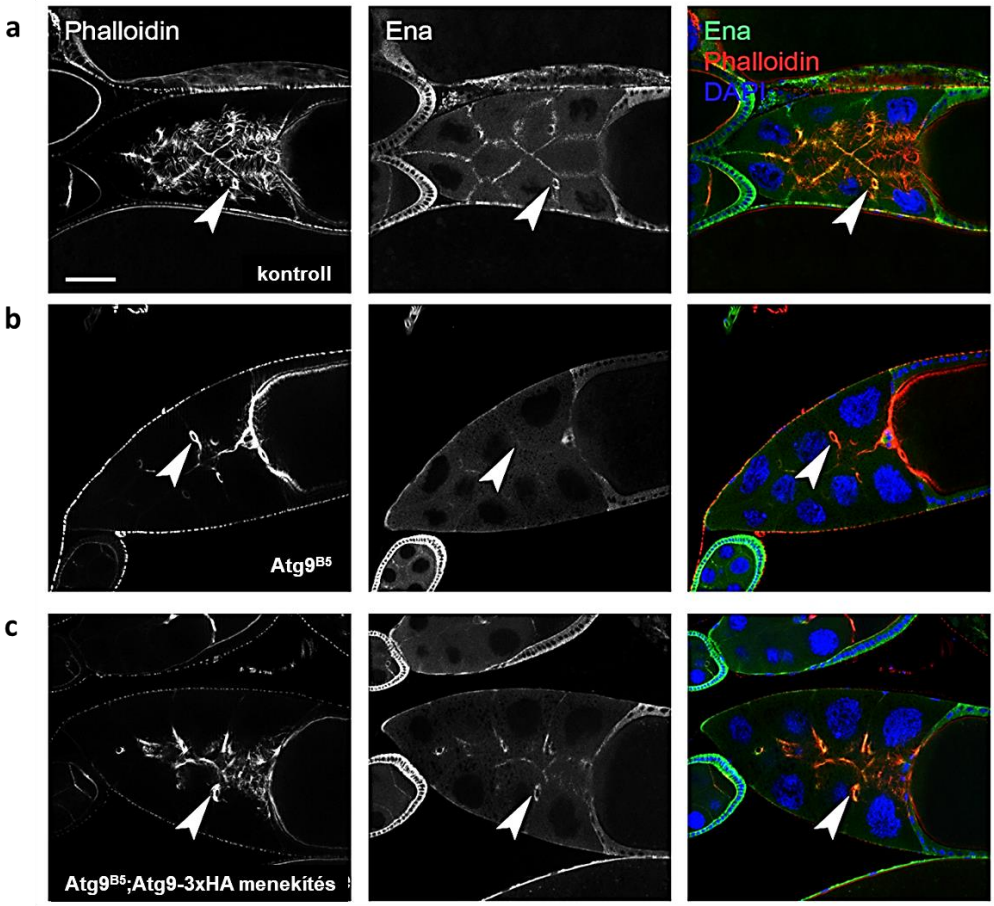
A profilin lokalizációjának vizsgálatához egy UASt-Flag-*chic* transgenikus muslica törzset használtunk [149]. Immunfestéssel láthatóvá tettük a *chic*-hez fúzionált Flag címkén keresztül a profilin lokalizációját lárvális nyálmirigysejtekben, majd összehasonlítottuk a GFP-Atg9 mintázatával. Az Ena-tól eltérően nem a bazális felszínen, hanem „beljebb", a sejtek magja felé igazoltunk Atg9-re és profilinre is egyaránt pozitív struktúrákat, a plazmamembrán egésze pedig mind a két fehérjére pozitív volt (18. d ábra). Megvizsgáltuk, hogy léteznek-e olyan struktúrák, amelyekben az Atg9, az Ena és a profilin is egyszerre van jelen, azonban ilyen „hármas pozitív" struktúrák meglétét nem tudtuk igazolni. Az *Atg9,* habár mindkét aktin szabályozóval mutatott genetikai kölcsönhatást, és külön-külön az Ena és a profilin is mutatott kolokalizációt az Atg9-cel, a hármas kolokalizáció hiánya arra utalhat, hogy nem egy időben történik az együttműködés a három fehérje között. Feltételeztük, hogy az Atg9 az Ena-val és a profilinnel az aktin hálózat kialakításának olyan fázisaiban hathat kölcsön, amikor az Ena és a profilin nincsenek egy komplexben, vagy ha létre is jön egy hármas komplex, az nagyon rövid ideig áll fenn.



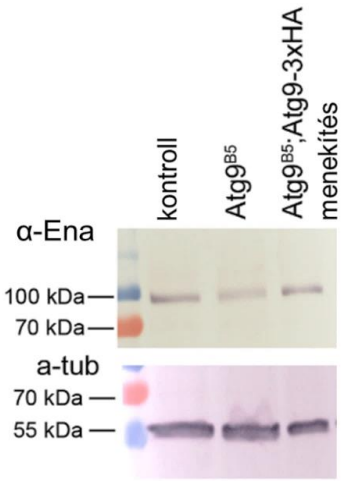
18. ábra. Az Atg9 és az aktin szabályozó Ena és profilin lokalizációjának vizsgálata dajkasejtekben és lárvális nyálmirigysejtekben. A GFP-Atg9 és az Ena lokalizációja dajkasejtekben (a, nyílfejek mutatják a kettős pozitív struktúrákat). Lárvális nyálmirigyben, a bazális felszínhez közel a GFP-Atg9 és az F-aktin (phalloidin) kolokalizálnak (c), a fészek-szerű, GFP-Atg9 által formált struktúrák egy-egy diszkrét Ena-mCherry-gazdag képletet ölelnek körbe (b). Szintén lárvális nyálmirigyben, a GFP-Atg9 mintázata határozottan átfed a profilin (Flag-profilin) mintázatával, mind a plazmamembránban, mind pedig citoplazmás struktúrákban (d). A sárga nyílfejek a kolokalizációt jelölik a b-d képeken. Scale bar: 20 µm a–d.

4. 3. 2. Az *Atg9* szabályozza az Ena membránközeli elhelyezkedését

Kolokalizációs tesztjeinket követően megvizsgáltuk, hogy az *Atg9* befolyásolja-e az Ena sejten belüli elhelyezkedését. Megvizsgáltuk az Ena lokalizációját *Atg9* mutáns petekamrákban (19. ábra). Jól detektálhatóan változott meg az Ena mintázata az *Atg9*^{B5} dajkasejtekben, hiszen a vad típusú kontrollhoz, valamint az *Atg9*-3xHA menekítő vonallal összehasonlítva jelentősen kevesebb Ena-t tudtunk kimutatni (19. b ábra). Míg a kontrollban és a menekítő vonalban az Ena jellemzően a sejtmembránok, valamint a gyűrűcsatornák közelében dúsult fel, addig *Atg9* hiányában ez a jellegzetes mintázat sokkal kevésbé volt megfigyelhető. Western blottal ellenőriztük, van-e különbség az Ena fehérje szintjében *Atg9* mutáns és a kontroll (vad típus és menekítős) petefészkek között. Azt tapasztaltuk, hogy *Atg9* hiányában kevesebb Ena található a petefészkekben a vad típusú kontrollhoz képest, az *Atg9*-3xHA transzgénnel azonban ez a csökkent fehérjeszint menekíthető volt (20. ábra).



19. ábra. Az *Atg9* hiányának hatása az Ena lokalizációjára petekamrákban. Az Ena lokalizációja vad típusú kontroll (a), *Atg9*^{B5} mutáns (b) és *Atg9*-3xHA menekítő transzgént hordozó (c) petekamrákban. α-Ena ellenanyagos festés, az Ena lokalizációjának helyét fehér nyílfejek mutatják. Scale bar: 50 µm, a-c.



20. ábra. Az Ena fehérje szintjének vizsgálata Western blot-tal. Petefészkekből izolált fehérje preparátumokból kimutatható az Ena fehérjének hozzávetőleges alacsonyabb szintje *Atg9* mutáns (*Atg9*^{B5}) petefészkekben összehasonlítva vad típusú kontrollal és *Atg9*-3xHA menekítéssel (*Atg9*^{B5};Atg9-3xHA).

A *chic* és az *Atg9* kapcsolatának vizsgálatához sajnos nem állt rendelkezésünkre ivarvonal-specifikusan kifejeztethető *chic* transzgén, sem petefészekben megbízhatóan működő α-profilin ellenanyag, így nincs adatunk arról, változna-e a profilin elhelyezkedése dajkasejtekben *Atg9* hiányában.

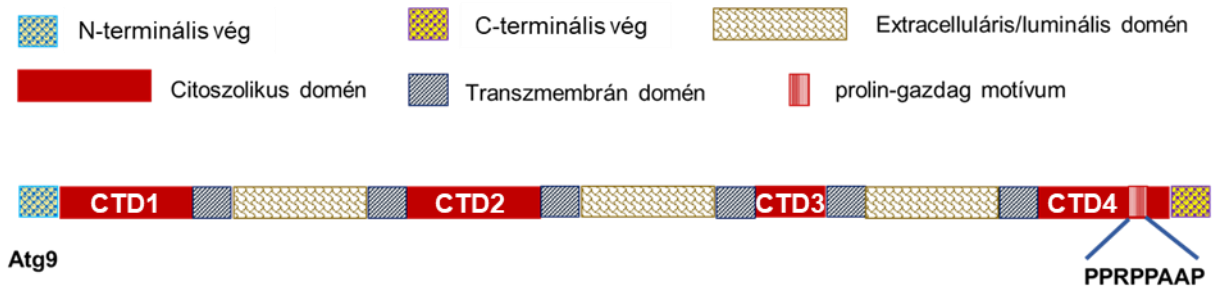
Eredményeink összességében arra utalnak, hogy az Atg9 hozzájárul az Ena membránhoz történő asszociációjához. Arra a kolokalizációs tesztek nem adnak választ, hogy az Atg9 az Ena lokalizációjának szabályozásán túl más funkciójának betöltéséhez is hozzájárul-e.

4. 4. Interakciós vizsgálatok

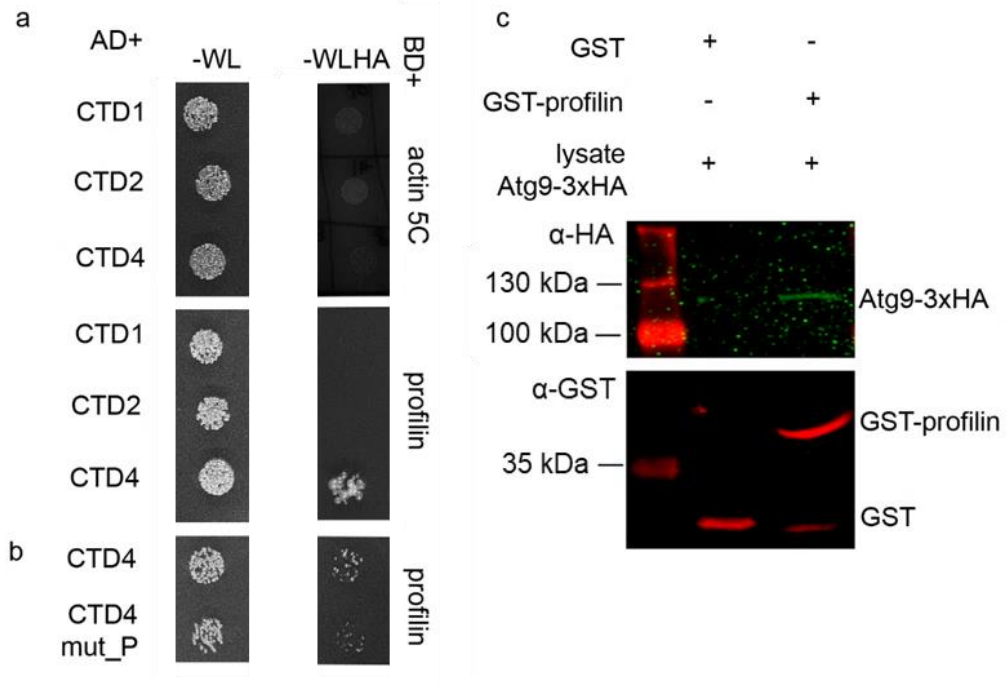
4. 4. 1. Élesztő kettős-hibrid teszt

Ahhoz, hogy tovább erősítsük a genetikai interakciós tesztekben kapott eredményeinket, és megtudjuk, van-e közvetlen kölcsönhatás az Atg9 és a vizsgált két aktin-szabályozó fehérje (Ena, profilin) között, biokémai teszteket is végeztünk. Az élesztő kettős-hibrid teszthez az Atg9 fehérje citoszólikus doménjeit használtuk. A négy darab citoszólikus doménjéből (CTD) a három legnagyobbat választottuk ki: N-terminális domén vagy CTD1 (as 1-117), a CTD2 (as 194-334), és a C-terminális domén vagy CTD4 (as 530-845). A harmadik citoszólikus doménje annyira rövid, hogy nem terveztünk vele vizsgálatot. Megvizsgáltuk a CTD-ek lehetséges interakcióját három különböző faktorral: actin 5C, Ena és profilin. Az aktin 5C egyik Atg9 CTD-nel sem mutatott interakciót. Azonban az CTD1 az Ena-val gyengén, a CDT4 pedig a profilinnel erősebben hatott kölcsön (22. a, 23. e ábrák). Ismert az irodalomból, hogy a profilin prolin-

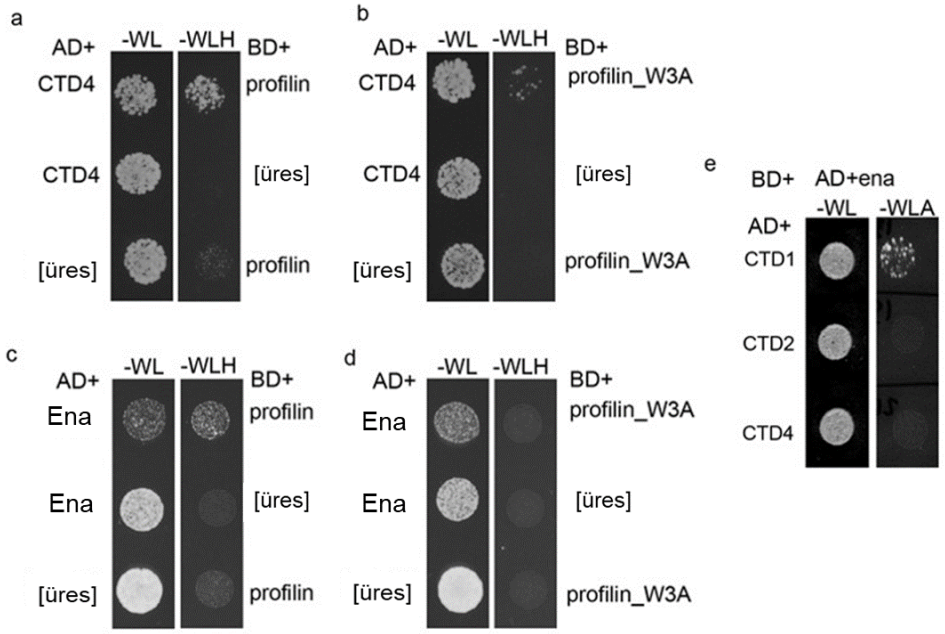
gazdag régiókhoz kötődik (prolin-gazdag motívumok). Létezik néhány jól definiált prolin-motívum, amely ligandumként szolgálhat a profilin számára [117]. Ilyen motívum a PPXPP, és a PXXP is, ahol P a prolinokat, X pedig bármilyen, nem meghatározott aminosavat jelöl. Megvizsgáltuk az *Atg9* mindhárom CTD-jét, találunk-e benne prolin-gazdag régiót. A CTD2-ben egy 'PGSP', a CTD4-ben pedig egy 'PPRPPAAP' motívumot találtuk, melyekben felismerhetőek a fentebb említett motívumok. Az élesztő kettős-hibrid kísérletek első eredményeire támaszkodva, miszerint az CTD4 kölcsönhat a profilinnel, a továbbiakban a CTD4-re koncentráltunk. A vizsgált aminosav szekvencia a CTD4-en belül tehát a következő volt: PPRPPAAP (21. ábra). Ebben a motívumban a prolinokat alaninra cseréltük (P->A), aminek következtében az új szekvencia AARAAAAA lett, az új szekvenciát tartalmazó alternatív CTD neve pedig 'CTD4 mut_P' lett. Megismételtük az élesztő kettős-hibrid tesztet kontrollként használva az eredeti, vad típusú CTD4-t és azt tapasztaltuk, hogy bár látványosan lecsökkent az interakció erőssége a profilin és az új CTD4mut_P között, teljesen mégsem szűnt meg (22. b ábra). Ez az eredmény azt mutatja, hogy az általunk választott prolin-gazdag motívum hozzájárulhat a profilin és az Atg9 kötődéséhez, azonban nem kizárólagosan felelnek a kötésért. Irodalomban leírtak olyan precedenst, amikor az Ena egy hosszabb, prolinban gazdag szakaszán található 8 prolint alaninná mutálták, és még abban az esetben sem szűnt meg teljesen a kölcsönhatás a profilin és az Ena között [113].



21. ábra. Az Atg9 fehérje sematikus ábrázolása a PPRPPAAP motívum jelölésével. Bal oldalon az N-terminális végtől indulva piros téglalapok jelzik a négy citoszólikus doméneket 1-4. Piros függőlegesen csíkozott szakasz jelzi a negyedik citoszólikus domén prolin-gazdag motívumát.



22. ábra. Az Atg9, az aktin és a profilin interakciójának vizsgálata élesztő kettős-hibrid rendszerben. Az interakció vizsgálata aktin 5C és az Atg9 citoszólikus doménjei (a), CTD4 és a profilin (a), valamint a CTD4 mut_P között (b). GST pull-down teszt adult nőstényekből készült teljes fehérje mintából származó Atg9 és rekombináns GST-profilin közötti interakció kimutatására (c).



23. ábra. Az Atg9 citoszólikus doménjei, az Ena és a profilin interakciójának vizsgálata élesztő kettős-hibrit rendszerben. Az interakciók vizsgálata CTD4 és profilin (a), profilin_W3A (triptofán->alanin csere) és a CTD4 (b), az Ena és a profilin (c), az Ena és a profilin_W3A (d) és a CTD1 és az Ena között (e). Az [üres] felirat minden esetben az interaktor szekvenciát nem tartalmazó vektort jelöli (kontroll).

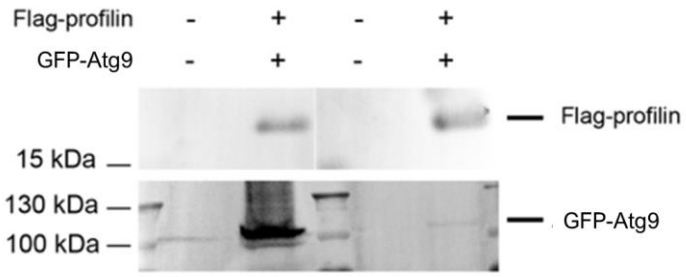
Az élesztő kettős-hibrid tesztet megterveztük a profilin oldaláról olyan módon, hogy a profilin prolin-gazdag régihóz való kötődését igyekeztünk megszüntetni. A profilin, habár méretét tekintve kicsi fehérje, aminosav szekvenciája kismértékű azonosságot mutat az egyes organizmusok között. A *Drosophila* profilin a humán profilin 1-gyel (PFN1) 40%-os, az egér profilin 1-gyel 46%-os, a szarvasmarha profilinnel 43%-os homológiát mutat. Ennek ellenére sikerült az irodalom alapján megtalálni azt a konzervált aminosavat, amely felelős a prolin-gazdag régiók kötéséért. Ez az aminosav a hármas triptofán (W3) [150]. Kicseréltük ezt a triptofánt alaninra (W3A) és élesztő kettős-hibrid rendszerben teszteltük a mutáns profilin (profilin_W3A) kötődési képességét Ena-hoz és Atg9-hez. Az Ena-val teljesen megszűnt a kötődés (23. c, d ábra) és az Atg9 negyedik citoszólikus doménjével is gyengült az interakció (23. a, b ábra). Ezzel a kísérlettel igazoltuk, hogy az irodalomból ismert prolin-gazdag régió kötéséért felelős konzervált triptofán felelős muslicában is a prolin-gazdag szekvenciák kötéséért, és bár az Atg9 más peptidszekvenciái is felelősek lehetnek a kötés létrejöttéért, de a konzervált triptofán elsődleges szerepet tölthet be az interakcióban. Ezzel magyarázható az a jelenség, hogy kolokalizációs tesztjeinkben miért nem találtunk Atg9-Ena-profilin hármas-pozitív struktúrákat, hiszen eredményeink alapján az a következtetés vonható le, hogy a profilin egyazon szakaszán osztozhat az Ena és az Atg9, tehát vagy az Ena-hoz, vagy az Atg9-hez kötődik. Eredményeink arra nem adnak választ, hogy az Atg9 képes-e mindkettő aktin szabályozó faktort, az Ena-t és profilint egyszerre kötni.

4. 4. 2. Az Atg9 és a profilin interakciójának bizonyítása ko-immunprecipitációval és GST pull-down technikával

A GST pull-down olyan *in vitro* eljárás, amelyben baktériumokban megtermelt GST címkével fúzionált rekombináns fehérjét Glutathione-Sepharose oszlopra kötöttük fel (immobilizálunk) és vizsgáljuk egy másik, oldatban lévő fehérjével a kölcsönhatását. Fizikai kölcsönhatás esetén a GST-fúziós fehérje megköti az interakciós partnerét, így az szintén az affinitás mátrixon marad (immobilizálódik). Ebben az esetben az eluálási lépést követően a GST-kötött és az interaktor fehérjét is le tudjuk mosni a gyöngyökről kis térfogatú elegybe, amelyből pl. Western blot segítségével kimutatható az GST-fuzionált csali és az interaktor fehérjék jelenléte is. Kísérletünkben a GST-profilin rekombináns fehérjét alkalmaztuk csali fehérjeként, az Atg9-3xHA fehérjét, mint feltételezett interaktort pedig nőstény muslicák teljes fehérje lizátumából nyertük. A többszörös transzmembrán tulajdonsága miatt az Atg9-et nagyon nehéz lett volna baktériumokban megtermelni és tisztítani, ezért választottuk az általunk létrehozott *Atg9*-3xHA transzgenikus, menekítő muslica törzset, mint forrást. Eredményeink alapján a

profilin GST címkéje specifikusan az oszlophoz kötötte a profilint, ezt az immunoblot képen a megfelelő magasságban (~40 kDa) megjelent GST-profilinnak megfelelő specifikus jel (csík) jelezte. Interakciót is detektáltunk az Atg9 és a profilin között, ugyanis HA címkére specifikus ellenanyaggal a Atg9-3xHA is kimutatható volt a várt mérettartományban (~110 kDa) (22. c ábra). Eredményeink erősítették *in vivo* megfigyelésünket, mely szerint az *Atg9* kölcsönhatásba lép az aktin hálózat szabályozásáért felelős egyik faktorral, a profilinnel. Megjegyzendő, hogy bár az Atg9-et specifikusan kimutattuk a GST-profilin által „kifogott" fehérjék között, azonban az Atg9 teljes fehérje lizátumból származott sok más fehérje mellett, így nem zárható ki, hogy a profilin az Atg9-et közvetve, más fehérjével komplexben „húzta" ki. Ennek tisztázására rekombináns Atg9 megtermelésére és tisztítására lenne szükség, azonban e projekt keretei között erre sajnos nem volt lehetőségünk.

Ko-immunprecipitációval szintén kimutattuk a kölcsönhatást az Atg9 és a profilin között. Ebben az esetben UASt-Flag-*chic* (profilint túltermelő) transzgenikus muslicákat kereszteztünk UASp-GFP-*Atg9* transzgenikus muslicákkal, utódjaikat pedig mindkét transzgénre egyszerre szelektáltuk. Mindkét transzgén expresszióját tub-Gal4 driverrel indukáltuk, majd a nőstényekből 3-5 naposan teljes fehérjemintát izoláltunk és a Flag címkével ellátott profilint immobilizáltuk Flag címkére specifikus gyöngyök felszínén, melyen keresztül az Atg9 is kikötődött a profilinen keresztül a gyöngyökre (24. ábra), igazolva ezzel, hogy *in vivo* a profilin és az Atg9 egy komplexben helyezkedik el a nőstényekben.

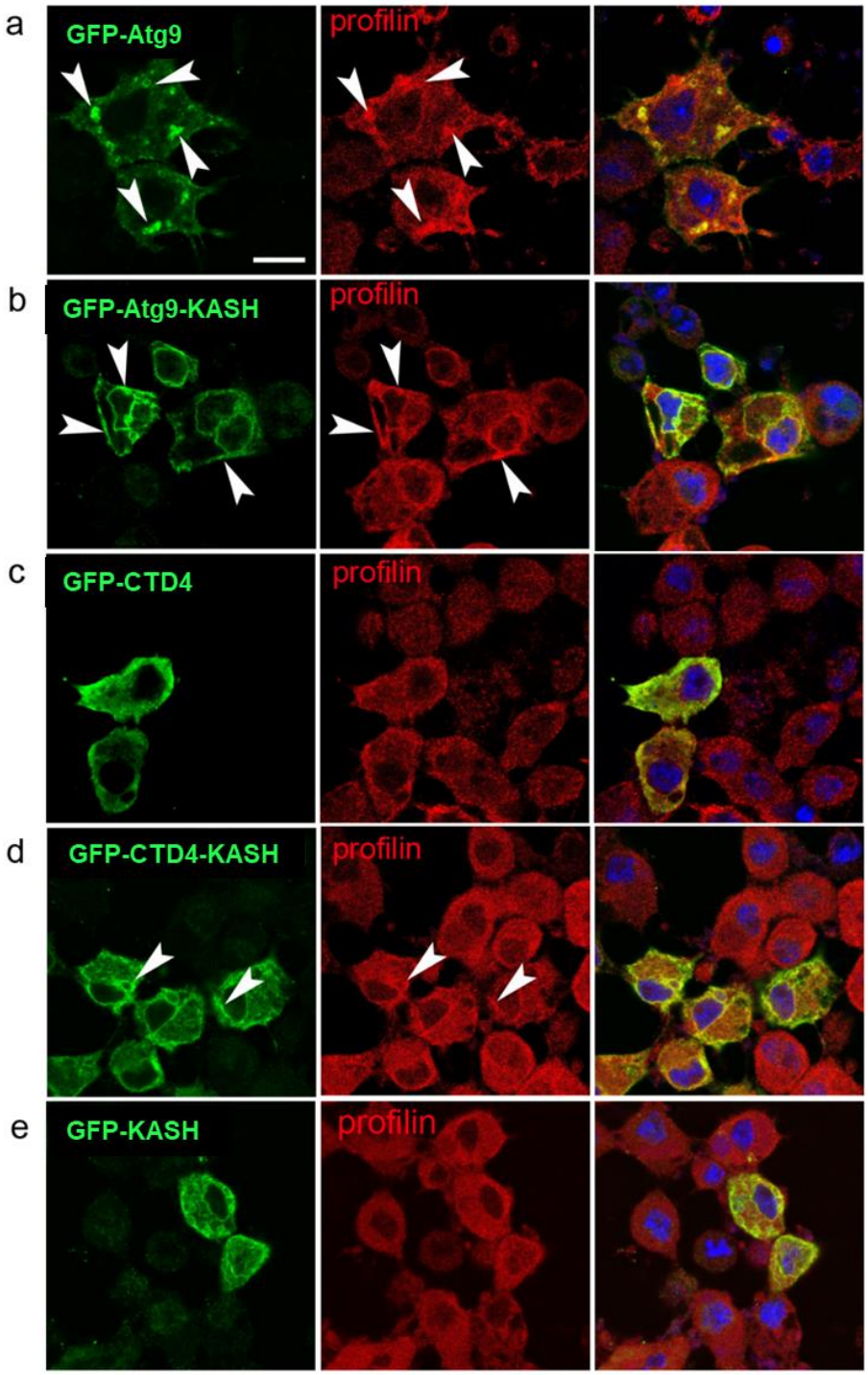


24. ábra. Az Atg9 és a profilin interakciójának vizsgálata ko-immunprecipitációval. A bal oldali panelen az 'input', gyönggyel nem találkozott minták, a jobb oldalin a Flag-specifikus gyöngy által kihúzott Flag-profilin és a profilinnel interakcióban álló Atg9 (GFP-Atg9) által adott jelek (csíkok) láthatóak.

4. 5. Az Atg9 és az aktin regulátorok kapcsolata *in vitro* rendszerben - *Drosophila* S2 sejtes kísérletek

Az élesztő kettős-hibrid tesztek során kapott eredmények arra világítottak rá, hogy az Ena és a profilin az Atg9 két egymástól eltérő citoszólikus doménjéhez kötődnek, továbbá

igazoltuk, hogy az Atg9 és a profilin egy komplexben van jelen. Szerettünk volna olyan kolokalizációs tesztet kidolgozni, amelyben azt is tudjuk igazolni, hogy az Atg9-nek csak az adott citoszólikus doménjének a jelenléte elegendő ahhoz, hogy az aktin szabályozó faktorokkal kötődjön. Ezt a kolokalizációs tesztet *Drosophila* S2 sejtekben végeztük el. Úgy terveztük meg a kísérletet, hogy egy olyan sejtalkotóhoz „irányítottuk" az Atg9-et, valamint a CTD1 és CTD4 szakaszokat, amely membránnal határolt és normál esetben nem az Atg9 helye a sejtben. Ilyen sejtalkotó a külső magmembrán. Ismertek az ún. KASH-domén fehérjék, amelyeknek mindössze kettő képviselője van *Drosophila*-ban, a Klarsicht és az Msp-300. A KASH domén felelős a fehérjék magmembrán-lokalizációjáért. Vizsgálatainkban az Msp-300 fehérje szekvenciáját használtuk, amely 13481-13540 bázispárjai között tartalmazza az 56 aminosav hosszúságú KASH domént. Ezt a KASH domént PCR reakció segítségével "emeltük ki" a muslica genomból, majd hozzáépítettük a teljes hosszúságú GFP címkével fúzionált *Atg9*-hez, valamint a CTD1 és CTD4 szakaszokhoz is külön-külön. A CTD1 és CTD4 szakaszokat is elláttuk GFP címkével. Kontrollként GFP címkével megjelölt KASH domént használtunk, hogy igazoljuk, hogy az aktin regulator fehérjék nem magához a KASH doménhez kötődnek. Első körben a teljes hosszúságú *Atg9*-cel (GFP-*Atg9*) transzfektáltuk a sejteket. Immunfestéssel tettük láthatóvá a profilint és a GFP címkét. Kíváncsiak voltunk, hogy látunk-e erős kolokalizációt az Atg9 és az aktin-regulátorok között. Az Atg9 nagyon határozott plazmamembrán-lokalizációt mutatott, valamint apró vezikulákat, membránhatárolt struktúrákat is kijelölt a citoplazmában, de egyáltalán nem volt jellemző magmembránba történő beépülése. (25. a ábra). Jellemzően az endogén profilin követte a teljes hosszúságú Atg9 által mutatott mintázatot, mind a plazmamembránban, mind pedig a kisméretű citoplazmikus struktúrákban (vezikulák). Amikor az Atg9 KASH doménnel rendelkezett, nagy mennyiségben halmozódott fel a magmembránban és a perinukleáris régióban, az endogén profilinnel együtt (25. b ábra). Az GFP-CTD4 túltermelése inkább egy homogén eloszlást mutatott a sejtekben, ritkán apró, citoszólikus struktúrákban is felhalmozódott, azonban a profilinnel, amely szintén homogén eloszlású a sejtekben, nagymértékű kolokalizációt mutatott (25. c ábra). A KASH doménnel a megmembránba kényszerített CTD4 jelentős mennyiségű profilint toborzott magához (25. d ábra). A kontrollként használt szimpla GFP-KASH domén nem kötött nagyobb mennyiségű profilint a magmembránhoz (25. e ábra). A transzfektált sejteket α-Ena ellenanyaggal is megfestettük, azonban az α-Ena ellenanyagunk minden esetben olyan nagy hátteret adott, hogy nem tudtunk biztonsággal Ena-ra specifikus jelet detektálni. Ebből adódóan nem tudtuk igazolni, hogy az Atg9 az Ena-val hasonló kapcsolatban áll, mint a profilinnel ugyanebben a rendszerben.



25. ábra. Az Atg9 lokalizációjának hatása a profilin lokalizációjára *Drosophila* S2 sejtekben. A GFP-Atg9 S2 sejtekben a plazmamembránban és kis citoplazmikus, vezikulaszerű struktúrák membránjában van jelen, mintázata jelentősen átfed a profilinnal (a, fehér nyilak). A KASH-doménnel fúzionáli GFP-Atg9 a külső magmembránban is megjelenik, vele együtt a profilin is felhalmozódik a külső magmembrán környékén (b, fehér nyilak). GFP-CTD4-nel transzfektált sejtekben az zöld jel homogénné válik, mely átfed a profilin szintén homogénné váló mintázatával (c). GFP-CTD4-KASH azonban erősen a külső magmembránban lokalizálódik, jól detektálhatóan a profilin is erősebb külső magmembrán lokalizációt mutat (d, fehér nyilak). A kontroll GFP-KASH bár kijelöli a külső magmembránt, a profilin homogén jelet ad (e).

Drosophila S2 sejtes kísérletünk és az interakciós tesztek eredményeiből összességében elmondhatjuk, hogy az Atg9 kötődik a profilinhez, az Ena-val a kölcsönhatást pedig csak élesztő kettős-hibrid rendszerben igazoltuk. Igazoltuk azonban, hogy *Atg9* hiányában az Ena-nak jelentősen megváltozik a lokalizációja, bizonyítva az *Atg9* és az *ena* közötti kölcsönhatás meglétét. S2 sejtekben az Atg9 befolyásolja a profilin lokalizációját, amelyhez elégséges feltétel a CTD4, vagyis az Atg9 C terminális doménjének jelenléte.

4. 6. Az *Atg9* aktin szabályozással összefüggő szerepe testi eredetű sejtekben

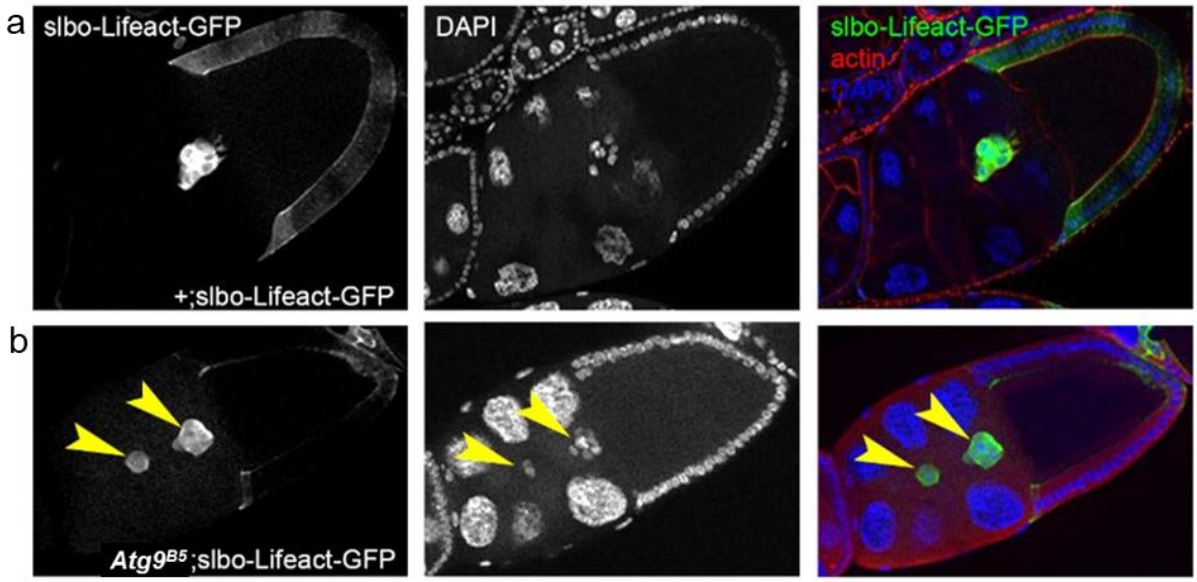
4. 6. 1. A határsejt klaszter vándorlásának vizsgálata

A muslica petefészek fejlődésében fontos szerepet töltenek be a testi, epitéliális eredetű follikuláris sejtek, melyek nélkülözhetetlen funkciókkal bírnak a petefejlődés során. Ezek egyik típusa a már a bevezetőben jellemzett határsejtek (border cell), melyekből petekamránként 6-10 darab van jelen a follikuláris sejtek rétegében. Szigorúan szabályozott nyúlványnövekedés segítségével a határsejtek képesek a dajkasejtek között vándorolni és meghatározott idő alatt a petekamra anterior végéből a petesejt anterior határához érni. A vándorlás a 9. stádiumban indul és a 10. stádium végére fejeződik be. A nyúlványnövekedés és azok gyors változása dinamikus sejtváz átrendeződéssel jár, jellemzően az aktin sejtváz fel-, le- és újjáépülése révén valósul meg. Eddigi eredményeink igazolták, hogy az *Atg9* szerepet játszik az aktin citoszkeleton szabályozásában ivarvonal eredetű dajkasejtekben, így kíváncsiak voltunk arra, hogy az *Atg9*-nek van-e hasonló szerepe testi sejtekben is. Megvizsgáltuk a határsejtek vándorlását és a határsejtek csoportjának (klaszter) a változásait a vándorlás folyamán (26. ábra). Azt figyeltük meg, hogy *Atg9* mutáns petekamrákban a klaszter gyakrabban maradt le és nem érte el a petesejt anterior határát, valamint igen gyakorta a sejtek szoros összetartása sem valósult meg (sérült a klaszter-integritás), egy-egy sejt elszakadt a csoporttól (26. b ábra), és az is előfordult, hogy teljesen más irányba folytatta a vándorlást, eltévedt. A határsejtek nyomonkövetésére egy *slbo* promóterrel ellátott Gal4 drivert használtunk, amely kombinálva volt egy ún. Lifeact-GFP jelölő fehérjével (slbo-Lifeact-GFP). Ez a jelölés azért különösen alkalmas a határsejtek kijelölésére, mert a Lifeact-GFP, ahogy a neve (Life actin) is mutatja valós időben képes az aktin hálózat dinamikus változásait megjeleníteni (live imaging).

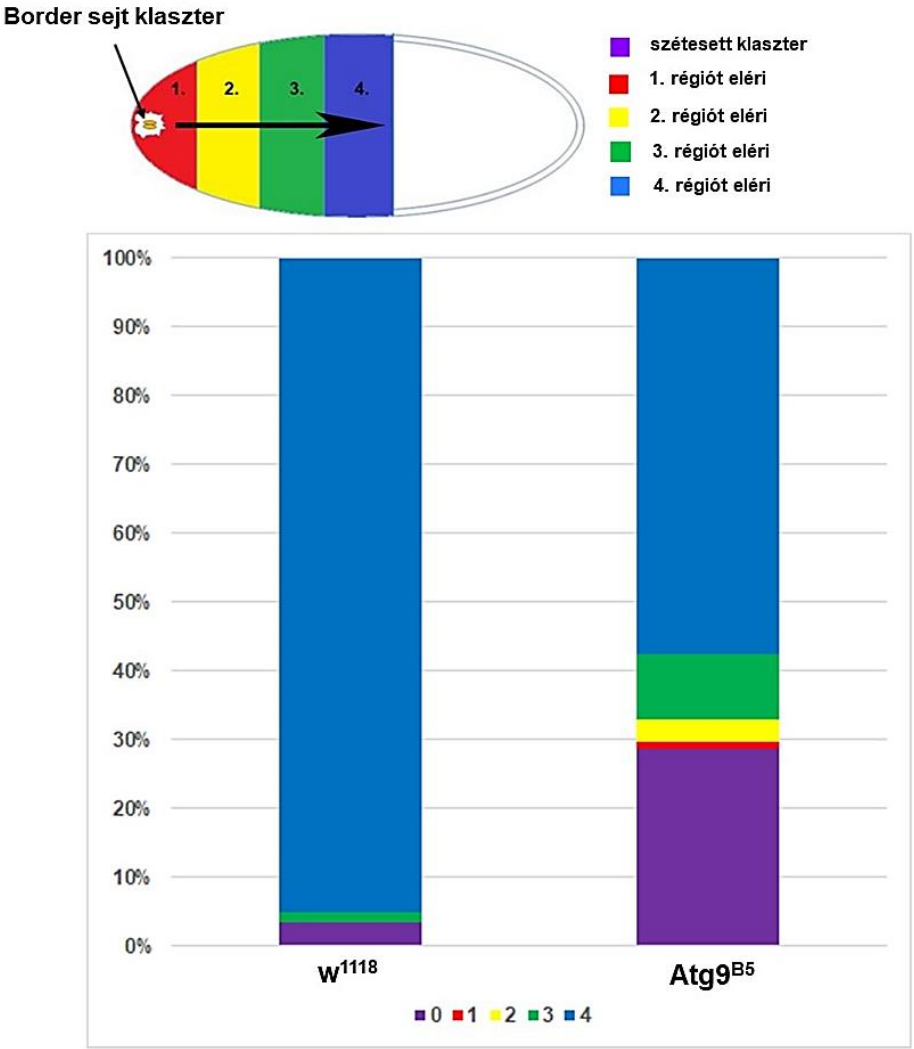
A vándorlási defektusok osztályozására az irodalomból már ismert kategóriákat alkalmaztuk, melyek azt jellemzik, hogy a 10. stádium végére meddig jutott el a határsejtek csoportja [151]. Ezzel a módszerrel 1-4-ig osztályoztuk a vándorlási fenotípust vad típusú kontrollban és az $Atg9^{B5}$ mutánsban (27. ábra). Továbbá bevezettünk egy újabb kategóriát, a

nulladikat (0.), ami a klaszter szétesését jelentette, mely esetben egy-egy sejt elszakadt a fő csoporttól (26. b ábra, 27. ábra). *Atg9* hiányában a határsejt klaszterek több, mint 50%-a a megfelelő időben érte el a petesejt anterior határát. Jelentős növekedést figyeltünk meg 2. kategóriában ($p<0,05$), a 3. és 4. kategóriákban ($p<0,001$), valamint az újonnan bevezetett 0. kategóriában is ($p<0,001$) összehasonlítva a kontrollal. Kontrollként a csak *slbo*-Lifeact-GFP transzgént egy kópiában hordozó nőstények petekamráit használtuk. Ezzel a kontroll petekamrákban is láthatóak voltak a határsejtek, valamint önmagában a transzgén vándorlást-befolyásoló hatását is figyelembe tudtuk venni a vézsgálat során.

Összességében az *Atg9* hiányos petekamrának mintegy 43%-a mutatott enyhébb vagy súlyosabb vándorlási problémát. Figyelembe véve, hogy az *Atg9* hiánya mind csíra-, mind testi sejtekben okoz termékenységgel kapcsolatos defektusokat, nem zárható ki, hogy az *Atg9* hiányában fellépő csökkent termékenység nem egy mechanizmus hibájából adódik, hanem több defektus hatásának összeadódása okozza.



26. ábra. A határsejt klaszter vándorlása vad típusú és *Atg9^{B5}* mutáns petekamrákban. A határsejteket specifikusan *slbo*-Lifeact-GFP transzgén segítségével jelöltük meg. A felső három panelen vad típusú határsejtek láthatóak, amint a 10. stádiumban megérkeznek a petesejt anterior határához. Az alsó három panelen látható, hogy *Atg9* hiányában a klaszterről leszakad néhány sejt, melyek lemaradnak (sárga nyilak). Scale bar: 50 µm.



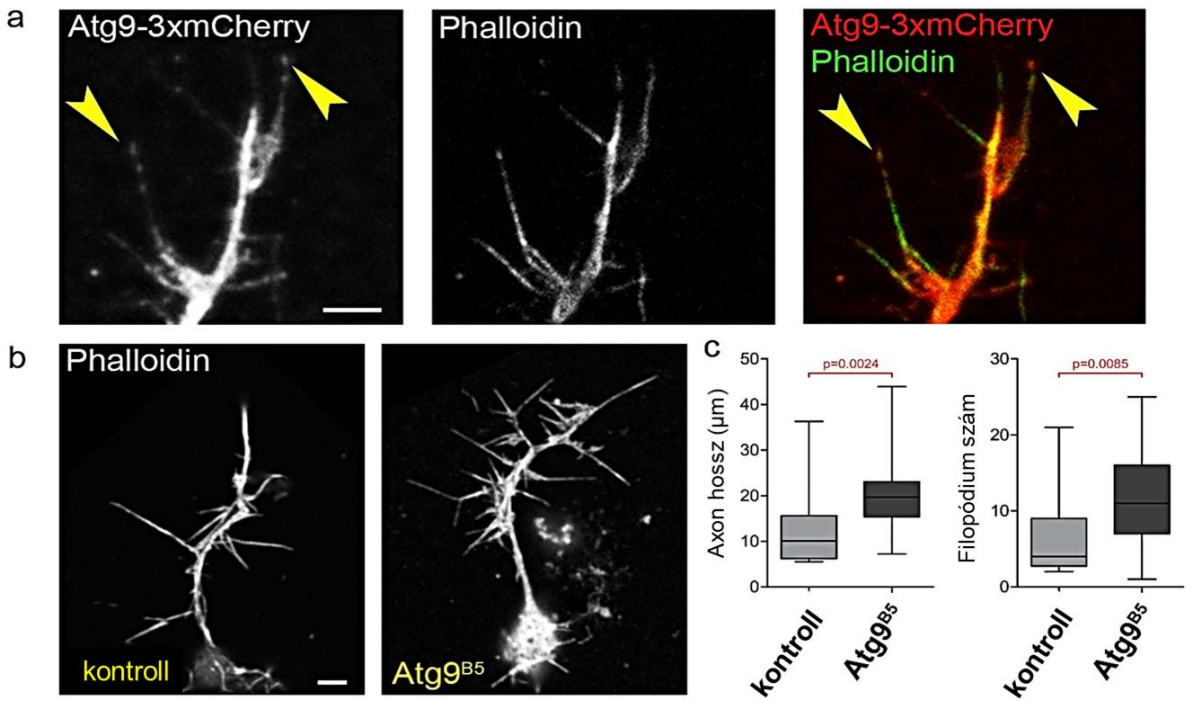
27. ábra. A határsejt klaszter vándorlásának defektusai és azok előfordulása vad típusú és *Atg9^{B5}* mutáns petekamrákban. Fönt egy 9. stádiumos petekamra látható, benne jelölve a határsejtek csoportjának (border sejt klaszter) vándorlásának az iránya, valamint a dajkasejtek által elfoglalt tér 4 részre fölosztva (1-4), kölönböző színekkel kiemelve (piros, sárga, zöld, kék). Attól függően, hogy a 10 stádium végéig melyik színnel jelölt régióban tartózkodik a vándorló sejtcsoport, osztályoztuk a vándorlási defektusokat. A 0. (lila) kategória a szétesett klaszter, tehát, amelyik klaszterről elszakadtak sejtek. Az alsó diagramon látható a vizsgálat eredménye vad- (n=178) és *Atg9^{B5}* mutáns (n=94) petekamrákban. A fenotípus-változás kategóriák előfordulása a vizsgált csoportokban: 0. kategória: kontroll n=6/178 és *Atg9^{B5}* n=27/94, $p<0.001$; 1. kategória: kontroll n=0/178 és *Atg9^{B5}* n=1/94, $p=0.246$; 2. kategória: kontroll n=0/178 és *Atg9^{B5}* n=3/94, $p<0.05$; 3. kategória: kontroll n=3/178 és *Atg9^{B5}* n=9/94, $p<0.001$; 4. kategória: kontroll n=169/178 és *Atg9^{B5}* n=54/94, $p<0.001$. Fisher's exact tesztet használtunk a statisztikai kiértékeléshez.

4. 7. Az *Atg9* szerepének vizsgálata az idegrendszer fejlődésében

4. 7. 1. *Ex vivo* vizsgálat izolált primer embrionális neuronokkal

A *Drosophila* modellben az aktin sejtváz vizsgálatának egyik legjobb rendszere az embrionális központi idegrendszer (central nervous system, CNS). A *Drosophila* embrionális

fejlődése 25°C-on nagyon jól jellemzett, meghatározott ideig tartó stádiumokból áll. Ezekben a stádiumokban a sejtek és szervek fejlődése nagyon szigorúan szabályozott. Az elsőre általunk választott metódus a primer embrionális neuronok *ex vivo* vizsgálata. ~16 órás embriókból izolált neuronokat 4 órán keresztül kultúrában növesztve vizsgálható a neuronok által növesztett axonok és filopódiumok hossza, amelyek az aktin-sejtváz működésének megbízható indikátorai. Az aktin citoszkeleton aktív, folyamatos és szabályozott átrendeződése feltétele az axonok, nyúlványok és filopódiumok fejlődésének. Több tudományos munkában számoltak már be a neuronok növekedésének defektusairól és azok hátterében húzódó sejbiológiai jelenségekről [116][152]. Eddigi eredményeink igazolták azt az elméletet, mely szerint az *Atg9* részt vesz az aktin citoszkeleton szabályozásában a petefészekben és vándorló testi sejtekben (határsejtek) is. Azt feltételeztük, hogy egy háztartási gén, mint az *Atg9* nem szövet-, vagy szervspecifikusan működik, hanem például aktin-szabályozó szerepe a szervezet egészére is kiterjedhet. Mind az *ena*, mind pedig a *chic* kapcsán ismert az idegrendszer sejtjeinek fejlődésében, növekedésében betöltött szerepük [152]. Elsősorban az axonok hosszában, valamint a filopódiumok hosszában és számában írták le szabályozó funkciójukat. A továbbiakban arra a kérdésre fókuszáltunk, hogy az *Atg9* hozzájárul-e az *ena* és/vagy a *chic* által betöltött aktin szabályozó funkcióhoz? Első lépésben ellenőriztük, hogy az Atg9 fehérje jelen van-e a primer embrionális neuronokban. *Atg9*-3xmCherry transzgént használva azt tapasztaltuk, hogy nem csak jelen volt, hanem az axonokban és filopódiumokban húzódó aktin-kötegekkel erős kolokalizációt mutatott, külön kiemelve a filopódiumok növekvő végeit (28. a ábra). Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy Ena nagyon hasonló mintázatot mutat ugyanezen típusú sejtekben [152]. Ezt követően megvizsgáltuk, hogy van-e hatása az *Atg9* hiányának az axonnövekedésre vagy a filopódiumok számára. Kontrollként vad típusú és *Atg5* (*Atg5*^{5cc5}) mutáns embriókat használtunk. Míg az *Atg5* autofág *null* mutáns kontrollban nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a filopódium növekedésben, addig az *Atg9* hiánya jelentősen megnövelte az axonok hosszúságát és a filopódiumok számát (28. b és c ábra). Eredményeink azt igazolták, hogy az *Atg9* autofágia-független módon részt vesz az *ex vivo* differenciáltatott primer embrionális neuronok fejlődése során az axon- és filopódium növekedés szabályozásában.



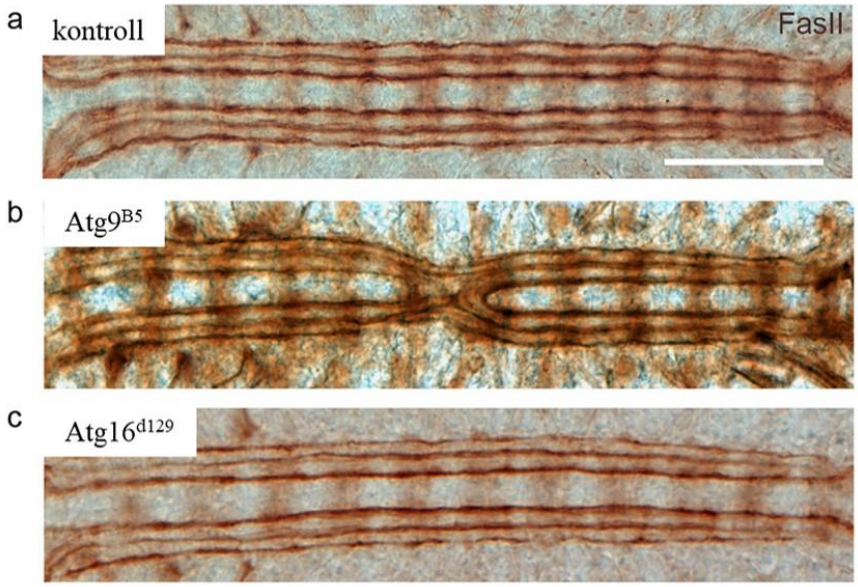
28. ábra. Az *Atg9* hiányának hatása primer embrionális neuronok axon- és nyúlványnövekedésére. Az *Atg9*-3xmCherry a teljes axon és a filopódiumok mentén is megtalálható átfedve a phalloidinnel, továbbá jellemzően a filopódiumok vegében mutat erősebb jelet (sárga nyílfej) (a). *Atg9* hiányában (n=65) jelentősen több filopódiumot növesztenek a primer embrionális neuronok vad típussal (n=121) összehasonlítva (b, c). Ugyanazokat a neuronokat vizsgálva, az *Atg9* hiánya hosszabb axonokat eredményezett a kontrollhoz viszonyítva. Two-tailed, two sampled unpaired T tesztet használtunk a statisztikai értékeléshez. Scale bar: a, b: 10 µm.

4. 7. 2. Az *Atg9* idegrendszerfejlődésben betöltött szerepének vizsgálata *in vivo*

In vivo rendszerben is megvizsgáltuk az *Atg9* hiányának a hatását az idegrendszer fejlődésére. Az embrionális központi idegrendszerben elsősorban az ún. axon-guidance (axon növekedési irány) problémák vizsgálhatóak. Fasciclin II (FasII) ellenanyagos festéssel az embrió hasi oldalán, hosszanti irányban futó, három párhuzamos (átkereszteződés-mentes) ventrális idegköteg jeleníthető meg (ventral nerve chord, VNC). Míg a vad típusú (29. a ábra) és az autofágia mutáns (*Atg16*^{d129}) kontroll (29. c ábra) embriókban nem figyeltünk meg megkereszteződéseket az idegkötegekben, addig az *Atg9*^{B5} mutáns embriók alacsony, mintegy 6,7 %-ában találtunk részleges- vagy teljes megkereszteződést (29. b ábra). Tekintve, hogy az irodalomban nem találtunk példát arra, hogy a van típusú embriók között előfordul akár részleges megkereszteződés, így az *Atg9* mutáns embriók esetében megfigyelt alacsony előfordulási arányt is a statisztikai számítások eredményeinek ellenére szignifikánsnak tekintettük.

Az embrionális idegrendszer *ex vivo* és *in vivo* vizsgálatai rávilágítottak arra, hogy *Atg9*-nek autofágiától függetlenül szabályozó szerepe van az idegrendszer fejlődésében. Mind a

filopódiumnövekedésben, mind pedig az axonnövekedésben igazolódott egy negatív, kontrolláló hatás, hiszen, ha az *Atg9* hiányzik, a filopódiumok száma és az axonok hossza jelentősen megnő. Enyhe, de mérhető hatása van az axon guidance folyamatában is, amely hatás eredményeink alapján szintén független az autofág funkcióktól. Eredményeink összességében azt is igazolják, hogy az *Atg9*, túl a vitathatatlan autofágia funkcióján, nem csak a petefészekben, hanem a *Drosophila* egyéb szereveinek megfelelő működésében, az aktin citoszkeleton szabályozásán keresztül is szerepet játszik a sejtek megfelelő működésének és fejlődésének folyamataiban.



29. ábra. Az *Atg9* hiányának súlyos kifejeződése embrionális központi idegrendszerben. 16. stádiumos embriók FasII festésével látható, hogy míg a vad típusú (n=87) (a) és autofágia mutáns kontroll (*Atg16*^{d129}) embriók (n=101) ventrális idegkötegei párhuzamosak (c), nem kereszteződnek meg, addig az *Atg9*^{B5} mutáns embriókban előfordul (7/104) az úgynevezett középvonali megkereszteződés (b). Scale bar: a-c: 20 µm.

5. Diszkusszió

Az autofágia, mint a sejtek egyik jelentős energianyerő folyamata, számottevő mértékben hozzájárul a sejt- és az egész szervezet normál működéséhez, homeosztázisának fenntartásához. Az élőlények teljes élethossza alatt, tehát az embrionális fejlődéstől egészen a halálig nélkülözhetetlen sejtélettani folyamat. Az autofágia szabályozását konzervált fehérjék (Atg fehérjék) jól összehangolva végzik. Számos olyan tudományos bizonyíték létezik, amely arra mutat rá, hogy az Atg fehérjék változatos, sokféle funkcióval bírnak az autofág folyamatok szabályozásán túl is. Egyik példa az *Atg16,* amely ezidáig tisztázatlan mechanizmus szerint szerepet játszik a gyulladásos bélbetegségek kialakulásának megakadályozásában [47]. Az *Atg12* és az *Atg3* a mitokondriális homeosztázis fenntartásában és szabályozásában vesznek részt [48]. Az autofág fehérjék egyetlen ismert transzmembrán doménnel rendelkező tagja, az Atg9 hozzájárul a JNK útvonal aktiválásához azáltal, hogy kötődik a dTRAF2 faktorhoz [44]. Legújabb kutatások szerint az *Atg9*-nek negatív szabályozó szerepe van a Tor kináz aktiválásában, amely a sejtnövekedést serkenti és az autofág folyamatokat gátolja [45].

Munkánkban szintén az *Atg9* autofágiától független funkcióját vizsgáltuk. Kutatásunkhoz az a megfigyelés szolgáltatott alapot, hogy az általunk létrehozott *Atg9 null* mutáció ($Atg9^{B5}$) nem csak az autofágia folyamatát rontotta el (p62 halmozódás), hanem a nőstények termékenységcsökkenését is okozta. Ez utóbbi jelenséget más életképes, autofágia mutáns nőstények (*Atg7*, $Atg16^{d129}$) esetében nem figyeltük meg, tehát a termékenység csökkenése feltehetően független volt az autofágiától. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy az autofágia folyamata szerepet játszik a *Drosophila* petesejt érése során. Barth és munkatársai igazolták, hogy a testi eredetű follikuláris sejtekben az autofágia zavara fertilitáscsökkenéshez vezet abban az esetben, ha az ivarvonalsejtekben az autofág folyamat zavartalan [50]. A szerzők a follikuláris és ivarvonal sejtek közötti jelátviteli folyamatok, mint a Notch, EGFR vagy a JAK/STAT útvonalak felborulásával magyarázták a jelenséget, amely a follikuláris sejtek autofágia zavarából következett. Elméletük azonban nem adott magyarázatot az általunk megfigyelt $Atg9^{B5}$ nőstényeket érintő termékenységcsökkenésre, ugyanis esetükben mind a testi, mind pedig az ivarvonal sejtekben hibát szenvedett az autofágia az *Atg9* mutáció hatás következtében. A jelenség magyarázata további kutatást, vizsgálódást, irodalmazást igényelt.

Megvizsgáltuk az Atg9 elhelyezkedését az ivarvonalsejteken belül, és azt láttuk, hogy kisméretű vezikulák membránjában, és a plazmamembránban helyezkedik el. Ez a megfigyelés egybecseng az emlősökben megfigyeltekkel (emlős Atg9, mAtg9) [31]. Továbbá jelentős Atg9

feldúsulás volt figyelhető a petesejt poszterior pólusán, amely kifejezetten az *osk* mRNS-sel összefüggésbe hozható elhelyezkedés, azonban nem találtunk eltérést az *osk* lokalizációjában *in situ* hibridizációs tesztekben. Eredményeink igazolták továbbá, hogy az Atg9 kis mértékben kolokalizál korai- és késői endoszómákban jelen levő fehérjékkel, az Rab5-tel és a Rab7-tel. A korai endoszóma-specifikus Rab5-ről igazolt, hogy hiányában jelentősen csökken a felnőtt egyedek repülési képessége és termékenysége [153]. Ezek az elváltozások a Rab5 idegrendszeri túltermelésével menekíthető volt, azt igazolva, hogy a termékenységcsökkenés idegrendszeri eredetű volt. Továbbá a Rab5, mint a Rbns-5 (Rabenosyn-5) effektor fehérjéje, szerepet játszik az *osk* mRNS-t szabályozó endoszómális útvonalban [154]. Vizsgálataink azonban nem igazolták, hogy az *Atg9* hiánya hatással van az *osk* mRNS lokalizációjára, és az *osk*-ral összefüggésbe hozható fejlődési rendellenességeket [155] sem tapasztaltunk az $Atg9^{B5}$ petékből fejlődő embriókon, így az *Atg9* és az *osk*, valamint az endoszómális rendszer kapcsolatát nem vizsgáltuk tovább. A jövőben azonban az idegrendszer kapcsán érdemes lehet az Atg9 vezikuláris rendszerben betöltött szerepét kutatni.

Az Atg9 plazmamembrán-lokalizációját megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az Atg9 az aktin kábelek és a membrán találkozásánál kialakuló ujj-szerű megnyúlásokat részesíti előnyben. Érdekesség, hogy az adatok alapján az mAtg9 mindinkább hajlamos a kis membrángörbületeket előnyben részesíteni, ilyenek a tubuláris vagy nagyon kis átmérőjű (30-60 nm) vezikulák [31][156]. A filopódiumok általában a bennük futó aktin filamentumok számától függően elérhetik a 60-200 nm átmérőt is [157] meghajlítva a membránt maga körül. Ez az erős görbület jellemzi a filopódium-szerű aktin-gazdag nyúlványok pozitív végei és a plazmamembrán találkozásánál kialakuló ujj-szerű membránstruktúrákat, melyek a dajkasejtekben is jelen vannak, és amely struktúráknál az Atg9 is detektálható. Elképzelhető, hogy az Atg9 szerkezetéből adódóan támogatja a kis membrángörbületek kialakulását, stabilitását, miközben akár más faktorok (szabályozó és/vagy membránasszociált fehérjék) megfelelő helyre toborzását is végzi. Felmerült bennünk a kérdés, hogy lehetséges-e kapcsolat az *Atg9* működése és az ivarvonal sejtek aktin hálózata között.

Az aktin citoszkeleton kialakulása és szabályozása sokat tanulmányozott jelenség a *Drosophila* ováriumban, zavara pedig képes akár jelentősen csökkenteni a nőstények termékenységét. Igazoltuk, hogy az *Atg9* hiánya feltűnő elváltozásokat okozott a csíravonal sejtek aktin hálózatában. Ismert, hogy a dajkasejtekben a 10. stádium végére jellegzetes, legyezőre emlékeztetető aktin kábel rendszer alakul ki. Ezeknek a kábeleknek a feladata a dumping során a dajkasejt magok pozícionálása és a gyűrűcsatornáktól való távol tartása. *Atg9*

hiányában késve alakult ki a legyező-szerű aktin kábel hálózat, valamint a plazmamembrán stabiltása is sérült, melyet a határolómembránok megszakadása, hiánya jelzett. A határolómembránok integritásának sérülése a kortikális aktin hálózat megváltozásának eredményeként alakulhatott ki [125]. A kortikális aktin hálózat gyengülését indirekt módon is mértük a citoplazmás áramlás vizsgálatával, igazolva, hogy *Atg9* hiányában jelentősen csökken az áramlás sebessége.

Az Atg9 sejtváz szabályozó szerepét - eredményeink alapján - aktin-szabályozó faktorokkal való kötődése által tölti be. Ezek az aktin-szabályozó faktorok az Ena/VASP és a profilin. Igazoltuk, hogy az Atg9 szabályozza mind az Ena (*in vivo* rendszer), mind pedig a profilin lokalizációját (*in vitro* rendszer), hiányában pedig nem képesek maradéktalanul betölteni aktin-szabályozó funkciójukat. Az Ena képes F-aktint és profilint is kötni, így elmondható, hogy az aktin-profilin-Ena komplex kialakulása és megfelelő működése szükségszerű az aktin filamentum növekedéséhez [152]. Eredményeink azt sugallják, hogy az *Atg9* szabályozza az *ena*- és *chic*-függő aktin filamentum növekedést azáltal, hogy interakcióba lép az aktin szabályozó faktorokkal (*ena* és *chic*). Eredményeink igazolták, hogy az Atg9 első citoszólikus doménje (CTD1) az Ena-val, negyedik citoszólikus doménje (CTD4) pedig a profilinnel kapcsolódik. Vizsgálataink során nem igazolódott az a feltevés, hogy a három fehérje egyszerre, egy komplexben helyezkedik el. A hármas komplex hiányát az az eredményünk is támogatja, hogy a profilin harmadik triptofánjának cseréje megszüntette az Ena-val, és gyengítette az Atg9-cel a kötődési képességét. Ez azt sugallja, hogy a profilin vagy az egyik, vagy a másik fehérjéhez képes kötődni, egyszerre a kettőhöz nem. A jövőben érdemes lehet kompetíciós analízissel megerősíteni, vagy kizárni ezt a feltételezést.

Vizsgálataink alapján azonban egyértelmű genetikai interakciót állapítottunk meg az *Atg9* és az *ena*, valamint a *chic* között. Bár $Atg9^{B5}$, *ena* heterozigóta, valamint *chic* heterozigóta petekamrákban ritkán jelentek csak meg egymással fúzionált dajkasejtek a petekezdeményekben, az *Atg9* teljes hiánya mind az *ena*, mind pedig a *chic* heterozigóta háttérrel jelentősen megemelte a fúziók számát és súlyosságát. Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy az *Atg9* hozzájárul a kortikális aktin hálózat integritásának fenntartásához együttműködve az Ena és profilin szabályozó faktorokkal. Figyelembe véve, hogy az Atg9 előnyben részesíti az erős membrángörbületeket, felvetődik az az elmélet, mi szerint hiányában a membrán nem képes stabilan megőrizni a görbületeit, ezáltal az aktin-gazdag nyúlványok instabillá válhatnak, a dumping hatására kialakuló nyomás pedig szétszakíthatja a

dajkasejtek membránját. Ennek vizsgálatára további tesztek, valamint nagyfelbontású elektronmikroszkópos képekre lenne szükség.

Az Atg9 fehérje szubcelluláris mintázata részint átfed az Ena mintázatával, ez az átfedés pedig a membránközeli régiókra korlátozódik elsősorban. Eredményeink továbbá azt is igazolják, hogy az Ena membránközeli lokalizációja függ az Atg9-től. α-Ena ellenagyaggal a kontrollokban tapasztalható membránasszociált és gyűrűcsatorna közeli, pontozott mintázat felbomlik, szinte teljesen meg is szűnik. Ennek mintegy indirekt következményeként tudható be az aktin kábelek kialakulásában tapasztalható késés, valamint a kortikális aktin instabilitása. Megfigyeltük, hogy fehérje szinten csökkent az Ena mennyisége *Atg9* hiányában. Ennek molekuláris magyarázatát nehéz megfejteni eredményeink alapján, azonban lehetséges, hogy a mögötte álló jelenséget a petefészkek állapotában kell keresni. Méretében, habár nem különbözik jelentősen az $Atg9^{B5}$ nőstények petefészke a kontrollokétól, általános jelenség, hogy az 5 napos vagy annál is idősebb nőstényekben kiürülnek a 9-13. stádiumban lévő petekamrák a petefészekből (nem közölt adat). Ezekben a stádiumokban nagyon kifejezett az Ena termelődése, így ezen stádiumok hiánya az Ena szintjének viszonylagos csökkenéséhez vezethet petefészkekből származó fehérjemintákban.

Az aktin citoszkeleton szabályozás egyensúlyának felborulása az idegrendszer fejlődésében is megmutatkozott $Atg9^{B5}$ embriókban. *Ex vivo*, primer embrionális neuron sejtek a normál mértéknél intenzívebb filopódium- és axonnövekedést mutattak. *Atg9* hiányában szabályozatlanabbá válhat az aktin polimerizáció iniciációja, amely jelenség megnövekedett filopódium-számot eredményezhet. Ez a magyarázat az *Atg9* általunk feltételezett restriktív hatását erősíti az aktin sejtváz szabályozásában. $chic^{221}$ embriókból származó primer neuronok estében szintén intenzívebb filopódium-képződést és -növekedést lehet tapasztalni, ellentétben az e*na* mutációval (ena^{23}), ahol a filopódium szám jelentősen csökken a vad típushoz képest [152]. Ez némiképp ellentmond annak az álláspontnak, hogy a profilin az aktin polimerizációt elősegítő faktor. Felmerül hát egy másik lehetséges magyarázat, miszerint a profilin kettős funkcióval bír: egyrészt G-aktin-t köt és biztosítja az aktin-monomer építőköveket az aktin filamentumok növekedéséhez, másrészt negatívan szabályozza a polimerizációt végző formin és az Arp2/3 komplex működését, ezáltal magát az aktin nukleációt [152]. Izgalmas megfigyelés, hogy az $Atg9^{B5}$ embriók esetében is fokozott filopódium-növekedés figyelhető meg, amely megfelel a $chic^{221}$ mutánsokban tapasztaltaknak. Ez arra utalhat, hogy *Atg9* hiányában elsősorban a *chic* funkciója sérül: az a negatív hatás, amely az aktin nukleációját gátolja, vagyis ebben az esetben a filopódium-növekedés kiesik egy restriktív hatás alól. Ez nem csak a

növekedésben, hanem a későbbi embriogenezis során az axonok úgynevezett projekciójában (növekedési irányában) is megmutatkozik. *Atg9* hiányában bár ritkán, de előfordul a középvonali megkereszteződés, ami vad típusú embrióknál nem figyelhető meg. Ez a probléma megközelítőleg az *Atg9*^{B5} embriók 7%-át érinti, megjegyzendő azonban, hogy *chic*^{221} homozigóta embriók esetében is <10% az előfordulása a középvonali megkereszteződésnek [116]. Ez a párhuzam azt sugallja, hogy az *Atg9* hiánya gátolja a *chic* funkciója, eredményezve így a *chic* mutáns embriókra jellemző fenotípust.

A dajkasejtekben az aktin filamentum organizáció hibái, tehát a kortikális aktin hálózatot és az aktin kábeleket érintő problémák csökkent citoplazmás áramláshoz, illetve defektív határsejt vándorláshoz vezetnek. Idegrendszerben az aktin organizáció hibája a filopódiumok és axonok növekedését zavarja meg. Ezek összességében arra utalnak, hogy az *Atg9*, túl a csírasejteken, a teljes szerevezetet (szomatikus- és ivarvonal sejteket) érintő, generális funkcióval bír. Bár vannak bizonyos nyilvánvaló fenotípusok (szőrnövekedési defektusok, háti záródási rendellenességek), amelyek például *chic* transzheterozigóta adultaknál megfigyelhetőek, *Atg9*^{B5} muslicák esetében azonban nem alakult ki. Ez arra enged következtetni, hogy az *Atg9* hatása, habár generálisnak mondható, a szabályozási útvonal korántsem univerzális. Lehetséges magyarázat, hogy az aktin citoszkeleton kialakulása méginkább bebiztosított, valószínűleg több más (ismert és eddig nem ismert) faktor által is szabályozott folyamat, így bizonyos kontextusban az *Atg9* hiánya nem elegendő a fenotípus kialakulásához. Joggal merül föl a kérdés, hogy mi is az oka tehát annak, hogy *Atg9* hiányában olyan erősen csökken a nőstények fertilitása. Erre eredményeink alapján pontos választ nem tudunk adni, de annyi bizonyos, hogy mind az ivarvonal sejtek, mind a petefészek működésének szabályozását végző neuronhálózat mutatja az aktin citoszkeleton kialakulásának rendellenességeit, így nem zárhatjuk ki, hogy a hatások összeadódásának eredménye a drasztikusan lecsökkent pete- és utódszám.

Korábbi munkák igazolták, hogy az Atg9 negyedik citoszólikus doménje (tulajdonképpen a C-terminális doménje), amely - eredményein alapján - a profilinnel hat kölcsön, immár egy többszörösen kölcsönható domén, ugyanis korábbi tanulmányokban igazolták, hogyaz Atg9 C-terminális a kötődik a dTRAF2 [44], a ’tight junction’ komponens Patj és a Tor kináz inhibitor TSC2 proteinekhez [45]. Érdekes tény, hogy emlősökben az Atg9-nek két izoformája létezik: Atg9A és Atg9B. Míg az Atg9A gyakorlatilag minden sejtben expresszálódik, addig az Atg9B (APG9L2) nagyobb mennyiségben elsősorban a placentában és az agyalapi mirigyben jelenik meg [158]. Az mAtg9B egy kevéssé vizsgált gén, azonban egyes

kutatások felfedték további szövetekben is a jelenlétét, és kimutatták a gyomor- és vastagbél daganatok kialakulásában betöltött szerepét az autofágia szabályozásán keresztül [159]. Az mAtg9A-ról sokkal több információ áll rendelkezésre, az autofágia folyamatával kapcsolatosan számtalan tanulmányban szerepel, illetve az mAtg9B-hez hasonlóan szintén a vastagbél daganatok vonatkozásában szerepel kutatásokban [160][161]. Összességében azonban elmondható, hogy sem az mAtg9A-t, sem az mAtg9B-t ezidáig kísérletesen nem hozta összefüggésbe egyetlen tanulmány sem az aktin citoszkeleton szabályozásával emlős rendszerben. Mindezen megállapítások azt mutatják, hogy az *Atg9* kutatásában vannak még olyan területek, amelyek felfedezésre várnak, talán autofágia-független folyamatokban is sikerül a jövőben kimutatni a szerepüket. A jövőbeli vizsgálatok pontosabb választ adhatnak az *Atg9* aktin-szabályozásban betöltött szerepére akár magasabbrendűekben is.

Többekkel együtt a mi eredményeink is igazolják, hogy az *Atg9*-nek számos, az autofágia folyamatának szabályozásán kívüli funkciója létezik, azonban szinte biztos, hogy ez a sor még folytatódni fog, alapjául szolgálva újabb és újabb kutatásoknak. A jövőben további autofágia génről derülhet még ki, hogy más élettani folyamatokban is fontos szerepet tölt be. Lévén, hogy a legtöbb Atg génnek a homológjai megtalálhatóak magasabbrendű szervezetekben, így az emberben is, az Atg gének a jövőben akár humán betegségek vizsgálatánál is szóba kerülhetnek, legyen szó alap- vagy akár klinikai vonatkozású, alkalmazott kutatásokról.

6. Saját hozzájárulásom a munkához

Doktori értekezésemben közölt eredmények jelentős része saját munkám, amelyet kiegészített, megerősített és támogatott közreműködő munkatársaim munkája és eredményei. Az alábbi kísérletek és eredmények saját munkám nyomán születtek:

- az *Atg9*^{B5} mutáció molekuláris módszerekkel történő igazolása;
- az UASp-*Atg9*-3xmCherry plazmid és transzgenikus legyek létrehozása, valamint az UASp-GFP-*Atg9* plazmid létrehozása;
- a *Drosophila* S2 sejtek transzfekciójához használt plazmidok létrehozása;
- a fertilitásvizsgálatok;
- a petegyűjtés és fotózás a dumpless fenotípus igazolására;
- a dolgozatban szerepló összes sztereomikroszkóppal készült felvétel és az ahhoz szükséges preparációk elkészítése;
- a citoplazmás áramlás méréséhez szükséges boncolás és a mikroszkópos felvételek elkészítése;
- a CLEM előkészítésekor a petefészkek preparálása, a lowicryl blokkok faragása és metszetek készítése;
- a CLEM utómunkálatai közül a fluoreszcens felvételek és a 3D elektrotomogramok egyesítése;
- a dolgozatban szereplő összes Western blot;
- a ko-immunprecipitációs kísérletek;
- az dolgozatban szereplő petekamra immunhisztokémiai festések, valamint az ezekről készült mikroszkópos felvételek, kivéve a 10. d-f ábrák (Maruzs Tamás nyomán);
- az összes határsejt vándorláshoz kapcsolódó kísérlet;
- a genetikai kölcsönhatásokat bemutató kísérletekben a megfelelő genotípusú legyek létrehozása, valamint a dajkasejtfúzió és gyűrűcsatornák számlálása, a kapott adatok feldolgozása;
- a primer embrionális neuronok immunfestése és mikroszkópos felvételeik;
- az embrionális CNS vizsgálatokhoz az embriók gyűjtése és immunfestése
- a *Drosophila* S2 sejtes kísérlet eredményeit ábrázoló mikroszkópos képek.

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megragadni az alkalmat, hogy kifejezzem mindazoknak hálás köszönetemet, akik állhatatos munkával, kitartással, hittel és bizalommal segítették doktori tanulmányaimat, és ezen dolgozat elkészítését. Mindenekelőtt köszönet illeti témavezetőmet, Prof. Dr. Juhász Gábor egyetemi tanárt, aki doktoranduszi éveimet követően, egy sikertelen PhD munkát magam mögött hagyva esélyt adott csoportjában az újrakezdéshez, helyet biztosított csapatában és segített, hogy ezúttal végig is járhassam a PhD fokozat megszerzéséhez vezető rögös utat. Továbbá köszönöm a támogató hozzáállását szakmai utamhoz az SZBK Genetikai Intézet igazgatójának, Dr. Erdélyi Miklósnak.

Hálás és derűs szívvel gondolok munkatársaimra, akikben a kezdetektől kezdve nemcsak kiváló szakemberekre, munkatársakra, de igaz barátokra is leltem, akik nélkül ma sem szakmailag, sem emberileg nem lennék az, aki vagyok. Külön kiemelem Varga Kata, Simon-Vecsei Zsófia, Maruzs Tamás és Jipa András munkatársaimat, hiszen barátságuk és kitartó, hitteljes segítségük nélkül ma nem írhatnám e gondolatokat a doktori dolgozatom zárósoraiként. Hálás vagyok Ürmösi Adélnak, aki mindig szórakoztatóvá és értékessé tette számomra a napokat, és mindig készen állt segíteni, legyen szó munkáról vagy magánéletről, hétköznap vagy hétvégén.

Hálásan gondolok a European Molecular Biology Organization (EMBO)-ra, amiért egy három hónapos ösztöndíjjal biztattak egy rövidebb projekt németországi elvégzésére. Egyúttal köszönetemet fejezem ki befogadó csoportom vezetőjének, Dr. Anne Ephrussi-nak és munkatársának, Dr. Gáspár Imrének, a heidelberg-i European Molecular Biology Laboratories (EMBL) munkatársainak a sok támogatásért és tanácsokért, az *oskar* mRNS vizsgálatokhoz biztosított ellenanyagokért és muslica törzsekért. Szintén itt fejezem ki köszönetemet Dr. Paolo Ronchi-nak, szintén az EMBL munkatársának a sok vidám pillanatért, illetve a nélkülözhetetlen segítségért, támogatásáért és az óriási fejlődési lehetőségért az elektronmikroszkóppal végzett kísérleteim során.

Köszönöm Szabad János tanár úrnak az elkötelezett munkáját, támogatását és felbecsülhetetlen értékkel bíró tanácsait, melyek nélkül szintén nem készülhetett volna el ez a munka. Köszönöm Dr. Mihály Józsefnek és munkatársainak, Dr. Szikora Szilárdnak és Dr. Földi Istvánnak a muslica idegsejtekkel végzett munkában nyújtott segítségüket, szakmai tanácsaikat! Köszönöm a szakmai támogatást és segítséget Dr. Vilmos Péternek és csoportjának, külön megköszönve Bajusz Csabának a sejtesmunkákban nyújtott készséges segítségét. Hálás vagyok Dr. Erdélyi Miklós csoportjának, kiemelve Dr. Jankovics Ferencet és Ugrainé Szatmári Margitot, akik

mindig szívesen segítettek, legyen szó légymunkáról, immunfestésről vagy csak egy szakmai tanácsról. Köszönöm a Genetikai Intézet munkatársainak, mind a szakmai hátteret, mind pedig a derűs munkavégzéshez szükséges légkört. Külön kiemelem a gazdasági iroda munkatársait, Abonyi Tündét és Ördög Edinát, akik szakértelmükkel nem ismertek lehetetlent.

Köszönöm a lehetőséget a fokozatszerzésre a Szegedi Tudományegyetemnek és Biológia Doktori Iskolának, köszönöm a színvonalas oktatást és a professzionális szakmai hátteret, amely nélkül sem egyetemi-, sem posztgraduális tanulmányaim nem valósulhattak volna meg ilyen magas színvonalon.

Köszönöm a segítséget Dr. Sinka Ritának, aki szakmai tanácsokon túl ellenanyagokkal is segítette munkámat. Kiemelem, hogy Dr. Sinka Rita jelen dolgozatom szakmai elbírálását is vállalta, amelyért szintén nagyon hálás vagyok. Továbbá másik bírálómnak, Dr. Lipinszki Zoltánnak is szeretném kifejezni köszönetemet, és hogy értékes szakmai kritikákkal illette munkámat.

Hála a BDSC és VDRC központoknak a muslica törzsekért, a DSHB-nak az ellenanyagokért.

Köszönet illeti csoportunk minden tagját, hiszen igen hosszan sorolhatnám, hogy mennyi érdem fűződik mindenkihez, nem csak a doktori munkámhoz köthetően. Asszisztensünk, Szilvi munkájára mindig számíthattam, legyen az legyes- vagy molekuláris munka. HVG-nek mindig volt egy derűre okot adó megjegyzése. Andris időről időre igazolta hatalmas szívét, humorát és barátságát, és mindenkivel kapcsolatban legalább egy olyan esetet tudnék sorolni, amikor bátorított, megmosolyogtatott, elgondolkodtatott. Ezek az élmények értékek, mi több: példaértékűek, mind magammal vittem, belegyúrtam a munkámba, az életembe, és kis ékkövekként őrzöm őket, nagyon hálás vagyok értük!

Nem utolsó sorban szeretném szeretteimnek megköszönni azt a hatalmas mennyiségű támogatást, amit mindenkori tanulmányaim során kaptam. Hálás vagyok szüleimnek, amiért hittel, és mindenre kiterjedő támogatásukkal kísértek utamon. Köszönöm testvéremnek, hogy nem mondta mindig azt, amit hallani akartam, ezzel segített józannak maradni. Mindig velem volt és kitartásra biztatott, de emlékeztetett az élet élvezetére, hogy a munka végén majd azt mondhassam: ez nagy kaland volt! Szeretném megköszönni páromnak, Barkóczi Sanyinak a kitartó biztatást, a támogatást az élet minden területén, és a türelmet, amivel a munka és a dolgozatírás hosszú, néhol rögös útján kísért.

8. Irodalomjegyzék

[1] T. Yorimitsu and D. J. Klionsky, “Autophagy: Molecular machinery for self-eating,” *Cell Death Differ.*, vol. 12, pp. 1542–1552, 2005, doi: 10.1038/sj.cdd.4401765.

[2] P. Boya, F. Reggiori, and P. Codogno, “Emerging regulation and functions of autophagy,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, no. 7, pp. 713–720, 2013, doi: 10.1038/ncb2788.

[3] N. Mizushima, B. Levine, A. M. Cuervo, and D. J. Klionsky, “Autophagy fights disease through cellular self-digestion,” *Nature*, vol. 451, no. 7182, pp. 1069–1075, 2008, doi: 10.1038/nature06639.

[4] N. Mizushima and M. Komatsu, “Autophagy: Renovation of cells and tissues,” *Cell*, vol. 147, no. 4, pp. 728–741, 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.10.026.

[5] E. L. Arrese and J. L. Soulages, “Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation,” *Annu. Rev. Entomol.*, vol. 55, no. 1, pp. 207–225, 2010, doi: 10.1146/annurev-ento-112408-085356.

[6] T. Maruzs, Z. Simon-Vecsei, V. Kiss, T. Csizmadia, and G. Juhász, “On the fly: Recent progress on autophagy and aging in Drosophila,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 7, no. JULY, pp. 1–15, 2019, doi: 10.3389/fcell.2019.00140.

[7] A. Bhattacharjee, Á. Szabó, T. Csizmadia, H. Laczkó-Dobos, and G. Juhász, “Understanding the importance of autophagy in human diseases using Drosophila,” *J. Genet. Genomics*, vol. 46, no. 4, pp. 157–169, 2019, doi: 10.1016/j.jgg.2019.03.007.

[8] M. Tsukada, “Isofation and charact ~~ zation of autophagy-defective mutants of,” vol. 333, no. 1, pp. 169–174, 1993.

[9] D. J. Klionsky *et al.*, “A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes,” *Dev. Cell*, vol. 5, no. 4, pp. 539–545, 2003, doi: 10.1016/S1534-5807(03)00296-X.

[10] D. J. Klionsky *et al.*, “Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition),” *Autophagy*, vol. 12, no. 1, pp. 1–222, 2016, doi: 10.1080/15548627.2015.1100356.

[11] G. Das, B. V. Shravage, and E. H. Baehrecke, “Regulation and function of autophagy during cell survival and cell death,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 4, no. 6, pp. 1–14, 2012, doi: 10.1101/cshperspect.a008813.

[12] D. J. Klionsky and B. A. Schulman, “Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 21, no. 4, pp. 336–345, 2014, doi: 10.1038/nsmb.2787.

[13] C. Mauvezin, P. Nagy, G. Juhász, and T. P. Neufeld, “Autophagosome-lysosome fusion is independent of V-ATPase-mediated acidification,” *Nat. Commun.*, vol. 6, no. May, 2015, doi: 10.1038/ncomms8007.

[14] C. Mauvezin, C. Ayala, C. R. Braden, J. Kim, and T. P. Neufeld, “Assays to monitor autophagy in Drosophila,” *Methods*, vol. 68, no. 1, pp. 134–139, 2014, doi: 10.1016/j.ymeth.2014.03.014.

[15] V. Kirkin, T. Lamark, T. Johansen, and I. Dikic, “NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets,” *Autophagy*, vol. 5, no. 5, pp. 732–733, 2009, doi: 10.4161/auto.5.5.8566.

[16] M. Kim *et al.*, “Mutation in ATG5 reduces autophagy and leads to ataxia with developmental delay,” *Elife*, vol. 5, pp. 1–18, 2016, doi: 10.7554/elife.12245.

[17] M. Lippai and P. Low, “The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/832704.

[18] K. Pircs *et al.*, “Advantages and Limitations of Different p62-Based Assays for Estimating Autophagic Activity in Drosophila,” *PLoS One*, vol. 7, no. 8, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0044214.

[19] P. Nagy, Á. Varga, A. L. Kovács, S. Takáts, and G. Juhász, “How and why to study autophagy in Drosophila: It’s more than just a garbage chute,” *Methods*, vol. 75, pp. 151–161, 2015, doi: 10.1016/j.ymeth.2014.11.016.

[20] J. L. Webber and S. A. Tooze, “Coordinated regulation of autophagy by p38a MAPK through mAtg9 and p38IP,” *EMBO J.*, vol. 29, no. 1, pp. 27–40, 2010, doi: 10.1038/emboj.2009.321.

[21] A. R. J. Young *et al.*, “Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes,” *J. Cell Sci.*, vol. 119, no. 18, pp. 3888–3900, 2006, doi: 10.1242/jcs.03172.

[22] F. Reggiori, K. A. Tucker, P. E. Stromhaug, and D. J. Klionsky, “The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure,” *Dev. Cell*, vol. 6, no. 1, pp. 79–90, 2004, doi: 10.1016/S1534-5807(03)00402-7.

[23] T. Lang, S. Reiche, M. Straub, M. Bredschneider, and M. Thumm, “Autophagy and the cvt pathway both depend on AUT9,” *J. Bacteriol.*, vol. 182, no. 8, pp. 2125–2133, 2000, doi: 10.1128/JB.182.8.2125-2133.2000.

[24] T. Noda, “Autophagy in the context of the cellular membrane-trafficking system: The enigma of Atg9 vesicles,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 45, no. 6, pp. 1323–1331, 2017, doi: 10.1042/BST20170128.

[25] Y. Rao, M. G. Perna, B. Hofmann, V. Beier, and T. Wollert, “The Atg1-kinase complex tethers Atg9-vesicles to initiate autophagy,” *Nat. Commun.*, vol. 7, 2016, doi: 10.1038/ncomms10338.

[26] S. W. Suzuki *et al.*, “Atg13 HORMA domain recruits Atg9 vesicles during autophagosome formation,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 112, no. 11, pp. 3350–3355, 2015, doi: 10.1073/pnas.1421092112.

[27] M. Mari, J. Griffith, E. Rieter, L. Krishnappa, D. J. Klionsky, and F. Reggiori, “An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis,” *J. Cell Biol.*, vol. 190, no. 6, pp. 1005–1022, 2010, doi: 10.1083/jcb.200912089.

[28] T. Sekito, T. Kawamata, R. Ichikawa, K. Suzuki, and Y. Ohsumi, “Atg17 recruits Atg9 to organize the pre-autophagosomal structure,” *Genes to Cells*, vol. 14, no. 5, pp. 525–538, 2009, doi: 10.1111/j.1365-2443.2009.01299.x.

[29] Y. Ohashi and S. Munro, “Membrane delivery to the yeast autophagosome from the Golgi-endosomal system,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 21, no. 22, pp. 3998–4008, Nov. 2010, doi: 10.1091/mbc.E10-05-0457.

[30] A. Orsi *et al.*, “Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but

not membrane integration, are required for autophagy," *Mol. Biol. Cell*, vol. 23, no. 10, pp. 1860–1873, 2012, doi: 10.1091/mbc.E11-09-0746.

[31] C. Puri, M. Renna, C. F. Bento, K. Moreau, and D. C. Rubinsztein, "ATG16L1 meets ATG9 in recycling endosomes additional roles for the plasma membrane and endocytosis in autophagosome biogenesis," *Autophagy*, vol. 10, no. 1, pp. 182–184, 2014, doi: 10.1016/j.cell.2013.08.044.

[32] K. Imai *et al.*, "Atg9A trafficking through the recycling endosomes is required for autophagosome formation," *J. Cell Sci.*, vol. 129, no. 20, pp. 3781–3791, 2016, doi: 10.1242/jcs.196196.

[33] C. A. Lamb *et al.*, " TBC 1D14 regulates autophagy via the TRAPP complex and ATG 9 traffic ," *EMBO J.*, vol. 35, no. 3, pp. 281–301, 2016, doi: 10.15252/embj.201592695.

[34] D. Popovic and I. Dikic, "TBC1D5 and the AP2 complex regulate ATG9 trafficking and initiation of autophagy," *EMBO Rep.*, vol. 15, no. 4, pp. 392–401, 2014, doi: 10.1002/embr.201337995.

[35] H. W. Tang, Y. B. Wang, S. L. Wang, M. H. Wu, S. Y. Lin, and G. C. Chen, "Atg1-mediated myosin II activation regulates autophagosome formation during starvation-induced autophagy," *EMBO J.*, vol. 30, no. 4, pp. 636–651, 2011, doi: 10.1038/emboj.2010.338.

[36] T. Noda *et al.*, "Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways," *J. Cell Biol.*, vol. 148, no. 3, pp. 465–480, 2000.

[37] P. Nagy, K. Hegedus, K. Pircs, Á. Varga, and G. Juhász, "Different effects of Atg2 and Atg18 mutations on Atg8a and Atg9 trafficking during starvation in Drosophila," *FEBS Lett.*, vol. 588, no. 3, pp. 408–413, 2014, doi: 10.1016/j.febslet.2013.12.012.

[38] S. F. Soukup *et al.*, "A LRRK2-Dependent EndophilinA Phosphoswitch Is Critical for Macroautophagy at Presynaptic Terminals," *Neuron*, vol. 92, no. 4, pp. 829–844, 2016, doi: 10.1016/j.neuron.2016.09.037.

[39] C. He *et al.*, "Recruitment of Atg9 to the preautophagosomal structure by Atg11 is essential for selective autophagy in budding yeast," *J. Cell Biol.*, vol. 175, no. 6, pp. 925–935, 2006, doi: 10.1083/jcb.200606084.

[40] C. E. Krebs *et al.*, "The sac1 domain of SYNJ1 identified mutated in a family with early-onset progressive parkinsonism with generalized seizures," *Hum. Mutat.*, vol. 34, no. 9, pp. 1200–1207, 2013, doi: 10.1002/humu.22372.

[41] M. Cao, I. Milosevic, S. Giovedi, and P. De Camilli, "Upregulation of Parkin in endophilin mutant mice," *J. Neurosci.*, vol. 34, no. 49, pp. 16544–16549, 2014, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1710-14.2014.

[42] J. F. Trempe *et al.*, "SH3 Domains from a Subset of BAR Proteins Define a Ubl-Binding Domain and Implicate Parkin in Synaptic Ubiquitination," *Mol. Cell*, vol. 36, no. 6, pp. 1034–1047, 2009, doi: 10.1016/j.molcel.2009.11.021.

[43] M. Quadri *et al.*, "Mutation in the SYNJ1 gene associated with autosomal recessive, early-onset parkinsonism," *Hum. Mutat.*, vol. 34, no. 9, pp. 1208–1215, 2013, doi: 10.1002/humu.22373.

[44] H. W. Tang, H. M. Liao, W. H. Peng, H. R. Lin, C. H. Chen, and G. C. Chen, "Atg9

interacts with dTRAF2/TRAF6 to regulate oxidative stress-induced JNK activation and autophagy induction," *Dev. Cell*, vol. 27, no. 5, pp. 489–503, 2013, doi: 10.1016/j.devcel.2013.10.017.

[45] J. K. Wen *et al.*, "Atg9 antagonizes TOR signaling to regulate intestinal cell growth and epithelial homeostasis in Drosophila," *Elife*, vol. 6, pp. 1–22, 2017, doi: 10.7554/eLife.29338.

[46] K. Varga, P. Nagy, K. Arsikin Csordás, A. L. Kovács, K. Hegedü, and G. Juhász, "Loss of Atg16 delays the alcohol-induced sedation response via regulation of Corazonin neuropeptide production in Drosophila," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. October, pp. 1–10, 2016, doi: 10.1038/srep34641.

[47] P. Nagy, Z. Szatmári, G. O. Sándor, M. Lippai, K. Hegedűs, and G. Juhász, "Drosophila atg16 promotes enteroendocrine cell differentiation via regulation of intestinal Slit/Robo signaling," *Dev.*, vol. 144, no. 21, pp. 3990–4001, 2017, doi: 10.1242/dev.147033.

[48] L. Radoshevich *et al.*, "ATG12 conjugation to ATG3 regulates mitochondrial homeostasis and cell death," *Cell*, vol. 142, no. 4, pp. 590–600, 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.07.018.

[49] D. L. Berry and E. H. Baehrecke, "Growth Arrest and Autophagy Are Required for Salivary Gland Cell Degradation in Drosophila," *Cell*, vol. 131, no. 6, pp. 1137–1148, 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.10.048.

[50] J. M. I. Barth, J. Szabad, E. Hafen, and K. Köhler, "Autophagy in Drosophila ovaries is induced by starvation and is required for oogenesis," *Cell Death Differ.*, vol. 18, no. 6, pp. 915–924, 2011, doi: 10.1038/cdd.2010.157.

[51] T. E. Rusten *et al.*, "Programmed autophagy in the Drosophila fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K Pathway," *Dev. Cell*, vol. 7, no. 2, pp. 179–192, 2004, doi: 10.1016/j.devcel.2004.07.005.

[52] R. C. Scott, O. Schuldiner, and T. P. Neufeld, "Role and regulation of starvation-induced autophagy in the Drosophila fat body," *Dev. Cell*, vol. 7, no. 2, pp. 167–178, 2004, doi: 10.1016/j.devcel.2004.07.009.

[53] L. P. Nezis *et al.*, "Cell death during Drosophila melanogaster early oogenesis is mediated through autophagy," *Autophagy*, vol. 5, no. 3, pp. 298–302, 2009, doi: 10.4161/auto.5.3.7454.

[54] D. Drummond-Barbosa and A. C. Spradling, "Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during Drosophila oogenesis," *Dev. Biol.*, vol. 231, no. 1, pp. 265–278, 2001, doi: 10.1006/dbio.2000.0135.

[55] Y. C. C. Hou, S. Chittaranjan, S. G. Barbosa, K. McCall, and S. M. Gorski, "Effector caspase Dcp-1 and IAP protein Bruce regulate starvation-induced autophagy during Drosophila melanogaster oogenesis," *J. Cell Biol.*, vol. 182, no. 6, pp. 1127–1139, 2008, doi: 10.1083/jcb.200712091.

[56] A. D. Velentzas, I. P. Nezis, D. J. Stravopodis, I. S. Papassideri, and L. H. Margaritis, "Mechanisms of programmed cell death during oogenesis in Drosophila virilis," *Cell Tissue Res.*, vol. 327, no. 2, pp. 399–414, 2007, doi: 10.1007/s00441-006-0298-x.

[57] J. S. Peterson, M. Barkett, and K. McCall, "Stage-specific regulation of caspase activity in Drosophila oogenesis," *Dev. Biol.*, vol. 260, no. 1, pp. 113–123, 2003, doi:

10.1016/S0012-1606(03)00240-9.

[58] I. P. Nezis, D. J. Stravopodis, L. H. Margaritis, and I. S. Papassideri, "Programmed cell death of follicular epithelium during the late developmental stages of oogenesis in the fruit flies Bactrocera oleae and Ceratitis capitata (Diptera, Tephritidae) is mediated by autophagy," *Dev. Growth Differ.*, vol. 48, no. 3, pp. 189–198, 2006, doi: 10.1111/j.1440-169X.2006.00856.x.

[59] I. P. Nezis *et al.*, "Autophagic degradation of dBruce controls DNA fragmentation in nurse cells during late Drosophila melanogaster oogenesis," *J. Cell Biol.*, vol. 190, no. 4, pp. 523–531, 2010, doi: 10.1083/jcb.201002035.

[60] J. S. Poulton and W. M. Deng, "Cell-cell communication and axis specification in the Drosophila oocyte," *Dev. Biol.*, vol. 311, no. 1, pp. 1–10, 2007, doi: 10.1016/j.ydbio.2007.08.030.

[61] A. Gonzâlez-Reyes, H. Elliott, and D. St Johnston, "Polarization of both major body axes in drosophila by gurken-torpedo signalling," *Nature*, vol. 375, no. 6533. pp. 654–658, 1995, doi: 10.1038/375654a0.

[62] E. Assa-Kunik, I. L. Torres, E. D. Schejter, D. St Johnston, and B. Z. Shilo, "Drosophila follicle cells are patterned by multiple levels of Notch signaling and antagonism between the Notch and JAK/STAT pathways," *Development*, vol. 134, no. 6, pp. 1161–1169, 2007, doi: 10.1242/dev.02800.

[63] H. López-Schier and D. St. Johnston, "Delta signaling from the germ line controls the proliferation and differentiation of the somatic follicle cells during Drosophila oogenesis," *Genes Dev.*, vol. 15, no. 11, pp. 1393–1405, 2001, doi: 10.1101/gad.200901.

[64] E. J. Ward, X. Zhou, L. M. Riddiford, C. A. Berg, and H. Ruohola-Baker, "Border of Notch activity establishes a boundary between the two dorsal appendage tube cell types," *Dev. Biol.*, vol. 297, no. 2, pp. 461–470, 2006, doi: 10.1016/j.ydbio.2006.05.021.

[65] S. Yamamoto, W. L. Charng, and H. J. Bellen, "Endocytosis and intracellular trafficking of notch and its ligands," *Curr. Top. Dev. Biol.*, vol. 92, no. C, pp. 165–200, 2010, doi: 10.1016/S0070-2153(10)92005-X.

[66] R. Avraham and Y. Yarden, "Feedback regulation of EGFR signalling: Decision making by early and delayed loops," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 12, no. 2, pp. 104–117, 2011, doi: 10.1038/nrm3048.

[67] J. M. I. Barth, E. Hafen, and K. Köhler, "The lack of autophagy triggers precocious activation of notch signaling during drosophila oogenesis," *BMC Dev. Biol.*, vol. 12, no. 1, 2012, doi: 10.1186/1471-213X-12-35.

[68] G. Juhász, B. Érdi, M. Sass, and T. P. Neufeld, "Atg7-dependent autophagy promotes neuronal health, stress tolerance, and longevity but is dispensable for metamorphosis in Drosophila," *Genes Dev.*, vol. 21, no. 23, pp. 3061–3066, 2007, doi: 10.1101/gad.1600707.

[69] V. Kiss *et al.*, "*Drosophila* Atg9 regulates the actin cytoskeleton via interactions with profilin and Ena," *Cell Death Differ.*, doi: 10.1038/s41418-019-0452-0.

[70] J. Hodin and L. M. Riddiford, "Different Mechanisms Underlie Phenotypic Plasticity and Interspecific Variation for a Reproductive Character in Drosophilids (Insecta: Diptera)," *Evolution (N. Y).*, vol. 54, no. 5, p. 1638, 2000, doi: 10.1554/0014-

3820(2000)054[1638:dmuppa]2.0.co;2.

[71] D. P. Sarikaya, A. A. Belay, A. Ahuja, A. Dorta, D. A. Green, and C. G. Extavour, "The roles of cell size and cell number in determining ovariole number in Drosophila," *Dev. Biol.*, vol. 363, no. 1, pp. 279–289, 2012, doi: 10.1016/j.ydbio.2011.12.017.

[72] C. C. Mendes and C. K. Mirth, "Stage-specific plasticity in ovary size is regulated by insulin/insulin-like growth factor and ecdysone signaling in Drosophila," *Genetics*, vol. 202, no. 2, pp. 703–719, 2016, doi: 10.1534/genetics.115.179960.

[73] A. O. Bergland, A. Genissel, S. V. Nuzhdin, and M. Tatar, "Quantitative trait loci affecting phenotypic plasticity and the allometric relationship of ovariole number and thorax length in Drosophila melanogaster," *Genetics*, vol. 180, no. 1, pp. 567–582, 2008, doi: 10.1534/genetics.108.088906.

[74] M. L. Wayne, U. Soundararajan, and L. G. Harshman, "Environmental stress and reproduction in Drosophila melanogaster: Starvation resistance, ovariole numbers and early age egg production," *BMC Evol. Biol.*, vol. 6, pp. 1–10, 2006, doi: 10.1186/1471-2148-6-57.

[75] W. Xiaodong, P. SinghTanwar, and L. A. Raftery, "Drosophila follicle cells: morphogenesis in an eggshell Xiaodong," *Growth (Lakeland)*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2008, doi: 10.1038/jid.2014.371.

[76] M. Bownes, "The roles of juvenile hormone, ecdysone and the ovary in the control of Drosophila vitellogenesis," *J. Insect Physiol.*, vol. 35, no. 5, pp. 409–413, 1989, doi: 10.1016/0022-1910(89)90115-7.

[77] A. Spradling, M. T. Fuller, R. E. Braun, and S. Yoshida, "Germline stem cells," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, no. 11, pp. 1–20, 2011, doi: 10.1101/cshperspect.a002642.

[78] D. McKearin, "The Drosophila fusome, organelle biogenesis and germ cell differentiation: if you build it...," *Bioessays*, vol. 19, no. 2, p. 147—152, 1997, doi: 10.1002/bies.950190209.

[79] M. R. Cummings and R. C. King, "The cytology of the vitellogenic stages of oogenesis in Drosophila melanogaster. I. General staging characteristics," *J. Morphol.*, vol. 128, no. 4, pp. 427–441, 1969, doi: 10.1002/jmor.1051280404.

[80] P. J. DiMario and A. P. Mahowald, "The effects of pH and weak bases on the in vitro endocytosis of vitellogenin by oocytes of Drosophila melanogaster," *Cell Tissue Res.*, vol. 246, no. 1, pp. 103–108, 1986, doi: 10.1007/BF00219005.

[81] G. M. Guild, P. S. Connelly, M. K. Shaw, and L. G. Tilney, "Actin filament cables in Drosophila nurse cells are composed of modules that slide passively past one another during dumping," *J. Cell Biol.*, vol. 138, no. 4, pp. 783–797, 1997, doi: 10.1083/jcb.138.4.783.

[82] L. Cooley, E. Verheyen, and K. Ayers, "Chickadee Encodes a Profilin Required for Intercellular cytoplasm transport during Drosophila oogenesis," *Dev. Biol.*, vol. 69, no. 1, pp. 173–184, 1992, doi: 10.1006/dbio.1994.1257.

[83] P. F. McLean and L. Cooley, "Bridging the divide: Illuminating the path of intercellular exchange through ring canals," *Fly (Austin).*, vol. 8, no. 1, 2014, doi: 10.4161/fly.27016.

[84] M. Bownes, "The regulation of yolk protein gene expression in Drosophila

melanogaster," vol. 57, no. 3, 1982.

[85] T. Ikeya, M. Galic, P. Belawat, K. Nairz, and E. Hafen, "Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in Drosophila," *Curr. Biol.*, vol. 12, no. 15, pp. 1293–1300, 2002, doi: 10.1016/S0960-9822(02)01043-6.

[86] M. D. Brennan, A. J. Weiner, T. J. Goralski, and A. P. Mahowald, "The follicle cells are a major site of vitellogenin synthesis in Drosophila melanogaster," *Dev. Biol.*, vol. 89, no. 1, pp. 225–236, 1982, doi: 10.1016/0012-1606(82)90309-8.

[87] E. T. Ables, "Drosophila Oocytes as a model for understanding meiosis: An educational primer to accompany 'Corolla is a novel protein that contributes to the architecture of the synaptonemal complex of drosophila,'" *Genetics*, vol. 199, no. 1, pp. 17–23, 2015, doi: 10.1534/genetics.114.167940.

[88] V. L. Zimyanin *et al.*, "In Vivo Imaging of oskar mRNA Transport Reveals the Mechanism of Posterior Localization," *Cell*, vol. 134, no. 5, pp. 843–853, 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.06.053.

[89] A. M. Jaramillo, T. T. Weil, J. Goodhouse, E. R. Gavis, and T. Schupbach, "The dynamics of fluorescently labeled endogenous gurken mRNA in Drosophila," *J. Cell Sci.*, vol. 121, no. 6, pp. 887–894, 2008, doi: 10.1242/jcs.019091.

[90] T. T. Weil, K. M. Forrest, and E. R. Gavis, "Localization of bicoid mRNA in Late Oocytes Is Maintained by Continual Active Transport," *Dev. Cell*, vol. 11, no. 2, pp. 251–262, 2006, doi: 10.1016/j.devcel.2006.06.006.

[91] T. T. Weil, R. Parton, I. Davis, and E. R. Gavis, "Changes in bicoid mRNA Anchoring Highlight Conserved Mechanisms during the Oocyte-to-Embryo Transition," *Curr. Biol.*, vol. 18, no. 14, pp. 1055–1061, 2008, doi: 10.1016/j.cub.2008.06.046.

[92] I. Clark, E. Giniger, H. Ruohola-Baker, L. Y. Jan, and Y. N. Jan, "Transient posterior localization of a kinesin fusion protein reflects anteroposterior polarity of the Drosophila oocyte," *Curr. Biol.*, vol. 4, no. 4, pp. 289–300, 1994, doi: 10.1016/S0960-9822(00)00068-3.

[93] W. E. Theurkauf, S. Smiley, M. L. Wong, and B. M. Alberts, "Reorganization of the cytoskeleton during Drosophila oogenesis: Implications for axis specification and intercellular transport," *Development*, vol. 115, no. 4, pp. 923–936, 1992.

[94] A. P. Mahowald, "Assembly of the Drosophila germ plasm," in *International review of cytology*, vol. 203, Elsevier, 2001, pp. 187–213.

[95] S. Mahajan-Miklos and L. Cooley, "Intercellular Cytoplasm Transport during Drosophila Oogenesis," *Developmental Biology*, vol. 165, no. 2. pp. 336–351, 1994, doi: 10.1006/dbio.1994.1257.

[96] S. Wheatley, S. Kulkarni, and R. Karess, "Drosophila nonmuscle myosin II is required for rapid cytoplasmic transport during oogenesis and for axial nuclear migration in early embryos," *Development*, vol. 121, no. 6, pp. 1937–1946, 1995.

[97] L. G. Tilney, M. S. Tilney, and G. M. Guild, "Formation of actin filament bundles in the ring canals of developing Drosophila follicles," *J. Cell Biol.*, vol. 133, no. 1, pp. 61–74, 1996, doi: 10.1083/jcb.133.1.61.

[98] A. M. Hudson and L. Cooley, "A subset of dynamic actin rearrangements in Drosophila

requires the Arp2/3 complex ," *J. Cell Biol.*, vol. 156, no. 4, pp. 677–687, Feb. 2002, doi: 10.1083/jcb.200109065.

[99] M. G. Riparbelli and G. Callaini, "Cytoskeleton of the Drosophila egg chamber: new observations on microfilament distribution during oocyte growth," *Cell Motil. Cytoskeleton*, vol. 31, no. 4, pp. 298–306, 1995.

[100] M. E. Quinlan, J. E. Heuser, E. Kerkhoff, and R. D. Mullins, "Drosophila Spire is an actin nucleation factor," *Nature*, vol. 433, no. 7024, pp. 382–388, 2005, doi: 10.1038/nature03241.

[101] A. E. Rosales-Nieves, J. E. Johndrow, L. C. Keller, C. R. Magie, D. M. Pinto-Santini, and S. M. Parkhurst, "Coordination of microtubule and microfilament dynamics by drosophila Rho1, spire and cappuccino," *Nat. Cell Biol.*, vol. 8, no. 4, pp. 367–376, 2006, doi: 10.1038/ncb1385.

[102] K. Dahlgaard, A. A. S. F. Raposo, T. Niccoli, and D. St Johnston, "Capu and Spire Assemble a Cytoplasmic Actin Mesh that Maintains Microtubule Organization in the Drosophila Oocyte," *Dev. Cell*, vol. 13, no. 4, pp. 539–553, 2007, doi: 10.1016/j.devcel.2007.09.003.

[103] D. Nashchekin, A. R. Fernandes, and D. St Johnston, "Patronin/Shot Cortical Foci Assemble the Noncentrosomal Microtubule Array that Specifies the Drosophila Anterior-Posterior Axis," *Dev. Cell*, vol. 38, no. 1, pp. 61–72, 2016, doi: 10.1016/j.devcel.2016.06.010.

[104] M. Barzik *et al.*, "Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 31, pp. 28653–28662, 2005, doi: 10.1074/jbc.M503957200.

[105] K. Cant, B. A. Knowles, M. S. Mooseker, and L. Cooley, "Drosophila singed, a fascin homolog, is required for actin bundle formation during oogenesis and bristle extension," *J. Cell Biol.*, vol. 125, no. 2, pp. 369–380, 1994, doi: 10.1083/jcb.125.2.369.

[106] M. Li *et al.*, "during Drosophila Oogenesis," *Cell*, vol. 146, no. 5, pp. 1061–1073, 1999.

[107] S. Huelsmann, J. Ylänne, and N. H. Brown, "Filopodia-like actin cables position nuclei in association with perinuclear actin in Drosophila nurse cells," *Dev. Cell*, vol. 26, no. 6, pp. 604–615, 2013, doi: 10.1016/j.devcel.2013.08.014.

[108] C. Revenu, R. Athman, S. Robine, and D. Louvard, "The co-workers of actin filaments: From cell structures to signals," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 5, no. 8, pp. 635–646, 2004, doi: 10.1038/nrm1437.

[109] C. Bachmann, L. Fischer, U. Walter, and M. Reinhard, "The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 33, pp. 23549–23557, 1999, doi: 10.1074/jbc.274.33.23549.

[110] M. Van Troys, D. Dewitte, M. Goethals, M. F. Carlier, J. Vandekerckhove, and C. Ampe, "The actin binding site of thymosin beta 4 mapped by mutational analysis.," *EMBO J.*, vol. 15, no. 2, pp. 201–210, 1996, doi: 10.1002/j.1460-2075.1996.tb00350.x.

[111] A. S. Sechi and J. Wehland, "Ena/VASP Proteins: Multifunctional regulators of actin cytoskeleton dynamics," *Front. Biosci.*, vol. 9, no. June 2004, pp. 1294–1310, 2004, doi: 10.2741/1324.

[112] A. Schirenbeck, R. Arasada, T. Bretschneider, T. E. B. Stradal, M. Schleicher, and J. Faix, “The bundling activity of vasodilator-stimulated phosphoprotein is required for filopodium formation,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 20, pp. 7694–7699, 2006, doi: 10.1073/pnas.0511243103.

[113] S. M. Ahern-Djamali *et al.*, “Identification of profilin and src homology 3 domains as binding partners for Drosophila enabled,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 9, pp. 4977–4982, 1999, doi: 10.1073/pnas.96.9.4977.

[114] S. Krugmann, I. Jordens, K. Gevaert, M. Driessens, J. Vandekerckhove, and A. Hall, “Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex,” *Curr. Biol.*, vol. 11, no. 21, pp. 1645–1655, 2001, doi: 10.1016/S0960-9822(01)00506-1.

[115] F. B. Gertler, E. C. Liebl, and D. Abl, “enabled, a dosage-sensitive suppressor of mutations in the Drosophila Abl tyrosine kinase, encodes an Abl substrate with SH3 domain-binding properties,” pp. 521–533, 1995.

[116] T. Matusek *et al.*, “Formin proteins of the DAAM subfamily play a role during axon growth,” *J. Neurosci.*, vol. 28, no. 49, pp. 13310–13319, 2008, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2727-08.2008.

[117] B. J. Mayer, “SH3 domains: complexity in moderation,” *J. Cell Sci.*, vol. 114, no. 7, pp. 1253–1263, 2001.

[118] D. R. Kovar, E. S. Harris, R. Mahaffy, H. N. Higgs, and T. D. Pollard, “Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin,” *Cell*, vol. 124, no. 2, pp. 423–435, 2006, doi: 10.1016/j.cell.2005.11.038.

[119] M. A. Wear and J. A. Cooper, “Capping protein: New insights into mechanism and regulation,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 29, no. 8, pp. 418–428, 2004, doi: 10.1016/j.tibs.2004.06.003.

[120] J. A. Cooper and D. Sept, “New Insights into Mechanism and Regulation of Actin Capping Protein,” *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, vol. 267, no. 08, pp. 183–206, 2008, doi: 10.1016/S1937-6448(08)00604-7.

[121] M. Hieda, “Implications for Diverse Functions of the LINC Complexes Based on the Structure,” *Cells*, vol. 6, no. 1, p. 3, 2017, doi: 10.3390/cells6010003.

[122] C. M. Groen, A. Jayo, M. Parsons, and T. L. Tootle, “Prostaglandins regulate nuclear localization of Fascin and its function in nucleolar architecture,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 26, no. 10, pp. 1901–1917, 2015, doi: 10.1091/mbc.E14-09-1384.

[123] A. Jayo *et al.*, “Fascin Regulates Nuclear Movement and Deformation in Migrating Cells,” *Dev. Cell*, vol. 38, no. 4, pp. 371–383, 2016, doi: 10.1016/j.devcel.2016.07.021.

[124] S. Gigliotti *et al.*, “Nup154, a new Drosophila gene essential for male and female gametogenesis is related to the Nup155 vertebrate nucleoporin gene,” *J. Cell Biol.*, vol. 142, no. 5, pp. 1195–1207, 1998, doi: 10.1083/jcb.142.5.1195.

[125] J. Gates *et al.*, “Enabled and Capping protein play important roles in shaping cell behavior during Drosophila oogenesis,” *Dev. Biol.*, vol. 333, no. 1, pp. 90–107, 2009, doi: 10.1016/j.ydbio.2009.06.030.

[126] A. A. Ogienko, D. A. Karagodin, V. V. Lashina, S. I. Baiborodin, E. S. Omelina, and E. M. Baricheva, “Capping protein beta is required for actin cytoskeleton organisation and

cell migration during Drosophila oogenesis," *Cell Biol. Int.*, vol. 37, no. 2, pp. 149–159, 2013, doi: 10.1002/cbin.10025.

[127] S. M. Ahern-Djamali *et al.*, "Mutations in Drosophila enabled and rescue by human vasodilator- stimulated phosphoprotein (VASP) indicate important functional roles for Ena/VASP homology domain 1 (EVH1) and EVH2 domains," *Mol. Biol. Cell*, vol. 9, no. 8, pp. 2157–2171, 1998, doi: 10.1091/mbc.9.8.2157.

[128] W. Li, Y. Li, and F. B. Gao, "Abelson, enabled, and P120catenin exert distinct effects on dendritic morphogenesis in Drosophila," *Dev. Dyn.*, vol. 234, no. 3, pp. 512–522, 2005, doi: 10.1002/dvdy.20496.

[129] B. K. Haarer, S. H. Lillie, A. E. M. Adams, V. Magdolen, W. Bandlow, and S. S. Brown, "Purification of profilin from Saccharomyces cerevisiae and analysis of profilin-deficient cells," *J. Cell Biol.*, vol. 110, no. 1, pp. 105–114, 1990, doi: 10.1083/jcb.110.1.105.

[130] E. M. Verheyen and L. Cooley, "Profilin mutations disrupt multiple actin-dependent processes during Drosophila development," *Development*, vol. 120, no. 4, pp. 717–728, 1994.

[131] O. Urwyler, F. Cortinas-Elizondo, and B. Suter, "Drosophila sosie functions with βH-Spectrin and actin organizers in cell migration, epithelial morphogenesis and cortical stability," *Biol. Open*, vol. 1, no. 10, pp. 994–1005, 2012, doi: 10.1242/bio.20122154.

[132] M. Starz-Gaiano and D. J. Montell, "Genes that drive invasion and migration in Drosophila," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 14, no. 1, pp. 86–91, 2004, doi: 10.1016/j.gde.2003.12.001.

[133] E. P. Lucas *et al.*, "The Hippo pathway polarizes the actin cytoskeleton during collective migration of Drosophila border cells," *J. Cell Biol.*, vol. 201, no. 6, pp. 875–885, 2013, doi: 10.1083/jcb.201210073.

[134] F. Llense and E. Martín-Blanco, "JNK Signaling Controls Border Cell Cluster Integrity and Collective Cell Migration," *Curr. Biol.*, vol. 18, no. 7, pp. 538–544, 2008, doi: 10.1016/j.cub.2008.03.029.

[135] A. Saadin and M. Starz-Gaiano, "Identification of novel regulators of the JAK/STAT signaling pathway that control border cell migration in the Drosophila ovary," *G3 Genes, Genomes, Genet.*, vol. 6, no. 7, pp. 1991–2002, 2016, doi: 10.1534/g3.116.028100.

[136] V. van de Bor, G. Zimniak, D. Cérézo, S. Schaub, and S. Noselli, "Asymmetric localisation of cytokine mRNA is essential for JAK/STAT activation during cell invasiveness," *Development*, vol. 138, no. 7, pp. 1383–1393, 2011, doi: 10.1242/dev.056184.

[137] S. Takáts *et al.*, "Non-canonical role of the SNARE protein Ykt6 in autophagosome-lysosome fusion," *PLoS Genet.*, vol. 14, no. 4, pp. 1–23, 2018, doi: 10.1371/journal.pgen.1007359.

[138] P. Lőrincz *et al.*, "MiniCORVET is a Vps8-containing early endosomal tether in drosophila," *Elife*, vol. 5, no. JUNE2016, pp. 1–27, 2016, doi: 10.7554/eLife.14226.

[139] K. Hegedus *et al.*, "The Ccz1-Mon1-Rab7 module and Rab5 control distinct steps of autophagy," *Mol. Biol. Cell*, vol. 27, no. 20, pp. 3132–3142, 2016, doi:

10.1091/mbc.E16-03-0205.

[140] F. Port, H. M. Chen, T. Lee, and S. L. Bullock, “Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in Drosophila,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 29, 2014, doi: 10.1073/pnas.1405500111.

[141] E. M. Selva and B. E. Stronach, “Germline clone analysis for maternally acting Drosophila hedgehog components,” in *Hedgehog Signaling Protocols*, Springer, 2007, pp. 129–144.

[142] S. A. Chugani, M. Whiteley, K. M. Lee, D. D’Argenio, C. Manoil, and E. P. Greenberg, “QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in Pseudomonas aeruginosa,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 98, no. 5, pp. 2752–2757, 2001.

[143] S. Takáts *et al.*, “Autophagosomal Syntaxin17-dependent lysosomal degradation maintains neuronal function in Drosophila,” *J. Cell Biol.*, vol. 201, no. 4, pp. 531–539, 2013, doi: 10.1083/jcb.201211160.

[144] S. J. Nixon, R. I. Webb, M. Floetenmeyer, N. Schieber, H. P. Lo, and R. G. Parton, “A single method for cryofixation and correlative light, electron microscopy and tomography of zebrafish embryos,” *Traffic*, vol. 10, no. 2, pp. 131–136, 2009.

[145] W. Kukulski, M. Schorb, S. Welsch, A. Picco, M. Kaksonen, and J. A. G. Briggs, *Precise, Correlated Fluorescence Microscopy and Electron Tomography of Lowicryl Sections Using Fluorescent Fiducial Markers*, vol. 111. Elsevier, 2012.

[146] S. Szikora *et al.*, “The formin DAAM is required for coordination of the actin and microtubule cytoskeleton in axonal growth cones,” *J. Cell Sci.*, vol. 130, no. 15, pp. 2506–2519, 2017, doi: 10.1242/jcs.203455.

[147] P. Lörincz *et al.*, “Rab2 promotes autophagic and endocytic lysosomal degradation,” *J. Cell Biol.*, vol. 216, no. 7, pp. 1937–1947, 2017, doi: 10.1083/jcb.201611027.

[148] P. A. Yeh and C. J. Chang, “A novel function of twins, B subunit of protein phosphatase 2A, in regulating actin polymerization,” *PLoS One*, vol. 12, no. 10, pp. 1–15, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0186037.

[149] C. Medioni, M. Ramialison, A. Ephrussi, and F. Besse, “Imp promotes axonal remodeling by regulating profilin mRNA during brain development,” *Curr. Biol.*, vol. 24, no. 7, pp. 793–800, 2014, doi: 10.1016/j.cub.2014.02.038.

[150] A. Lambrechts, V. Jonckheere, D. Dewitte, J. Vandekerckhove, and C. Ampe, “Mutational analysis of human profilin I reveals a second PI(4,5)-P 2 binding site neighbouring the poly(L-proline) binding site,” *BMC Biochem.*, vol. 3, pp. 1–12, 2002, doi: 10.1186/1471-2091-3-12.

[151] T.-H. Lin, T.-H. Yeh, T.-W. Wang, and J.-Y. Yu, “The Hippo pathway controls border cell migration through distinct mechanisms in outer border cells and polar cells of the Drosophila ovary,” *Genetics*, vol. 198, no. 3, pp. 1087–1099, 2014.

[152] C. Gonçalves-Pimentel, R. Gombos, J. Mihály, N. Sánchez-Soriano, and A. Prokop, “Dissecting regulatory networks of Filopodia formation in a Drosophila Growth Cone Model,” *PLoS One*, vol. 6, no. 3, pp. 1–9, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0018340.

[153] T. Wucherpfennig, M. Wilsch-Bräuninger, and M. González-Gaitán, “Role of Drosophila Rab5 during endosomal trafficking at the synapse and evoked neurotransmitter release,” *J. Cell Biol.*, vol. 161, no. 3, pp. 609–624, 2003.

[154] T. Tanaka and A. Nakamura, “The endocytic pathway acts downstream of Oskar in Drosophila germ plasm assembly,” *Development*, vol. 135, no. 6, pp. 1107–1117, 2008.

[155] A. Ephrussi and R. Lehmann, “Induction of germ cell formation by oskar,” *Nature*, vol. 358, no. 6385, pp. 387–392, 1992.

[156] A. Longatti, C. A. Lamb, M. Razi, S. I. Yoshimura, F. A. Barr, and S. A. Tooze, “TBC1D14 regulates autophagosome formation via Rab11- and ULK1-positive recycling endosomes,” *J. Cell Biol.*, vol. 197, no. 5, pp. 659–675, 2012, doi: 10.1083/jcb.201111079.

[157] P. K. Mattila and P. Lappalainen, “Filopodia: molecular architecture and cellular functions,” *Nat. Rev. Mol. cell Biol.*, vol. 9, no. 6, pp. 446–454, 2008.

[158] T. Yamada *et al.*, “Endothelial nitric-oxide synthase antisense (NOS3AS) gene encodes an autophagy-related protein (APG9-like2) highly expressed in trophoblast,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 18, pp. 18283–18290, 2005, doi: 10.1074/jbc.M413957200.

[159] M. R. Kang *et al.*, “Frameshift mutations of autophagy-related genes ATG2B, ATG5, ATG9B and ATG12 in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability,” *J. Pathol. A J. Pathol. Soc. Gt. Britain Irel.*, vol. 217, no. 5, pp. 702–706, 2009.

[160] Y. Kong *et al.*, “The lncRNA NEAT1/miR-29b/Atg9a axis regulates IGFBPrP1-induced autophagy and activation of mouse hepatic stellate cells,” *Life Sci.*, vol. 237, p. 116902, 2019, doi: 10.1016/j.lfs.2019.116902.

[161] C. Delcour *et al.*, “ATG7 and ATG9A loss-of-function variants trigger autophagy impairment and ovarian failure,” *Genet. Med.*, vol. 21, no. 4, pp. 930–938, 2019, doi: 10.1038/s41436-018-0287-y.

9. Összefoglalás

Az autofágia, más néven sejtes önemésztés, egy olyan evolúciósan konzervált folyamat, amelynek nyomán a fölöslegessé vált, vagy hibásan működő sejtalkotók, fehérjék lizoszómális lebontását követően a sejt energiához és építőelemekhez jut. A folyamatot stressz (pl.: éhezés, fertőzés) illetve fejlődési jel (pl.: ekdizon hormon) indukálhatja, és a sejtek, illetve a teljes élőlény homeosztázisának fenntartására, visszaállítására irányul. Hiányában különféle betegségek léphetnek fel a neurodegeneratív rendellenességektől a tumorokig.

Vizsgálataink során előállítottuk a *Drosophila Atg9* gén *null* mutánsát ($Atg9^{B5}$), melyet az általunk előállított ellenanyaggal Western blot kísérletben igazoltunk. Bizonyítottuk a gén autofágiában betöltött szerepét különböző kísérleti rendszerekben, változatos technikák alkalmazásával (Western blot, Lyso Tracker, immunhisztokémia). *Atg9* mutánsban egyértelműen sérült az autofágia, és felhalmozódott a p62 szintje lárvális zsírsejtekben, emellett az állatok élethossza, mászási- és stressztűrő képességei is egyaránt csökkentek a kontrollhoz és a menekített muslicákhoz képest. Továbbá megállapítottuk, hogy az *Atg9* hiánya drasztikusan csökkenti a nőstények peterakását és ezzel együtt a fertilitását is, ellentétben más, adultként életképes Atg mutánsokkal.

Vizsgálatainkkal igyekeztük körbejárni az *Atg9* és a muslica nőstények megváltozott fertilitásának hátterében álló okokat. Az $Atg9^{B5}$ mutáció autofágiával igazoltan *összefüggő* és a fertilitásra vonatkozó fenotípusai menekíthetőek voltak a genomi promoter hajtotta *Atg9*-3xHA expressziójával. Megvizsgáltuk az Atg9 lokalizációját felnőtt petefészekben, és megállapítottuk, hogy markáns membránlokalizáció jellemzi a fehérjét. Jellemzően a phalloidin-nel festett aktin kábelkötegek membránba nyúló végeihez asszociál. Eredményeink abba az irányba mutattak, hogy az *Atg9* hiányában az aktin citoszkeleton működésében következhet be változás a muslicák petefészkében. Megvizsgálva az aktin hálózatot a különböző fejlettségű petekezdemények dajkasejtjeiben megállapítottuk, hogy eltérően a vad típustól és más autofágia mutánsoktól (*Atg16*), *Atg9* hiányában az aktin hálózat kialakulása zavart szenved. A petekamrákra jellemző, prominens aktin kábelek kialakulása késik, valamint a kortikális aktin hálózat és a dajkasejtek plazmamembránja destabilizálódik. A plazmamembránok felbomlása eredményezi, hogy a gyűrűcsatornák is felbomlanak vagy elúsznak a citoplazmában, mert nem csatlakoznak tovább membránstruktúrához. Az *Atg9* hiányában megfigyelhető aktin- és membrán problémák aktin szabályozó *ena* és *chic* mutáns alléljeinek (ena^{23}, $chic^{221}$) egy kópiában történő bevezetésével drasztikusan súlyosbodnak, gyakoriságuk megnő. Ez a súlyosbodás annak ellenére áll fenn, hogy

az *ena* és *chic* egy kópiájának hiánya sem külön-külön, sem együttesen nem okoznak súlyos aktin citoszkeleton zavart és membrán instabilitást, így igazoltuk, hogy az *Atg9,* az *ena* és a *chic* között genetikai interakció áll fönt.

Biokémiai módszerekkel (*in vitro* fehérje-fehérje kölcsönhatási kísérletek, ko-immunprecipitáció, élesztő kettős-hibrid teszt) történő vizsgálatával igazoltuk, hogy Atg9 mind az Ena, mind a profilin fizikai interakciós partnere. Ismert, hogy a profilin prolin-gazdag motívumokat köt, ennek megfelelően találtunk egy prolin-gazdag szekvenciát az Atg9 negyedik citoszólikus doménjében (PPRPPAAP). Eredményeink alapján azt feltételezzük, hogy a profilin hármas triptofánján (W3) keresztül az Atg9 negyedik citoszólikus doménjének prolin-gazdag szekvenciájához képes kötődni élesztő rendszerben. A W3 egy konzervált aminosav, igazoltan az Ena prolin-gazdag régiójának kötéséért felelős emberben. Élesztő kettős-hibrid kísérletünkben igazoltuk, hogy *Drosophila*-ban szintén ez az aminosav felelős a profilin-Ena fizikai interakcióért.

Eredményeink rávilágítottak, hogy az *Atg9* az idegrendszer fejlődésében is szerepet játszik az aktin citoszkeleton szabályozásán keresztül. Hiányában hasonló neuronális defektusokat fedeztünk fel, mint amelyek irodalomból ismertek és az *ena* és *chic* mutáns alléljeinek hatására alakulnak ki. Ezek a fenotípusok a túlzott axon- és filopódiumnövekedés primer embrionális neuronok esetében *ex vivo*, valamint a ventrális idegköteg teljes- vagy részleges megkereszteződése.

Összefoglalásként elmondható, hogy az *Atg9 Drosophila*-ban szükséges az autofágia folyamatában, hiányában csökken a muslicák élethossza, romlanak a neuromuszkuláris funkcióik és a stressztűrő képességük, sejtszinten pedig felhalmozódik a szelektív autofágia receptor p62. Az *Atg9* mutáns nőstények nem, vagy csak alig raknak petét, amely jelenség összefügghet az ivarvonal sejtekben az aktin citoszkeleton hibájával és a membrán destabilizálódással, továbbá az aktin-szabályozás hibájából következő neuronális defektusokkal. Az *Atg9* az aktin citiszkeleton szabályozásában az *ena*-val és a *chic*-kel kölcsönhatva vesz részt, függetlenül az autofágia folyamatától, azonban ennek a kölcsönhatásnak a mélyebb megértésére további kutatások tudnak csak részleteiben rávilágítani.

10. Summary

The autophagy is an evolutionarily conserved cellular process, that removes damaged or unnecessary organelles and proteins by lysosomal degradation, providing energy and building blocks during development or stress. Autophagy, induced by stress or developmental signals contributes to balance of the organismal homeostasis and survival. Falied or missed autophagy process can lead to numoreous diseases: neurodegenerative disorders, inflammations or cancer.

In this study, we generated a *null* mutant strain for *Drosophila Atg9*, called $Atg9^{B5}$. The $Atg9^{B5}$ deletion was validated using Western blot, confirming that our mutant allele is *null*. *Drosophila Atg9* is a bonafide autophagy gene, that is shown using different methods: Western blot, Lyso Trancker staining, and immunohistchemistry. In $Atg9^{B5}$ mutants, increased level of p62 was shown in larval fat body and adults. Moreover, comparing to controls, lifespan, locomotive capability, and stress tolerance declined due to autophagy failure caused by lack of *Atg9*. In addition, $Atg9^{B5}$ leads to dramatically drop in egg production of flies, resulting in almost complete infertility, unlike other viable Atg mutants, that do not affect significantly productiveness.

We aimed at unlock the connection between *Atg9* and the female fertility. Characteristics regarding infertility and failured autophagy are rescuable by introducing a genomic promoter-driven *Atg9* transgene. Because of the infertility, our focus has shifted toward the ovary. Fluorescence studies have revealed that the Atg9 was characterized by a solid membrane-localization, in addition the Atg9 signal was scattered in cytoplasm forming smaller dots, as membranous organelles (lysosomes, endosomes) in germline cells. Regarding the above mentioned membrane-localization, phalloidin staining has shown that the Atg9 localizes to the tip of actin-rich membrane protrusions. Compared to controls (wild type and Atg16 mutant), lack of *Atg9* leads to the failure of actin cytoskeleton in germline cells, actin cable formation exhibites a delay in time, the cortical actin meshwork and the plasma membrane become unstable. Disruption of membranes results in aggregation or desorganization of ring canals. Actin-associated phenotypes are even more enhanced by additional depletion of one copy of *ena* and/or *chic* actin regulators (ena^{23}, $chic^{221}$) resulting in more severe and frequent disorders in actin network, membrane disruption, and ring canal loss. Unlike, neighter ena^{23}, nor $chic^{221}$ does not induce detectable defects in actin cytoskeleton in hetezygous condition presuming genetic interaction of both and *Atg9*. These observations suggest that *Atg9* has a significant role in formation of actin network and contributes to membrane stability by cooperation with actin regulation system.

Using biochemical methods (GST pull-down, co-immunoprecipititation, yeast two-hybrid assay) we confirmed that the Atg9 has physical interaction with either Enabled, or profilin, moreover PPRPPAAP motif whitin the C-terminal region of Atg9 is responsible for binding to Trp3 (W3) of profilin [150]. This triptophan is a conserved amino acid and binds to poly-prolin region of Enabled in human . In our study, we have revealed that this amino acid binds not only Enabled, but Atg9 in *Drosophila*.

Our results have shown the role of *Atg9* in development of nervous system via regulation of actin cytoskeleton. Depletion of *Atg9* leads to defects in growth and projection of neurons, likely lack of *ena* or *chic*. These defects are overgrowth of axons and filopodia in primer embryonic neurons *ex vivo*, as well as complete or partial cross of the ventral nerve chords during embryonic development.

Summerizing, the *Atg9* is necessary for autophagy in *Drosophila*. Lack of *Atg9* causes shorter lifespan, decay in neuromuscular function, decreased stress tolerance, and accumulation of p62 selective autophagy receptor protein. Moreover, *Atg9* mutant females are almost completly infertile, unlike other viable Atg mutants. In line with infertility, actin network shows a failure in *Atg9* germline cells leading to defective cytoskeleton and membrane instability, not only in ovary, but in nervous system. Mutant alleles of two actin reggulators, *ena* and *chic* also result in defects in ovary and neurons, likely $Atg9^{B5}$. Our study provides some clear evidences to the genetics and physical interactions between Atg9 and the actin regulators, Ena and profilin, and this cooperation functions independently from autophagy contributes to the normal actin formation and helps to maintain membrane stability, although this process still remain unclear in detail.