

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

című doktori értekezés tézisei

Készítette: Kiss Viktória

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar,

Biológia Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Juhász Gábor, DSc., az MTA doktora, tudományos tanácsadó

ELKH Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet

Szeged

2020

Bevezetés

Az autofágia, más néven sejtés önemésztés folyamata rendkívül fontos szerepet tölt be a sejt- és szervezet szintjén lezajló fiziológiai és patológiás folyamatokban. Ilyen folyamatok a differenciáció, fejlődés, öregedés, idegrendszeri változások, daganatképződés, stb. [1][2]. Az Atg9 az Atg fehérjecsald konzervált és egyetlen transzmembrán fehérje képviselője, feladata membrán részletek, lipidek biztosítása az autofág struktúrák növekedéséhez [3]. Az irodalomból ismert, hogy az autofágia folyamata szerepet játszik a *Drosophila melanogaster* petesejt fejlődésében. A *Drosophila* peteérés az irodalomban alaposan körülírt folyamat. A petefészkek petekezdemények láncolataiból áll össze, egy petekezdeményt pedig ivarvonalsejtek (15 dajkasejtek, 1 petesejt) és testi sejtek (follikuláris sejtek, határsejtek, stb.) alkotják. A peteérés folyamán az ivarvonal eredetű sejtek szoros kapcsolatban állnak egymással és a petekezdeményt körbevevő testi sejtekkel, közöttük pedig intenzív kommunikáció zajlik. Mozaik analízisekkel igazolt, hogy az ivarvonal- és testi sejtek között zajló interakció egyik fontos szabályozója az autofágia, azonban csak abban az esetben figyelhető meg termékenység csökkenés, ha a testi sejtekben gátolt az autofágia (*Atg1* vagy *Atg7* mutáns follikuláris sejtek) [4][5]. Ezt a megfigyelést erősíti, hogy számos életképes, *Atg* génre *null* mutáns törzs létezik: *Atg3/Aut1*, *Atg5*, *Atg7*, és *Atg16* [6][7]. Különös módon, a felsorolt *Atg* mutáns törzsektől eltérően, az *Atg9* mutáns nőtények szinte teljes mértékben terméketlensé [8][9]. Felmerült a kérdés, vajon van-e az *Atg9*-nek olyan, az autofágiától független funkciója, mellyel a peteérés szabályozásában vesz részt?

A *Drosophila* peteérés különböző stádiumai (1-14 stádiumok) meghatározott sejtbiológiai és élettani jelek, jelenségek alapján jól elkülöníthetők [10]. Az egyik leginkább vizsgált folyamat a *Drosophila* peteérés során az aktin sejtíváz (citoszkeleton) kialakulása és működése, melynek zavara jól felismerhető elváltozásokat okoz, gyakran pedig a termékenység csökkenéséhez vezet. A sejtívázal kapcsolatos egyik jelenség a 10. stádium végén kezdődő dajkasejt

„dumping”, amely során a dajkasejtek átpréselik citoplazmájukat a petesejtbe, táplálva és megnövelve azt. A dajkasejt dumping hibátlan lezajlásához, a dajkasejtek stabil, erős aktin hálózatára van szükség. A dumping hibája kisebb, ún. „dumpless” petéket eredményezhet. Számos olyan ismert faktor vesz részt az ivarvonal sejtek sejtíváz szabályozásában (aktin, Enabled, profilin, capping fehérjék, stb) [11][12][13], amelyek testszerte, más szövetek sejtjeiben is hasonló módon a sejtíváz kialakítását, működését irányítják (pl. idegrendszer). A dolgozatom alapjául szolgáló munkában a muslica petefészkeben vizsgáltam az Atg9 lehetséges, autofágiától független szerepét, vizsgálataimat pedig más sejtípusokra is kiterjesztettem (embrionális és lárvális szövetek, sejtek).

Célkitűzések

Munkánk célja *Atg9* mutáns muslica törzs létrehozása és annak jellemzése, a *Drosophila Atg9* gén funkciójának meghatározása. CRISPR/Cas9 technikával *Atg9 null* mutáns muslica törzset hoztunk létre, melynek jellemzését klasszikus autofágia tesztekkel, és a muslica petefészke vizsgálatával végeztük. Továbbá genetikai és biokémiai módszerekkel azonosítottuk az *Atg9* két új interakciós partnerét. A genetikai interakciókat és az *Atg9 null* allél hatását a petefészkekben és az idegrendszerben is vizsgáltuk. Céljainkat az alábbi lépéseken keresztül valósítottuk meg:

1. CRISPR/Cas9 technikával *Atg9 null* mutáns létrehozása (*Atg9^{B5}*).
2. Az *Atg9^{B5}* törzs jellemzése (klasszikus autofágia tesztek).
3. Az *Atg9^{B5}* nőstények petefészke morfológiai vizsgálatai.
4. Az *Atg9* aktin sejtíváz kialakulásával kapcsolatos vizsgálatai:
 1. immunhisztokémiai vizsgálatok
 2. az *Atg9* sejten belüli lokalizációjának vizsgálata mikroszkópia segítségével
 3. interakciós vizsgálatok: élesztő kettős-hibrid, GST pull-down és anti-tag ko-immunprecipitáció tesztek, genetikai interakció vizsgálata

Módszerek

1. Az *Atg^{9^{B5}}* deléciós mutáns előállítása CRISPR/Cas9 technikával.
2. Szekvenciameghatározás és PCR technika alkalmazása a deléción mértékének megállapítására.
3. Western blot analízis.
4. Szomatikus klónsejtek létrehozása lárvális zsírtestben.
5. Lárvális zsírtest Lysotracker-rel történő festése.
6. Autofágia vizsgálatok: oxidatív stressz vizsgálata Paraquat mérgezéssel, *Pseudomonas aeruginosa* fertőzési teszt, mászás teszt.
7. Fény-, epifluoreszcens- és elektronmikroszkópos technikák
8. Rekombináns DNS technikák.
9. Transzgénikus *Drosophila* vonalak előállítása.
10. Embriónális-, lárvális- és felnőtt szövetek immunhisztokémiai vizsgálata.
11. Élesztő kettős-hibrid technika.
12. Anti-tag ko-immunprecipitációs technika.
13. GST pull-down technika.
14. Primer embrionális neuronsejtek kinyerése és növesztése *ex vivo*.
15. Citoplazmikus áramlás mérése.
16. Statisztikai számítások alkalmazása.

Eredmények

1. Az *Atg⁹* funkcionális vizsgálata céljából CRISPR/Cas9 módszerrel mutánsokat hoztunk létre, melyekből egy, az *Atg^{9^{B5}}* null allélnak bizonyult. Western blot és zsírsejteken végzett szomatikus klón analízisekkel igazoltuk, hogy az *Atg^{9^{B5}}* null allél elrontja az autofág folyamatokat. Az autofág defektusokat az általunk létrehozott, genomi promóter által

meghajtott *Atg9*-et tartalmazó transzgenikus konstrukciók (*Atg9-3xHA*, *Atg9-3xmCherry*) menekítették, igazolva, hogy a megfigyelt elváltozások az *Atg9* hiányából eredtek.

2. Az *Atg9^{BS}* mutáns egyedek rövidebb ideig éltek, mint a vad típusú kontroll és menekítő transzgenikus (*Atg9-3xHA*) muslicák, továbbá oxidatív stresszt okozó, paraquat toxinnal, valamint fertőzéssel (*Pseudomonas aeruginosa*) szemben is jelentősen érzékenyebnek bizonyultak. Eredményeink ismételten igazolták az *Atg9* hiányából eredő hibásan működő autofágiát.
3. Az *Atg9 null* mutáns nőtényeknek nagymértékben csökkent a termékenysége. Sztereomikroszkópiával igazoltuk, hogy az *Atg9 null* nőtények petefészkei nem csökevényesek, azonban lerakott petéinek ~30%-a kisebb, kerekesebb, mint a kontroll nőtények petéi. Ezek az úgynevezett „dumpless” peték, mely fenotípus az ivarvonal sejtek aktin hálózatának hibájára utalt. Ennek igazolására megmértük a dumping hatására a petesejtben keletkező áramlás sebességét, amely *Atg9 null* esetében jelentősen lecsökkent. Igazoltuk tehát, hogy *Atg9* hiányában az aktin sejtváza működése zavart szenved.
4. CLEM és nagyfelbontású konfokális mikroszkópos felvétel igazolta, hogy az *Atg9* a plazmamembránba benyomódó aktin-kábelek csúcsi részéhez kapcsolódik. *Atg9* hiányában a petefejlődés folyamán a dajka sejtekben a 10. stádium után jellemző aktin-kábel hálózat kialakulása késik, ellentétben más autofág mutánssal (*Atg16^{d129}*), igazolva, hogy az aktin hálózatban bekövetkező változások autofágiától függetlenek.
5. Kimutattuk, hogy az *Atg9* két aktin sejtváza szabályozó fehérjével interakcióban áll. *Atg9* hiányában az Ena/VASP (Ena) fehérje lokalizációja megváltozik dajkasejtekben, valamint lárvális nyálmirigyben kimutattuk, hogy az *Atg9* kolokalizál az Ena-val és a profilinnal is, de hármas kolokalizációt nem találtunk, amely arra utalt, hogy a három fehérje nincs jelen egyszerre, egy komplexben. Az *Atg9* és a profilin fehérjék kölcsönhatását GST pull down

és anti-tag ko-immunprecipitációval is kimutattuk erősítve, hogy a két fehérje valóban egy komplexben van jelen.

6. Genetikai interakciós tesztekkel vizsgáltuk az *Atg9* és az *ena*, illetve az *Atg9* és a *chic* (a profilint kódoló gén) genetikai kölcsönhatását. Fluoreszcens mikroszkópiával igazoltuk, hogy az *Atg9* hiányából ritkán előforduló dajkasejt fúzió és gyűrűcsatorna-vesztés *ena* és *chic* mutáns allélek (*ena*²³ és *chic*²²¹) heterozigótaként történő használatával jelentősen súlyosbítható, igazolva ezzel, hogy az *Atg9* mind az *Ena*-val, mind a profilinnal genetikai kölcsönhatásban állnak.
7. Élesztő kettős-hibrid teszttel igazoltuk, hogy az *Atg9* különböző citoszólikus doménjei (CTD) kötik az *Ena* és a profilin fehérjéket: az első (CTD1) az *Ena*-t, a negyedik (CTD4) a profilint köti. Ismert, hogy a profilin prolin-gazdag régiókhöz kötődik, így megvizsgálva az *Atg9* CTD4 aminosav sorrendjét, találtunk egy prolin-gazdag motívumot, PPRPPAAP, amelyben kicseréltük a prolinokat alaninra. Az új CTD4 (CTD4_mut) kevésbé kötötte a profilint, igazolva, hogy a CTD4 prolinjai szerepet játszanak az *Atg9*-profilin kötésben.
8. Kimutattuk, hogy az *Atg9 null* mutáció hatása embrionális idegrendszerben az aktin-hálózat szabályozásán keresztül érvényesül: hiánya *ex vivo* a primer embrionális neuronok fokozott axon- és filopodium növekedéséhez vezet, idősebb embrióban pedig ritkán a ventrális idegköteg (VNC) középvonali megkereszteződését okozza. Ismert, hogy az *ena* és a *chic* funkcióinak kiesése is hasonló idegrendszeri elváltozásokat okozhatnak [14], így megerősítve látszik az *Atg9* aktin sejtvázas szabályozásában betöltött szerepe az *ena*-n és a *chic*-en keresztül.

Összefoglalás

Vizsgálataink során előállítottuk a *Drosophila Atg9* gén *null* mutánsát (*Atg9^{B5}*). *Drosophila*-ban az *Atg9* hiánya az autofágia mutánsokra jellemző fenotípusokon túl a nőstények jelentősen csökkent termékenységet okozta. A nőstények által lerakott peték jelentős része kisebb, ún.

dumpless pete volt, melynek háttérében az ivarvonal sejtekben működő aktin sejtváza hibája állt. Az Atg9 a dajkasejtekben a membránba benyomódó aktin kábelek végénél volt jelen. Ebből a megfigyelésből kiindulva igazoltuk, hogy az *Atg9* genetikai kölcsönhatásban áll az aktin kábelek összeszerelésének két szabályozó fehérjéjével, az Ena-val és a profilinnel. Az *Atg9*, lévén háztartási gén, a szervezet minden sejtjében jelen van, így aktin-szabályozó hatása is kimutatható volt más szövetekben is, például az embriók fejlődő idegrendszerében. Eredményeink felvetik a lehetőségét, hogy az *Atg9* más organizmusokban, például emlősökben szintén szerepet játszhat a sejtváza kialakulásában vagy stabilizálásában.

A doktori értekezés alapjául szolgáló közlemény, melyben az eredmények publikálásra kerültek:

Drosophila Atg9 regulates the actin cytoskeleton via interactions with profilin and Ena

Kiss, Viktória ; Jipa, András ; Varga, Kata ; Takáts, Szabolcs ; Maruzs, Tamás ; Lőrincz, Péter ; Simon-Vecsei, Zsófia ; Szikora, Szilárd ; Földi, István ; Bajusz, Csaba ; Tóth, Dávid ; Vilmos, Péter ; Gáspár, Imre ; Ronchi, Paolo ; Mihály, József ; Juhász, Gábor

CELL DEATH AND DIFFERENTIATION 27 : 5 pp. 1677-1692. , 16 p. (2020)
(DOI:10.1038/s41418-019-0452-0)

Egyéb közlemények

Vps8 overexpression inhibits HOPS-dependent trafficking routes by outcompeting Vps41/Lt

Lőrincz, Péter ; Kenéz, Lili Anna ; Tóth, Sarolta ; Kiss, Viktória ; Varga, Ágnes ; Csizmadia, Tamás ; Simon-Vecsei, Zsófia ; Juhász, Gábor

ELIFE 8 Paper: e45631 (2019) (DOI: 10.7554/eLife.45631)

On the Fly: Recent Progress on Autophagy and Aging in *Drosophila*

Maruzs, Tamas ; Simon-Vecsei, Zsofia ; Kiss, Viktoria ; Csizmadia, Tamas ; Juhasz, Gábor

FRONTIERS IN CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY 7 Paper: 140 , 15 p. (2019)
(DOI: 10.3389/fcell.2019.00140)

Referenciák

- [1] N. Mizushima and B. Levine, “Autophagy in mammalian development and differentiation,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 12, no. 9, pp. 823–830, 2010.

- [2] F. M. Menzies *et al.*, “Autophagy and neurodegeneration: pathogenic mechanisms and therapeutic opportunities,” *Neuron*, vol. 93, no. 5, pp. 1015–1034, 2017.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.

- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.

