

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biológia Doktori Iskola

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

Ph.D. értekezés tézisei

András Jipa

Témavezető:

Dr. Juhász Gábor, D.Sc. tudományos tanácsadó

Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és
Informatikai Kar



Szeged

2020

Bevezetés

Az autofágia egy evolúciósan erősen konzerválódott intracelluláris lebontó folyamat. A fő útvonala során egy membrán ciszterna keletkezik, amit fagofórnak hívnak (esetleg izoláló membránnak), majd fokozatosan meghosszabbodik és körbe véve a citoplazma egy részét, bezáródik és kialakul belőle a duplamembránú autofagoszóma. Az autofagoszóma az egyetlen kizárólag autofágiához köthető sejtservecske, amely végül, vagy endoszómával, amely végül a lizoszómához fuzionál, illetve fuzionálhat közvetlenül a lizoszómához is. Ezen folyamat során kialakul az autolizoszóma amelyben a lizoszóma hidrolitikus enzimeit monomerjeire bontják a sejt komponenseit.

Az autofágia folyamatát főleg az AMPK, TOR kináz szabályozza, valamint az Atg fehérje komplexek. Ez a katabolikus folyamat rendkívül fontos szerepet tölt be az eukarióta sejtekben, mivel a folyamat során megújulnak a sejtek fehérjéi és sejtservecskéi, ezért jelentős öregedés elleni hatása van, valamint hozzájárul az éhezés okozta stressz elleni védekezésben. Ezen funkciói mellett az autofágiának jelentős szerepe van számos fiziológiai és kóros folyamatban. Ezért az Atg gének tanulmányozása kulcsfontosságú területté vált az elmúlt évtizedekben.

Az egyik legérdekesebb Atg gén, az Atg8, amely egy ubikvitin-szerű fehérje, amely az autofágia során a fagofór

phosphatidylethanolamine (PE) lipidéhez kötődik. Az Atg8 fehérje a fagofórhoz a C-terminális glicin aminosaván keresztül kapcsolódik a fagofórhoz. Ezt a folyamatot egy ubikvitinálással analóg folyamat katalizálja, amelynek van E1, E2 és E3-szerű funkciót betöltő tagja is. A folyamat fontos szerepet játszik az autofágia során, beleértve a fagofór elongációját, a fagofór záródását, a szubsztrátok felismerését, az autofagoszómák mozgását és az autofagoszómák lizoszómához való pályvázását.

Emberben hét Atg8 homológot írtak le, amelyek erős redundanciát mutatnak. Ezzel ellentétben *Drosophila melanogaster*-ben mindössze két Atg8 homológot írtak le eddig: az *Atg8a*-t és az *Atg8b*-t. Ezek pontos funkciót még nem tisztázták. PhD tanulmányaim alatt ezen géneket tanulmányoztam és jellemeztem.

Célkitűzések:

1. Rovar filogenetikai fajfa generálása, amely reprezentálja az Atg8 kópiaszám evolúcióját az Atg8 géncsaládnak.
2. Null mutáns készítése az *Atg8a* és az *Atg8b* génekre, valamint lipidációra képtelen allél készítése az *Atg8a* génre *in vivo* mutagenézis módszerekkel.
3. Az új allélok jellemzése az autofágiában és az egyedfejlődésben betöltött szerepük alapján.

4. Az *Atg8a*-t és az *Atg8b*-t transzgenikusan kifejező konstrukciók készítése az elkészült új allélok menekítésének céljából.
5. Az *Atg8a* és az *Atg8b* kifejeződési mintázatának vizsgálata, olyan transzgenikus riporterek segítségével, amelyek endogén promoterral vannak ellátva.
6. Az *Atg8b* mutáns hím steril fenotípusának vizsgálata.

Anyagok és módszerek

1. Bioinformatikai módszerekkel rekonstruáljuk és az *Atg8* kópiaszám evolúcióját.
2. „Plug-and-Play” módszerrel *Atg8a* génre null allél generálása (*Atg8a*^{Tro-Gal4}).
3. CRISPR/Cas9 közvetítette homológ rekombináció segítségével *Atg8a* génre lipidálódásra képtelen allél generálása (*Atg8a*^{G116*}).
4. CRISPR/Cas9 génszerkesztési módszer segítségével deléciós mutáns előállítás (*Atg8b*^{l6}).
5. Szekvenálással és PCR kísérlettel validálni az új *Atg8a* és *Atg8b* génekre készített allélokat.
6. Western blot vizsgálatok *Atg8* és Ref(2)P ellenanyagok felhasználásával.
7. Szomatikus klónsejtek generálása és vizsgálata lárvális zsírtestekben.
8. Lárvális zsírtestek Lysotracker festése.

9. Transzgénikus riporterek és immunfestések alkalmazása zsírtestekben.
10. Fény-, epifluoreszcens- és elektronmikroszkópia alkalmazása.
11. Rekombináns DNS technikák alkalmazása.
12. Transzgénikus *Drosophila melanogaster* konstrukciók létrehozása .
13. Immunhisztokémiai módszerek használata here mintákon.
14. Statisztikai analízisek.

Eredmények

1. Rekonstruáltuk a rovarfajok Atg8 fehérjecsálád kópiaszám evolúcióját egy törzsfán. Azt találtuk, hogy a rovarok ősi formájában két Atg8 fehérjecsáláddal rendelkeztek, de a második Atg8 fehérje több rovarcsoportban eltűnt, beleértve a Diptera rend legtöbb faját is. Drosophilidae család tagjaiban másodlagosan duplikálódott az *Atg8a* gén, retrotranszpozíció útján duplikálódott létrehozva egy új homológot, az *Atg8b*-t.
2. *Drosophila melanogaster*-ben létrehoztunk egy új null mutánst az *Atg8a* génre. Ehhez egy Plug-and-Play *in vivo* mutagenézis módszert használtuk, úgy hogy genetikai módszerekkel a Trojan (T2A)-Gal4 kazettát helyeztünk a MI13726 transzpozonba. Az így készített konstrukciót

leteszteltük Atg8 ellenanyag segítségével western bloton, ahol nem találtunk kifejeződött Atg8a-t.

3. Készítettünk egy olyan mutánst amely lipidálódásra képtelen Atg8a-t fejez ki. Ehhez egy egyszálú DNS donort és CRISPR/Cas9-el indukáltunk egy homológ rekombinációt használtunk. Az így létrehozott allél nem rendelkezik C-terminális glicinnel, így képtelen a lipidálódásra. Az így létrehozott Atg8a^{G116*} allélt Atg8 ellenanyaggal Western bloton teszteltük, ahol nem láttunk lipidált Atg8 kifejeződést. Ezen felül az allélt DNS szekvenálással is teszteltük az elmutált lokusz körül.
4. Továbbá készítettünk dupla gRNS és CRISPR/Cas9 felhasználásával egy Atg8b génre deléciós null mutánst, az Atg8b¹⁶-ot. Ebben az allélban az Atg8b kódoló régiója teljesen ki lett vágva, amit PCR vizsgálattal, valamint szekvenálással is megerősítettünk.
5. Lárvális zsírtestben végzett szomatikus klónanalízis vizsgálatokban azt találtuk, hogy az Atg8a mutáns zsírsejtekben jelentősen visszaesett a savas struktúrák száma (többnyire autolizozómák) és jelentősen megemelkedett a Ref(2)P (az autofágia specifikus szubsztrát) szintje, ezzel ellentétben az Atg8b mutáns sejtekben nem találtunk jelentős eltérést a mutáns és a kontroll sejtekben. Ezek az eredmények arra engednek

következtetni, hogy az *Atg8b* nem játszik semmilyen szerepet az autofágiában, szemben az *Atg8a*-val.

6. A lárvális középbél első harmadában található vakbelek bábozódáskor történő zsugorodása autofágia függő programozott sejthalál modellként funkcionál. Megfigyeltük, hogy az *Atg8a* null mutánsban a folyamat jelentősen gátolt, ellentétben az *Atg8a* lipidációs mutánssal és az *Atg8b* mutánssal, amelyekben a kontrollhoz hasonlóan megy végbe a folyamat.
7. Endogén promoterű *Atg8a*-t és *Atg8b*-t kifejező riporter transzgének vizsgálatával azt találtuk, hogy míg az *Atg8a* általános kifejeződést mutat, addig az *Atg8b* csak herék szintjén fejeződik ki. Herékben az *Atg8a* moderált általános kifejeződést mutat, amíg az *Atg8b* csak a csíravonal sejtekben expresszál.
8. Az *Atg8b* null mutáns hím steril fenotípust mutat, szemben az összes többi életképes *Atg* mutánssal, amelyek fertilisek. Ez a hím steril fenotípus nem mutatott semmilyen finomszerkezeti elváltozást.
9. A Ref(2)P szintjének transzgenikus riporterek és Western blot vizsgálatok segítségével vizsgálva kimutattuk, hogy az *Atg8b*-nek herék szintjén sincs semmilyen szerepe az autofágiában. Továbbá azt is kimutattuk, hogy az *Atg8b* mutáns hím steril fenotípusát menekíteni lehet egy olyan

transzsgénnel, amely az *Atg8b*-t egy csonkolt, C-terminális glicin nélkül fejezi ki.

10. *Atg8a* promoterével rendelkező *Atg8b*-t kódoló transzgenikus konstrukciók használatával sikerült menekíteni az *Atg8a* mutáns fenotípusait. Ugyanakkor az *Atg8b* promoterral rendelkező *Atg8a*-t kódoló szekvenciával sikeresen menekítettük az *Atg8b* mutáns fenotípusát.

Összefoglaló

Az *Atg8* fontos szerepet tölt be az autofagoszómák biogenezisében az eukarióta élőlényekben. Ezen felül ez a leggyakrabban használt marker az autofágia követésére, köszönhetően annak, hogy kovalens módon kötődik a fagofór lipidjéhez. Az *Atg8* fehérjecsalád jelentős redundanciát mutat a többsejtű állatokban és a növényekben egyaránt, ennek ellenére *Drosophila* fajokban csak két *Atg8* homológot írtak le. Munkám során reverz genetikai megközelítés alkalmazásával kimutattuk *Drosophila melanogaster* modellorganizmuson, hogy a lipidálódott *Atg8a* szükséges az autofágia folyamatához. Ugyanakkor azt is kimutattuk lárvális középbél első felében található vakbelek és a nyálmirigy sejthalál modelljén, hogy a nem lipidálódott forma szerepet játszik az egyedfejlődés függő sejthalálban. Ugyanakkor kimutattuk, hogy az *Atg8b* kizárólag hím ivarvonalon fejeződik ki és ennek megfelelően erős hím steril

fenotípusa van, mivel elvesztette hímivarsejtjei elvesztették a mozgásképességüket. Ugyanakkor ezen szerepének betöltéséhez herék szintjén sem tölt be funkciót az autofágiában. Ezt azzal is igazultuk, hogy a lipidálatlan *Atg8b* transzgénikus kifejeztetése ivarvonalon képes menekíteni az *Atg8b* mutáns fenotípusát. Továbbá kísérleteink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az *Atg8a* és az *Atg8b* különböző funkciói a herék ivarvonál szintjén elsősorban nem szekvenciafüggő, hanem génkefejeződés mintázatával és mértékével függ össze. Az *Atg8* nem kanonikus funkcióiból levonhatjuk azt a következtetést, hogy bár a különböző lipidációért felelős *Atg* gének elvesztése az autofágia meghibásodását okozzák, ennek ellenére nem okoznak jelentős fejlődésbiológiai zavart és hím sterilitást.

Saját közlemények jegyzéke

MTMT azonosító: 10052982

Összesített impakt faktor: 31,897

A fokozatszerzési eljárás alapját képező közlemények jegyzéke:

Analysis of *Drosophila* *Atg8* proteins reveals multiple lipidation-independent roles

András, Jipa ; Viktor, Vedelek ; Zsolt, Merényi ; Adél, Ürmösi ; Szabolcs, Takáts ; Attila, L., Kovács ; Gábor, V., Horváth ; Rita, Sinka ; Gábor, Juhász

AUTOPHAGY, In press (2020)

(DOI: 10.1080/15548627.2020.1856494.) **IF: 9.77**

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) **IF: 10.717**

Egyéb közlemények:

Mutation in ATG5 reduces autophagy and leads to ataxia with developmental delay

Myungjin, Kim ; Erin, Sandford ; Damian, Gatica ; Yu, Qiu ; Xu, Liu ; Yumei, Zheng ; Brenda, A., Schulman ; Jishu, Xu ; Ian, Semple ; ... Andras, Jipa ; Szabolcs, Takats ; Gabor, Juhasz ; Margit, Burmeister,

ELIFE 5 paper, e12245 (2016) **IF: 7.725**

(DOI:<http://dx.doi.org/10.7554/eLife.12245.001>)

The Ccz1-Mon1-Rab7 module and Rab5 control distinct steps of autophagy Burmeister

Krisztina, Hegedűs ; Szabolcs, Takáts ; Attila, Boda ; András, Jipa, Péter, Nagy ; Kata, Varga ; Attila, L., Kovács ; Gábor, Juhász

MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL 27 (20), 3132-3142
(2016) (10.1091/mbc.E16-03-0205) **IF: 3.685**

Konferencia előadások:

1. Jipa A, Takats S, Karpati M, Juhasz G
CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of core autophagy genes in *Drosophila*
Kolozsvári Biológus napok, Kolozsvár, Románia
(2015).
2. Jipa A, Takats S, Varga A, Kiss V, Vedelek V, Sinka R, Juhasz G
Atg gének tanulmányozása ecetmuslicában
PEME XV. PhD Budapest, Magyarország,
(2017).

Konferencia poszterek:

1. Jipa, A ; Takats, S ; Varga, A ; Vedelek, V ;
Urmosi, A ; Mukami, M ; Sinka, R ; Horvath,
VG ; Juhasz, G
Characterization of mutant alleles of Atg8
genes in *Drosophila melanogaster*
V4 Society for Developmental Biology,
Brno, Csehország.
2. Jipa A, Takáts Sz, Varga A, Vedelek V, Sinka
R, Juhasz G
Atg8 genes in *Drosophila melanogaster*
Straub-Napok, 2017. május 24-25. Szeged,
poszter Magyarország (2017).