

Doktori értekezés

Ürmösi Adél

**Szegedi Tudományegyetem
Biológia Doktori Iskola**

***A *Drosophila melanogaster* Ref(2)P LC3- interakciós
régio mutációjának hatása az oxidatív stresszre***

PhD értekezés

Ürmösi Adél

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

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Genetikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatika Kar

2022

Szeged

Tartalom

Rövidítések jegyzéke	3
1. Irodalmi áttekintés	5
1.1. Lizoszóma-függő intracelluláris lebontó folyamatok.....	5
1.1.1. A lizoszóma.....	5
1.1.2. Az autofágia és típusai.....	5
1.1.2.1. Makroautofágia.....	6
1.1.2.2. Mikroautofágia.....	6
1.1.2.3. A chaperon-közvetített autofágia	7
1.1.2.4. RN/DNautofágia (RDA).....	7
1.1.2.5. Krinofágia.....	8
1.1.3. A szelektív autofágia és jelentősebb típusai.....	9
1.1.4. Az autofágia szabályozása	11
1.1.4.1. Az autofág gének	11
1.1.4.2. Az autofágia aktiválása a TOR komplex és az AMPK hatására.....	13
1.1.4.3. Az Atg1/ULK1 szerin-treonin kináz komplex.....	13
1.1.4.4. A foszfatidil-inozitol-3 kináz III (PI3K(III)) komplex	13
1.1.4.5. Az Atg9 vezikulák és az Atg2-Atg18 komplex.....	14
1.1.4.6. Az Atg12 és az Atg8 konjugációs komplex.....	14
1.1.4.7. Az autofagoszóma-lizoszóma fúzió faktorai	16
1.1.4.8. A szelektív autofágia receptorok (SAR).....	16
1.1.4.9. A p62 és a <i>Drosophila</i> homológ Ref(2)P felépítése	18
1.1.4.10. A p62/Ref(2)P kapcsolata az Atg8-al.....	20
1.1.5. Az autofágia vizsgálata és patológiás jelentősége	21
1.2. Az oxidatív stressz.....	22
1.2.1. Az oxidatív stressz és az autofágia.....	23
1.2.2. A Keap-1 - Nrf2/CncC útvonal	23
1.2.3. A Keap1 – Nrf2 útvonal kapcsolata a p62/Ref(2)P -vel	24
2. Célkitűzések	25
3. Anyagok és módszerek	26
3.1. Felhasznált <i>Drosophila melanogaster</i> törzsek.....	26
3.2. Transzgének és transzgénikus törzsek létrehozása	26
3.3. Élethossz és paraquat rezisztencia tesztek.....	27
3.4. Mászó tesztek	27
3.5. RT-Q-PCR tesztek.....	28

3.6.	Mikroszkópos technikák.....	29
3.6.1.	Lysotracker festés (LTR festés)	29
3.6.2.	MitoSOX festés.....	29
3.6.3.	Immuncitokémia.....	29
3.6.4.	Az elektronmikroszkópos minták előkészítése	30
3.6.5.	Ko-immunoprecipitáció és Western blot technikák	30
4.	<i>Eredmények</i>	33
4.1.	A <i>p62/Ref(2)^{PLIR}</i> mutánsok létrehozása és izogenezálása	33
4.2.	A <i>p62/Ref(2)^{PLIR}</i> mutánsokban az ubiquitinált fehérje aggregátumok száma megnő	34
4.3.	A <i>Ref(2)^{PLIR}</i> mutáns állatok nem szelektív autofágiája nem változik.....	38
4.4.	A <i>Ref(2)^{PLIR}</i> mutáns állatok proteozómális funkciói sértetlenek.....	40
4.5.	A <i>Ref(2)^{PLIR}</i> mutáns állatok nem mutatnak fiziológiai problémákat, azonban jobban ellenállnak a paraquat által kiváltott oxidatív stressznek	42
4.6.	A Ref(2)P - Keap1 kapcsolata és ennek változása a LIR mutáció hatására.....	44
4.7.	A Nrf2/Cnc aktivációjának szerepe a paraquat toleranciában	45
4.8.	Az öregedéssel összefüggő mitokondriális szuperoxid termelés csökken a megemelkedett Nrf2/Cnc szint hatására	47
4.9.	Az aggregátumok növekedéséhez a Ref(2)P - ubiquitin együttműködése szükséges	50
4.10.	A Ref(2)P LIR mutációja csökkenti a Ref(2)P mitokondriális lokalizációját, amit az ubiquitin túltermelés helyreállít.....	52
5.	<i>Eredmények megvitatása</i>	54
5.1.	A <i>Drosophila Ref(2)^{PLIR}</i> mutációja ubiquitinált fehérje-aggregátumok képződését eredményezi, azonban ez alig befolyásolja az állatok élethosszát	54
5.2.	<i>Ref(2)^{PLIR}</i> állatok alapszintű autofágiája működőképes marad.....	54
5.3.	A <i>Ref(2)^{PLIR}</i> állatoknak nincs látványos fiziológiai rendellenességük, azonban jobban ellenállnak a paraquat által kiváltott oxidatív stressznek.....	55
5.4.	A <i>Ref(2)^{PLIR}</i> állatok paraquat rezisztenciáját a Keap1-gyel való kötődése és az Nrf2 út vonal aktiválás befolyásolja	56
5.5.	Az aggregátumképződés zavara a felhalmozott Ref(2)P-t a mitokondriumokra irányítja.....	57
6.	<i>Összefoglalás</i>	59
7.	<i>Summary</i>	63
8.	<i>Irodalomjegyzék</i>	67
9.	<i>Köszönetnyilvánítás</i>	77
10.	<i>Saját hozzájárulásom a munkához</i>	79
11.	<i>Függelékek</i>	80

Rövidítések jegyzéke

AIM – Atg8 interakciós régió (ATG8-interacting motif)

Atg – Autofágiát szabályozó gén (Autophagy related gene)

ATP – Adenosine 5'-triphosphate

CCCP – Carbonyl Cyanide Chlorophenylhydrazone

CMA – Dajkafehérje közvetítette autofágia (Chaperone-mediated autophagy)

Cvt – Citoplazma vakuólum útvonal (Cytoplasm-to-vacuole targeting)

DAPI – 4', 6-diamidino-2-fenilindol

E1 – E1 ubiquitin aktiváló enzim

E2 – E2 ubiquitin konjugáz

E3 – E3 ubiquitin ligáz

ER – Endoplazmatikus Retikulum

GFP – Green Fluorescent Protein

Hsc70 –Heat shock cognate 71 kDa protein

HOPS – Homotypic fusion and protein sorting

HTT –Huntingtin

Keap1 – Kelch Like ECH Associated Protein 1

KIR – Kelch-szerű interkációs régió (Kelch-like interacting region)

LAMP2C – Lizoszómális membrán asszociált protein 2 (Lysosomal membrane-associated protein 2)

LIR – LC3 interakciós régió (LC3 Interacting Region)

LTR – LysoTracker-Red

MTG – Mitotracker Green

NBR1 – Neighbor of Brca1 gene

NEB – New England Biolabs

Nrf2 – Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2

OPTN – Optineurin

PBS – Phosphate Buffered Saline puffer

PE – Foszfatidil-etanol-amin

PINK1 – PTEN-induced kinase 1

PI3P – Phosphatidylinositol-3-Phosphate

PCR – Polimeráz lánreakció (Polymerase chain reaction)

PQ – Paraquat

ROS – Reaktív oxigén gyökök (Reactive oxygen species)

RT-Q-PCR - Quantitative Real Time PCR

RNS – Ribonukleinsav

SDS – Sodium dodecyl sulfate

SLE – Szisztémás lupus erythematosus

SNARE – SNAP REceptor

ssDNS – Single stranded dezoxiribonukleinsav

SQSTM1 – Sequestosome 1

UAS – Upstream Activation Sequence (Upstream Aktiváló Szekvencia)

UBA – Ubiquitin-associated domains

1. Irodalmi áttekintés

1.1. Lizoszóma-függő intracelluláris lebontó folyamatok

1.1.1. A lizoszóma

A lizoszómákat Christian de Duve és munkatársai izolálták először patkánymájából és a hidrolitikus aktivitása után nevezték el (DE DUVE et al. 1955). Az első elektronmikroszkópos vizsgálatok során Novikoff és munkatársai szintén patkánymájban írták le a lizoszómát, amit savas pH-ja miatt sötét és denz képletként figyeltek meg (Novikoff, Beaufay, and De Duve 1956).

A lizoszómák a fő sejtkomponensek, amelyek felelősek az extracelluláris anyagok fagocitózissal, endocitózissal, vagy az intracelluláris anyagok autofágiájával való elkülönített lebontásáért. A meghibásodásuk során emésztetlen anyagokat halmoznak fel, amelynek súlyos következményei lehetnek, mint például a neurodegeneratív rendellenességekhez való hozzájárulás, ilyenek a Huntington-, Parkinson- és Alzheimer-kór. Az ezekben a betegségekben keletkező aggregátumok eltávolítása a lizoszóma által egy ígéretes terápiás megközelítés lehet (Saftig and Haas 2016). A lizoszómák membránnal határolt, dinamikus, heterogén organellek, melyek különbözhetnek morfológiájukban, méretükben, enzimtartalmukban és szubsztrátjukban is. Membránjuk több száz integrált és perifériás membránfehérjét valamint ioncsatornát tartalmaz. A savas 4,5-5,5 pH értéket a több alegységből álló V-ATPáz protonpumpa tartja fent. Az alacsony pH érték teszi lehetővé a több mint 50 intralizoszómális hidroláz aktivitását, ami végül megemészteti a bekerülő makromolekulákat és patogén baktériumokat. A lebontott végtermék végül elszállítódik és újrahasználandó a sejt homeosztázisában. Ezen kívül a lizoszómáknak fontos szerepük van az autofágia szabályozásában is (Yang and Wang 2021).

1.1.2. Az autofágia és típusai

Az autofágia (sejtes önmérsztés) egy eukariótákban erősen konzervált sejtes újrahasznosító folyamat, az ubiquitin-proteoszóma rendszer mellett a másik fő degradációs útvonal. Fontos szerepe van a sejt túlélésében és fenntartásában, a citoplazmatikus organellek, fehérjék valamint egyéb makromolekulák lebontásában és ezeknek az újrahasznosításában. Az újrahasznosítás új építőköveket és energiát szolgáltat a sejtnek az

újjaépüléshez és a normális homeosztázishoz (Parzych and Klionsky n.d.). Eleinte úgy gondolták, hogy az autofágia nem a szelektív degradációs folyamatokért felelős és éhezés során az energia pótlásában van szerepe. Éppen ezért különbséget tettek az alapszintű autofágia és az éhezés vagy stressz indukált autofágia között. Azonban mára a szelektív autofágiának több típusa is ismert, például organellumok (mitofágia, pexofágia), baktériumok (xenofágia), riboszómák, makromolekulák, egyedi molekulák és fehérje aggregátumok (aggregfágia) specifikus lebontása (Birgisdottir, Lamark, and Johansen 2013). Az autofágia fő típusai: a makroautofágia, a chaperon-közvetítette autofágia, RN/DNautofágia, mikroautofága és a krinofágia (Johansen and Lamark 2011).

1.1.2.1. Makroautofágia

A makroautofágia (a dolgozatban a nemzetközi gyakorlatnak megfelelően autofágiának nevezem) során egy sajátos, a folyamatra jellemző köztes organellum segíti a lebontást, ez az autofagoszóma (**1A. ábra**). Ez az autofágia legismertebb és leggyakoribb formája. A folyamat során egy duplamembránú ciszterna, az izoláló membrán (más néven fagofór) alakul ki. Ez a fagofór bekebelezi a citoplazma azon részét, ahol a lebontásra ítélt anyagok és sejtszervecskék találhatóak. Ez a kettős membránnal körülvett autofagoszóma, ami ezután egy endoszómával vagy lizoszómával fuzionálva létrehozza az amfiszómát vagy az autolizoszómát. Az amfiszóma belsejében multivezikuláris testekre jellemző kis vezikulák és egy az autofagoszóma belső membránjával határolt beltartalom található. Az autolizoszóma már csak egyszeres membránnal határolt, mert a folyamat során az autofagoszóma belső membránja lebomlik, hasonlóan mint a benne található anyagok a lizoszómában található savas hidrolázok segítségével (Mizushima and Komatsu 2011).

Először Christian de Duve használta az autofágiát, mint fogalom. Az 1950-es évek végén elektronmikroszkópos vizsgálatok segítségével azonosították a fagofórt és az autofagoszómát. Azonban a folyamatban résztvevő gének leírása később történt meg (Duve 1963).

1.1.2.2. Mikroautofágia

A mikroautofágia során a citoplazma betüremkedik a lizoszómába, majd a lizoszóma membránja lefűződik és a bejutott citoplazma lebontódik a tartalmával együtt (**1B. ábra**). A membrán dinamika igen hasonló az ESCRT-függő multivezikuláris test kialakulásához, ami a késői endoszómánál figyelhető meg (Mizushima and Komatsu 2011). A mikroautofágia még

kevésbé ismert és kisebb jelentőségű, mint a makroautofágia, azonban a szelektív változata akár organellek, például mitokondrium, endoplazmatikus retikulum és akár a sejtmag lebontására is képes (Yim and Mizushima 2020).

1.1.2.3. A chaperon-közvetített autofágia

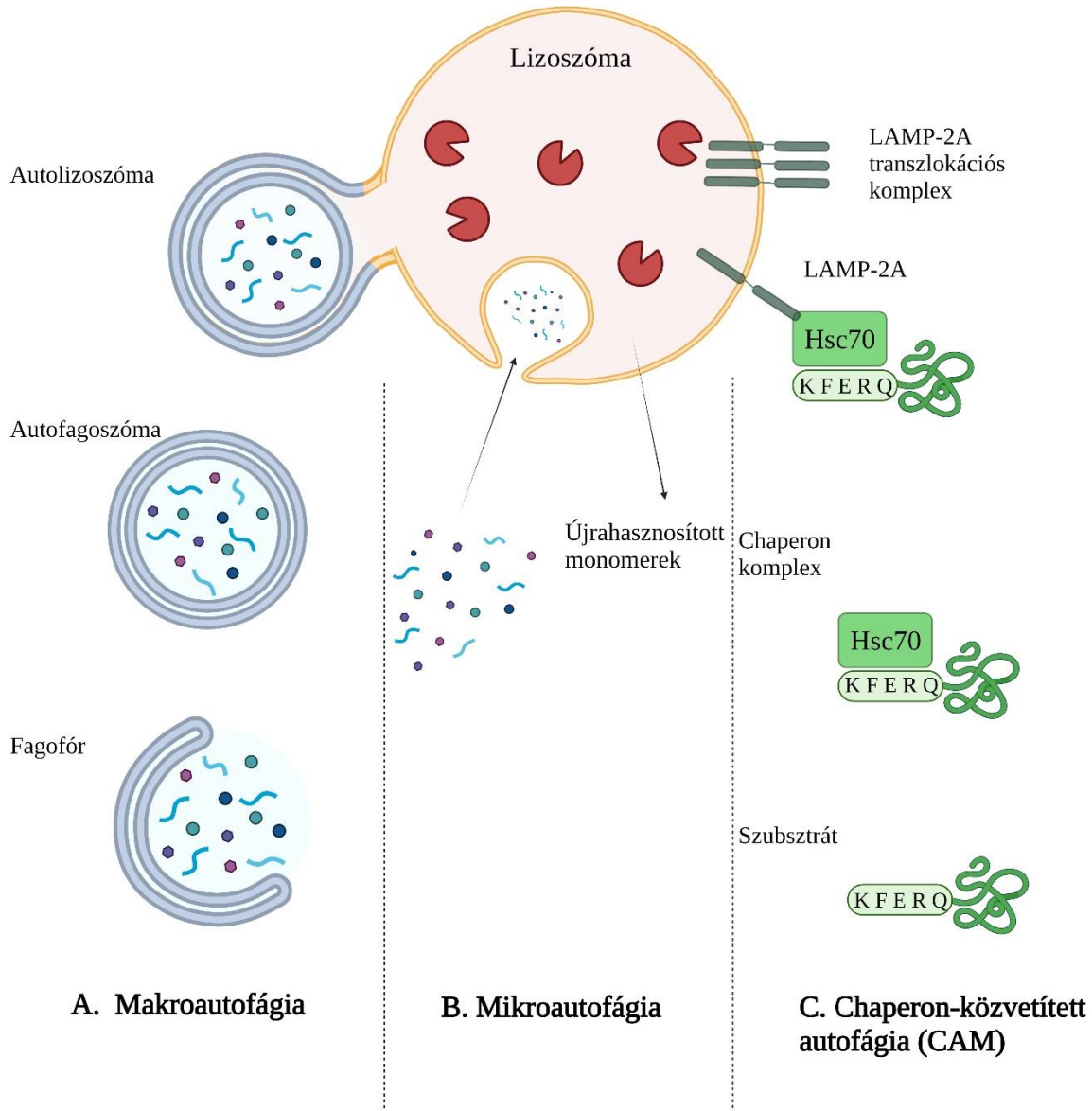
A chaperon-közvetített autofágia (CMA) egy szelektív formája az autofágiának, amely során a specifikus citoszolikus fehérjék egy az egyben transzportálódnak a lizoszóma membránján keresztül és degradálódnak (**1C. ábra**). A folyamat közben a membránok nem szerveződnek át. A CMA szelektíven a citoszolban oldott fehérjék lebontására specializálódott, tehát ez az útvonal nem bont le sejtsejtszervecskéket. Hsc70 citoszolikus chaperon fehérjék specifikusan felismerik azokat a hibás felépítésű fehérjéket, amik tartalmazzák a KFERQ motívumot. A KFERQ motívumot először a ribonukleáz A-ban azonosították (Orenstein and Cuervo 2010). Ezután a Hsc70 a lizoszóma membránjában elhelyezkedő Lamp2A-hoz kapcsolódik, majd további dajkafehérjék segítségével membrántranszportra alkalmas szerkezetűvé alakul. Utolsó lépésként a Lamp2A multimerizálódik és csatornát képez amin keresztül a lebontandó fehérje képes a lizoszóma lumenébe jutni, ahol a hidrolitikus enzimek által lebomlik (Cuervo and Dice 1996).

1.1.2.4. RN/DNautofágia (RDA)

Az autofágia ezen típusánál a nukleinsav direkt módon jut a lizoszómába és bomlik le. Ez az útvonal ATP-függő és a CMA útvonaltól eltérően független a Hsc70-től. Az útvonalhoz szükséges lizoszómális membrán fehérje a Lamp2, amelynek három izoformája létezik, a Lamp2A, Lamp2B és a Lamp2C. Mindhárom tartalmaz egy transzmembrán régiót és azonos felépítésűek, kivéve a különböző C-terminális citoszolikus véget. A Lamp2A a már korábban említett CMA útvonalban játszik szerepet. A Lamp2B DNS-kötő képességgel rendelkezik. Az evolúciósan konzervált Lamp2C pedig lizoszómális membrán fehérje, amely kötődik az RNS-hez. Ezen kívül képes direkt kapcsolódni a DNS-hez is, így annak lebontásában is szerepe van (Fujiwara, Furuta, et al. 2013; Fujiwara, Kikuchi, et al. 2013). Az autofágia ezen típusának valószínűleg a vírus- vagy mitokondriális eredetű DNS lebontásában van szerepe, azonban a mechanizmusa még nem ismert (Nguyen et al. 2017).

1.1.2.5. Krinofágia

Krinofágia során a sejt által megtermelt, azonban ki nem ürült, illetve az előregedett szekréciós granulumok fuzionálnak a lizoszómákkal. A folyamat során létrejön a krinoszóma, amely egy egyszeres membránnal határolt, vegyes eredetű és beltartalmú képlet. Általában az eredeti lizoszómát és a szekréciós granulumot és annak alkotóit tartalmazza. Jellemzően endokrin sejtekben figyelhető meg, ahol intenzív a szekréciós tevékenység. A folyamatban résztvevő faktorok még alig ismertek (Csizmadia et al. 2018).



1. ábra. Az autofágia típusai. Az autofágia összes típusa során a sejt saját anyagai kerülnek lebontásra és újrahasznosításra a lizoszóma segítségével. **A.** A makroautofágia során a kettős membránnal rendelkező fagofór alakul ki a citoszolban. Ezután a fagofór bezárulásával kialakul az autofagoszóma, amely tartalmazza a citoplazma egy részét és a degradációra ítélt sejt szervecskéket és makromolekulákat. Ezután az autofagoszóma egy endoszómával, vagy lizoszómával fuzionálva autolizoszómává alakul. A lizoszómában lévő savas hidrolázok elvégzik a

bejuttatott anyagok lebontását. **B.** A lizoszóma membránjának betüremkedése a citoplazma egy részét bekebelezi, majd azonos módon a többi típushoz, lebontja. **C.** A chaperon-közvetített autofágia során dajkafehérjék és a Lamp2A fehérjék segítségével kerülnek degradálódásra a hibás konformációjú fehérjék. (Andrade-Tomaz et al. 2020) alapján a Biorender felhasználásával).

1.1.3. A szelektív autofágia és jelentősebb típusai

A szelektív autofágia során a sejt célzott módon bont le egy sérült, vagy már szükségtelen makromolekulát, vagy akár sejt szervecskét. A nem szelektív autofágiát inkább éhezés során figyelték meg, amikor a sejt a citoplazma egy véletlenszerű részét emészt meg. A szelektív autofágia a makroautofágia egy típusa, amiben szerepet játszanak autofágia receptor fehérjék. Ezeknek fontos szerepük van, mivel képesek poliubiquitin láncokat kötni a lebontásra ítélt fehérjékhez és az Atg8-at, amely fagofór membránján található. Így juttatják be a degradálandó makromolekulákat az autofagoszómába, amik ezután lizoszómával fuzionálva lebontásra kerülnek. A folyamat során az Atg8 és az autofág receptor is degradálódik (Gatica, Lahiri, and Klionsky 2018). Emlősökben a SQSTM1, NBR1 és az OPTN a legjellemzőbb receptorok, amik az Atg8 fehérjéhez vagy homológjához kapcsolódnak. A szelektív autofágiának több típusa van, aszerint hogy melyik organelum lebontásáért felelnek.

Az **aggrefágia (2A. ábra)** felelős a fehérje-aggregátumok lebontásáért, kiválthatják különböző proteotoxikus állapotok, mint például a 26S proteaszóma vagy a chaperonok gátlása. A lebontásra ítélt aggregátumok ubiquitinálódnak, majd egy szelektív autofágia receptor ezt összeköti a fagofóron lévő adaptor fehérjével. Az aggregálódott fehérjék felhalmozódását általában a neurodegeneratív betegségekkel hozzák összefüggésbe, mint például Alzheimer-kór, Parkinson-kór és a Huntington-kór. Megfigyelték, hogy ezeknél a betegségeknél a felhalmozódott fehérjék aggregációra hajlamosak, mint például a mutáns HTT (Huntingtin) (Ravikumar et al. 2004; Bhattacharjee et al. 2019).

A **mitofágia (2B. ábra)** a hibás vagy szükségtelen mitokondriumok lebontásáért felel, ezzel fenntartja a normális metabolikus homeosztázist és több neurodegeneratív és mozgásszervi betegségtől védi meg a szervezetet. Jelenleg ez a legjobban jellemzett szelektív autofágia típus, felfedezése a Parkinson-kór esetében sikerült. Ebben a szelektív autofágia típusban a képződő fagofór a mitokondrium felszínéhez asszociálva jön létre és növi körbe a degradációra szánt mitokondriumot, így a környező citoplazma gyakorlatilag nem kerül bele az autofagoszómába. A folyamatban a PINK1 kináznak és a Parkin E3 ligáznak van fontos szerepe az ubiquitin láncok felépítésében a mitokondrium külső membránján. A sérült mitokondrium külső membránjára kötődik a PINK1 és foszforilálja az ubiquitin és a Parkin UBL doménjét.

Ezek együttesen aktiválják a Parkint a mitokondriumokban. Ezután egy p62-höz hasonló szelektív autofág receptor közvetítésével a mitokondrium lebontásra kerül. A PINK1 vagy a Parkin funkcióvesztése a károsodott mitokondriumok felhalmozódásához vezet, ami a Parkinson-kór és más neurodegenerációs tünetek kialakulásához vezet (R. H. Chen, Chen, and Huang 2019; Lee, Giordano, and Zhang 2012).

A **lipofágia (2C. ábra)** a lipid cseppek lebontását végző folyamat, aminek a legnagyobb szerepe éhezés során van, mivel a sejt triglicerid homeosztázis fenntartásával segíti az életben maradást. A zsírtesteket körülvevő perilipin fehérjéket a chaperon közvetítette autofágia bontja le, ami a lipofágia folyamatát gyorsítja. Nincs specifikus receptora ami csak a szelektív autofágia ezen formáját segítené elő (Singh et al. 2009).

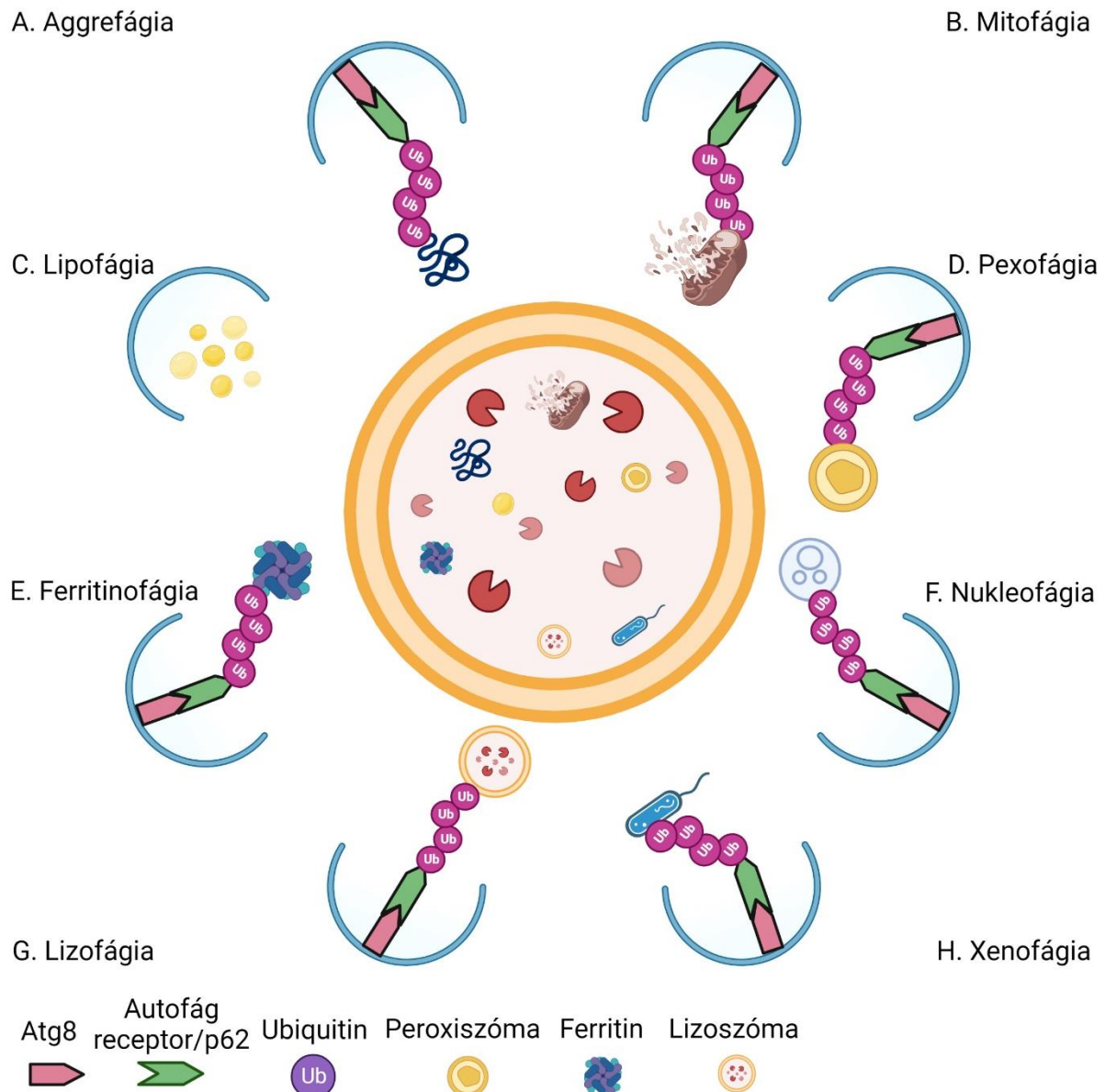
A **pexofágia (2D. ábra)** a peroxiszóma lebontását jelenti. A folyamathoz szükséges a PEX2 E3 enzim, ami monoubiquitinálja a PEX5-öt. Ezután a SQSTM1 és az NBR1 autofág receptorok ismerik fel a PEX5-öt. Ezek segítségével a peroxiszóma a fagofórhoz kötődik és lebontásra kerül (J. Zhang et al. 2015).

Ezen kívül még több kevésbé ismert és kisebb szelektív autofágia típus is létezik. Ilyen a **ferritinofágia, (2E. ábra)** amely során a ferritin bomlik le NCOA4 receptor segítségével, ezzel hozzájárulva a vashiány pótlásához.

Nukleofágia (2F. ábra) során a nukleáris komponensek, beleértve a DNS, RNS, a sejtmag, a nukleáris fehérje és a nukleáris burok lebontását végzi, amely során először mikronukleuszok képződnek és ezeket ismeri fel az autofág rendszer. Két formája van, a makronukleofágia és a mikronukleofágia (Otto and Thumm 2021; Li et al. 2020).

A **lizofágia (2G. ábra)** a lizoszóma lebomlásának folyamata. A nem stabil lizoszómákból a citoszolba nagy mennyiségű hidroláz szabadul ki, ami káros a sejtre. A lizoszóma kiszakadásakor protonok és kalcium szabadul fel, ami a sejtfunkciókat is tönkreteszi. Ahhoz, hogy a celluláris homeosztázist a sejtek képesek legyenek fenntartani a sérült lizoszómákat el kell távolítani, mivel az intracelluláris lizoszómák össz-száma csak kis mértékben változik, még akkor is ha ezek közül több is működésképtelen (Li et al. 2020).

A **xenofágia (2H. ábra)** pedig az intracelluláris patogének például gombák, baktériumok és vírusok lebontásában játszik fontos szerepet. A xenofágia során ugyanazok az autofág receptorok játszanak szerepet mint amik a mitofágia során is (Gatica, Lahiri, and Klionsky 2018; Li et al. 2020).



2. ábra. A szelektív autofágia típusai. A szelektív autofágia típusaiban szerepe van a fagofór membránján lévő adaptor fehérjének, ez általában az Atg8 vagy a homológja, egy szelektív autofág receptornak (SQSTM1, NBR1, OPTN) és az ubiquitin jelölésnek, ami a degradálandó makromolekulát vagy sejtstruktúrát jelöli ki az autofág rendszernek. Mindegyik típusban az autofagoszóma lizozómával fuzionál ((Gatica, Lahiri, and Klionsky 2018) alapján a Biorender felhasználásával).

1.1.4. Az autofágia szabályozása

1.1.4.1. Az autofág gének

Az 1990-es években Oshumi és munkatársai több autofágiával összefüggő gént azonosítottak élesztő modellben. Ezeknek a funkcionális homológja megtalálható magasabb rendű eukariótákban is (**1. Táblázat**). 2003 óta Atg génekként ismerjük a folyamatban

résztevő géneket. Az autofág folyamatokat az Atg fehérjék komplexekbe rendeződve hajtják végre (Sheng and Qin 2019). Körülbelül 16-20 konzervált Atg fehérjét ismerünk és mindegyiket különálló biokémiai és funkcionális csoportokba soroljuk, attól függően, hogy az autofágia mely részében hatnak (Levine and Kroemer 2019).

SZEREP:	<i>S. CEREVISIAE</i>	<i>DROSOPHILA M.</i>	<i>H. SAPIENS</i>
INDUKCIÓ	TOR	dTOR	mTOR
	ATG1	Atg1	ULK1, ULK2
	ATG13	Atg13	ATG13
	ATG17	–	–
	ATG29	–	–
	ATG31	–	–
	–	Atg17/ FIP200	FIP200, RB1CC1
NUKLEÁCIÓ	–	Atg101	ATG101
	ATG6	Atg6	BECN1
	VPS34	VPS34/Pi3K59F	PIK3C3
	VPS15	ird1	PIK3R4
	ATG14	Atg14	ATG14 (barkor)
	–	Uvrag	UVRAG
	–	endoB	SH3GLB1
	–	buffy	BCL2
	–	–	AMBRA1
	ATG3	Atg3	ATG3
	ATG4	Atg4	ATG4A,B,C,D
	ATG5	Atg5	ATG5
	ATG7	Atg7	ATG7
	ATG8	Atg8a, Atg8b	MAP1LC3A, MAP1LC3B, MAP1LC3B2, MAP1LC3C, GABARAP, GABARAPL1 GABARAPL2
	ATG10	Atg10	ATG10
	ATG12	Atg12	ATG12
ATG16	Atg16	ATG16L1, ATG16L2	

1. Táblázat. Az autofág gének és homológjai (Zirin, Perrimon, and Hughes, n.d.)

1.1.4.2. Az autofágia aktiválása a TOR komplex és az AMPK hatására

A korábban már említett tápanyagmegvonás egy erős autofágia aktivátor. Az éhezés hatására az autofágia vizsgálata könnyebb, mivel egy gyors válasz indul be az intracelluláris fehérjék és organellek tömeges lebontásának érdekében. Ez a folyamat aminosavakat és energiaforrást biztosít a túléléshez. Az autofágia fő szabályozója a tápanyag hozzáférhetőségre a mTOR komplex 1 (mTORC1) (**3. ábra**). Az mTOR egy szerin/treonin protein kináz, ami a sejtnövekedés és az anyagcsere szabályozásáért felelős. A lizoszómák citoszol felőli oldalán aktiválódik, amikor aminosavakat érzékel. Ilyenkor az aktív mTORC1 gátolja az autofágiát az ULK1 és az Atg13 foszforilálásával. Aminosav megvonás esetén az mTORC1 aktivációja megszűnik és az ULK1 valamint az Atg13 gyors defoszforilációjának hatására az ULK1 kináz aktiválódik és ez az autofágia indukcióját eredményezi.

Az ULK1 kináz komplex aktiválását más faktorok is segíthetik, például növekedési faktorok jelátvittele és az energiamegvonás is befolyásolhatja az mTOR aktivitását. Energiamegvonás hatására az alacsony ATP szint vagy az AMP:ATP arány növekedése az AMP-aktivált protein kináz (AMPK) aktiválását okozza (**3. ábra**). Az AMPK képes inaktiválni az mTORC1 komplexet a rajta található RAPTOR fehérje foszforilálásával. Az AMPK ezen kívül képesek közvetlenül foszforilálni az ULK1-et és így aktiválni azt, azonban ellentétben ezzel képesek foszforilálni az Atg13-at, amivel az mTORC1 gátlását segítik elő amennyiben az éhezés megszűnik (Zachari and Ganley 2017).

1.1.4.3. Az Atg1/ULK1 szerin-treonin kináz komplex

Autofágia során az Atg1/ULK1 szerin-treonin kináz komplex (**3. ábra**) az első, amelyik aktiválódik, az autofágia iniciációjáért felel és összetobozza, valamint aktiválja a szükséges fehérjéket. A növekedés során az Atg1-hez kötődő Atg13-at a TORC1 kináz foszforilálja, azonban éhezés hatására defoszforilálódik, ami növeli az Atg13 affinitását az Atg1-hez, ezzel fokozva az aktivitását. Ezenkívül élesztőben az Atg1 kötőpartnere még az Atg17, ami kapcsolódik az Atg29-hez és az Atg31-hez. Ez a komplex specifikusan az éhezés indukált autofágiához szükséges (Ganley et al. 2009).

1.1.4.4. A foszfatidil-inozitol-3 kináz III (PI3K(III)) komplex

Másodszor a foszfatidil-inozitol-3 kináz III (PI3K(III)) komplex (**3. ábra**) aktiválódik, amelynek tagja az élesztőben a Vps34, ami két komplex létrehozására képes. Az I-es komplex az autofágiához szükséges, míg a II-es a Vps útvonáshoz. Az I-es komplexet alkotja a Vps34,

Vps15, Vps30/Atg6 és az Atg14. A II komplexben Atg14 helyett Vps38/UVRAG található. Ez az egy alegység határozza meg a komplex lokalizációját, például a Vps38 jelenléte endocitotikus membránokban specifikus. Fontos szerepe van ezenkívül a nukleációban, vagyis az autofagoszóma membránjának kialakulásában (Ohsumi 2014). A Vps34, ami egy III típusú PI3-kináz, foszfatidilinozitol-3-foszfátot (PI3P) hoz létre a foszfatidil-inozitolból a membránban, ezzel megindítva a membránt az izoláló membrán képződése felé. A Vps15 lipid horgonyként a komplexet a membránhoz köti. Az Atg6 pedig fontos szerepet játszik a komplex összeszerelődésében és aktiválásában (Itakura et al. 2008; Juhász et al. 2008).

1.1.4.5. Az Atg9 vezikulák és az Atg2-Atg18 komplex

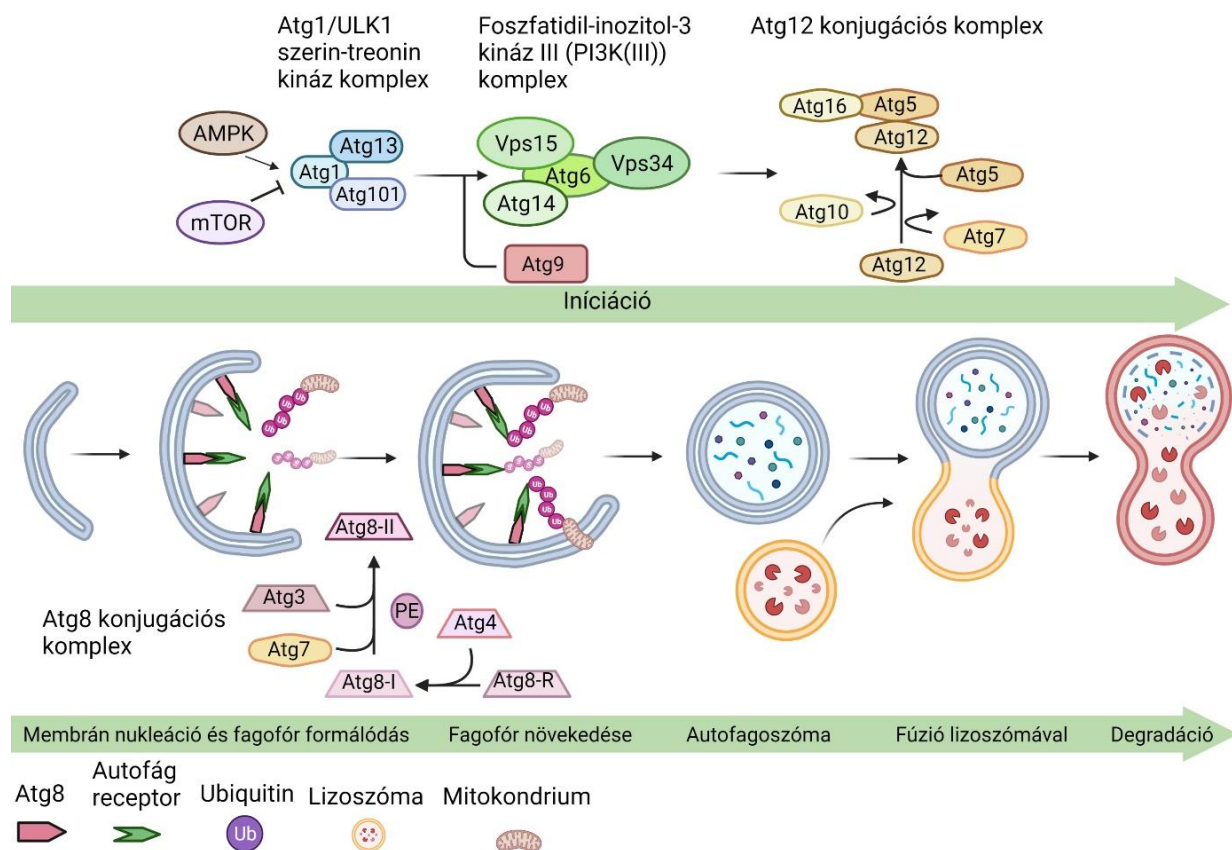
Az Atg9 (**3. ábra**) az egyetlen ismert, evolúciósan konzervált transzmembrán doménnel rendelkező Atg fehérje. Az autofagoszóma kialakulásához membránrészletek és lipidek szállítása valamint reciklizálása a feladata, az Atg1 komplex segítségével. Az Atg9 pozitív struktúrákat megfigyelték az ER-ben, transz-Golgiban, korai és újrahasznosuló endoszómákban is. Az Atg9 autofágia folyamatában betöltött szerepe még nem tisztázott. Ezen felül az Atg9 rendelkezik nem autofágiával összefüggő szereppel is, például a kulcsfontosságú kortikális aktin hálózat kialakításában van szerepe (Kiss et al. 2020; Yamamoto et al. 2012).

1.1.4.6. Az Atg12 és az Atg8 konjugációs komplex

Az autofágiához szükséges két ubiquitinszerű fehérje konjugációs komplex (**3. ábra**) is, amelyeknek a fagofór elongációjában van szerepe. Az Atg8 és az Atg12 ubiquitinszerű fehérjék ubiquitinálása történik a komplex többi tagjának segítségével. Az Atg12 lipidációját az Atg7 E1-szerű enzim aktiválja, aminek hatására az utolsó glicinjén egy tiolészter kötést alakít ki az Atg7-tel, majd az Atg10 E2-szerű enzimmel. Az ebben a folyamatban poszttranszlációs módosításon átesett Atg7 szükséges lesz az Atg8 lipidációjához.

Az Atg8 C-terminálisán található glicint követő régióját az Atg4 cisztein endoproteáz lehasítja, majd ezt a már poszttranszlációs módosításon átesett fehérjét az Atg7 E1 funkciójú enzim aktiválja ATP-függő módon. A folyamatot az Atg3 E2 funkciójú enzim segíti. Részt vesz még a folyamatban az Atg12-Atg5-Atg16 komplex, mely E3-szerű enzim funkcióval rendelkezik. Ennek kialakulásakor az Atg12 az Atg5-höz kötődik egy izopeptid kötésen keresztül az első konjugációs rendszer aktivitása révén, majd ehhez a dimerhez kapcsolódik az Atg16 E3-szerű enzim a C-terminális régiójával az Atg5 N-terminális régióján keresztül. Ez a komplex képes további multimerizációra. Az Atg16 szerepe leginkább a komplex fagofórhoz

való kapcsolódásában van. Ez a komplex felelős a korábban kialakított karboxi-terminális glicin kovalens kötődéséért a foszfatidil-etanolaminhoz (PE), ami a képződő fagoforon is megtalálható. Ezt a folyamatot az Atg8 lipidációjának is nevezik. A lipidált Atg8 mediálja a fagofór elongációját, majd bezáródását. Az Atg8 dekonjugálásához az Atg4 szükséges, ami az autofagoszóma külső részéről eltávolítja az Atg8-at (Das, Shrivage, and Baehrecke n.d.; Geng and Klionsky 2008; Pang et al. n.d.). Ezen felül az Atg8-nak számos, az autofágiával nem összefüggő folyamatban is szerepe van, így találhatunk lipidált és lipidálatlan Atg8-at is (Martens and Fracchiolla 2020). Ismert, hogy a fagocitózis során, amikor a sejt membránja körbevesz egy apoptotikus sejtet vagy mikrobát és lefűzi egy egyrétegű lipiddel körülvett fagoszómába, azt bizonyos körülmények között Atg8/LC3 borítja be (Sanjuan et al. 2007). Ezt a folyamatot LC3-asszociált fagocitózisnak is nevezzük, illetve generalizálva más egyrétegű membránokra (pl. endoszóma, lizoszóma) CASM-nak (conjugation of Atg8 to single membranes). A lipidálatlan forma funkciója az endoplazmatikus retikulum kapcsolt lebontási útvonalban is megfigyelhető (Liu et al. 2018).



3. ábra. Az autofágia szabályozása. Az mTOR és az AMPK felől érkező jelek hatására elindul az autofágia. Először az Atg1/ULK1 szerin-treonin komplex odatobozza és aktiválja az autofágiáért felelős fehérjét. Ezután a foszfatidil-inozitol-3 kináz III (PI3K(III)) komplex az autofagoszóma membránjának kialakításában vesz részt. Ezen komplex tagjai közül a Vps15 lipid horgonyként a komplexet a membránhoz köti, míg az Atg6-nak a komplex összeszerelődésében és aktiválásában van szerepe. Az Atg9 az autofagoszóma kialakulásához

membránrészeket és lipideket szállít. Az Atg12 és Atg8 konjugációs komplex feladata az Atg8 lipidációja és komplex fagofórhoz való kapcsolása (Hansen, Rubinsztein, and Walker 2018). (a Biorender felhasználásával)

1.1.4.7. Az autofagoszóma-lizoszóma fúzió faktorai

A fagofór bezáródásával kialakul az autofagoszóma, ami ezután fuzionál a lizozómával, ezzel kialakítva az autolizozómát. A fúzióhoz szükségesek a SNARE fehérjék, amelyek két komplexbe rendeződnek. Az egyik komplexet a Syx17-Snap29-Vamp7/Vamp8 alegységek alkotják, míg a másikat a Syx17-Snap29-Ykt6. Ezen komplexek kialakulásához szükségesek a pányvázó HOPS komplexek, amelyek közelebb húzzák egymáshoz a két vezikulát. Az eddigi fehérjéken kívül a fúzióhoz szükség van még különböző GTP aktivált kis GTPáz Rab és Arl fehérjékre is. A lizozómán található Arl8 kis GTPáz fehérje képes kötődni a HOPS komplexen keresztül az autofagoszómán található más kis GTPázokhoz. Ezek közül a legfontosabbak a Rab7 és a Rab2 (Hegedűs et al. 2016; Takáts et al. 2018).

1.1.4.8. A szelektív autofágia receptorok (SAR)

Az első megismert szelektív autofágia típust, a **citoplazma-vakuólum útvonalat (Cvt)** *Saccharomyces cerevisiae*-ben írták le először. Ez az útvonal felhasználja az autofág rendszert, hogy az aminosav-aminopeptidáz 1, aszpartil aminopeptidáz és α -mannozidáz (Ape1, Ape4 és Ams1) enzimeket a vakuólumba juttassa. Ezekhez autofagoszóma-szerű vezikulákat használ, úgynevezett Cvt vezikulákat. Ebben az útvonalban az Atg19 és az Atg34 autofág receptorok játszanak szerepet. Specifikusan képesek kapcsolódni az Atg11 pányvázó alegységre az Atg1 komplexhez és az Atg8-hoz (Zaffagnini and Martens 2016). Az élesztőben az autofág receptorok leggyakrabban az Atg8-hoz és az Atg11-hez kötődnek, kivéve a Cue5, ami csak az Atg8-al képes kapcsolatot létrehozni (Lu, Psakhye, and Jentsch 2014).

Az autofágia leelőször leírt folyamatában a citoplazma véletlenszerű részei különülnek el és emésztődnek meg a lizozómában. Később derült csak ki, hogy az autofágia célzottan is képes fehérjéket, lipidcseppeket, sejtszervecskéket, aggregátumokat is lebontásba vinni. Ebben vesznek részt a korábban már említett szelektív autofágia receptorok, amelyek feladata, hogy kötődjenek a degradálendő fehérjéhez/organelumhoz és a formálódó fagofórhoz is. Ezzel képesek a lebontásra ítélt a sejt-komponenseket megkülönböztetve, szelektíven a fagofórba juttatni, miközben maguk a receptorok is degradálódnak. Metazoaokban a receptorok a fagofórhoz főként az Atg8/LC3/GABARAP fehérjén keresztül kapcsolódnak, míg a lebontandó anyaghoz egy ubiquitin-kötő domén segítségével kötődnek. Ezenkívül a működésükben fontos szerepe van még a multimerizációs doménnek. A receptorok poszttranszlációs és szerkezeti

módosulásokon mennek keresztül, hogy a feladatukat el tudják végezni. Ilyenek például a foszforiláció, az ubiquitináció, az acetiláció és az oligomerizáció. Az első azonosított metazoa szelektív autofágia receptor a p62 volt (sequestosome-1 (SQSTM1)), melynek *Drosophila* homológja a Ref(2)P (Bjørkøy et al. 2005). Emlősben több ilyen LIR motívummal rendelkező receptort is azonosítottak az évek során, például NBR1, NDP52, optineurin (OPTN), TAX1BP1, Nix, Stbd1. *Drosophila*-ban a Ref(2)P mellett LIR motívummal rendelkező szelektív autofág receptor a Kenny és az ALFY/blue cheese (Gohel et al. 2020).

A Kenny az emlős IKK γ /NEMO homológja. Kulcsfontosságú szerepe van a *Drosophila* veleszületett immunitás szabályozásában az IMD útvonalon keresztül. Az IMD útvonal, hasonlóan az emlősök TNF receptor útvonalához, az antimikrobiális peptid expresszió szabályozásáért felelős. A Kenny fontos tagja az I κ B kináz (IKK) komplexnek, ami az IKK β /ird5 és az IKK γ /Kenny alegységekből áll. A Relish transzkripciós faktor nukleáris transzportjában játszanak fontos szerepet, így szerepük van az antimikrobiális peptid (AMP) gének expressziójának indukálásában, mint például a Diptericinében (Dpt) (Rutschmann et al. 2000). A Kenny 387 aminosavból épül fel és tartalmaz egy ZZ-típusú zinc-finger domént a C-terminális végén. Az N-terminális végén található egy LIR domén, amely az Atg8a-hoz képes kötődni. Ezt a kapcsolatot S2R+ *Drosophila* sejteken is megerősítették. Ez a kölcsönhatás a Kenny LIR doménjének mutációjakor és az Atg8a mutációjakor is megszűnt. Kimutatták, hogy Kenny az IKK komplex lebontásának szelektív autofágia receptora, mivel kölcsönhatásba lép az ird5-tel és az Atg8a-val (Tusco et al. 2017).

A Blue cheese a *Drosophila* homológja az emlős Alf γ fehérjének. Ez az erősen konzervált fehérje 3489 aminosavból épül fel. Tartalmaz ZZ-típusú zinc-finger domént, BEACH domént és több WD40 ismétlődést, amelyet egy LIR motívum követ a C-terminálison. Az N-terminálisán egy erősen konzerválódott leucin-izoleucin gazdag domén található (Alf Håkon Lystad et al. 2014). A szerkezetében megtalálható több fehérje-fehérje interakciós domén miatt sokféle fehérje kölcsönhatásra képes. Ilyen például a membránvezikulákkal is kialakított szoros kapcsolat, amivel pedig elősegíti az ubiquitinálódott fehérje aggregátumok lebontását az autofágia által (Bjørkøy et al. 2005). Az emlős homológ Alf γ -ról ismert, hogy hozzájárul az autofágiához szükséges szelektivitáshoz az ubiquitinált fehérjék toborzásával a p62-n keresztül. Ezen kívül erősen kötődik az LC3C-hez és a GABARAP-okhoz a WD40 doménjében található LIR motívumon keresztül (Alf Håkon Lystad et al. 2014).

A legtöbb lebontandó organelumnak saját szelektív autofágia receptora van, melyet a **2. Táblázatban** összefoglaltam.

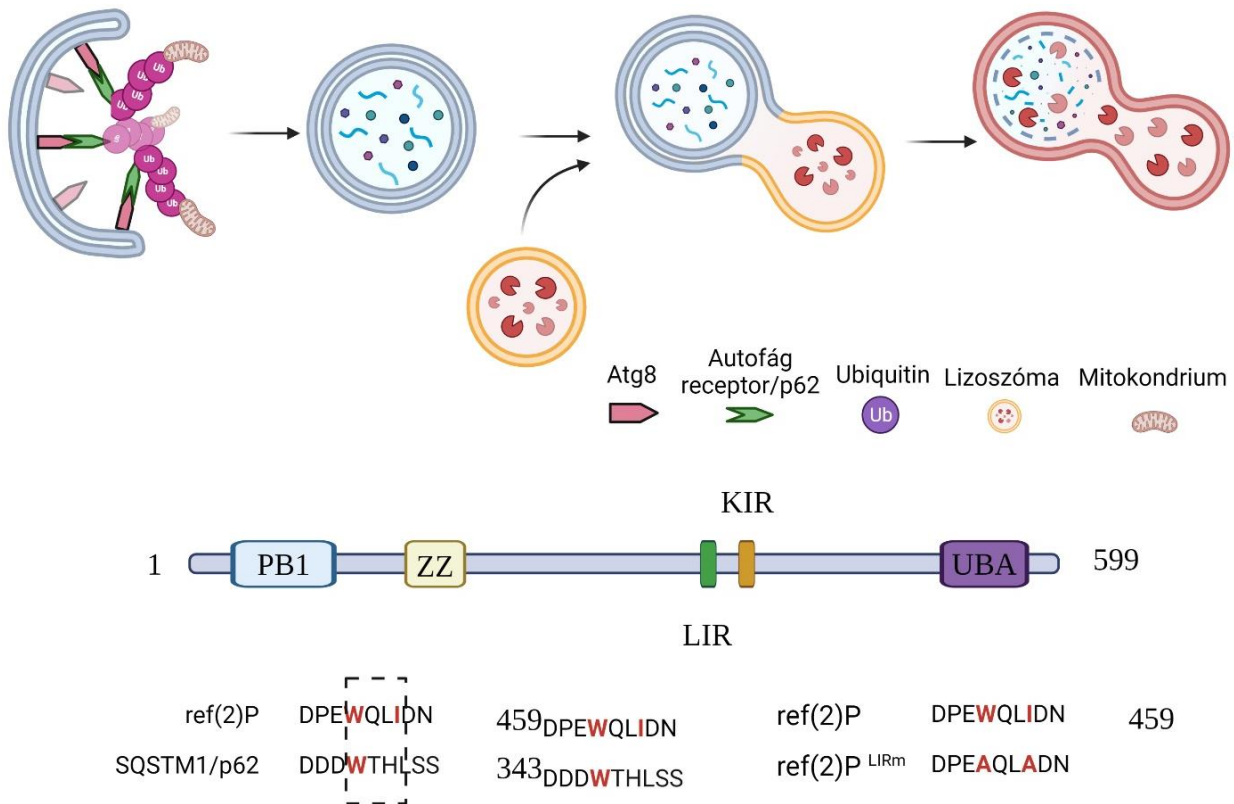
SZELEKTÍV AUTOFÁGIA	LEBONTANDÓ ORGANELLUM	FAJ	SZELEKTÍV AUTOFÁGIA RECEPTOR
AGGREFÁGIA	Aggregátumok	Élesztő	Cue5
		Növény	NBR1
		Emlős	NBR1, OPTN, p62, TOLLIP, TAX1BP1
CVT ÚTVONAL	Ape1, Ape4, Ams1	Élesztő	Atg19, Atg34
ER-FÁGIA	Endoplazmatikus retikulum	Élesztő	Atg39, Atg40
		Növény	ATI3, C53
		Emlős	ATL3, C53, CCPG1, FAM134B, RTN3, Sec62, TEX264, CALCOCO1
FERRITINOFÁGIA	Ferritin	Emlős	NCOA4
GLIKOFÁGIA	Glikogén	Emlős	STBD1
LIPOFÁGIA	Lipid cseppek	Emlős	p62
LIZOFÁGIA	Lizoszóma	Emlős	p62, TRIM16
MITOFÁGIA	Mitokondrium	Élesztő	Atg32
		Emlős	AMBRA1, Bcl2L13, BNIP3, FUNDC1, NDP52, NIX, NLRX1, OPTN, p62, PHB2, TAX1BP1
NUKLEOFÁGIA	Sejtmag részei	Élesztő	Atg39
PEXOFÁGIA	Peroxiszóma	Élesztő	Atg30, Atg36
		Emlős	NBR1, p62
RIBOFÁGIA	Riboszóma	Emlős	NUFIP1
XENOFÁGIA	Baktériumok és vírusok	Emlős	NDP52, OPTN, p62, TAX1BP1

2. Táblázat. A szelektív autofágia típusai. A szelektív autofágia típusai degradálandó organellum, a faj és a szelektív autofág receptor szerint.

1.1.4.9. A p62 és a *Drosophila* homológ Ref(2)P felépítése

Az emlős p62/Ref(2)P fehérje 440 aminosavból épül fel és öt funkcionális domént tartalmaz. Egy N-terminális Phox és Bem1p domént (PB1 domén), egy ZZ-típusú zinc-finger domént és egy C-terminális ubiquitin-kötő domént (UBA domén). Ezenkívül található még benne egy LC3-kölcsönható régió, más néven LIR motívum, amelyet Atg8 interakciós

motívumnak (AIM) is hívják. A p62/Ref(2)P a LIR motívumával képes kapcsolódni az LC3B-hez és az Atg8-hoz (Birgisdottir, Lamark, and Johansen 2013). Végül az emlős p62-ben található egy Keap1 interakciós régió (KIR), ami szükséges a Keap1-hez való kapcsolódáshoz, azonban ez a *Drosophila* Ref(2)P-ből hiányzik (4. ábra). Már más csoportok kimutatták, hogy a Ref(2)P ubiquitinált Keap1-el immunoprecipitálódik, ami a Ref(2)P UBA doménjén keresztül lehetséges. Az UBA domén mutációja képes ezt a kölcsönhatást megszüntetni (Jain et al. 2015). A p62, mint autofág receptor fontos szerepe van az autofágia folyamatában. A képződő fagofórhoz kapcsolódó Atg8, és a degradálandó fehérje vagy organelumokon lévő ubiquitin kötésével a lebontásra ítélt anyagokat az autofagoszómába vezeti. Ez később a lizoszómával fuzionálva létrehozza az autolizoszómát, és a benne található anyagok lebontásra kerülnek (4. ábra).



4. ábra. A p62/Ref(2)P felépítése és szerepe az autofágiában. A humán p62 és a *Drosophila* Ref(2)P funkcionális doménjei a Phox és Bem1p domén (PB1 domén), egy ZZ-típusú zinc-finger domén és egy C-terminális ubiquitin-kötő domén (UBA domén), LC3-kölcsönható régió (LIR motívum) és a p62 esetében a Keap1 interakciós régió (KIR). Autofágia során a p62/Ref(2)P kapcsolódik a lebontandó fehérjéhez, vagy organelumhoz az UBA doménnel és az LC3/Atg8-hoz a LIR motívummal. (a Biorender felhasználásával)

A LIR motívumot a Θ 0-X1-X2- Γ 3 konszenzus szekvencia jellemzi. Ebből a Θ 0 aromás (W/F/Y) és az Γ 3 alifás aminosavak segítségével kötődik a két hidrofób zsebhez LIR

kötőhelyen. A motívumon kívüli savas aminosavak stabilizálják a kapcsolatot, ezt a régiót a kiterjesztett LIR résznek is nevezzük. A *Drosophila*-ban az első felfedezett W454-Q-L-I457 LIR motívum szekvenciával rendelkező fehérje a Ref(2)P. A LIR motívum pontos helyének meghatározását Jain és munkatársai végezték (Jain et al. 2015). Biokémiai elemzésekkel megfigyelték, hogy ebben a motívumban két aminosav cseréje alaninra (W454A, I457A) képes a Ref(2)P-Atg8a közötti kölcsönhatást megszüntetni (**4. ábra**). Ezzel együtt a Ref(2)P nem képes bejutni a lizozómába és degradálódni (Jain et al. 2015). Emellett a szakirodalomban megtalálható még több Ref(2)P mutáns, mint például a *Ref(2)^{POD2}* és *Ref(2)^{POD3}*. A *Ref(2)^{POD2}* mutánsnak a PB1 doménje, míg a *Ref(2)^{POD3}* mutánsnak az UBA doménje hiányzik. Ezeknek a mutánsoknak az élethossza normál tápon tartva és az oxidatív stressz növelésére használt paraquat kezelés hatására is szignifikánsan csökkent (Nezis et al. 2008). A negatív geotaxis tesztek során szignifikáns különbséget láttak a vad típushoz képest, ami az életkor előrehaladtával tovább nőtt. Megfigyelték, hogy a *Ref(2)^{POD2}* és *Ref(2)^{POD3}* mutánsok Atg8a mutáns háttéren nem mutattak fehérje aggregátum felhalmozódást az adult állatok agyában, ellentétben az Atg8a mutánsal. Emellett az ubiquitin aggregált citoplazmatikus festődést mutatott, amely kolokalizált a Ref(2)P-vel és további vizsgálatok során kimutatták, hogy oldhatatlan összezsapzódott ubiquitinált fehérjék találhatóak az adult állatok agyában (Nezis et al. 2008). A p62 ubiquitin tartalmú fehérje aggregátumokban is felhalmozódik, beleértve több neurodegeneratív betegséget, például Alzheimer-kórt, a Pick-kórt, a Lewy-testes demenciát és a Parkinson-kórt.

Egy másik tanulmányban a Ref(2)P UBA illetve PB1 domént nem tartalmazó mutánsaiban megfigyelt mitokondriális hibák ellenére nem találtak nagyobb különbséget a mitokondriumok számában. Minden bizonnyal a motoros teljesítmény korai életkortól megfigyelt csökkenése arra utal, hogy a mitokondriális hibák a nagy energiaigényű szöveteket érintik (De Castro et al. 2013).

1.1.4.10. A p62/Ref(2)P kapcsolata az Atg8-al

A p62 Atg8-hoz való kötődését egy W/F/YxxL/I/V motívum teszi lehetővé, ez az Atg8/LC3 interakciós motívum/régió (AIM/LIR). Ezt a motívumot hidrofób aminosavak jellemzik a nulladik és a harmadik pozícióban és negatív töltésű aminosavak szegélyezik, ezzel növelve a kötődés erősségét.

Az élesztő Atg8-nak emlősökben hat homológját is azonosították, amelyeket az LC3 és GABARAP családokra osztottak. Az előbbibe tartoznak az LC3A, LC3B, LC3C, míg az

utóbbiba a GABARAP, GABARAPL1 és GABARAPL2 (más néven GATE-16). Az emlősökben megtalálható autofág receptorok az AIM-szerű LC3-interakciós régión és GABARAP-interakciós motívumon keresztül (LIR-ek, illetve GIM-ek) kötődnek az Atg8-hoz. A motívumok felépítése hasonló az élesztőéhez.

Az Atg8/LC3/GABARAP-kötő motívum mellett minden autofág receptor általában tartalmaz egy domént, amivel képes kötődni a degradálandó anyaghoz. Ez általában egy ubiquitin-kötő domén, mivel a legtöbb lebontandó anyag ubiquitinálódik.

Az ubiquitin-független felismeréskor az autofág receptor közvetlenül a degradálandó anyaghoz kötődik. Ilyenkor a rajtuk lévő szacharidokat és lipideket ismeri fel (Gubas and Dikic 2022), vagy a mitokondrium külső membránjában exponálódik (egyes mitofágia receptorok).

1.1.5. Az autofágia vizsgálata és patológiás jelentősége

Az autofágia fő feladata, hogy lebontsa a sérült vagy már feleslegessé vált fehérjéket és organellumokat, ezáltal biztosítva a sejt túlélését olyan stressz hatások alatt, mint például az éhezés és különböző fertőzések. *Drosophila*-ban ennek a vizsgálatára a lárvális zsírtest megfelelő, mivel itt éhezés hatására stressz-indukált autofágia figyelhető meg.

Ezen felül azonban fontos szerepe van az egyedfejlődésben is, ezt fejlődési autofágiának is nevezzük, amit *Drosophila*-ban metamorfózis során figyelhetünk meg. Ezen folyamatok során az autofágia biztosítja a megfelelő anyag- és energiaszükségletet, mivel a lebontásra került lárvális szöveteket újrahasznosítja (Tracy and Baehrecke 2013).

Megfigyelték az autofágia szerepét az öregedési, neurodegenerációs és az oxidatív stressz elleni védekezés folyamatában is. Az autofágia gátlása az agyban növelte a neurodegeneratív megbetegedések kialakulásáért felelős fehérje aggregátumok jelenlétét. Ezen felül szerepe van az idegrendszer fejlődésében és a szinapszisok kialakulásában is (Kulkarni, Chen, and Maday 2018).

Tumoros megbetegedésekkel szemben pozitív és negatív eredményeket is találtak. Az indukált autofágia proapoptotikus hatása miatt tumor ellenes. Azonban a tumoros sejtekben hozzájárul a gyors növekedéshez, az energia- és anyagigény megtermelésével (White 2012).

A szelektív autofágiában résztvevő gének mutációja számos betegsége hajlamossá teszi. A p62, az optineurin, a Parkin E3 ligáz és a PINK1 mutációi családi és olyan korai kezdetű neurodegeneratív betegségek leggyakoribb oka, mint például Parkinson-kór, demencia és amiotrófiás laterális szklerózis (ALS). Ezen kívül több résztvevő gén mutációja okoz különböző betegségeket, ezeket a **3. Táblázatban** részleteztem (Levine and Kroemer 2019).

Gén	Betegség
Atg16L1	Crohn-betegség
Atg5	Gyerekkori ataxia, Szisztémás szklerózis, szisztémás lupus erythematosus
BECN1 / Atg6	Mellrák, petefészekrák
Lamp2	Danon-féle kardiomiopátia
SQSTM1 (p62)	Amiotrófiás laterálszklerózis, Frontotemporális demencia, Paget-betegség, disztális miopátia
VPS13D	Ataxia
Parkin	Parkinson-kór, vastagbél- tüdő- és agyrák
PINK1	Parkinson-kór

3. Táblázat. Autofágiában résztvevő gének és a mutációik által okozott betegségek.

1.2. Az oxidatív stressz

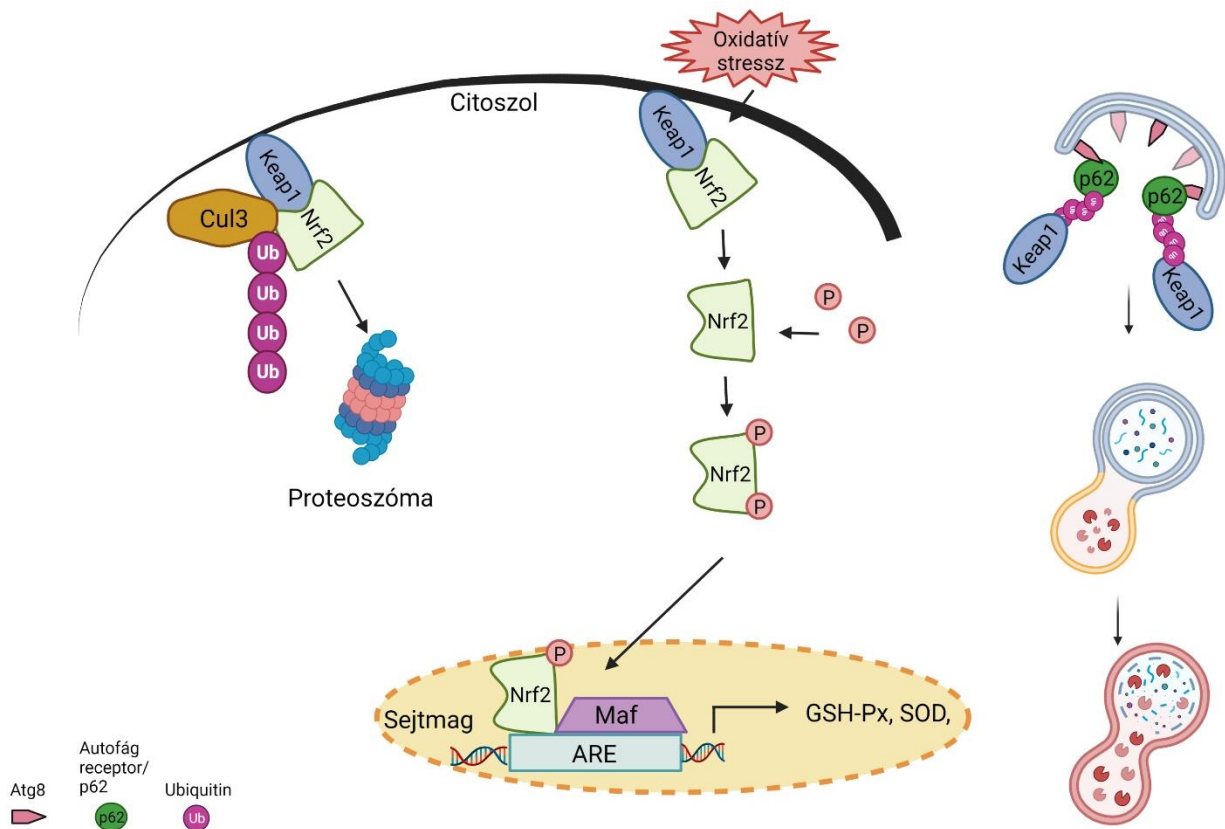
Az oxidatív stressz az oxidánsok és az antioxidánsok közötti egyensúly felborulását jelenti, amely redoxállapot megzavarásához és molekuláris károsodásokhoz vezet. A sejtjeinket többféle stressz is érheti, ilyen például a metabolikus stressz, baktériumok általi fertőzés, vagy az oxidatív stressz. Mindhárom folyamatra különböző stresszválasz reakciók alakultak ki. A megnövekedett oxidatív stressz szerepet játszik a legtöbb öregedéssel összefüggő betegségben, az öregedésben, de a rákos megbetegedésekben is. Az oxidatív stressz, mint fogalom az 1950-es években született meg, azóta úgy határozták meg, hogy a folyamat a redox jelátvitel és szabályozás zavara. Ez magában foglalja a reaktív oxigén fajtákat (ROS) és a reaktív nitrogénfajtákat (RNS) túlzott képződését. Ilyenek például a peroxinitrit (ONOO⁻), hidrogén-peroxid (H₂O₂), nitrogén-oxid (NO), hidroxilgyökök (HO·) és szuperoxid-anion gyökök (O₂^{·-}). A szervezetben ROS és RNS források találhatóak nem csak patológiás, de fiziológias körülmények között is. A legtöbb ROS a mitokondriumokban, az endoplazmatikus retikulumban és a peroxiszómákban található. A ROS magas szintje az antioxidáns rendszerben fellépő egyensúly hiányának következménye. A ROS szint növekedése károsítja a DNS-t, a sejtmembránokat és fehérjéket és ezáltal az öregedéssel is összefüggő neurodegeneratív betegségek kialakulásához vezet (Yu and Xiao 2021). Az oxidatív stressz elleni harcban az autofágiának és a Keap1-Nrf2 rendszernek egyaránt fontos szerepe van. Mindkét folyamat részt vesz az oxidatív stresszválaszokban, a metabolikus útvonalakban és a veleszületett immunitásban (Ichimura et al. 2013).

1.2.1. Az oxidatív stressz és az autofágia

Többen beszámoltak már arról, hogy éheztetés hatására kialakuló autofágiát a ROS képes indukálni, azonban még nem világos, hogy hogyan és milyen szabályozás alatt áll a folyamat. Vannak adatok arról, hogy a szuperoxid-anion gyököknek ($O_2^{\cdot-}$) szerepük van az éheztetéssel indukált autofágiában (Y. Chen, Azad, and Gibson 2009). Több bizonyíték is utal rá, hogy a hidrogén-peroxid (H_2O_2) az a molekula, amely az éhezés hatására azonnal termelődni kezd (Scherz-Shouval, Shvets, and Elazar 2007). Sokan úgy gondolják, hogy a ROS-nak kulcsfontosságú szerepe van az autofágiában, mivel az antioxidánsokkal való kezelés részben vagy teljesen visszaállítja a folyamatot (C. Zhang et al. 2013).

1.2.2. A Keap-1 - Nrf2/CncC útvonal

Az oxidatív károsodások leküzdéséhez a szervezet egyik védekező rendszere a Keap1-Nrf2 útvonal, amelynek segítségével a szervezet inaktiválja a ROS-t (**5. ábra**). A Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) transzkripciós faktor több antioxidáns enzim génjének fő szabályozója, amely érzékeli az oxidatív stressz mértékét. Aktiválja az antioxidáns védelem több résztvevőjét is, mint például a szuperoxid-diszmutázt (SOD), glutation-peroxidázt (GPx), glutation-reduktázt, tioredoxin-reduktázt és ferritint. Az Nrf2 szerepe, hogy megakadályozza a sejtek öregedését, az antioxidáns hatású génexpresszió szabályozásán keresztül. Kimutatták azt is, hogy az Nrf2 gátlása elősegíti a sejtek öregedését, ami bizonyítja az Nrf2 szerepét az öregedés gátlásában (Wati, Matsumaru, and Motohashi 2020; Yu and Xiao 2021). A Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) az Nrf2 negatív szabályozója. A Keap1 egy Cullin 3 tartalmú E3 ubiquitin ligáz, amely képes lebontásra kijelölni az Nrf2-t. Oxidatív stressz hatására a Keap1 konformációs változáson megy keresztül, ezáltal az Nrf2 disszociációját okozza. Ezután az Nrf2 a sejtmagba kerül, ahol heterodimert képez a musculoaponeurotic fibrosarcoma-val (Maf), amivel közösen az antioxidáns válasz elemhez kötődve (ARE) több antioxidáns gén transzkripcióját is elindítják (Yu and Xiao 2021).



5. ábra. A Keap-1 - Nrf2 útvonal. Normál állapotban az Nrf2 szintjét a proteoszóma szabályozza. Azonban oxidatív stressz hatására az Nrf2 leválik a Keap1-ről és a sejtmagba kerül, ahol a Maf-fal heterodimerizálódik. Ez a heterodimer az ARE-hez kötődik, hogy indukálja az antioxidáns és metabolikus gének expresszióját (Bellezza et al. 2018). A p62 köti a Keap1-et, ami ezáltal lebontásra kerül. (a Biorender felhasználásával)

1.2.3. A Keap1 – Nrf2 útvonal kapcsolata a p62/Ref(2)P -vel

A p62-Keap1-Nrf2 hármasa egy szignalizációs útvonal, amely részt vesz a mérgezések, a humán hepatocelluláris karcinómák, az apoptózis és az autofágia szabályozásában. A p62 kompetitíven képes kötni a Keap1-et, ezzel aktiválva a Nrf2-t. A p62 révén a Keap1 szelektív autofágiára kerül (5. ábra). A p62 szabályozása ilyenkor olyan poszttranszlációs módosításokkal történik, mint például a p62 foszforilációja és ubiquitinációja (Katsuragi, Ichimura, and Komatsu 2016). Ehhez például a TRIM21 E3 ubiquitin ligáz szükséges, ami a p62 ubiquitinációjával negatívan szabályozza p62-Keap1-Nrf2 antioxidáns útvonalat. A TRIM21 ezen kívül számos biológiai folyamatban vesz részt, mint például az immunválasz, a sejtmétabolizmus, a redox homeosztázis és a rák kialakulása (Wang et al. 2021). A p62-Keap1-Nrf2 út fontos védő szerepet játszik a normál sejtekben, azonban a legújabb kutatások szerint ez az útvonal a pre-malignus sejtek tumorgenezisét is indukálja és elősegíti a tumorsejtek növekedését és gyógyszer rezisztenciáját az Nrf2 aktivációján keresztül (Ichimura and Komatsu 2018).

2. Célkitűzések

Az autofágia egy nagy konzerváltságot mutató intracelluláris lebontó folyamat az eukarióta élőlények között. Az elmúlt harminc évben az autofágia kutatás fellendült az autofág gének izolálásának hatására.

PhD dolgozatomban a Ref(2)P, a *Drosophila melanogaster*-ben található szelektív autofág receptor egyik fő komponensében, a LIR motívumban általunk létrehozott mutáció hatását vizsgáltam. A mutációval szeretnénk volna szelektív autofágia hibáját előidézni, mivel az előzetes eredmények szerint (Jain et al. 2015) a motívum elrontásával a Ref(2)P képes ugyan az ubiquitinálódott fehérjékhez és organelumokhoz kapcsolódni, azonban képtelen kapcsolódni az Atg8-hoz és így a képződő fagofórba nem kerülnek be a degradálásra kijelölt anyagok. Úgy gondoltuk, hogy a felhalmozódó aggregátumok és a Ref(2)P hatással lesz a *Drosophila* élethosszára és motoros funkcióira.

Munkám során a következőket tűztem ki célul:

- Terveink között szerepelt CRISPR/Cas9 homológ irányított hibajavítással létrehozni egy Ref(2)P dupla aminosav cserét a LIR motívumban, amely elrontja az Atg8a-hoz való kapcsolódást.
- Szerettük volna a létrehozott mutáns vonal általános vizsgálata mellett különböző fiziológiai változásokat is megfigyelni, mint például élethossz és negatív geotaxis tesztek.
- A fent említett vizsgálatokat szeretnénk volna megismételni idősödő legyeken, hogy vizsgálhassuk az öregedés hatását.
- Vizsgálni szeretnénk volna az általános autofágia és a felhalmozódott aggregátumok jelenlétének hatását a LIR mutáció jelenlétében a lárva és az adult állat különböző szöveteiben.
- A szelektív autofágia változását a LIR mutáció jelenlétében kívántuk megfigyelni, és a betöltött szerepét megvizsgálni.
- A Ref(2)P szerepének vizsgálatát tűztük ki az oxidatív stresszválasz útvonalakban.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Felhasznált *Drosophila melanogaster* törzsek

A felhasznált *Drosophila melanogaster* törzseket standard agar és kukoricadara alapú táptalajon tartottam. Közvetlenül a kísérletekhez felhasznált törzseket 25°C-on tartottam, beleértve a keresztezéseket és a minta előkészítési munkálatokat is. A későbbiekben minden kísérletben a w^{1118} törzset használtam mint kontroll.

A munkám során a következő törzseket használtam fel:

- w^{1118} ,
- $3 \times mCherry-Atg8a$ (Hegedűs et al. 2016)
- $w[*]; P\{w[+mC]=sqh-EYFP-Mito\}3$,
- $Cnc IR[TRiP.HMS00650]/TM3$,
- $Sb, w; ;p[w+ 9 \times pim-2.HA] 3.2$,
- $UAS-GFP-CL$ (Pandey et al. 2007)
- $y[1] w[*]; P\{w[+m*]=nSyb-GAL4.S\}3$,
- $Atg16[d129]$ (Varga et al. 2016)
- $UAS-GFP-CncC-7/TM3$ (Terje Johansen),
- $UAS-GFP-Keap1/CyO$,
- $UAS-GFP-Keap1/FM7$,
- $Tub-GAL4/TM6$,
- $Act5C-Cas9 (54590)$
- $BcGla/CyO$
- $Ref(2)^{LIR}; Atg16^{d129}$
- $Ref(2)^{LIR}, tub > CncC.RNAi$
- $Ref(2)^{LIR} tub > GFP$

3.2. Transzgének és transzgénikus törzsek létrehozása

A $Ref(2)^{LIR}$ mutációját tartalmazó vonal generálásához CRISPR/Cas9 közvetítette *in vivo* homológ rekombináció alapú mutagenézist használtunk (Port et al. 2014). A p62_LIR_gRNS1 és p62LIR_gRNS2 (**4. táblázat**) oligonukleotidokat 95°C-on denaturáltuk, majd lehűtve hidrolizáltattuk egymással. Az így kapott kétszálú oligonukleotidot pCFD5 (Addgene, 73914, Simon Bullock által megosztott) plazmidba Bbs1 (NEB, R0539S) restrikciós hasítóhelyre ligáltuk, hogy single guide RNS-t expresszáló plazmidot kapjunk. Az így kapott plazmidot koinjektáltattuk a p62_LIR_DONOR egyszálú donor polinukleotiddal együtt (**4. táblázat**) $Act5C-Cas9, lig^{4169}$ törzsbe. Ezek utódaiból izoláltuk a mutáns allélt morfológiai fenotípusuk (**F1. ábra**), PCR és $Ref(2)^P$ ellenanyag alapú Western blot szűréssel. A mutánsokat Sanger szekvenálással azonosítottuk a LIR mutációra specifikus primerek segítségével. Ezen kívül a mutáns ecetmuslicákat hat keresztezéssel izogenizáltuk a vad típusú (w^{1118}) törzsszel való visszakeresztezéssel.

Oligonukleotid neve	Oligonukleotid szekvenciája
p62_LIR_gRNS_FOR	tgcaTTGTCAATAAGCTGCCACTC
p62_LIR_gRNS_REV	aaacGAGTGGCAGCTTATTGACAA
p62_LIR_ssDONOR	TCGGAAACCACCACCGAAACAGAGCAGGAAAGACGCC G TTCAGACAGCTTGGATCCAGAG gcc cag ctg gcc GACAATGCATACTCTGCAAACAATAGTAACTTGATCAA TCTGGACACAACCAATCCCACT
p62_LIR_DONOR reverz	AGT GGG ATT GGT TGT GTC CAG ATT GAT CAA GTT ACT ATT GTT TGC AGA GTA TGC ATT GTC GGC CAG CTG GGC CTC TGG ATC CAA GCT GTC TGA ACG GCG TCT TTC CTG CTC TGT TTC GGT GGT GGT TTC CGA
P62seq1	AACCAGAAGAGCAGGGTCAA
P62seq2	TGGATCAGATGCAGCAGAAG
P62LIR	GAGTATGCATTGTTCGGCCAG

4. Táblázat. A felhasznált oligonukleotidok és primerek neve és szekvenciája

3.3. Élethossz és paraquat rezisztencia tesztek

Az élethossz tesztekhez fiolánként 20 frissen kikelt hím, illetve nőtény ecetmuslicákat használtunk. Genotípusonként 10 fiolát 25 °C-on standard tápon tartottuk. Heti háromszor friss táptalajra raktuk az állatokat és számoltuk az elhullást.

Az éheztetéshez az ecetmuslicákat üres fiolákba helyeztük, amelyekben csak vízzel átitatott szűrőpapír volt és ezt naponta cseréltük, míg az utolsó muslica is elpusztult. Minden 12 órában feljegyeztük az elpusztult muslicák számát.

A paraquatot az oxidatív stresszel szembeni rezisztencia mérésére használjuk. Ehhez 3 napos állatokat húszasával fiolákba helyeztük, amelyekbe 20 mM paraquatot tartalmazó szűrőpapírt tettünk. Naponta új paraquatot tartalmazó friss fiolákba tettük az ecetmuslicákat és a halott állatok számát feljegyeztük 12 óránként.

3.4. Mászó tesztek

A mászó tesztekhez (Rana et al. 2017) 100 darab ecetmuslicát egy 100 ml-es mérőhengerbe tettünk (249 mm magas). Miután az állatok az altatásból felébredtek, a mérőhengert leütöttük, majd hagytuk az ecetmuslicákat 2 percig mászni és ezt nyolcszor megismételtük. Egy perccel az utolsó leütéstől számítva képet készítettünk a mérőhengerről. Ezután megszámloltuk a felső, középső és az alsó harmadban lévő állatokat.

3.5. RT-Q-PCR tesztek

A szükséges genotípusokból 3 napos állatokat gyűjtöttünk (háromszor 9 hím és 9 nőstény) és össz RNS-t izoláltunk DiretZol RNA Miniprep készlet használatával. A cDNS szintézis 1 µg össz RNS-ből random hexamer primerek és a RevertAid cDNS szintézis készlet segítségével történt. A szintézishez használt beállítások a következők voltak: 25°C 5 perc, 42°C 1 óra és 72°C 5 perc. 50 ng cDNS-t használtunk fel, három különböző biológiai mintából és három kísérleti ismétlést végeztünk el. PerfeCTa SYBR Green FastMix-et használtunk, Qiagen Rotor-Gene Q rendszerben az alábbi beállításokkal: kezdeti denaturáció 95°C 5 percig, 45 ciklus 95°C 20 másodpercig, 60°C 20 másodpercig és 72°C 20 másodpercig. Az adatok értékeléséhez a Rotor-Gene Q rendszert használtuk, a gének expresszióját az *Rpl32* szintjéhez normalizáltuk. A felhasznált primerek megtalálhatóak az **5. Táblázatban**.

P62seq1	AACCAGAAGAGCAGGGTCAA
P62seq2	TGGATCAGATGCAGCAGAAG
P62LIR	GAGTATGCATTGTCGGCCAG
Rpl32_FP	TGCTAAGCTGTTCGCACAAATGGC
Rpl32_RP	CGATCCGTAACCGATGTTGGGC
Ref(2)P_FP	GACCTTCTGGATCGACGCTG
Ref(2)P_RP	CTCTTGCTTGGTGGCCTTTG
Keap1_FP	CCAGAAAGGCACAGCAGGCATC
Keap1_RP	CGCCAGCTCCAAGGGGTGTGT
CncC_FP	GAGGTGGAAATCGGAGATGA
CncC_RP	CTGCTTGTAGAGCACCTCAGC
GstE1_FP	GCTGGAGACGTTCTGGGCAA
GstE1_RP	ACAGTGGGTCCGGTGGACAGA
cat_FP	ACCAGGGCATCAAGAATCTG
cat_RP	AACTTCTTGGCCTGCTCGTA
GclC_FP	CGCTTTATCCAGAAGCGTGCCG
GclC_RP	AATCCTGCTTGTAATCCGGGTGGC

5. Táblázat. A felhasznált RT-Q-PCR primerek neve és szekvenciája

3.6. Mikroszkópos technikák

3.6.1. Lysotracker festés (LTR festés)

L3 stádiumú lárvákat 20%-os szacharóz oldatba helyeztük négy órára éheztetés céljából. Ezután PBS-ben kiboncoltuk a lárvák zsírtestjeit és azonnal 50 nM Lysotracker Red-et (LTR; Invitrogen, L7528) és 0,5 µg/ml DAPI-t (Sigma, D9542) tartalmazó PBS-ben inkubáltuk 4 percig. A festés után egyszeres PBS-ben mostuk, majd glicerin-PBS-ben (4:1) fedtük. Zeiss Axioimager M2 rendszerrel 40×/0.75 Plan-Neofluar objektívvel vizsgáltuk. A LTR pozitív struktúrákat Fiji szoftverrel értékeltük ki.

3.6.2. MitoSOX festés

Adult nőstény hemithoraxokat boncoltunk hideg PBS-ben és festettük a következő oldattal: MitoSOX red (5 µM; Invitrogen, M36008) és Mitotracker Green-FM (100 nM; Invitrogen, M7514) PBS-ben. Szobahőmérsékleten 12 percig inkubáltuk, majd háromszor mostuk PBS-sel. A fedéshez 80%-os glicerol-PBS oldatot használtunk. Zeiss Axioimager M2 rendszerrel 40×/0.75 Plan-Neofluar objektívvel vizsgáltuk. A MitoSOX fluoreszcencia intenzitását Fiji szoftverrel értékeltük ki.

3.6.3. Immuncitokémia

A frissen kiboncolt L3 lárva zsírszövetet, vagy adult nőstény hemithoraxot 4%-os PBS-paraformaldehidben fixáltuk 30 percig. Ezután háromszor 10 percig PBST-ben (PBS+0,1% Triton-X-100) mostuk. A blokkoláshoz 5%-os normál szérumot (FBS) használtunk PBST-ben oldva, egy órán át szobahőmérsékleten. Az ellenanyagok hígítása a **6. Táblázatban** és a **7. Táblázatban** található. Az elsődleges ellenanyagot a blokkoló oldathoz adva, egy éjszakán át 4 °C-on billegő rázógépen inkubáltuk. Ezután a fent leírt mosásokat ismételtük és a másodlagos ellenanyagot a blokkoló oldathoz adva két órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ismét három mosás után 15-20 percig DAPI oldatban inkubáltuk, majd egy PBS-sel történő mosás után 80%-os glicerol-PBS-sel fedtük. Az adult agy immunfestéséhez a kiboncolt szövetet 4%-os PBS-paraformaldehidben fixáltuk 30 percig. Ezután háromszor 10 percig PBTx-ben (PBS+0,3% Triton-X-100) mostuk. A blokkoláshoz 5%-os normál szérumot (FBS) használtunk PBTx-ben oldva, négy órán át szobahőmérsékleten. Az elsődleges ellenanyagot a blokkoló oldathoz adva, két éjszakán át 4 °C-on rázó gépen inkubáltuk. Ezután a fent leírt mosásokat

ismételtük és a másodlagos ellenanyagot a blokkoló oldathoz adva egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk. Ismét három mosás után 15-20 percig DAPI oldatban inkubáltuk, majd egy PBS-sel történő mosás után 80%-os glicerol-PBS-sel fedtük. A fotózáshoz a Zeiss Axioimager M2 rendszert használtunk. A kolokalizáció kiértékeléséhez Fiji szoftvert és a Pearson-féle korrelációs együtthatót használtuk. A felhasznált ellenanyagok a **6. Táblázatban** és a **7. Táblázatban** találhatóak.

3.6.4. Az elektronmikroszkópos minták előkészítése

Három napos adult nőstények agyát PBS-ben kiboncoltuk, majd a következő oldatban fixáltuk: 3,2%-os paraformaldehid, 0,5% glutáraldehid, 1% szukróz, 0,028% CaCl₂, a 0,1 N Na-cacodylate (pH=7.4) egy éjszakán át 4 °C-on. Az utólagos fixáláshoz 0,5%-os OsO₄ –et használtunk egy órán át, Araldite-ba ágyasztuk. A metszés után kapott ultravékony (70 nm) metszeteket Reynold-féle citráttal Lead [II] nitrate és tri-nátrium-citrát-dihidráttal és NaOH-al festettük. A képalkotás Olympus Morada kamerával felszerelt Jeol JEM-1011 transzmissziós elektronmikroszkóppal készült 5000-10.000-szeres nagyításban.

3.6.5. Ko-immunoprecipitáció és Western blot technikák

Az immunoprecipitációhoz 130 db 1-7 napos ecetmuslicát használtunk fel. Az állatokat Dounce homogenizátor segítségével feltártuk, 45 lenyomással 1,5 ml homogenizáló oldatban, jégen. Az oldat az alábbi vegyületekből áll: 20 mM HEPES (pH=7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.2% Triton X-100 és proteáz inhibitor koktél (Pierce Protease Inhibitor Tablet; Thermo Scientific, A32965). A lizátumokat ezután először 5 percig 1000xg-vel 4°C-on fugáltuk. Majd ezután 15 percig 58.000 xg-vel fugáltuk 4°C-on. A következő lépésben 25 µl RFP-Trap Magnetic Agarózzal inkubáltunk 1 mg muslica kivonatot 3 órán át 4°C-on. A gyöngyöket előzőleg háromszor 10 percig mostuk a fent leírt homogenizáló oldatban 4°C-on. Az elúcióhoz 50 µl 1x Laemmli oldatot (Sigma, S3401) használtunk, amihez 100 mM DTT-t adtunk, majd 5 percig 100 °C-on forraltuk. A géltre töltéskor 25 µl eluátumot használtunk, 20 µg inputtal. Western blot-hoz anti-mCherry-t (1:1000) és anti-Ref(2)P-t (1:2000) használtunk (**6. Táblázat**). Western blot-hoz L3 lárvák vagy felnőtt egyedek lizátumát használtunk, amelyeket 1x Laemmli-ben forraltunk. Ezután homogenizáltuk az állatokat és újabb 5 percig forraltuk. Az SDS-poliakrilamid géltre azonos mennyiségű fehérjéket töltöttünk fel, majd 0,45 µm PVDF membránra (Immobilon-FL Millipore, IPFL00010) transzferáltuk egy éjszakán át. A membránokat TBS Odyssey bufferrel blokkoltunk egy órán át szobahőmérsékleten. Az

elsődleges ellenanyagot 4 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk. Ezután négyszer 10 percig mostuk TBST-ben (TBS + 0,1% Tween-20). Ezután másfél órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk a másodlagos ellenanyagban (**7. Táblázat**). Háromszor 10 perc TBST mosás után 5 perc TBS –es mosás és 5 perc H₂O mosás következett. Az előhívás LI-COR Odyssey CLx rendszerrel történt. A felhasznált ellenanyagok a **6. Táblázatban** és a **7. Táblázatban** találhatóak.

Elsődleges ellenanyagok	Hígítás	Felhasználása
HA (Roche 11867431001)	1:1500	Western blot
TUBA/alpha-tubulin (DSHB, AA12.1)	1:2000	Western blot
GFP-chicken (Aves Labs, Inc. GFP-1020)	1:500	Immunfestés
Keap1 (rabbit; Terje Johansen, Department of Medical Biology, UiT The Arctic University of Norway, Tromsø, Norway),	1:250	Immunfestés
	1:1000	Western blot
Ref(2)P (rabbit (Pircs et al. 2012))	1:300	Immunfestés
	1:2000	Western blot
poly-ubiquitin FK2 (mouse; Enzo, BMLPW8810)	1:350	Immunfestés
	1:1000	Western blot
GABARAP (rabbit; Abcam, ab109364),	1:400	Immunfestés
	1:2000	Western blot
mCherry (mouse; Novus Biologicals, NBP1-96752),	1:1000	Western blot
cnc/CncC (rabbit; Huai Deng, Swenson College of Science and Engineering, University of Minnesota, Duluth, MN, USA)	1:10	Immunfestés
anti-PSMD/p54/Rpn10	1:2000	Western blot
PSMC4/p48A/Rpt3	1:2000	
PSMD6/p42A/Rpn7	1:2000	
PSMD13/p39A/Rpn9	1:2000	
PSMA3/CP α 7/Prosa7	1:2000	

6. Táblázat. A felhasznált elsődleges ellenanyagok és hígításuk

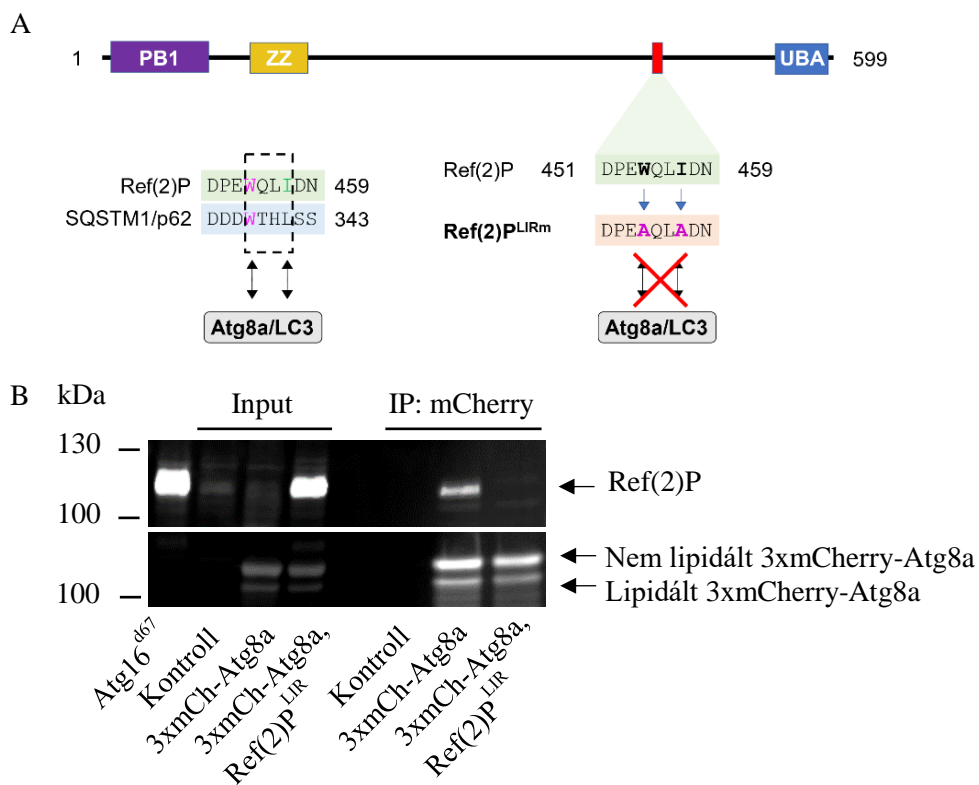
Másodlagos ellenanyag	Hígítás	Felhasználása
goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A-11008)	1:800	Immunfestés
goat antirabbit Alexa Fluor 546 (Invitrogen, A-11010)	1:800	
goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A-11001)	1:800	
goat anti-mouse Alexa Fluor 546 (Invitrogen, A-11003)	1:800	
goat anti-chicken DyLight 488 (Thermo Scientific, SA5-10070)	1:800	
IRDye 800CW goat-anti rabbit (LI-COR Biosciences, 926-32211)	1:5000	Western blot
800CW goat anti-mouse (LI-COR Biosciences, 926- 32210)	1:5000	
680RD goat-anti mouse (LI-COR Biosciences, 926- 68,070)	1:5000	

7. Táblázat. A felhasznált másodlagos ellenanyagok és hígításuk

4. Eredmények

4.1. A *p62/Ref(2)^{LIR}* mutánsok létrehozása és izogenizálása

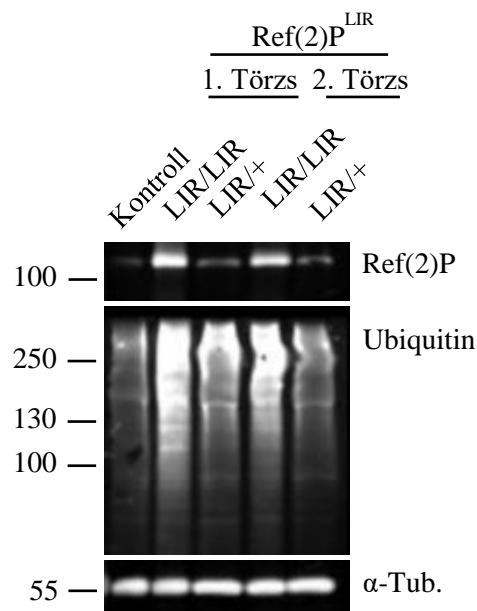
A korábban bemutatott biokémiai analízisek alapján (Jain et al. 2015) szeretnénk volna megvizsgálni a LIR motívumban létrehozott mutáns fehérje változat viselkedésének *in vivo* fiziológiai következményeit *Drosophila*-ban. Ehhez CRISPR/Cas9 rendszerrel létrehoztunk egy *Drosophila* knock-in mutánst, amelyben a LIR motívumban egy triptofánt és egy izoleucint kicseréltünk egy-egy alaninra. A többi motívumban nem történt változás. Összehasonlításképpen az ábrán feltüntettem a humán p62 (SQSTM1) helyzetét és a LIR motívumát is, ahol megfigyelhető a *Drosophila*-ban található LIR motívumhoz képest a hasonlóság. A LIR domán mutációjának hatására a LIR mutáns Ref(2)P nem képes kapcsolódni az Atg8a-hoz. **(6A. ábra)**. Ko-immunoprecipitációval vizsgálva az Atg8a-p62 kölcsönhatást, világosan megfigyelhető volt, hogy míg a vad típusú Ref(2)P-t hordozó extraktokban kölcsönhatott a két fehérje, a *Ref(2)^{LIR}* mutáns esetmuslicákban a p62-Atg8a interakció megszűnt. Az input Ref(2)P abundanciájára kontrollként az *Atg16^{d67}* (Varga et al. 2016) és *w¹¹¹⁸* törzseket használtunk. Az *Atg16^{d67}*, mint a legtöbb Atg mutáns felhalmozza a Ref(2)P-t **(6B. ábra)**. A *Ref(2)^{LIR}* mutáns állatok hasonló Ref(2)P halmozást mutattak, mint az autofág mutáns *Atg16^{d67}*, vagyis nem működött a Ref(2)P autofágiás degradációja. (Jipa et al. 2020)



6. ábra. A p62 és a *Ref(2)^{LIR}* motívumainak összehasonlítása és mutációja. **A.** A *Drosophila* Ref(2)P sematikus képe mutatja az LC3 interakciós régiót (LIR motívum) és az általunk létrehozott *Ref(2)^{LIR}* mutáns törzsben található mutációt, amely megakadályozza az Atg8-al való kölcsönhatást. A többi domén szerkezete nem változott. **B.** A fent jelzett genotípusokból származó állatokat immunprecipitáltuk anti-RFP gyöngyökkel. Az immunprecipitátum (mCherry) és a jelölt inputot SDS-gélen futtattuk és a 3xmCherry-Atg8a különböző formáit felismerő ellenanyagokkal vizsgáltuk (lipidált és lipidálatlan) és ko-immunoprecipitáltuk az endogén Ref(2)P-vel. Az *Atg16^{d67}* lizátum igazolja a Ref(2)P molekulatömegét, míg a *w¹¹¹⁸* törzs negatív kontrollként szolgál.

4.2. A *p62/Ref(2)^{LIR}* mutánsokban az ubiquitinált fehérje aggregátumok száma megnő

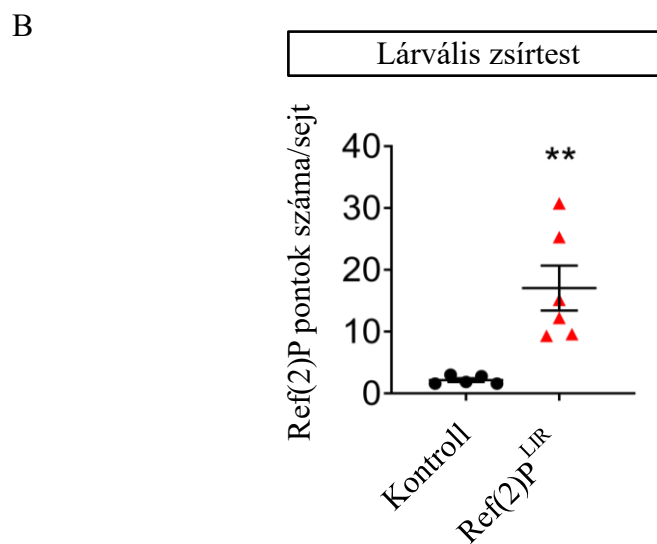
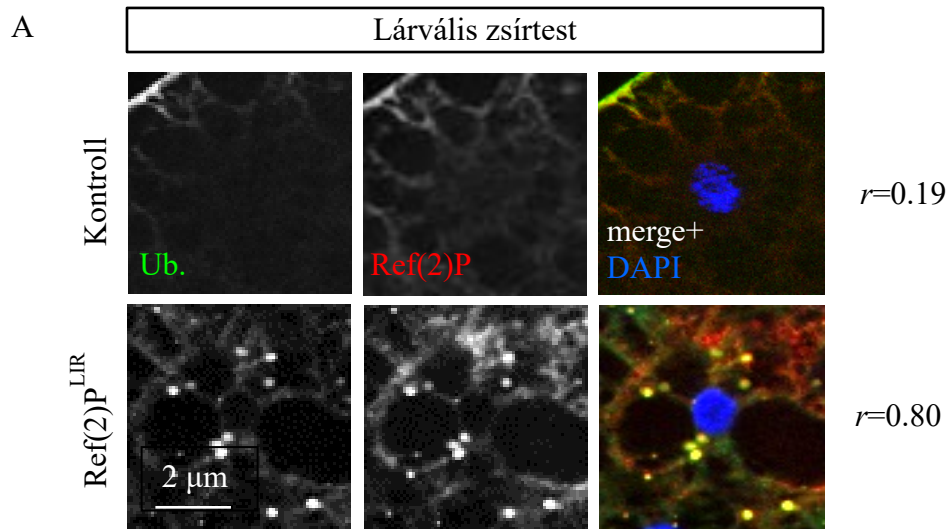
A CRISPR/Cas9 rendszerrel húsz különböző LIR mutáns törzset is létrehoztunk. Először ezekből az általunk létrehozott *Ref(2)^{LIR}* mutáns törzsekből öt adult állat teljes lizátumát vizsgáltuk meg. A **7. ábrán** ezek közül kettő látható, ahol megfigyelhettük, hogy mind a Ref(2)P, mind az ubiquitin szint megemelkedett ezekben az állatokban a vad típushoz képest.



7. ábra. A *Ref(2)^{LIR}* mutáns jelöltek vizsgálata Western blot módszerrel. A három napos állatok Western blot vizsgálata kontroll, homozigóta és heterozigóta *Ref(2)^{LIR}* mutáns állatok lizátumából Ref(2)P és ubiquitin felhalmozódást mutat. N = 5/genotípus

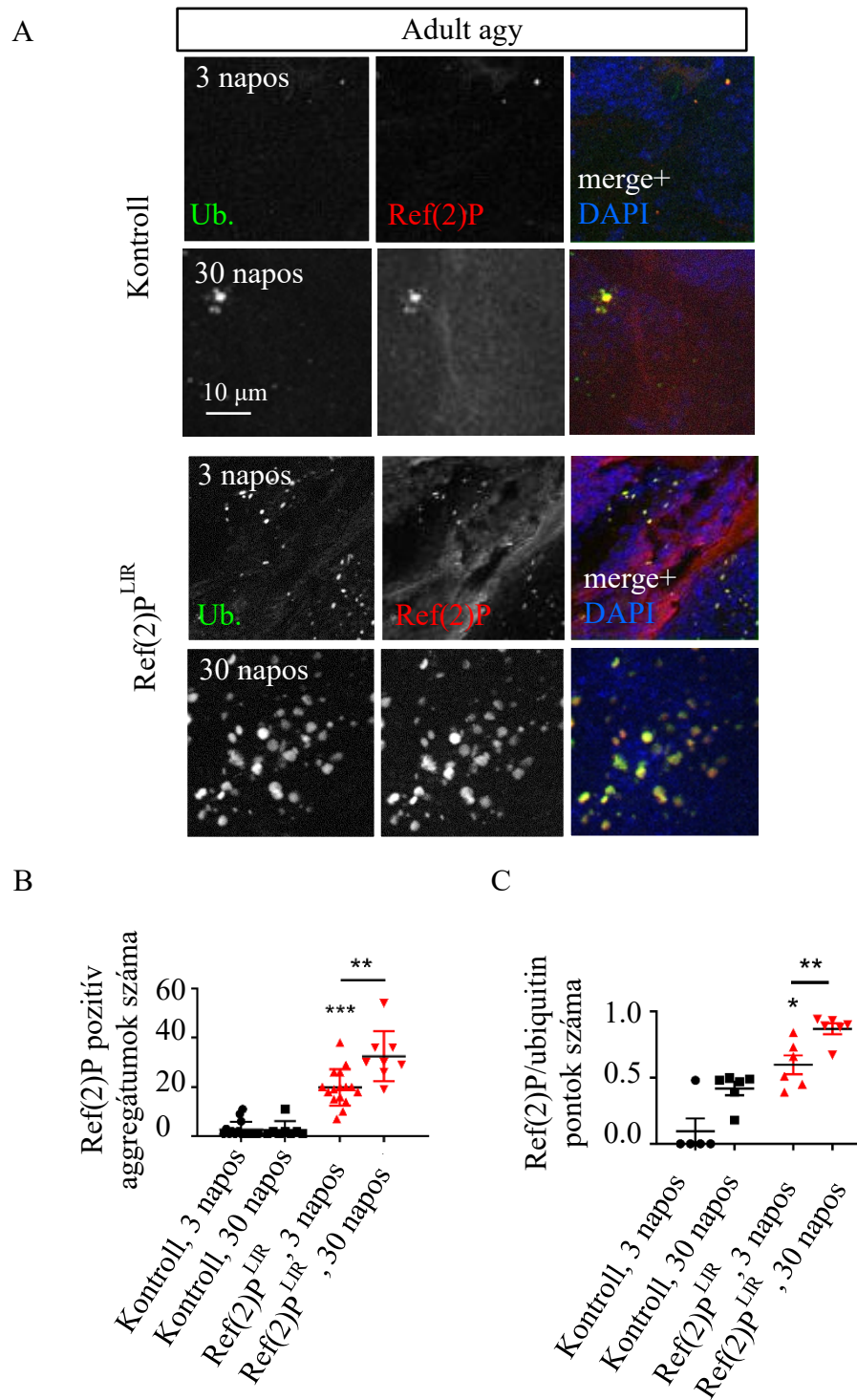
Ezután több szövetben is megnéztük a Ref(2)P és az ubiquitin jelenlétét, mint például lárvális zsírtestben, **(8A. ábra)** adult agyban, **(9A. ábra)** és az indirekt repülő izmokban (IFM). Minden szövetben szignifikánsan felhalmozódott a Ref(2)P és az ubiquitin. Ezenkívül erős kolokalizációt figyeltünk meg a Ref(2)P és az ubiquitin között az összes általunk vizsgált

szövetben. Mivel a Ref(2)P szintje hatással van az öregedésre és a neurodegeneratív betegségekre, ezért fiatalabb 3 napos és idősebb 30 napos korban is vizsgáltuk az ubiquitinált fehérje aggregátumok számát. Megfigyeltük, hogy az aggregátumok száma és a kolokalizáció mértéke is növekszik az életkorral a LIR mutánsban (**9B** és **9C. ábra**).



8. ábra. A Ref(2)^{PLIR} mutáns lárvális zsírtestjeinek immunfestése. **A.** Az L3 vándorló lárvák zsírtestjeiben a poliubiquitin (FK2, zöld) és a Ref(2)P (piros) felhalmozódása és kolokalizációja is megfigyelhető. A Pearson-koefficiensek (r) a kolokalizáció mértékét jelzik, a DAPI (kék) jelöli a magokat. **B.** A Ref(2)P pontok átlagos számának meghatározása. Statisztikai tesztelés: páratlan Student-féle t -teszt. A hibasávok szabványos hibát jelentenek. ** $p < 0,01$. Kontroll $N = 6$; ref(2)^{PLIR} $N = 4$.

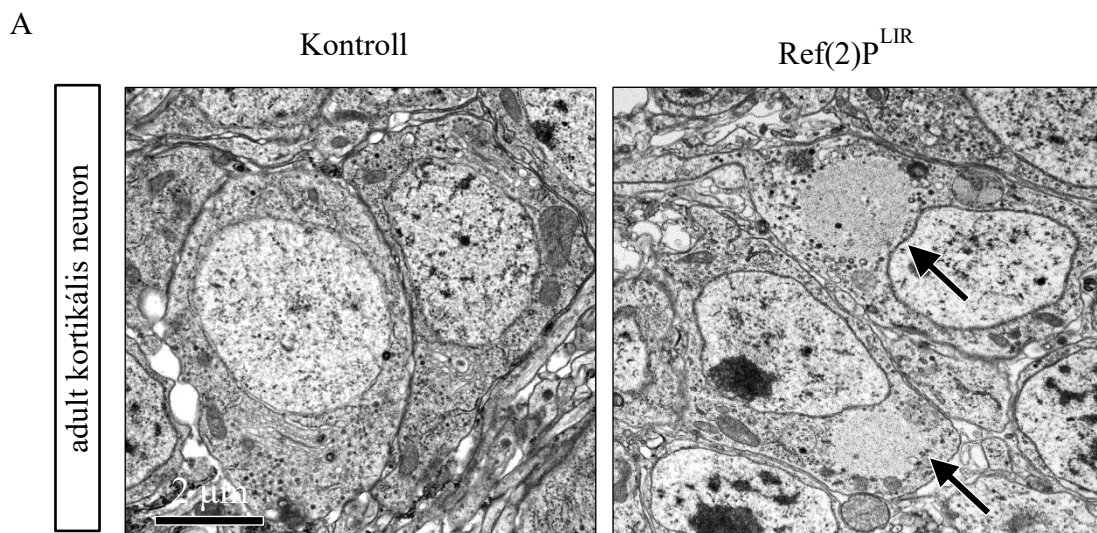
Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy az ubiquitinált fehérjék, amelyek normál esetben citoszolikusan oldott formában vannak jelen, képesek a szelektív autofágia hibájának hatására gyorsan aggregálódni és oldhatatlan állapotba kerülni a Ref(2)P-vel együtt a LIR mutáns állatokban.



9. ábra. 3 és 30 napos Ref(2)^{PLIR} mutáns nőstény állatok agyának immunfestése. A. A Ref(2)^{PLIR} mutáns állatoknál mind 3, mind 30 napos korban szignifikánsan megnőtt a poliubiquitin (zöld) és a Ref(2)P (piros) szintje

és ez a korral folyamatosan erősödik. Ezenkívül megfigyelhető a kolokalizációjuk is, ami szintén nő az életkor előrehaladtával. **B.** A Ref(2)P pozitív struktúrák számának meghatározása az agyban a megadott életkorban és genotípusban, a Kruskal-Wallis teszt használatával történt. A hibásávok standard hibát jelölnek. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$. **C.** Pearson-féle korrelációs együtthatók (r), amelyek a Ref(2)P és a poliubiquitin közötti kolokalizáció szintjét jelentik az agyban. Statisztikai tesztelés: Kruskal-Wallis teszt használatával. A hibásávok standard hibát jelölnek. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. $N = 4$ /genotípus

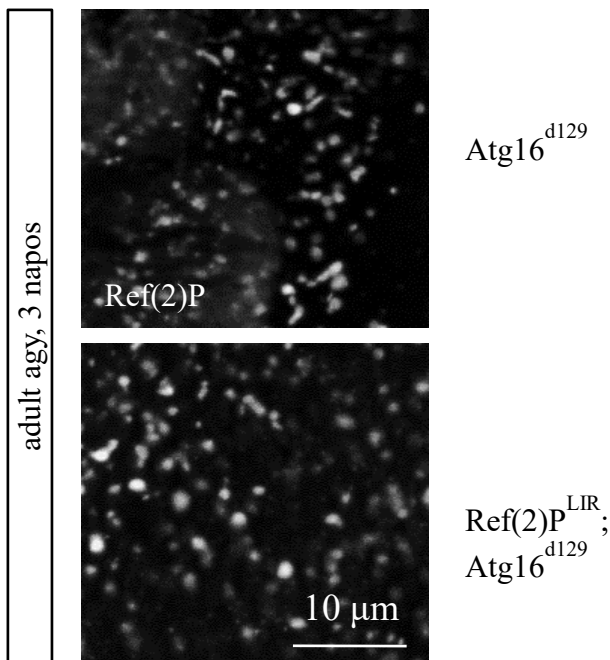
Ezeket az aggregátumokat elektronmikroszkóppal tovább vizsgáltuk. Ehhez az adult agy optikus lebenyét használtuk, ahol a *Ref(2)^{LIR}* mutánsokban citoszolikus, membrán nélküli 0,5 – 4 μm átmérőjű aggregátumokat találtunk (**10. ábra**).



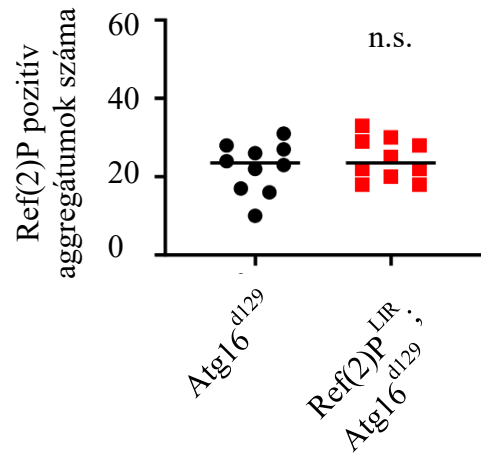
10. ábra. A 3 napos *Ref(2)^{LIR}* mutáns nőstény állatok kortikális neuron sejtestestjeinek elektronmikroszkópos megfigyelése. A *Ref(2)^{LIR}* mutáns állatoknál membrán nélküli citoszolikus aggregátumok találhatóak.

Mivel több olyan Atg gén van (*Atg7*, *Atg8a*, *Atg16*) (Varga et al. 2016; Juhász et al. 2007), amelyek elvesztése hasonlóan a LIR mutánshoz Ref(2)P pozitív fehérje aggregátumok felhalmozódását okozza, ezért létrehoztunk egy a *Ref(2)^{LIR}* mutáció mellett az *Atg16^{d129}* mutációt is tartalmazó kettős mutáns állatokat. Ezeknél az állatoknál megfigyeltük, hogy nem növekedett tovább a Ref(2)P felhalmozódás a csupán *Ref(2)^{LIR}* mutációt hordozó állatokhoz képest (**11A. és 11B. ábra**). Ez bizonyítja, hogy a LIR motívum hiánya teljesen eliminálja az ubiquitínált fehérjék szelektív autofágiáját.

A



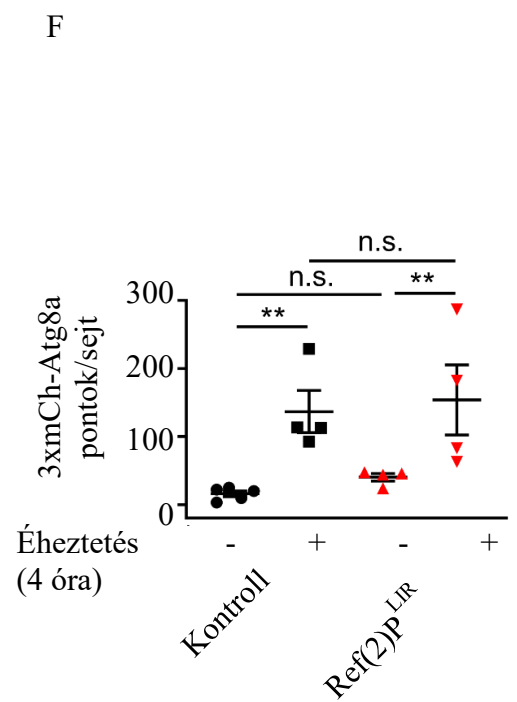
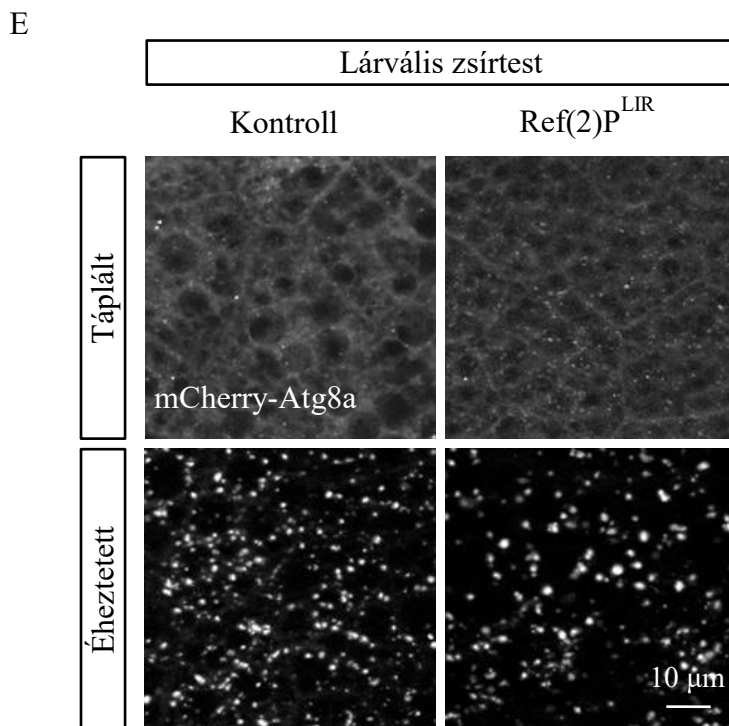
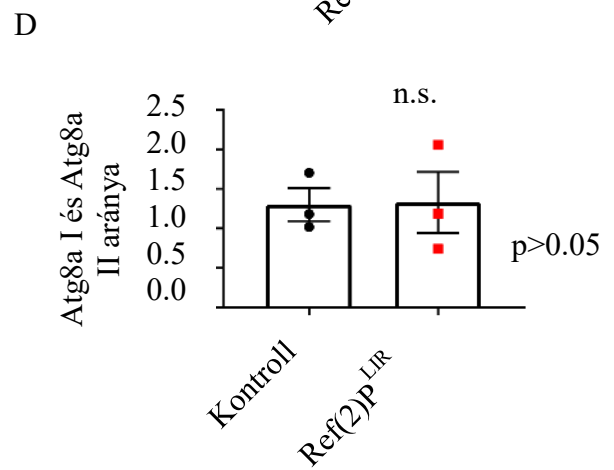
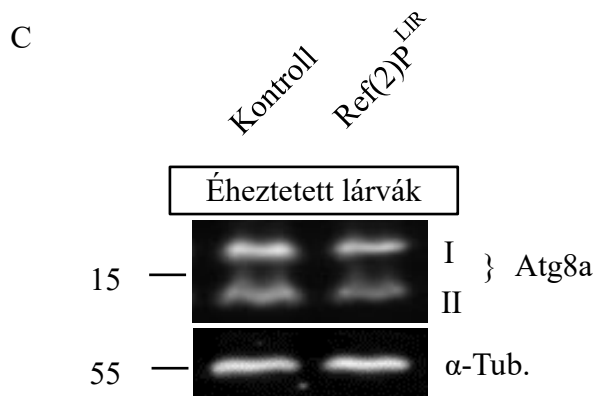
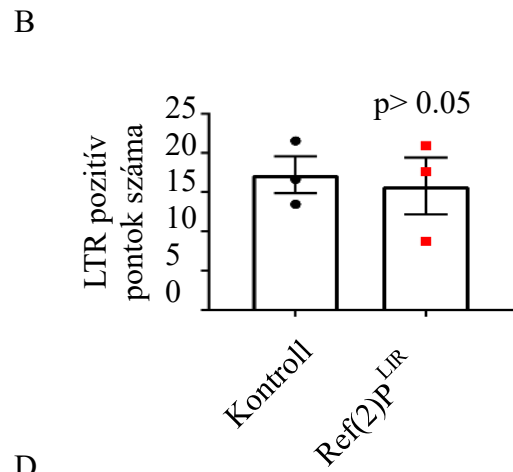
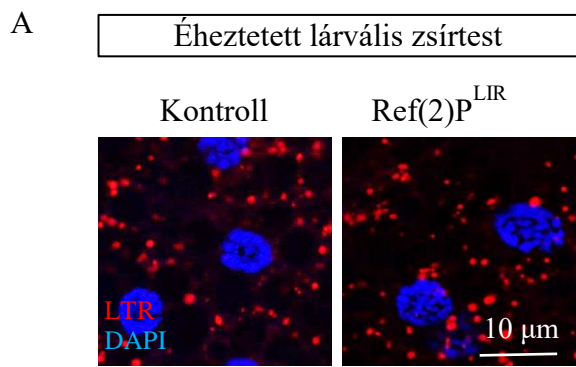
B



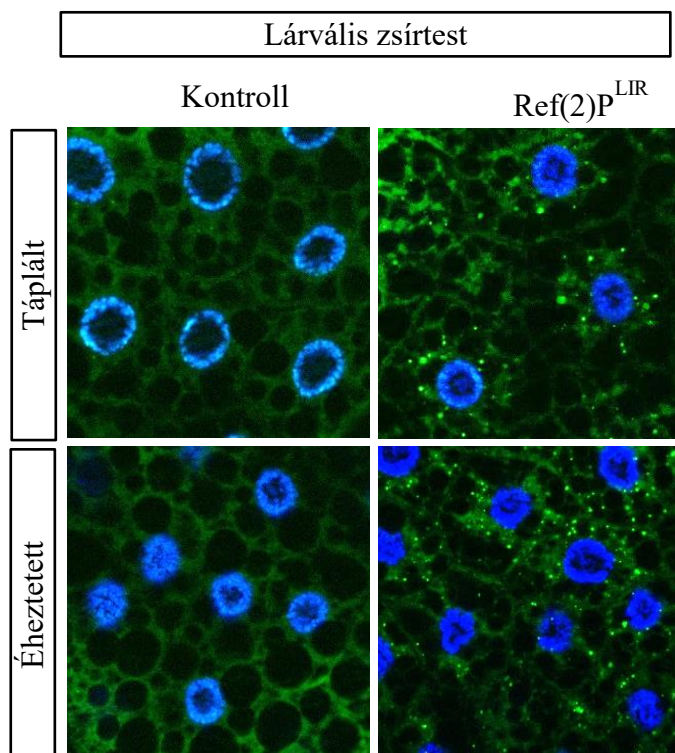
11. ábra. 3 napos *Atg16^{d129}* és *Ref(2)^{LIR}*; *Atg16^{d129}* nőstény állatok agyának immunfestése. **A.** A *Ref(2)^{LIR}* mutáns állatokban az *Atg16^{d129}* mutáció nem okoz szignifikáns különbséget a Ref(2)P számában. **B.** A Ref(2)P számszerűsítése a 3 napos immunfestett agyakon. N = 4/genotípus.

4.3. A *Ref(2)^{LIR}* mutáns állatok nem szelektív autofágiája nem változik

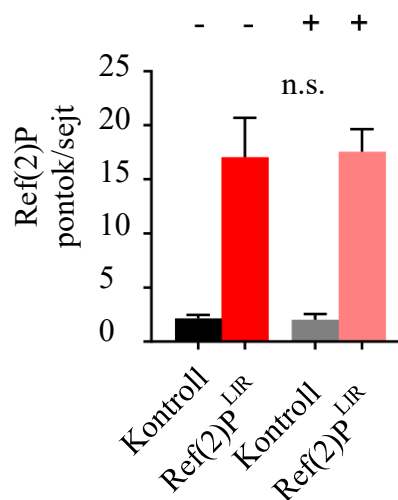
Ahhoz, hogy megvizsgáljuk a nem szelektív autofágia jelenlétét, LysoTracker festést használtunk, amely savas lizoszómákat jelöl lárvális zsírtestben. Az általunk vizsgált LIR mutáns és kontroll állatok zsírtestjeiben nem volt szignifikáns különbség a LysoTracker pozitív struktúrák számában (**12A. és 12B. ábra**). Ezen kívül teljes állat lizátumokban a lipidált Atg8a szintjében sem figyeltünk meg különbséget az éheztetett kontroll és LIR mutáns állatok között (**12C. és 12D. ábra**). Az endogén promotérral rendelkező 3xmCherry-Atg8a riportert használva éheztetett lárvákat vizsgálva azonos éhezési reakciót láttunk a kontroll és a mutáns lárva zsírtestjében (**12E. és 12F. ábra**). Ezen kívül az éheztetés a Ref(2)P szintjét sem emelte meg a zsírtestben. Ezért úgy gondoljuk, hogy a LIR mutáció jelenléte nem rontotta el a nem szelektív autofágia működését (**12 G. és 12H. ábra**).



G



H

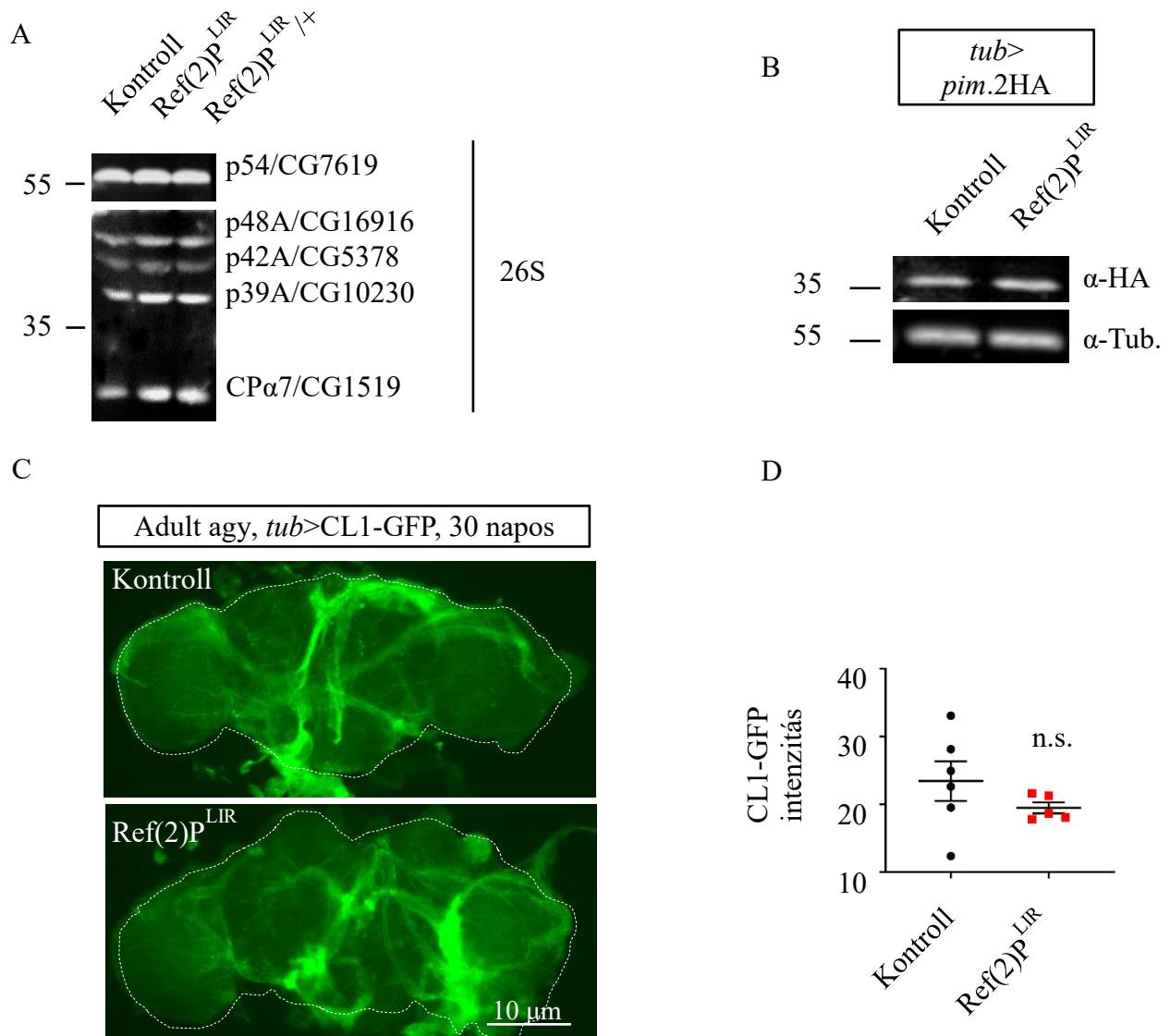


12. ábra. A *Ref(2)^{LIR}* mutációja nem befolyásolja az alapszintű autofágia működését. **A.** Az L3-as 4 órán át éheztetett lárvák LysoTracker Red (LTR, piros) festődésében nem látható különbség az éheztetett kontroll és a *Ref(2)^{LIR}* mutáns zsírtestjei között. **B.** Az LTR festés során nem látható szignifikáns különbség. **C.** Az éheztetett lárvák lizátumainak Western blot vizsgálata során a lipidált és lipidálatlan Atg8a hasonló szintet mutatott. N = 5/genotípus **D.** Az Atg8a lipidációs arány mennyiségi meghatározása 3 külön éheztetési kísérletről nem mutatott különbséget. **E.** Nincs különbség a 3xmCherry-Atg8a pozitív autofág struktúrák számában a kontroll és a *Ref(2)^{LIR}* mutáns táplált vagy éheztetett larva zsírsejtjei között. **F.** A lárvalis zsírtestben látható különbségek nem szignifikánsak. **G.** A táplált és az éheztetett L3 stádiumú lárvák zsírsejtjeinek Ref(2)P immunfestésével felhalmozódást figyeltünk meg. **H.** A Ref(2)P immunfestés számszerűsítése során megfigyelt felhalmozódás nem szignifikáns.

4.4. A *Ref(2)^{LIR}* mutáns állatok proteoszómális funkciói sértetlenek

Szerettük volna megvizsgálni a proteoszómális aktivitást az általunk létrehozott *Ref(2)^{LIR}* mutánsban. Korábban megfigyelték, hogy a sérült autofágiával rendelkező HeLa sejtekben felhalmozódnak a proteoszóma szubsztrátok a p62 felhalmozódása miatt, ami a 26S proteoszómához való szállítás hibájához vezet (Korolchuk et al. 2009). Ennek vizsgálatához összehasonlítottuk az ábrán jelzett *Drosophila* 26S proteoszóma alegységek fehérje szintjét a kontroll és a *Ref(2)^{LIR}* mutáns állatokban és ezekben nem találtunk különbséget (**13A. ábra**) (Lipinszki et al. 2009; Kurucz et al. 2002). Az egyik proteoszóma szubsztrát a pim, amelynek szintje hasonló volt a *Ref(2)^{LIR}* mutánsban (**13B. ábra**). Emellett egy CL1-GFP-t tartalmazó

törzset használtunk még, amiben a CL1 egy proteaszóma specifikus degron, ami az ubiquitin-proteaszóma rendszer általi lebontásra küld fehérjéket (Pandey et al. 2007). Az általunk vizsgált 30 napos állatokban nem találtunk különbséget a kontroll és a *Ref(2)^{LIR}* mutáns állatokban a CL1-GFP jel szintjében (13C. és 13D. ábra). Ezek az eredmények nem támogatják *Drosophila* esetében azt a korábbi megfigyelést az emlős p62-re nézve, hogy a p62 felhalmozódása gátolja a proteaszóma funkcióját (Korolchuk et al. 2009).



13. ábra. A *Ref(2)^{LIR}* mutációja nem befolyásolja a proteaszóma működését. **A.** A jelzett 26S proteaszóma alegységek vizsgálata során nem figyeltünk meg különbséget a 3 napos kontroll és a LIR mutáns állatok lizátumában. N = 5 **B.** A Pim/securin szintje a 3 napos kontroll és LIR mutáns állatokban nem mutat különbséget. Kontrollként a *tub-Gal4/pim.2×HA* és a *ref(2)^{LIR};tub-Gal4/pim.2×HA* törzseket használtuk. **C.** A CL1 proteaszóma szubsztrát szintjében nem látható különbség a 30 napos állatok agyában immunfestés után. Lépték: 10 μm. **D.** A GFP intenzitása a C panelről. A különbség nem szignifikáns. Statisztikai tesztelés: páratlan Student-féle t-teszt.

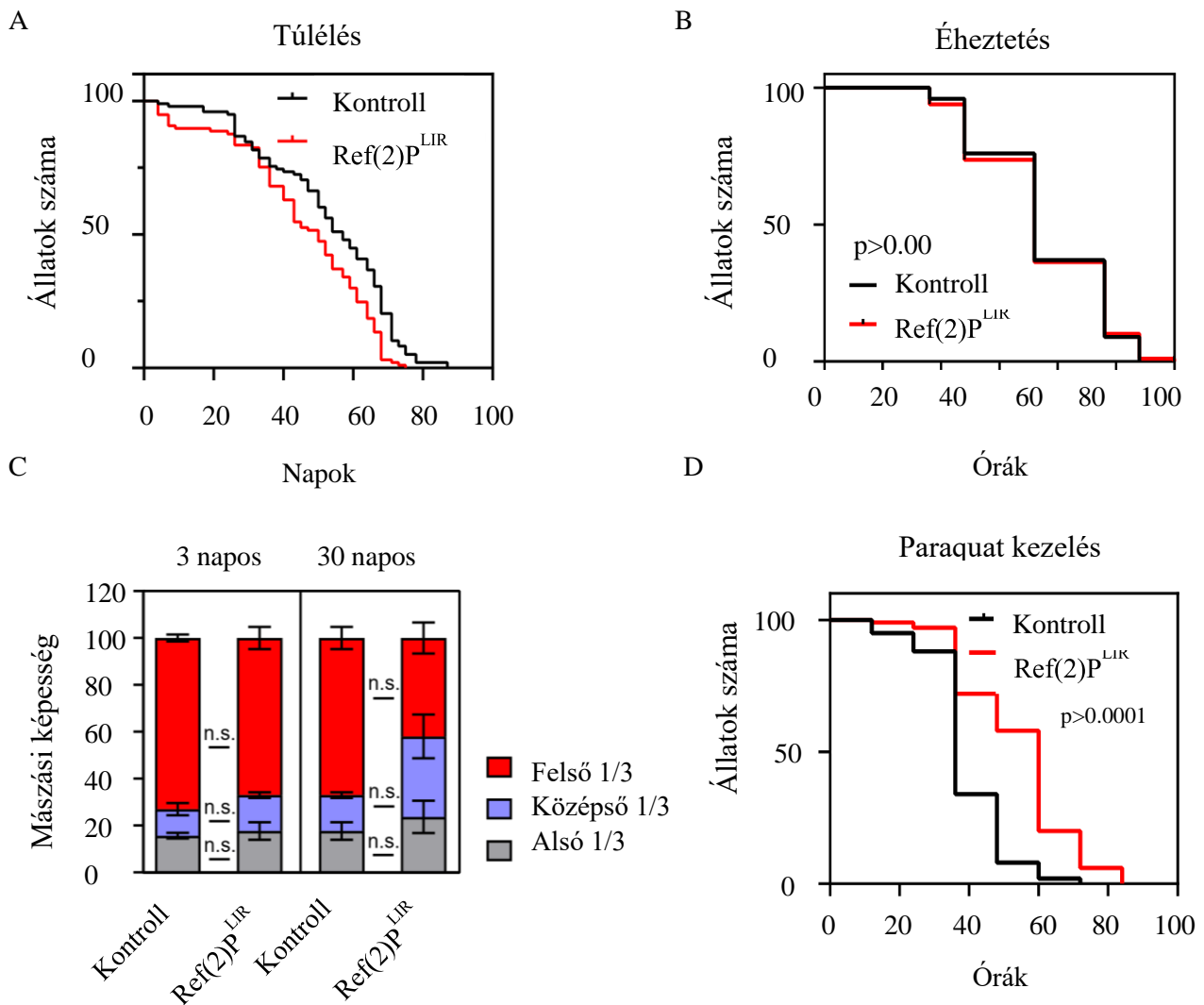
4.5. A *Ref(2)^{LIR}* mutáns állatok nem mutatnak fiziológiai problémákat, azonban jobban ellenállnak a paraquat által kiváltott oxidatív stressznek

Már korábban kimutatták, hogy az oxidatív stressz csökkenti az élettartamot (Demontis and Perrimon 2010). Ezen kívül több *Atg* mutáns rövid élethosszat mutat, mint például az *Atg7^{d77}* és az *Atg16^{d67}* (Varga et al. 2016; Juhász et al. 2007). A korábban létrehozott *Ref(2)P* mutánsoknál, amelyeknek a PB1 (*Ref(2)P^{od2}*), vagy az UBA (*Ref(2)P^{od3}*) doménjén változtattak, az *Atg* mutánsokhoz hasonlóan rövidebb élethosszt produkáltak. Ezen kívül csökkent mozgási funkciót és paraquat által kiváltott stresszre fokozott érzékenységet tapasztaltak ezekben a mutáns törzsekben (De Castro et al. 2013). Azonban a *Ref(2)P* túltermelése képes növelni az ecetmuslicák élettartamát (Aparicio, Rana, and Walker 2019).

Azért, hogy a *Ref(2)P^{LIR}* mutáns törzsben minden egyéb genetikai különbséget kiküszöböljünk, izogemizáltuk a törzset. Ezután az elvégzett élethossz kísérletekben a LIR mutáns állatok élethossza nem volt szignifikánsan rövidebb a vad típusúhoz képest. Ez a csökkenés az átlagos élettartam 14%-a volt. Az éheztetett élethossz kísérletben nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a vad típusú állatokhoz képest (**14A. és 14B. ábra**).

A neuromuszkuláris képességek vizsgálatához mászási tesztet alkalmaztunk az állatok 3 és 30 napos korában. Egyik vizsgált életkorban sem volt szignifikáns különbség a kontroll állatokhoz képest (**14C. ábra**).

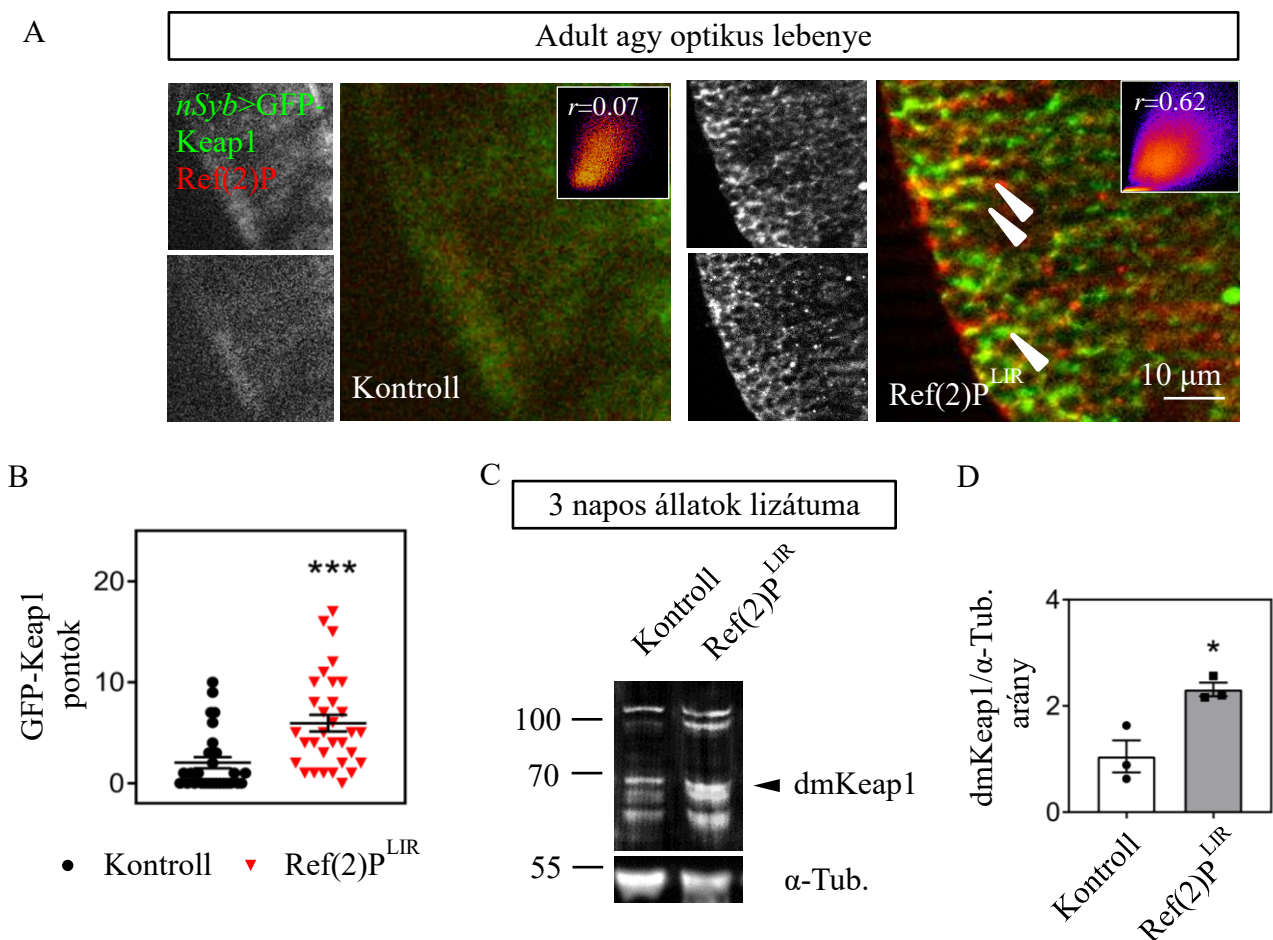
Ahhoz, hogy megfigyeljük az állatok oxidatív stresszre adott válaszát paraquat kezelést alkalmaztunk. A 3 napos LIR mutáns állatoknál szignifikánsan megnövekedett toleranciát tapasztaltunk a vad típusú állatokhoz képest. Ez a tolerancia 66%-os növekedést adott az átlagos túléléshez képest a *Ref(2)P^{LIR}* mutáns törzsnek (**14D. ábra**). Mivel a fent említett *Ref(2)P^{OD2}* és *Ref(2)P^{OD3}* a PB1 vagy az UBA domén hiányában képtelenek ubiquitinált fehérje aggregátumok kialakítására, így lehetséges egy kapcsolat az aggregátum képződés és a fiziológiai változások között a LIR mutáns esetében.



14. ábra. A *Ref(2)^{P^{LIR}}* mutációnak minimális hatása van az állatok élettartamára, miközben megnövekedett oxidatív stressz rezisztenciát eredményez. **A.** Az élethossz kísérletsorán nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a kontroll és a LIR mutáns állatok között. N= 191 kontroll N = 200 *Ref(2)^{P^{LIR}}* **B.** A teljes éheztetési kísérlet során az élethosszban nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a kontroll és a LIR mutáns állatok között. N= 112 kontroll N = 110 *Ref(2)^{P^{LIR}}* **C.** A 3 és 30 napos kontroll és *Ref(2)^{P^{LIR}}* mutáns ecetmuslicák mászó teljesítményében nincs szignifikáns különbség egy mérőhenger harmad térfogataiban való eloszlást vizsgálva. Mann-Whitney U tesztet használtunk. N= 300 3 napos kontroll és *Ref(2)^{P^{LIR}}* N = 261 30 napos kontroll N = 269 *Ref(2)^{P^{LIR}}* **D.** A 3 napos muslicák paraquattal való etetés során a *Ref(2)^{P^{LIR}}* mutáns állatok túlélése megnövekedett. A kísérletek értékeléséhez Kaplan-Meier túlélési elemzést használtunk. N= 314 kontroll N = 337 *Ref(2)^{P^{LIR}}*

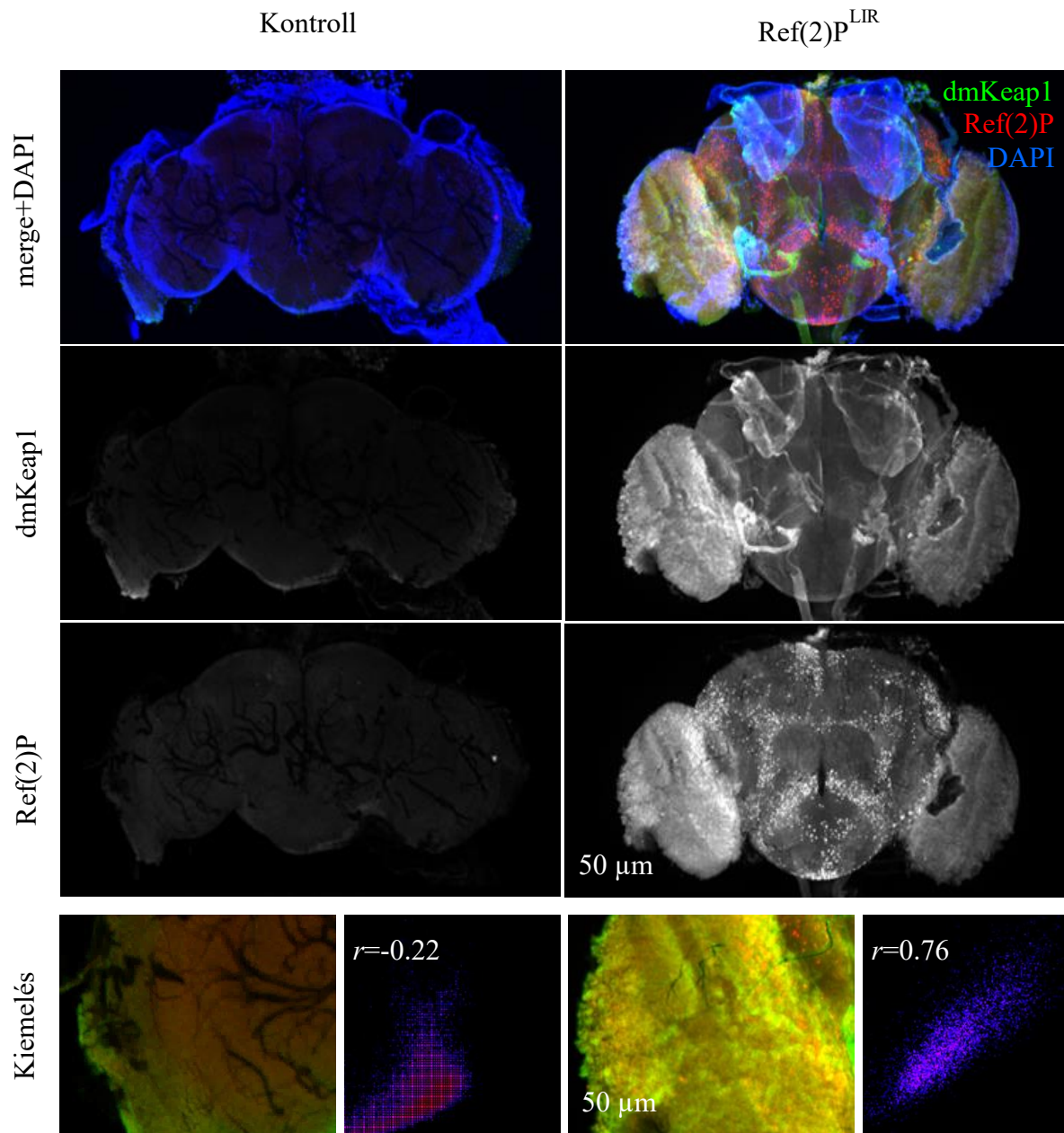
4.6. A Ref(2)P - Keap1 kapcsolata és ennek változása a LIR mutáció hatására

Ahhoz, hogy kiderítsük az oxidatív stresszrezisztencia okát, először megvizsgáltuk, hogy az ubiquitinált Keap1 együtt fejeződik-e ki a Ref(2)P-vel. Ehhez egy pánneurális *nSyb* driverrel meghajtott GFP-Keap1 transzgenikus törzset használtunk a LIR mutáns állatokban. Megfigyeltük, hogy az adult LIR mutáns ecetmuslicák agyában szignifikánsan több GFP-Keap1 volt jelen, mint a vad típusú állatoknál. Ezenkívül ezek a pontozott struktúrák részben kolokalizáltak a Ref(2)P-vel (**15A. és 15B. ábra**). Az endogén Keap1 és Ref(2)P használatával is hasonló eredményeket kaptunk (**16. ábra**). Ezen kívül a 3 napos *Ref(2)P^{LIR}* mutáns egyedek lizátumában több endogén Keap1 található, mint a kontroll mintákban (**15C. és 15D. ábra**).



15. ábra. A *Ref(2)P^{LIR}* mutáns állatokban a Keap1 felhalmozódik és kolokalizál a Ref(2)P-vel. **A.** A 3 napos, adult nőstény állat agyát immunfestettük Ref(2)P és GFP-Keap1-el. Részleges kolokalizációt figyeltünk meg (nyilak) a *Ref(2)P^{LIR}* mutáns állatoknál az optikus lebenyben. N= 4/genotípus **B.** A GFP-Keap1 mennyiségének meghatározása. A kiértékeléshez kétirányú Mann-Whitney U tesztet használtunk. **C.** Adult állatok lizátumát használva Western blot-ot végeztünk az endogén Keap1 szintjének meghatározására. A fekete nyíl jelöli a

specifikus Keap1-et. A *Ref(2)^{PLIR}* mutáns állatokban a Keap1 felhalmozódott. **D.** A C panelen található Western blot kvantifikálásához kétvégű Student's t tesztet használtunk.

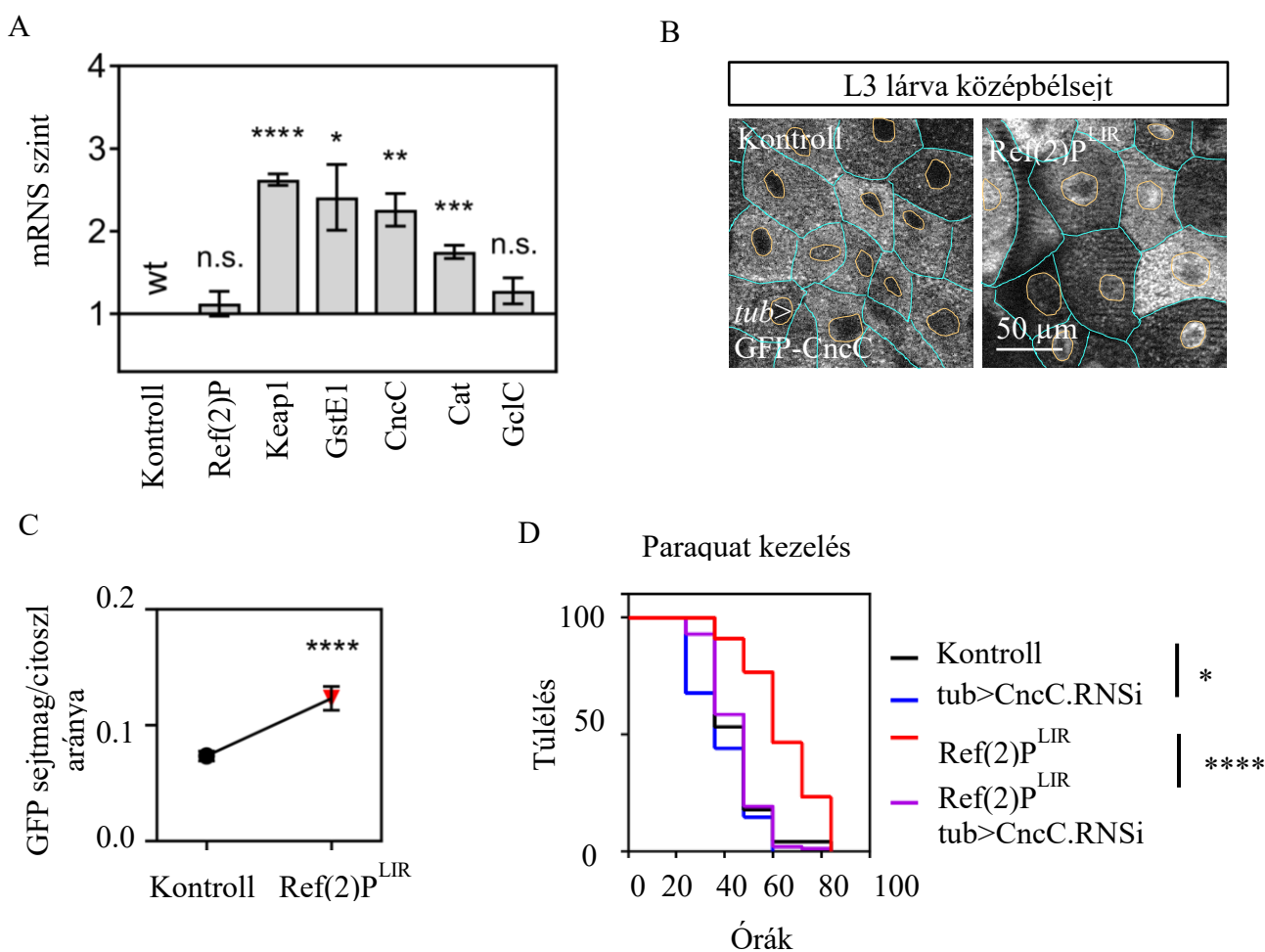


16. ábra. A 3 napos *Ref(2)^{PLIR}* mutáns állatok agyának immunfestése. A *Ref(2)^{PLIR}* mutáns adult állatok agyában a Keap1 (zöld) felhalmozódik és részben kolokalizál a Ref(2)P-vel (piros). A bekeretezett régiók lent láthatóak.

4.7. A Nrf2/Cnc aktivációjának szerepe a paraquat toleranciában

Mint azt az irodalmi áttekintésben is említettem, a Keap1 gátolja az Nrf2-t, ezért megvizsgáltuk a Nrf2 aktivitását, mint lehetséges okot a paraquat rezisztenciára. Megfigyeltük, hogy a *Ref(2)^{PLIR}* mutáns állatokban megnövekedett az Nrf2 és a tőle downstream található

ARE régiót tartalmazó gének transzkripció aktiválása. Ilyen például a Keap1, a glutation-S-transzferáz (Gst1) és a kataláz (Cat) aktivitása is, azonban a Ref(2)P transzkripciója, amely szintén Nrf2 target, változatlan maradt a mutáns állatokban (**17A. ábra**). Ezzel együtt, az Nrf2 megnövekedett nukleáris transzlokációját is megfigyeltük a *Ref(2)^{LIR}* mutáns lárva középbeli sejtjeiben (**17B. és 17C. ábra**). Ahhoz, hogy bizonyítsuk az Nrf2 szerepét a paraquat toleranciában, csendesítettük az Nrf2-öt a LIR mutáns állatokban. Ezeknek az állatoknak 33%-al csökkent az élethossza a paraquattal való kezelés során a *Ref(2)^{LIR}* mutáns állatokhoz viszonyítva (**17D. ábra**). Ezért úgy gondoljuk, hogy a paraquat tolerancia egy nem várt funkciónyerés az ecetmuslicákban, amelyekben meghibásodott az ubiquitin-függő autofágia.

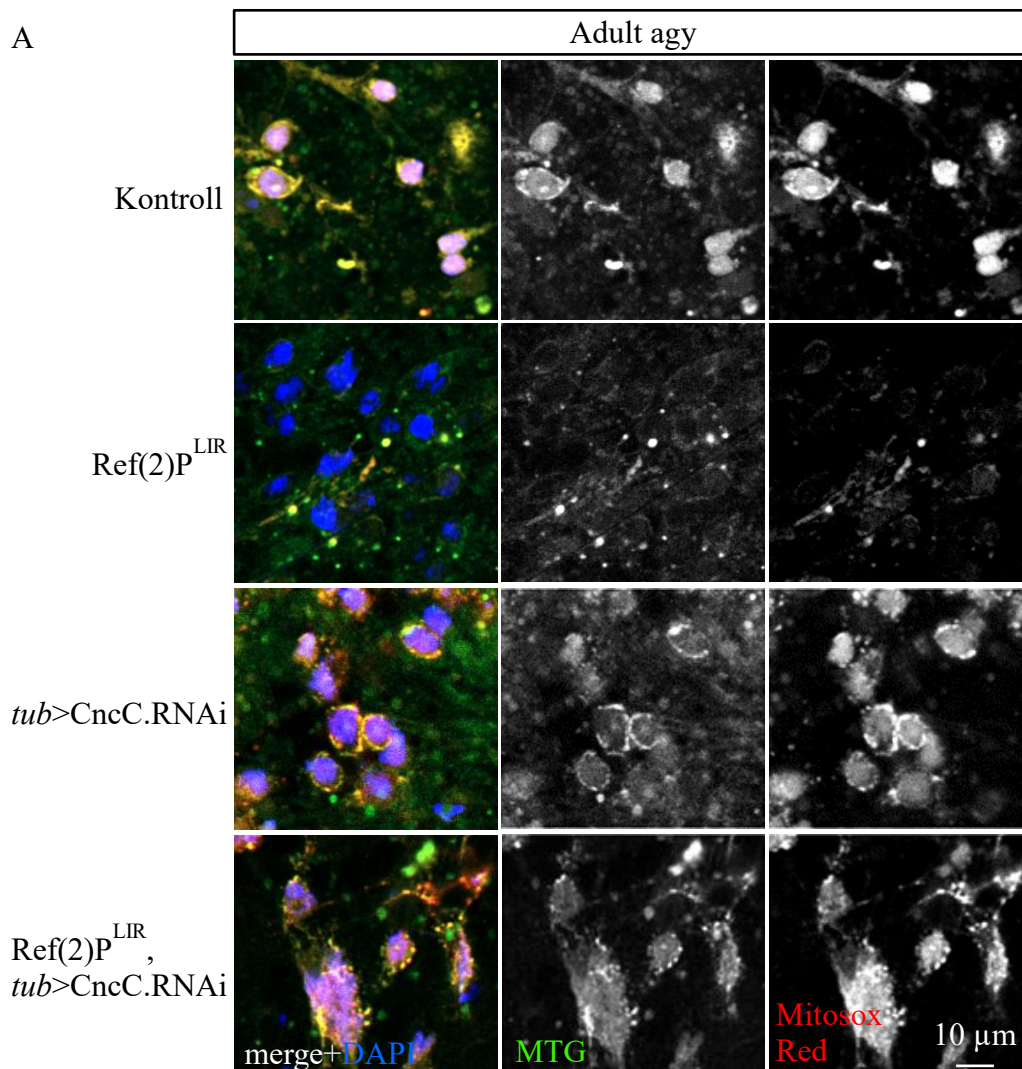


17. ábra. A *Ref(2)^{LIR}* mutáns állatokban a Keap1 megkötése a Nrf2/Cnc útvonal aktiválásához vezet. **A** RT-Q-PCR-rel lementük a Ref(2)P, Keap1, GstE1, CncC, Cat és GclC transzkriptek mennyiségét *Ref(2)^{LIR}* mutánsokban és Rpl32 kontrollhoz normalizáltuk. A statisztikai kiértékeléshez kétoldalas Mann-Whitney U tesztet használtunk. Bars: standard hiba. **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,005$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. **B** A kontroll és *Ref(2)^{LIR}* mutáns GFP-Cnc-t expresszáló L3 stádiumú lárvaiknak a középbeli sejtjeiben fokozott nukleáris transzlokációt figyeltünk meg. N = 6 **C** A B panelen látható citoszolikus GFP fluoreszcencia kiszámításához a sejtmagi GFP fluoreszcenciát kivontuk (narancssárga körök a B panelen) a teljes sejtből (cián körök a B panelen). Ezután a sejtmag GFP fluoreszcenciáját elosztottuk a citoszol GFP fluoreszcenciájával, így megkaptuk a sejtmag/citoszol

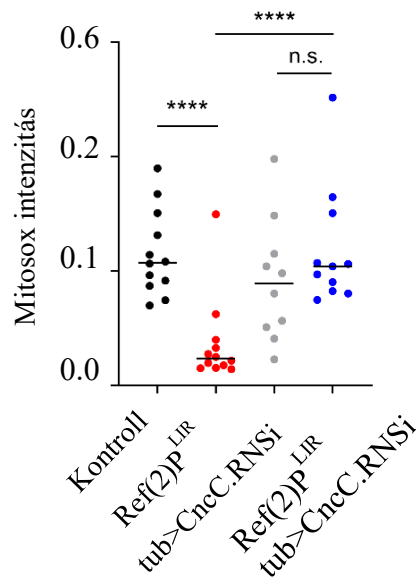
arányt. Statisztikai tesztelés: kétoldalas Mann-Whitney U teszt. Standard hiba. **** p < 0,0001. N = 66 kontroll N = 62 *Ref(2)^{LIR}* D A *Ref(2)^{LIR}* mutáns állatok paraquat túlélési reakciója a Cnc RNSi-vel azt mutatja, hogy az oxidatív stressz rezisztenciához szükség van a Cnc-re. Statisztikai tesztelés: Kaplan-Meier túlélési elemzés, majd Log-rank teszt. N = 314 kontroll N = 172 *tub>CncC.RNSi* N = *Ref(2)^{LIR}* N = 149 *Ref(2)^{LIR};tub>CncC.RNSi*

4.8. Az öregedéssel összefüggő mitokondriális szuperoxid termelés csökken a megemelkedett Nrf2/Cnc szint hatására

Az ecetmuslicáknál az öregedés során megfigyelhető a szuperoxidok termelődése a tor repülőizmaiban található mitokondriumokban. Ez a folyamat visszafordítható az életkor közepén *Ref(2)P* túltermelésével, valamint a *Drp1* segítségével, mivel mindkettő felgyorsítja a mitokondriumok degradálódását, így megújulását (Rana et al. 2017). A mitokondriális szuperoxid szintjének meghatározásához MitoSOX festést alkalmaztunk. A mutánsaink esetében, a MitoSOX jel csökkenését figyeltük meg 45 napos LIR mutáns állatok agyának optikus lebenyében a kontroll állatokhoz képest (18A. és 18B. ábra).

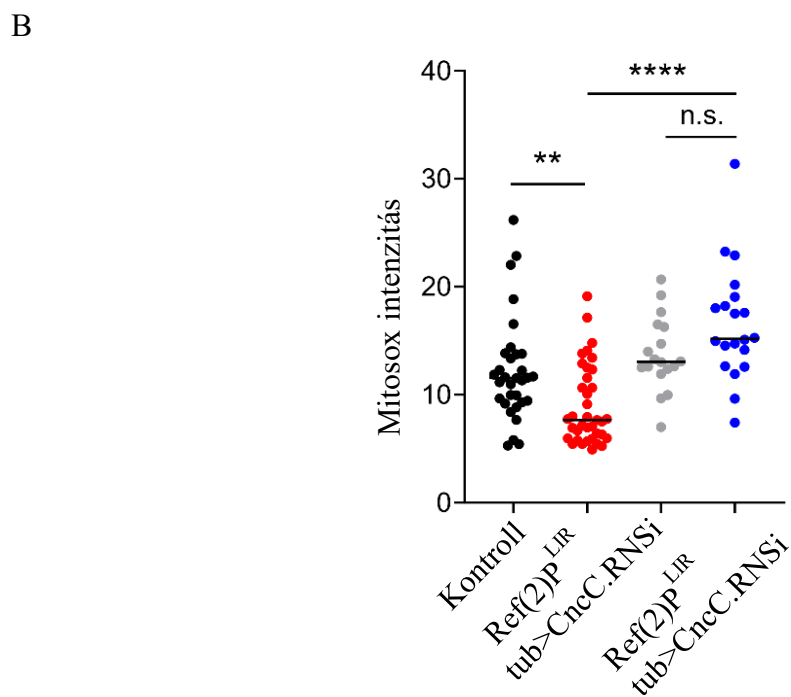
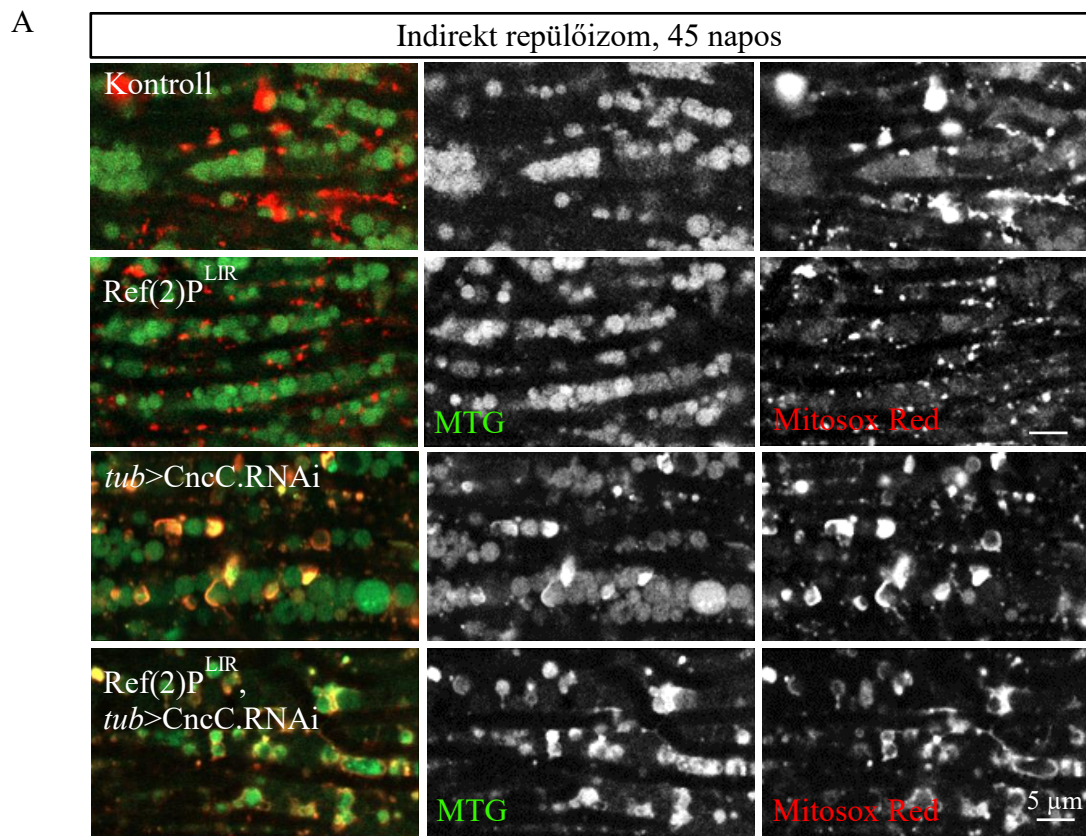


B



18. ábra. A megnövekedett mitokondriális szuperoxid termékek száma csökkent a *Ref(2)^{LIR}* mutáns állatokban. **A.** A jelzett genotípusokban a 45 napos adult nőstény állatok agyának optikus lebenyét kettős festéssel festettük, ahol a MitoSOX Red a mitokondriális szuperoxidot jelöli, míg a MitoTracker Green FM (MTG) a mitokondriumokat. Megfigyelhető a Mitosox jel csökkenése a *Ref(2)^{LIR}* mutánsban. **B.** A MitoSOX adatok kvantifikációja az A panelről. Statisztikai tesztelés: kétoldalas Mann-Whitney U teszt. **** $p < 0,0001$. n.s. = nem szignifikáns. $N = 6$

Hasonló eredményeket kaptunk a 45 napos állatok indirekt repülőizom (IFM) vizsgálata során is. Megfigyeltük, hogy a mitokondriális szuperoxid szint hasonló volt a 45 napos Cnc RNSi-t expresszáló izomszövetben mind a kontrollal, mind a *Ref(2)^{LIR}* mutáns háttérrel (**19A.** és **19B. ábra**).



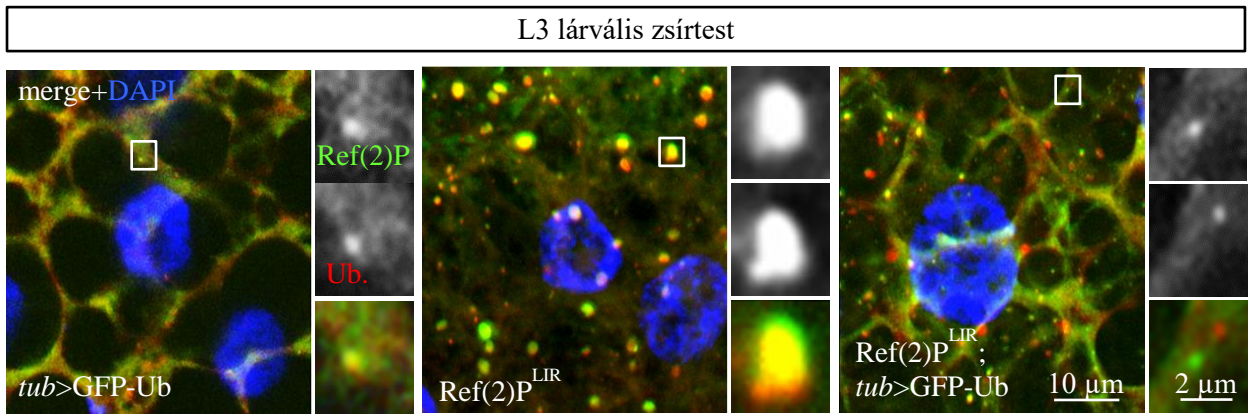
19. ábra. A 45 napos adult állatok repülőizmaiban csökkent a mitokondriális szuperoxidok mennyisége. A. A jelzett genotípusú 45 napos állatok repülőizmaikat feltártuk, majd MitoSOX (piros) és MitoTracker Green (zöld) festékekkel kezeltük. A *Ref(2)^{LIR}* mutáns állatokban csökkent a mitokondriális szuperoxidok mennyisége. A statisztikához kétirányú Mann-Whitney U tesztet használtunk. N = 6/genotípus

4.9. Az aggregátumok növekedéséhez a Ref(2)P - ubiquitin együttműködése szükséges

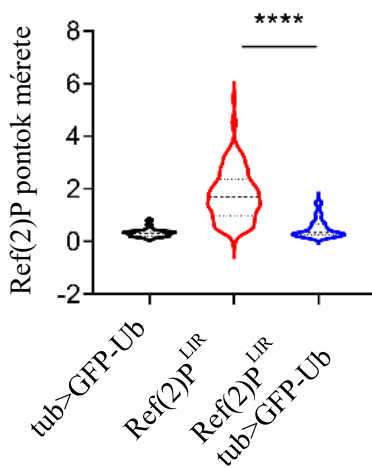
Szerettük volna tudni, hogy a Ref(2)P aggregátumok képződése elengedhetetlen-e Keap1-re gyakorolt gátló hatáshoz. Ennek megfigyeléséhez egy UAS-vezérelt N-terminális GFP-vel jelölt monoubiquitint expresszáló törzset használtunk, majd egy tubulin driverrel túltermeltettük LIR mutáns állatokban. Korábban megfigyelték, hogy a ZZ domén képes kötődni a K48- és K63-kapcsolt ubiquitin láncokhoz. Ezért a tetra-ubiquitin láncok túltermelése képes megzavarni a Ref(2)P – ubiquitin kölcsönhatást, azáltal, hogy a p62 ZZ doménjén keresztül kapcsolódik az ubiquitinhez (Zaffagnini et al. 2018). A p62 ZZ doménje közel helyezkedik el a PB1 doménhez, ezáltal képes csökkenteni a PB1 domén által létrejövő p62 polimerek létrejöttét (Ciuffa et al. 2015).

A korábbi megfigyelésekkel összhangban azt láttuk, hogy a *Ref(2)^{LIR}; tub>GFP-Ub* állatok szöveteiben jelentősen kevesebb Ref(2)P aggregátum található, mint a LIR mutáns állatokban (**20A. és 20B. ábra**). Ezen kívül a Ref(2)P pontok mérete is csökkent mind a lárva zsírtestjeiben, mind az adult agyban (**20C. ábra**). Megfigyeltük a Ref(2)P és az endogén ubiquitin kolokalizációjának csökkenését is (**20D. ábra**). Ez elsősorban azt jelzi, hogy a Ref(2)P - ubiquitin együttes kifejeződése szükséges az aggregátumok növekedéséhez. Emellett a *tub>GFP-Ub* expressziója növelte a GFP - ubiquitin pontok számát a LIR mutánsban, de a kontrollban nem. Ezek szerint a felhalmozódott lebontatlan Ref(2)P segíti az ubiquitin klaszterek kialakulását. Megfigyeltük, hogy a *ref(2)^{LIR}; tub>GFP-Ub* állatok szöveteiben jelen vannak ubiquitin pozitív Keap1 pontok is (**21A. és 21B. ábra**). Ez arra utal, hogy az UBA domén által vezérelt Keap1 - Ref(2)P kölcsönhatás nem függ szorosan a Ref(2)P aggregátum képződéstől (**21C. ábra**).

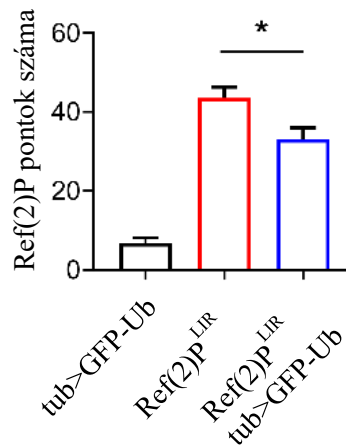
A



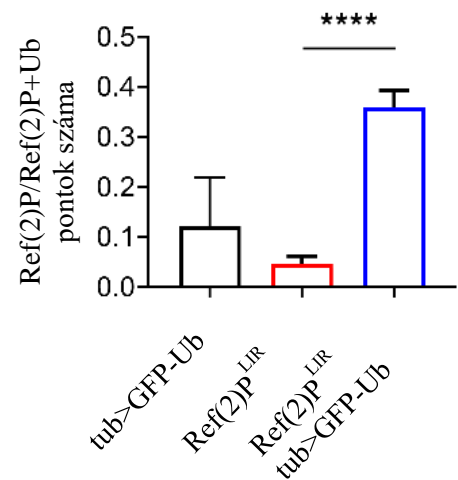
B



C

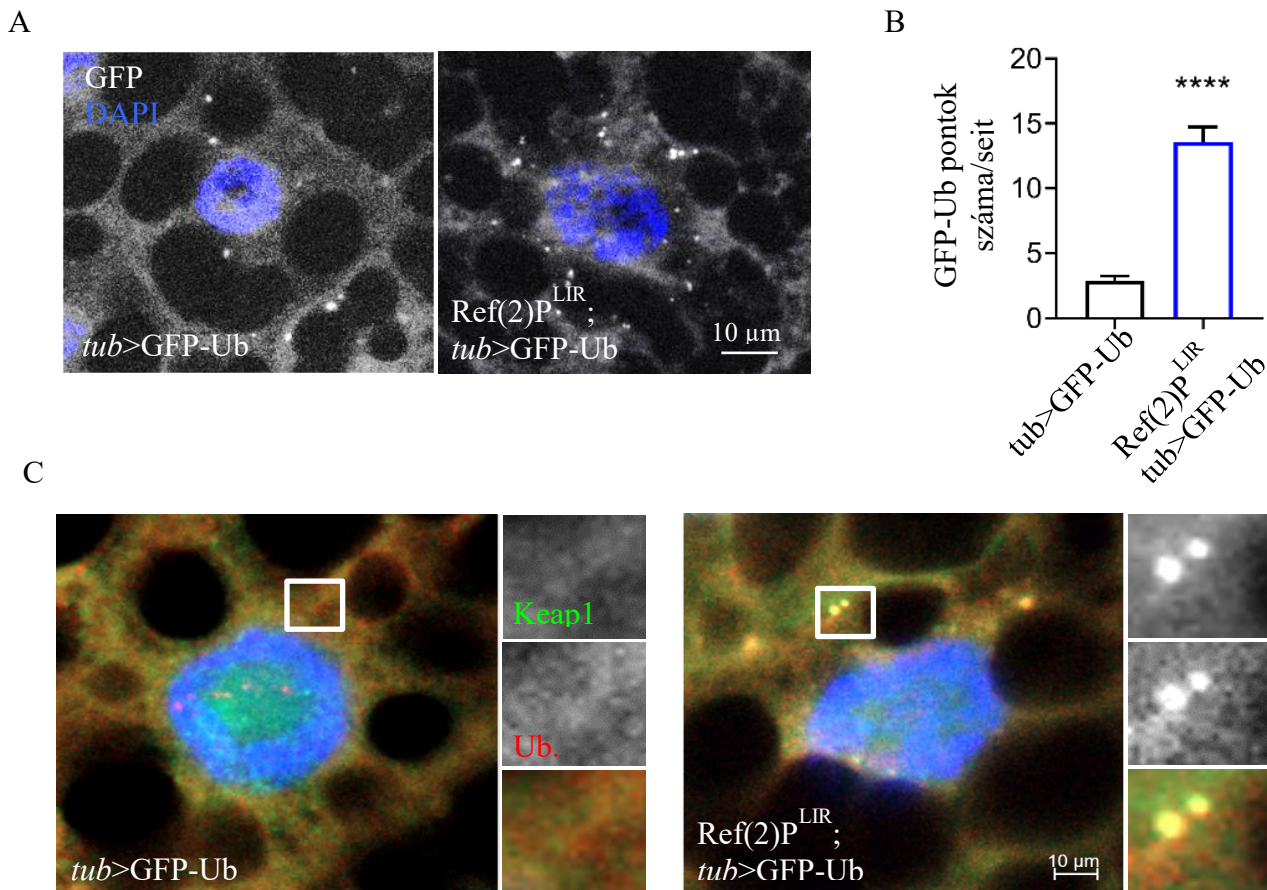


D



20. ábra. Az ubiquitin túlzott expressziója gátolja a Ref(2)P aggregátum növekedését a LIR mutánsokban.

A. A vándorló lárvák zsírszövetének immunfestése anti-Ref(2)P (zöld) és anti-ubiquitin ellenanyaggal (piros). $N = 6$ /genotípus **B.** Az A panelen a Ref(2)P aggregátumok mérete megnövekedett az ubiquitin túltermelés nélküli szöveteken. Statisztikai tesztelés: kétoldalas Mann-Whitney U teszt. **** $p < 0,0001$. **C.** A Ref(2)P aggregátumok száma megnövekedett mindkét LIR mutációt tartalmazó szöveten. Statisztikai tesztelés: kétirányú párosítatlan Student-féle t-teszt. **** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$. **D.** A Ref(2)P-ubiquitin kolokalizáció mértéke a LIR mutációt is tartalmazó ubiquitint túltermelő törzsen volt megfigyelhető. Statisztikai tesztelés: kétirányú párosítatlan Student t-teszt és kétirányú Mann-Whitney U-teszt (*tub-GFP-Ub* vs. *Ref(2)^{LIR}, tub-GFP-Ub*).



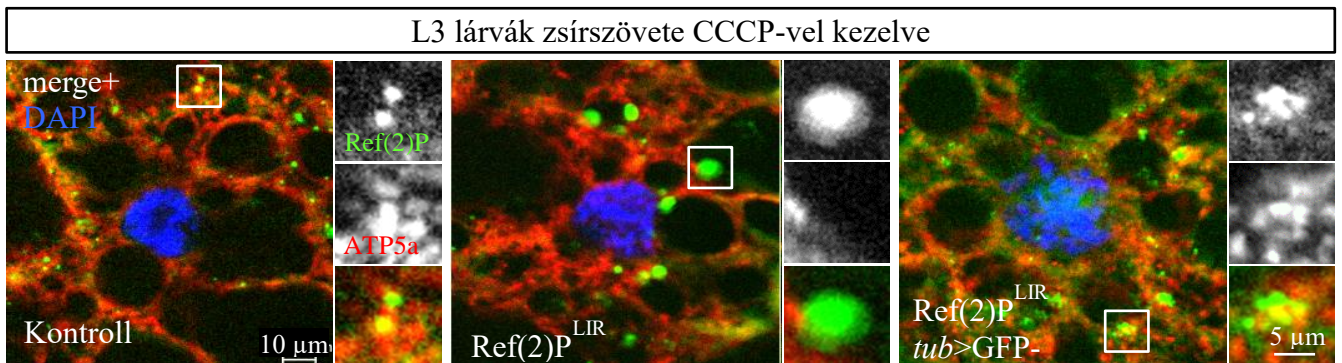
21. ábra. A Ref(2)P aggregáció képződésének zavara nem vezet a Keap1 szint változásához. **A.** Az L3 lárvális zsírszöveteket DAPI-val festettük és megfigyeltük a GFP-ubiquitin szintjét a LIR mutáció jelenlétében. **B.** Sejtenkénti GFP-ubiquitin pontok számának meghatározása. N=8, *tub-Gal4/UAS-GFP-Ub* és *Ref(2)P^{LIR}; tub-Gal4/UAS-GFP-Ub*. Bars = standard hiba. Statisztikai tesztelés: kétirányú Mann-Whitney U teszt. ****p<0,0001. **C.** Az L3 lárvális zsírtestet Keap1-el (zöld) és ubiquitinnel (piros) festettük. Megfigyeltük a Keap1-ubiquitin kolokalizációját. Scale bar=10 μm.

4.10. A Ref(2)P LIR mutációja csökkenti a Ref(2)P mitokondriális lokalizációját, amit az ubiquitin túltermelés helyreállít

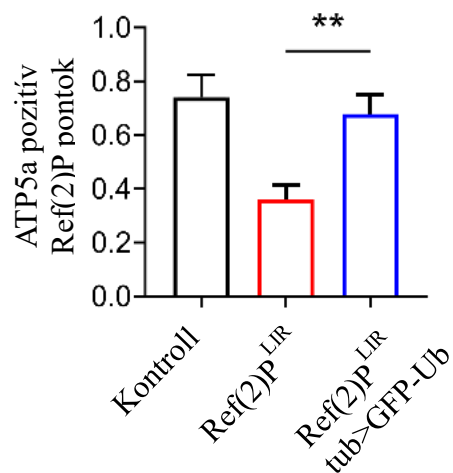
Az öregedés során a Ref(2)P a le nem bomlott mitokondriumokon található és túlzott expressziója felgyorsítja a mitofágiát. A sok Ref(2)P pont jelenléte a *tubulin>GFP-ubiquitin*; *Ref(2)P^{LIR}* mutáns szövetben felvetette a lehetőségét, hogy a nem aggregált Ref(2)P most már az ubiquitinált rakomány felismerését végzi. Ahhoz, hogy ezt teszteljük CCCP-vel egy oxidatív foszforiláció inhibitorral etettük a lárvákat, ami mitofágiát indukál. Ez a külső mitokondriális membránfehérjék ubiquitinációjához vezet és ezáltal a mitokondrium szelektív autofágia által degradálódik. A Ref(2)P fokozott mitokondriális lokalizációját találtuk a *Ref(2)P^{LIR}; tub>GFP-*

Ub szövetben, míg a *Ref(2)^{P^{LIR}}* mutáns sejtekben a Ref(2)P mitokondriális lokalizációja szignifikánsan alacsonyabb volt (22A. és 22B. ábra).

A



B



22. ábra. A CCCP-indukált mitofágia vizsgálata. **A** A fenti genotípusokban L3 lárvális zsírszövetben vizsgáltuk a CCCP-indukált mitofágiát Ref(2)P (zöld) és ATP5a (piros, mitokondriális marker) immunfestéssel. A kolokalizációk megfigyelhetőek a kis panelekben. N = 6/genotípus **B** Az A panelen található képek kvantifikációja, ahol látható, hogy a *Ref(2)^{P^{LIR}}* mutáns és a *Ref(2)^{P^{LIR}}*; *tub>GFP-Ub* ATP5a és Ref(2)P kolokalizáció közötti különbség szignifikáns.

5. Eredmények megvitatása

5.1. A *Drosophila Ref(2)^{PLIR}* mutációja ubiquitinált fehérje-aggregátumok képződését eredményezi, azonban ez alig befolyásolja az állatok élethosszát

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk a szelektív, ubiquitináció-függő fehérje autofágia hibáit és a nagyléptékű aggregátum képződés következményeit egy komplett állatban, létrehoztunk két mutációt a *Drosophila Ref(2)P*-ben található LIR motívumban. A LIR mutáció hatására a Ref(2)P nem képes kapcsolatot létrehozni az Atg8a-val és így nem jut be a képződő autofagoszómába a degradálandó anyaggal. Azonban az UBA domén jelenléte miatt a kötődik a degradálandó fehérjén lévő ubiquitinhez. Az így létrejött Ref(2)P-t és a vele kolokalizáló ubiquitinálódott fehérje aggregátumok felhalmozódását megfigyeltük a teljes állatok lizátumában, a lárvális zsírtestben és az adultak agyában is. Ebben a mutánsban nem figyeltünk meg proteotoxicitást, amire magyarázat lehet, hogy a legtöbb poliubiquitinált degradálandó anyag folyadék-folyadék fázisszeparáción megy át (Sun et al. 2018; Yamasaki et al. 2020).

Több Atg gén mutációja hasonló Ref(2)P fehérje aggregátumok felhalmozódását eredményezi (Varga et al. 2016), azonban az általunk létrehozott *Ref(2)^{PLIR}; Atg16^{d129}* kettősmutánsban nem figyeltünk meg erősebb Ref(2)P felhalmozódást. Ez arra enged következtetni, hogy a LIR mutációja teljesen megszünteti a szelektív autofágiát.

Az Atg mutánsokban ezen kívül élethossz rövidülést is megfigyeltek (Juhász et al. 2007; Varga et al. 2016), hasonlóan a többi Ref(2)P mutánshoz (De Castro et al. 2013). Az általunk létrehozott és izogemizált *Ref(2)^{PLIR}* állatokban az élethossz minimálisan csökkent a vad típushoz képest, normál körülmények között valamint éheztetés során. Ez a szelektív autofágia megnövekedett szerepének tudható be az öregedés alatt. A lipidcseppek folyamatos átalakulása aggregátumokat és ubiquitinált fehérjéket tartalmazó zárványokba is okozhatja az élethossz rövidülését. Éppen ezért, úgy gondoljuk, hogy a szelektív autofágia degradatív jelenléte kritikus szerepet játszik az élethossz növekedésében, vagy az élet későbbi szakaszában.

5.2. *Ref(2)^{PLIR}* állatok alapszintű autofágiája működőképes marad

Ahhoz, hogy az alapszintű autofágiát megvizsgáljuk Lysotracker Red festést alkalmaztunk. A Lysotracker Red a membránáteresztő képessége miatt a savas vezikulákban halmozódik fel.

Ezt a festéket széles körben használják *Drosophila* lárva zsírtestjében, mivel a jól táplált lárvákban alig, vagy egyáltalán nem fest, mivel a lizoszómák kisméretűek, valamint azok pH-ja nem savas. Ezzel szemben éheztetés hatására, vagy a fejlődési autofágia során LysoTracker-pozitív lizoszómák és autolizoszómák jelennek meg (Nagy et al. 2015). Az éheztetett *Ref(2)^{LIR}* mutáns lárvákban a LysoTracker Red pozitív struktúrák számában nem volt szignifikáns különbség a vad típushoz képest.

A további vizsgálatokhoz az endogén promóterrel rendelkező 3xmCherry-Atg8a-t használtuk vad háttéren. Ez a konstrukció a teljes Atg8a-gént és promóter régióját tartalmazza. Ezáltal a riporter konstrukció autentikusan reprodukálja a gén kifejeződési mintázatát. Az Atg8a a fontos szerepének megfelelően, minden szövetben és sejttípusban mutat kifejeződést (Hegedűs et al. 2016). A megfigyelt éheztetési reakció azonos volt a kontroll és a LIR mutáns lárvák zsírszövetében és a teljes állatok lizátumában. Emellett a lipidált Atg8a szintjében sem találtunk különbséget. Ezekből az eredményekből azt a következtetésre jutunk, hogy a LIR mutáció jelenléte nem befolyásolta az alapszintű autofágia működését az általunk létrehozott mutáns vonalban.

5.3. A *Ref(2)^{LIR}* állatoknak nincs látványos fiziológiai rendellenességük, azonban jobban ellenállnak a paraquat által kiváltott oxidatív stressznek

A *Ref(2)^{LIR}* mutáns állatok agyában felhalmozódott ubiquitinálódott fehérje aggregátumok jelenléte miatt szeretnénk volna megvizsgálni a neuromuszkuláris képességeiket. Ehhez mászási tesztek végeztünk fiatal és idős ecetmuslicákon. A mászás tesztek általánosan használják a neurodegeneratív rendellenességek vizsgálatához (Feany and Bender 2000). Az általunk elvégzett kísérletek során nem találtunk szignifikáns különbséget sem a fiatal 3 napos, sem az idős 30 napos állatok mászási teljesítményében. Ezek szerint az agyukban jelenlévő és a korukkal egyre növekedő poliubiquitin aggregátum jelenléte nem okoz az Atg mutánsokhoz hasonló és jelentős fiziológiai hibákat. Ezen eredményeinket egy másik csoport egér májban történt vizsgálatokkal megerősítette (Kageyama et al. 2021). A szintetikus LIR peptid túlzott expressziója során a SQSTM1-hoz kapcsolódik és más LC3 kötő partnerekhez is és ezáltal a felhalmozódott SQSTM1 aggregátumok perzisztens Nr2 aktivitáshoz vezetnek, miközben az alapszintű autofágia változatlan marad és a májműködési zavar sem észlelhető.

Ahhoz, hogy az általunk létrehozott állatokban a Keap1-Nrf2 útvonal által is szabályozott oxidatív stressz választ megfigyeljük paraquatot használtunk. A paraquatot a *Drosophila*-ban általában az oxidatív stresszel szemben szerzett rezisztencia mérésére használják (PQ rezisztencia teszt), mivel mitokondriális diszfunkciót, így szabadgyök felhalmozódást okoz (Hosamani and Muralidhara 2013). Megfigyeltük, hogy a $Ref(2)^{P^{LIR}}$ mutáns állatoknak szignifikánsan megnövekedett az oxidatív stressz toleranciája a kontroll állatokhoz képest. A többi ismert Ref(2)P mutánsokra ($Ref(2)^{P^{OD2}}$ és $Ref(2)^{P^{od3}}$) (Nezis et al. 2008) fokozott oxidatív stressz érzékenység volt jellemző. Ezért úgy gondoljuk, hogy a PB1 vagy az UBA domén hiányában nem alakulnak ki az ubiquitinált fehérje aggregátumok. Ezáltal az ubiquitinált fehérjék oldható formában lesznek jelen és valószínűleg sokkal toxikusabbak, mint az aggregátumok. Emellett a megemelkedett Ref(2)P szintnek is szerepe lehet a rezisztencia növekedésében, mivel az oxidatív stressz válaszban is szereplő Keap1-Nrf2 útvonal aktivitásáért is felel.

5.4. A $Ref(2)^{P^{LIR}}$ állatok paraquat rezisztenciáját a Keap1-gyel való kötődése és az Nrf2 útvonal aktiválás befolyásolja

Megfigyeltük, hogy a poliubiquitinált aggregátumok nem csak Ref(2)P-t hanem Keap1-et is tartalmaznak, amely a Nrf2-függő oxidatív stressz válasz negatív regulátora. A Keap1 autofág lebontását állatokban a Ref(2)P segíti, az Atg8a-Ref(2)P-Keap1 komplexszel az autofágiával degradálódó aggregátumokkal együtt. Ezáltal a Ref(2)P szabályozza a szabad Keap1 szintet és ezzel a Nrf2 aktivitást is, az emlősökhöz hasonlóan, annak ellenére, hogy az emlősökben megtalálható KIR régióval nem rendelkezik. A Ref(2)P-Keap1 együtt fejeződik ki a $Ref(2)^{P^{LIR}}$ mutánsban, azonban lebontódni nem tud, ezért a LIR mutáns állatokban a Keap1 szintje is megnő. A Keap1 felhalmozódása miatt a Nrf2 proteozómális lebontása gátlódik és ennek fontos következménye a LIR mutánsban a tartósan megnövekedett Nrf2 aktivitás. Végző soron ez vezet a megnövekedett paraquat toleranciához (**23. ábra**). Ezek az eredményeink megmagyarázzák a Ref(2)P PB1 és UBA domén mutánsaiban tapasztalt megnövekedett paraquat érzékenységet, amely legalább részben a degradálódó anyag, beleértve a Keap1 kifejeződési hibáinak is köszönhető. Más csoportok azt is megfigyelték, hogy a heterozigóta Keap1 mutáns állatok élethossza és paraquat toleranciája is megnövekedett (Sykiotis and Bohmann 2008).

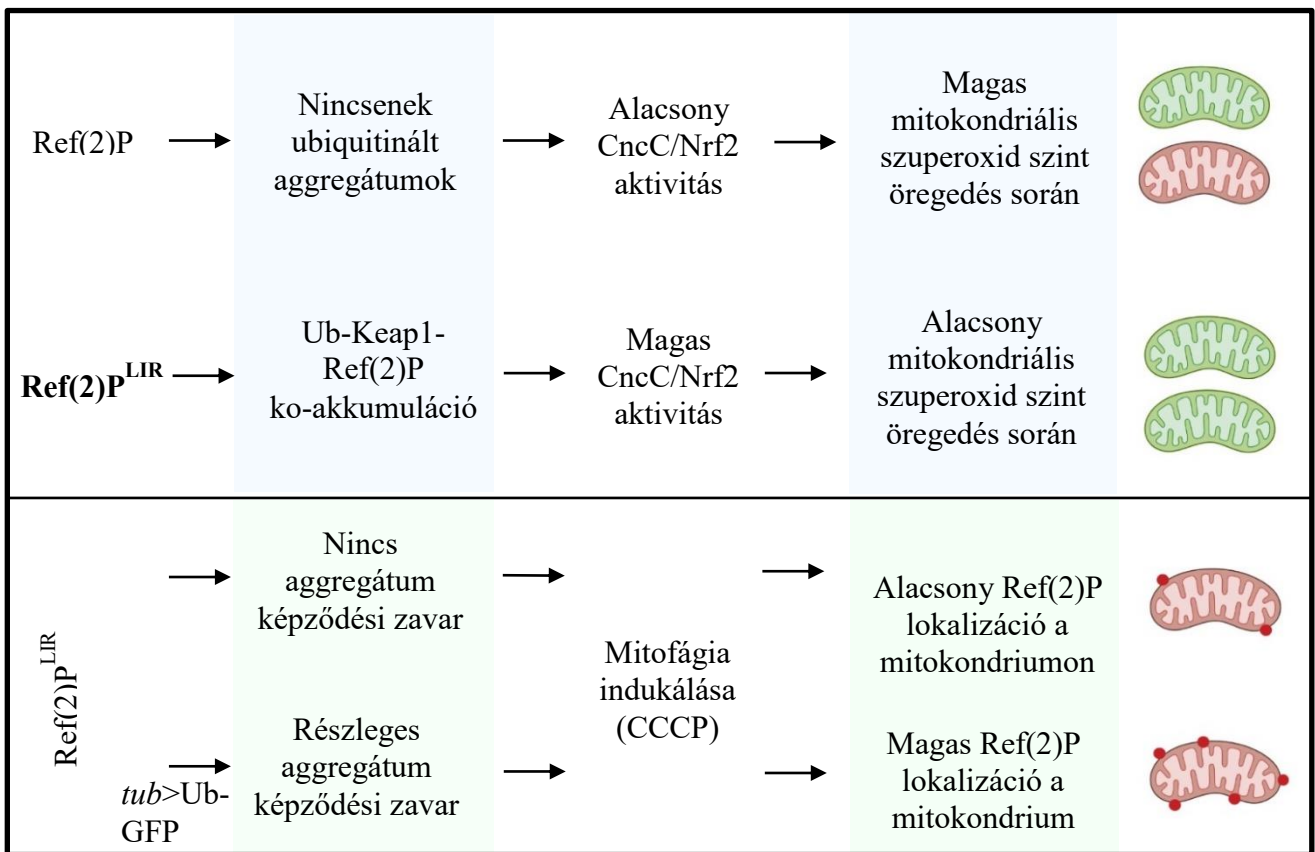
Megfigyeltük, hogy a $Ref(2)^{P^{LIR}}$ mutáns állatainkban, az Nrf2 tartós aktiválása fiziológiai előnyökkel járhat a vad típusú állatokhoz képest. Azáltal, hogy az ubiquitinált aggregátumok

létrejönnek, csökken a proteotoxicitásuk. Az Nrf2 vezérelt fokozott oxidatív stressz rezisztencia valószínűleg csökkenti az oxidált roncsolt fehérjék szintjét, ami ezáltal csökkentheti az oldott, feltehetőleg toxikusabb fehérjék jelenlétét is.

5.5. Az aggregátumképződés zavara a felhalmozott Ref(2)P-t a mitokondriumokra irányítja

Az antioxidáns gének tartós expressziója a *Ref(2)^{PLIR}* mutáns állatokban csökkenti az olyan organellumok oxidatív károsodását, mint amilyenek a mitokondriumok is. Ezzel együtt LIR mutánsunkban a konstitutívan aktív Nrf2 hatására a mitokondriális szuperoxid termékek száma csökken. Ahhoz, hogy megvizsgáljuk az ubiquitin túltermelésének hatását egy *Ref(2)^{PLIR}; tub>GFP-Ubiquitin* törzset használtunk. Az ubiquitin túltermelése képes megzavarni az *in vivo* aggregátum képződést *Ref(2)^{PLIR}* mutánsban, bár az ubiquitin pozitív Keap1 aggregátumok továbbra is kialakulnak. Ebben a kettős mutánsban a felhalmozódott Ref(2)P és a túltermeltetett ubiquitin miatt úgy tűnik, hogy a Ref(2)P és ubiquitin közötti kölcsönhatás károsodott. Ennek hatására az ubiquitinhez nem kötött Ref(2)P, amely még tud oligomerizálódni a citoszolban felhalmozódik. Úgy tűnik, hogy ez a nem felhalmozódott Ref(2)P képes a citoszolban lévő felesleges ubiquitint kis aggregátumokká alakítani. Emellett képes az UBA-doménon keresztül a Keap1-et megkötni és a mitokondriumra lokalizálni, ezért a mitofágia folyamata sértetlen marad (**23. ábra**) (Bhattacharjee et al. 2022). A tubulin-GFP-ubiquitint túltermelő *Ref(2)^{PLIR}* mutáns háttérű ecetmuslicák szöveteinek FRAP vizsgálata során a GFP-ubiquitin aggregátumok számának változása nem volt szignifikáns, ellentétben a Ref(2)P és a tetra-ubiquitin lánc által létrejött aggregátumokhoz képest, amelynél a fluoreszcencia gyorsan helyreállt (Zaffagnini et al. 2018). Az azt jelzi, hogy az aggregátumok elveszítik a dinamikus természetüket a celluláris ubiquitinált aggregátumokkal való kapcsolódás után és hogy a Keap1 megkötése esetleg nem reverzibilis a felesleges Ref(2)P jelenlétében.

Összefoglalásul elmondhatjuk, hogy az ubiquitinált fehérjék autofág lebontásának hiánya jelentős aggregátum felhalmozódáshoz vezet, ami fiziológiailag jól tolerálható a megnövekedett antioxidáns válaszok kompenzációs hatása miatt. Azonban az Nrf2 funkciói nélkül a szelektív ubiquitinált fehérje autofágia mutánsok, amelyekben az aggregátumok kötődése gátolt (a Ref(2)P mutánsok melyeknek a PB1 vagy UBA doménje hiányzik) károsodott mozgási aktivitást mutatnak. Ez mutatja igazán a Ref(2)P-függő szelektív autofágia jelentőségét és az ehhez kapcsolódó szignalizációs útvonalak szerepét.



23. ábra. A LIR motívum hiányának következményei. Az Nrf2 útvonal aktiválása a Keap1 gátlásán keresztül, valamint a potenciálisan citotoxikus anyagok megkötése a Ref(2)P aggregátumokban a celluláris antioxidáns válaszok fokozott szabályozásához és a mitokondriális szuperoxid szint csökkenéséhez vezetnek az öregedés során. A GFP-ubiquitin expressziója megzavarja a Ref(2)P aggregátum képződését és mitofágia indukálása során a felhalmozódott Ref(2)P-t a mitokondriumok felé irányítja.

6. Összefoglalás

Az autofágia a sejtek evolúciósan konzervált intracelluláris degradációs folyamata. A fő útvonala során a citoplazmatikus anyag lebontása a lizoszómális rendszeren keresztül történik. Az autofágiának három fő típusa van, a makroautofágia, a mikroautofágia és a chaperon-közvetített autofágia. A szelektív autofágia során célzottan egy makromolekula vagy sejtservecske lebontása történik. Ehhez szükséges egy szelektív autofágia receptor. A szelektív autofágia receptorok képesek felismerni az poliubiquitinálódott aggregátumokat és kötődni az Atg8/LC3 fehérjéhez, hogy biztosítsák az aggregátumok jelenlétét az autofagoszómába. Mindegyik szelektív autofágia típushoz különböző szelektív autofágia receptor tartozik. A *Drosophila*-ban a legismertebb autofágia receptor, amihez az ubiquitinált fehérje aggregátumok kapcsolódnak az általunk is vizsgált p62/Ref(2)P. A Ref(2)P-ben található egy C-terminális ubiquitin-kötő domén (UBA), egy N-terminális PB1 domén, amely közvetíti az aggregátumok képződését és egy LIR (LC3- interakciós régió) motívum, egy strukturálatlan régióban, ami felel az LC3/Atg8a-val való kötődésért az autofág membránon. Ezen kívül az emlős p62-ben található egy KIR domén, ami a *Drosophila* Ref(2)P-ben nem található. Az autofágia rendkívül fontos szerepet játszik az eukarióta sejtekben, mivel a folyamat során a degradálandó fehérjék és organelumok lebontódnak és az építőelemek újrahasznosítódnak, ezzel is lassítva az öregedést és az éhezés okozta stresszt.

Az autofágiához szükséges gének mutációja több betegség kiváltó okaként is ismert, mint például neurodegenerációs betegségek (például Parkinson-kór, ataxia), különböző rákos megbetegedések és Crohn-betegség.

Az autofágiának fontos szerepe van az oxidatív stressz elleni védelemben is, a Keap1-Nrf2 rendszerrel együtt. Több kutatás is kimutatta, hogy a ROS képes indukálni az éheztetés hatására kialakuló autofágiát, éppen ezért úgy gondolják, hogy kulcsfontosságú szerepe van a folyamatban. A Keap1-Nrf2 útvonal az egyik legfontosabb védekező rendszer az oxidatív károsodások ellen, amit a ROS inaktiválásával végez el. A rendszerben az Nrf2 érzékeli az oxidatív stressz mértékét és ezáltal szabályozza az antioxidáns enzimeket. Az emlős p62 a KIR régiójával képes kapcsolódni a Keap1-hez, azonban a Ref(2)P esetében ez a kapcsolat az UBA doménon keresztül lehetséges az ubiquitinált Keap1-el.

PhD munkám során a *Ref(2)^{LIR}* motívumában CRISPR/Cas9 közvetítette homológ rekombinációval létrehoztunk két aminosavcserét, ahol egy triptofánt és egy izoleucint alaninra cseréltünk. Ahhoz, hogy a *Ref(2)^{LIR}* mutáns állatokat azonos genetikai háttéren hasonlítsuk

össze a kontroll állatokkal, a vizsgált vonalakat izogenizáltuk. Az így létrehozott *Ref(2)^{P^{LIR}}* mutáns fehérje már nem képes kötni az Atg8-at, ami az elvárásainknak megfelelően a homozigóta mutáns állatokban nagymértékű ubiquitinált fehérje aggregátumok felhalmozódásához vezetett. Ezt ko-immunoprecipitációval és Western-blot kísérletekkel is megerősítettük. A *Ref(2)^{P^{LIR}}* mutáns törzsben a fehérje aggregátumokat több különböző szövetben is megfigyeltük, mint például a lárvális zsírtestben és az adult agyban. Mindkét szövetben mind a Ref(2)P, mind az ubiquitin szintje szignifikánsan megnőtt és kolokalizációt mutattak. Az agyban az aggregátumok száma és a kolokalizáció mértéke az életkorral növekedett. Ezeket az aggregátumokat tovább vizsgáltuk elektronmikroszkóppal is és az adult agy optikus lebenyében citoszolikus, membrán nélküli 0,5 – 4 µm átmérőjű aggregátumokat találtunk. Mivel a legtöbb Atg mutánsnál hasonló aggregátumok találhatóak, ezért létrehoztunk egy *Ref(2)^{P^{LIR}}*; *Atg16^{d129}* kettős mutánst is. Ebben a törzsben megfigyeltük, hogy a dupla mutációt hordozó törzsben a Ref(2)P szintje nem növekedett tovább, vagyis a LIR motívum hiánya teljesen eliminálja a szelektív autofágiát.

A szelektív autofágia után megvizsgáltuk LysoTracker festéssel az alapszintű autofágiát is a *Ref(2)^{P^{LIR}}* mutáns törzsben és azt tapasztaltuk, hogy a zsírtestjeiben nem volt szignifikánsan több savas pH-jú autolizoszóma a kontrollhoz képest. Emellett a teljes állatok lizátumában az autofágiához szükséges lipidált Atg8a szintjében sem figyeltünk meg különbséget. Az éhezési reakció megfigyeléséhez egy endogén promotérral rendelkező 3xmCherry-Atg8a riportert használtunk a kontroll és a mutáns lárvák zsírzsövetében. Azonban a megfigyelt éhezési reakció azonos volt a két genotípusban. Emellett a táplált és az éheztetett L3 stádiumú lárvák zsírzsövegeinek Ref(2)P immunfestése során felhalmozódást figyeltünk meg a *Ref(2)^{P^{LIR}}* mutánsban, azonban ez a különbség sem volt szignifikáns. Ezekből az eredményekből arra következtettünk, hogy a LIR mutációja nem befolyásolja a nem szelektív autofágia működését.

Az alapvizsgálatok után a felhalmozódó aggregátumok jelenléte miatt kíváncsiak voltunk, hogy ez milyen hatással van az élethosszra és a mászási képességre. Ennek oka, hogy a neurodegenerációs betegségeknél is hasonló fehérje aggregátumok jelennek meg az agyban, azonban ezeknek a patológiában betöltött szerepe még nem tisztázott. Hozzájárulhatnak a betegség kialakulásához, azonban védhetik is az idegsejteket a káros fehérjék raktározásával. A megfigyeléseink alapján minden sejtben megjelenő Ref(2)P-t és a poliubiquitinált fehérjéket tartalmazó aggregátumok felhalmozódása nem okoz jelentős életképességi és fertilitási problémákat a *Ref(2)^{P^{LIR}}* mutáns törzsben. A vizsgált élethossz és mászási tesztek során nem tapasztaltunk szignifikáns különbségeket a vad típushoz képest. Ez ellentmond a várakozásainknak, mivel a legtöbb Atg mutáns és a Ref(2)P PB1 és UBA domén mutáns

élethossza lerövidült, miközben az oxidatív stressz érzékenyséjük csökkent. A *Ref(2)^{PLIR}* mutáns állatok oxidatív stresszre adott reakciójának megfigyeléséhez az ecetmuslicákat paraquattal kezeltük. A *Ref(2)^{PLIR}* mutánsok kevésbé érzékenyek az oxidatív stresszre a kontrollokhoz képest. Az általunk alkalmazott paraquat kezelés során a túlélésük messze meghaladta a vad típusú állatokét. Úgy gondoljuk, hogy ezt a felhalmozódott Ref(2)P jelátviteli szerepe okozhatja, mivel feltehetően az oxidatív stressz válaszban is szereplő Nrf2 rendszer aktivitása magasabb a *Ref(2)^{PLIR}* mutánsban.

A paraquat rezisztencia növekedése miatt az Nrf2-Keap1 útvonalra koncentráltunk. Ehhez egy pánneurális nSyb driverrel-el meghajtott GFP-Keap1-et használtunk, hogy kiderítsük a Ref(2)P kölcsönhatásba lép-e az ubiquitinált Keap1-el. Az *Ref(2)^{PLIR}* mutáns adult állatok agyában megfigyelhettük, hogy szignifikánsan több a GFP-Keap1, melyek részben kolokalizálnak a Ref(2)P-vel. Ez a felhalmozódás a teljes állatok lizátumában is megfigyelhető. Mivel a Keap1 aktiválja az Nrf2-t, ezért megvizsgáltuk az aktivitását a *Ref(2)^{PLIR}* mutáns állatokban. Az RT-Q-PCR mérések során megfigyeltük, hogy a *Ref(2)^{PLIR}* mutáns állatokban az Nrf2 transzkripció aktivitása megnövekedett, amire az ARE régiót tartalmazó targetjeinek expressziójából következtettünk. Ezek például a már említett Keap1, a glutation-S-transzferáz (Gst1) és a kataláz (Cat). Az L3-as lárvák középbélsejtjeinek vizsgálata során megfigyeltük, hogy a túltermelődött Nrf2 a sejtmagba lokalizálódik. Az *Ref(2)^{PLIR}* mutáns állatokban az Nrf2 a paraquat toleranciában való szerepének vizsgálatához létrehoztunk egy Nrf2 csendesített törzset. Megfigyeltük, hogy ennek az Nrf2 csendesített *Ref(2)^{PLIR}* mutáns törzsnek a paraquat kezelés hatására 33%-al csökkent az élethossza. Ezért úgy gondoljuk, hogy a paraquat tolerancia egy nem várt funkciónyerés a *Ref(2)^{PLIR}* mutáns állatokban.

A torrepülőizmaiban az öregedéssel a szuperoxid termelődés megnő. Ez azonban a Ref(2)P túltermelésével visszafordítható. Mivel az indirekt repülő izmokban a mitokondriumok száma igen magas, kiboncoltuk és a mitokondriális szuperoxid szint megfigyeléséhez MitoSOX festést alkalmaztunk. A 45 napos adult állatok repülőizmaiban csökkent mitokondriális szuperoxid szintet figyeltünk meg. Emellett a MitoSOX jel csökkenését figyeltük meg a 45 napos *Ref(2)^{PLIR}* mutáns állatok agyának optikus lebenyében.

Meg akartuk vizsgálni, hogy a *Ref(2)^{PLIR}* mutációja és az aggregátumok jelenléte hogyan befolyásolja a Keap1 negatív szabályozását az Nrf2-re. Ehhez a *Ref(2)^{PLIR}* mutáns állatokban egy UAS-vezérelt N-terminális GFP-vel jelölt monoubiquitin törzset használtunk. Megfigyeltük, hogy a *Ref(2)^{PLIR}; tub>GFP-Ub* állatok lárvális zsírtestjeiben és az adultak agyában a Ref(2)P aggregátumok jelenléte csökkent. Emellett a Ref(2)P pontok mérete is csökkent mindkét általunk megfigyelt szövetben és a Ref(2)P – ubiquitin kolokalizációja is

csökkent. Ebből arra következtethetünk, hogy az aggregátumok létrejöttéhez és növekedéséhez a Ref(2)P és az ubiquitin együttes jelenléte szükséges. A mutánsban a GFP-ubiquitin pontok száma is megnövekedett a kontrollhoz képest, ami arra enged következtetni, hogy a felhalmozódott lebontatlan Ref(2)P segíti az ubiquitin klaszterek kialakulását.

A felhalmozódott, azonban nem aggregálódott Ref(2)P jelenléte a mitokondriumon felvetette az ötletet, hogy talán az ubiquitinált rakomány felismerését végzi. Ennek vizsgálatához a lárvákban a mitofágiát CCCP-vel indukáltuk és megfigyeltük a Ref(2)P megemelkedett mitokondriális lokalizációját *Ref(2)^{LIR}; tub>GFP-Ub* genotípusú ecetmuslicák szövetében.

Összefoglalásul elmondhatjuk, hogy sikeresen létrehoztunk egy *Ref(2)^{LIR}* mutáns törzset. Ezek az állatok nagy számban felhalmozzák a Ref(2)P-t és az ubiquitinált fehérjéket. Az általunk megfigyelt ubiquitin aggregátumok ubiquitinálódott Keap1-et tartalmaznak, amely az Nrf2 függő oxidatív stressz válasz negatív szabályozói. A Keap1 autofág lebontása a Ref(2)P LIR doménjén keresztül történik, így létrehozva az Atg8a-Ref(2)P-Keap1 komplexet, ami elősegíti a képződő aggregátumok degradálódását. Ezáltal az emlősökhöz hasonlóan a szabad Keap1 szint és az Nrf2 aktivitás a Ref(2)P által szabályozott. A Ref(2)P-Keap1 együttes kifejeződésének fontos következménye a LIR mutánsban a tartósan megnövekedett Nrf2 aktivitás, mivel annak proteaszómális lebomlását a mutáns Ref(2)P megakadályozza, ami végső soron megnövekedett paraquat toleranciához vezet. Megfigyeltük, hogy a folyamatos Nrf2 aktivitás a *Ref(2)^{LIR}* mutáns állatokban fiziológiai előnyökkel jár a vad típushoz képest. A kísérleti adatainkból létrehozott modell szerint az ubiquitinálódott aggregátumok felhalmozódása először megemeli a proteotoxicitást. Azonban ezután az Nrf2 által vezérelt megnövekedett detoxifikáció csökkenti az oxidált, majd ubiquitinálódott fehérjék számát, amelyek oldható formában találhatóak és valószínűleg sokkal toxikusabbak. A szelektív ubiquitinált fehérje-autofágia hibás ecetmuslicák hasonló mennyiségű poliubiquitin aggregátumot halmoznak föl, mint az *Atg* mutánsok, de nem mutatnak jelentősebb fiziológiai hibákat.

7. Summary

Autophagy is an evolutionarily conserved intracellular degradation process of cellular self-eating and the major pathway for the degradation of cytoplasmic material by the lysosomal machinery. There are three main types of autophagy, macroautophagy, microautophagy, and chaperone-mediated autophagy. Macroautophagy also requires an intermediate organelle, the phagophore. Selective autophagy specifically degrades a macromolecule or cell organelle. This requires a selective autophagy receptor. Selective autophagy receptors can recognize ubiquitinated aggregates, and bind to Atg8/LC3 proteins to ensure the capture of cargo into autophagosomes. Each type of selective autophagy has a different selective autophagy receptor. The selective autophagy receptor p62/Ref(2)P plays an important role in the autophagy process. In *Drosophila*, only one autophagy receptor for ubiquitinated protein aggregates is known: p62/Ref(2)P. Ref(2)P possesses a C-terminal ubiquitin-binding domain (UBA), an N-terminal PB1 domain to mediate aggregate formation, and a LIR (LC3-interacting region) motif in an unstructured region, which is responsible for LC3/Atg8a binding on autophagic membranes. In addition, a KIR domain is found in mammalian p62 that is not found in *Drosophila* Ref(2)P.

Autophagy plays an extremely important role in eukaryotic cells because in the process, the proteins and organelles to be degraded are broken down and the building blocks are recycled, thus slowing down the aging and stress caused by starvation. Mutations in genes required for autophagy are known to cause several diseases, such as neurodegenerative diseases (e.g., Parkinson's disease), various cancers, ataxia, and Crohn's disease.

Autophagy also plays an important role in protection against oxidative stress, along with the Keap1-Nrf2 system. Several studies have shown that ROS can induce starvation-induced autophagy. The Keap1-Nrf2 pathway is one of the most important defense systems against oxidative damage by inactivating ROS. The Nrf2 senses the degree of oxidative stress and thereby regulates antioxidant enzymes. Mammalian p62 binds to Keap1 relative to the KIR region, however, in the case of Ref (2) P, this association is possible with ubiquitinated Keap1 via the UBA domain.

In my PhD work, we replaced two amino acids by CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination in the LIR motif of Ref(2)P, where we exchanged one tryptophan and one isoleucine to alanines. To confirm our results, we did isogenization experiments to compare *Ref(2)P^{LIR}* mutant autophagic dysfunctional and control animals with the same genetic background. The *Ref(2)P^{LIR}* mutant is no longer able to bind Atg8, leading to the accumulation

of large ubiquitinated protein aggregates in homozygous mutant animals as expected. This was also confirmed by co-immunoprecipitation and Western blot experiments. In the *Ref(2)^{P^{LIR}}* mutant strain, protein aggregates were observed in several different tissues, such as the larval fat body and the adult brain. In both tissues, Ref(2)P and ubiquitin levels are significantly elevated and colocalize. The number of aggregates in the brain and the extent of colocalization increases with age. These aggregates were further examined by electron microscopy. In the optical lobe of the adult brain, cytosolic aggregates without membrane, 0.5–4 μm in diameter were found. Most Atg mutants have similar aggregates, so we also generated a *Ref(2)^{P^{LIR}}*; *Atg16^{d129}* double mutant. In this strain, we observed that the level of Ref(2)P in the double-mutant strain was not further increased, so the absence of the LIR motif completely eliminated selective autophagy.

After selective autophagy, we examined basal autophagy in the *Ref(2)^{P^{LIR}}* mutant strain by LysoTracker staining and it was found that its fat body did not have significantly less acidic autolysosomes than the control. In addition, no difference was observed in the level of lipidated Atg8a in the lysate of whole animals. A 3xmCherry-Atg8a reporter with an endogenous promoter in the fat tissue of control and mutant larvae was used to monitor the starvation response. However, the observed starvation response was similar in the two genotypes. In addition, accumulation was observed in the *Ref(2)^{P^{LIR}}* mutant during Ref(2)P immunostaining of fatbody tissues of fed and starved L3 stage larvae, however, this difference was not significant. From these results, we concluded that the LIR mutation does not affect the function of non-selective autophagy.

Due to the presence of accumulating aggregates after baseline studies, we were interested in the effect of this on lifespan and climbing ability. Similar protein aggregates appear in the brain in neurodegenerative diseases, but their role is not yet clear. They can contribute to the development of the disease, but they can also protect nerve cells by storing harmful proteins. Based on our observations, the accumulation of aggregates containing Ref(2)P and polyubiquitinated proteins present in all cells does not cause significant viability and fertility problems. No significant differences were found in the lifespan and climbing tests compared to the wild type. This is surprising since most Atg mutants and Ref(2)P PB1 and UBA domain mutant's lifespan are shortened. To observe the response of Ref(2)^{P^{LIR}} mutant animals to oxidative stress, flies were treated with paraquat. However, *Ref(2)^{P^{LIR}}* mutants are much more tolerant of oxidative stress compared to controls. In the paraquat treatment we used, their survival far exceeded that of wild-type animals. We think that this may be due to the signaling role of accumulated Ref(2)P, as the activity of the Nrf2 system, which is also involved in the

oxidative stress response, is presumably higher in the *Ref(2)^{P^{LIR}}* mutant. The role of Ref(2)P in regulating Nrf2 is already known from previous research, however, the Ref(2)P protein binds Keap1 involved in this relationship is missing from the *Drosophila* protein.

Due to the increase in paraquat resistance, we focused on the Nrf2-Keap1 pathway. In mammals, this pathway prevails in the KIR domain of Ref(2)P, which binds to Keap1, however, *Drosophila* Ref(2)P has no KIR domain. For this, we used GFP-Keap1 driven by a pan-neural nSyb driver to determine whether Ref(2)P co-sequestered with ubiquitinated Keap1. In the brains of *Ref(2)^{P^{LIR}}* mutant adult flies, we observed that there were significantly more GFP-Keap1 that partially colocalize with Ref(2)P. This accumulation can also be observed in the lysate of whole animals. Since Keap1 activates Nrf2, we examined its activity in *Ref(2)^{P^{LIR}}* mutant animals. In Q-PCR measurements, we observed that Nrf2 transcriptional activity was increased in *Ref(2)^{P^{LIR}}* mutant animals along with proteins containing the ARE region downstream. For examples these are a Keap1, glutathione S-transferase (Gst1) and catalase (Cat). In the study of the middle intestinal cells of L3 larvae, the increased Nrf2 localizes to the nucleus. During silencing of Nrf2 in the *Ref(2)^{P^{LIR}}* mutant animals we observed the role in paraquat tolerance. We observed that in the Nrf2 silenced *Ref(2)^{P^{LIR}}* mutant strain, the paraquat treatment reduced its lifespan by 33%. Therefore, paraquat tolerance is an unexpected function gain in selective ubiquitin autophagy in mutant flies.

As a result of this elevated Nrf2 level, the production of mitochondrial superoxide that accumulates during aging is altered. However, this can be reversed by overproduction of Ref(2)P. MitoSOX staining was used to monitor mitochondrial superoxide levels, and a decrease in MitoSOX signal was observed in the optical lobe of the brain of 45-day-old *Ref(2)^{P^{LIR}}* mutant animals. The number of mitochondria in the indirect flying muscles is very high, so we also used this tissue.

We investigated how the LIR mutation in Ref(2)P and the presence of aggregates affect the negative regulation of Keap1 to Nrf2. For this, we used an UAS-driven N-terminal GFP-labeled monoubiquitin strain in *Ref(2)^{P^{LIR}}* mutant animals. We observed a decrease in the presence of Ref(2)P aggregates in the larval fat bodies and in the brains of *Ref(2)^{P^{LIR}}*; tub>GFP-Ub. In addition, we observed the size of Ref(2)P puncta decreased in both tissues, and the colocalization of Ref(2)P - ubiquitin also decreased. From this it can be concluded that the co-sequencing of Ref(2)P and ubiquitin are required for the formation and growth of aggregates.

The number of GFP-ubiquitin puncta in the mutant was also increased compared to the control, suggesting that the accumulated undegraded Ref(2)P promotes the formation of ubiquitin clusters.

However, the presence of accumulated non-aggregated Ref(2)P on the mitochondria raised the idea of increased mitophagy. For this, mitophagy was induced in the larvae by CCCP and increased mitochondrial localization of Ref (2) P was observed in Ref (2) P^{LIR}; tub> in GFP-Ub tissue.

To summarize, we generated a *Ref(2)P^{LIR}* mutant stock. These flies accumulated copious amounts of Ref(2)P and poly-ubiquitin. We find that these polyUb aggregates contain ubiquitinated Keap1, a negative regulator of the Nrf2-dependent oxidative stress response. Keap1 autophagic degradation in flies is facilitated by Ref(2)P through its LIR-mediated interaction with the Atg8a-Keap1 complex, which promotes engulfment of the resulting aggregates. Thus, free Keap1 levels and by extension, Nrf2 activity is regulated by Ref(2)P similar to mammals. An important consequence of the Ref(2)P-Keap1 co-sequestration in the LIR mutant is persistently elevated Nrf2 activity as its proteasomal degradation is prevented, ultimately leading to increased PQ tolerance. We find that persistent Nrf2 activation in our *Ref(2)P^{LIR}* mutants can have physiological benefits even compared to wild-type animals. In our model that is gleaned from the experimental results, sequestration of ubiquitinated cargoes firstly increases their proteotoxicity. However, subsequent Nrf2-mediated increased detoxification likely reduces the burden of ubiquitinated proteins, which may also reduce the levels of soluble, presumably more toxic species. Our selective ubiquitinated protein autophagy defective flies develop just as many poly-Ub aggregates as *Atg* mutants do, but they do not show any major physiological defects.

8. Irodalomjegyzék

- Alf Håkon Lystad, Yoshinobu Ichimura, Kenji Takagi, Yinjie Yang, Serhiy Pankiv, Yumi Kanegae, Shun Kageyama, et al. 2014. “Structural Determinants in GABARAP Required for the Selective Binding and Recruitment of ALFY to LC3B-Positive Structures.” *EMBO Reports* 15 (5): 557–65. <https://doi.org/10.1002/embr.201338003>.
- Andrade-Tomaz, Marina, Izadora de Souza, Clarissa Ribeiro Reily Rocha, and Luciana Rodrigues Gomes. 2020. “The Role of Chaperone-Mediated Autophagy in Cell Cycle Control and Its Implications in Cancer.” *Cells* 9 (9). <https://doi.org/10.3390/CELLS9092140>.
- Aparicio, Ricardo, Anil Rana, and David W. Walker. 2019. “Upregulation of the Autophagy Adaptor P62/SQSTM1 Prolongs Health and Lifespan in Middle-Aged Drosophila.” *Cell Reports* 28 (4): 1029–1040.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.070>.
- Bellezza, Ilaria, Ileana Giambanco, Alba Minelli, and Rosario Donato. 2018. “Nrf2-Keap1 Signaling in Oxidative and Reductive Stress.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1865 (5): 721–33. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2018.02.010>.
- Bhattacharjee, Arindam, Áron Szabó, Tamás Csizmadia, Hajnalka Laczkó-Dobos, and Gábor Juhász. 2019. “Understanding the Importance of Autophagy in Human Diseases Using Drosophila.” *Journal of Genetics and Genomics* 46 (4): 157–69. <https://doi.org/10.1016/J.JGG.2019.03.007>.
- Bhattacharjee, Arindam, Adél Ürmösi, András Jipa, Levente Kovács, Péter Deák, Áron Szabó, and Gábor Juhász. 2022. “Loss of Ubiquitinated Protein Autophagy Is Compensated by Persistent Cnc/NFE2L2/Nrf2 Antioxidant Responses.” *Autophagy* 00 (00): 1–12. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2037852>.
- Birgisdottir, Ása Birna, Trond Lamark, and Terje Johansen. 2013. “The LIR Motif - Crucial for Selective Autophagy.” *Journal of Cell Science* 126 (15): 3237–47. <https://doi.org/10.1242/jcs.126128>.
- Bjørkøy, Geir, Trond Lamark, Andreas Brech, Heidi Outzen, Maria Perander, Aud Overvatn, Harald Stenmark, and Terje Johansen. 2005. “P62/SQSTM1 Forms Protein Aggregates Degraded by Autophagy and Has a Protective Effect on Huntingtin-Induced Cell Death.” *The Journal of Cell Biology* 171 (4): 603–14. <https://doi.org/10.1083/jcb.200507002>.
- Castro, I P De, A C Costa, I Celardo, R Tufi, D Dinsdale, Sh Y Loh, and L M Martins. 2013.

- “Drosophila Ref(2)P Is Required for the Parkin-Mediated Suppression of Mitochondrial Dysfunction in Pink1 Mutants.” *Cell Death and Disease* 4.
<https://doi.org/10.1038/cddis.2013.394>.
- Chen, Ruey Hwa, Yu Hsuan Chen, and Tzu Yu Huang. 2019. “Ubiquitin-Mediated Regulation of Autophagy.” *Journal of Biomedical Science* 26 (1).
<https://doi.org/10.1186/S12929-019-0569-Y>.
- Chen, Y., M. B. Azad, and S. B. Gibson. 2009. “Superoxide Is the Major Reactive Oxygen Species Regulating Autophagy.” *Cell Death and Differentiation* 16 (7): 1040–52.
<https://doi.org/10.1038/CDD.2009.49>.
- Ciuffa, Rodolfo, Trond Lamark, Abul K. Tarafder, Audrey Guesdon, Sofia Rybina, Wim J.H. Hagen, Terje Johansen, and Carsten Sachse. 2015. “The Selective Autophagy Receptor P62 Forms a Flexible Filamentous Helical Scaffold.” *Cell Reports* 11 (5): 748–58.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.062>.
- Csizmadia, Tamás, Péter Lorincz, Krisztina Hegedus, Szilvia Széplaki, Péter Low, and Gábor Juhász. 2018. “Molecular Mechanisms of Developmentally Programmed Crinophagy in *Drosophila*.” *The Journal of Cell Biology* 217 (1): 361.
<https://doi.org/10.1083/JCB.201702145>.
- Cuervo, Ana Maria, and J. Fred Dice. 1996. “A Receptor for the Selective Uptake and Degradation of Proteins by Lysosomes.” *Science* 273 (5274): 501–3.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.273.5274.501>.
- Das, Gautam, Bhupendra V Shrivastava, and Eric H Baehrecke. n.d. “Regulation and Function of Autophagy during Cell Survival and Cell Death.” Accessed February 18, 2022.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008813>.
- Demontis, Fabio, and Norbert Perrimon. 2010. “FOXO/4E-BP Signaling in *Drosophila* Muscles Regulates Organism-Wide Proteostasis during Aging.” *Cell* 143 (5): 813–25.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.007>.
- DUVE, C. DE, B. C. PRESSMAN, R. GIANETTO, R. WATTIAUX, and F. APPELMANS. 1955. “Tissue Fractionation Studies. 6. Intracellular Distribution Patterns of Enzymes in Rat-Liver Tissue.” *Biochemical Journal* 60 (4): 604. <https://doi.org/10.1042/BJ0600604>.
- Duve, Christian De ; Anthony V S De Reuck; Margaret P Cameron; Ciba Foundation. 1963. *Symposium on Lysosomes*. Boston Mass.: Little Brown.
- Feany, Mel B., and Welcome W. Bender. 2000. “A *Drosophila* Model of Parkinson’s Disease.” *Nature* 404 (6776): 394–98. <https://doi.org/10.1038/35006074>.
- Fujiwara, Yuuki, Akiko Furuta, Hisae Kikuchi, Shu Aizawa, Yusuke Hatanaka, Chiho Konya,

- Kenko Uchida, et al. 2013. “Discovery of a Novel Type of Autophagy Targeting RNA.” *Autophagy* 9 (3): 403. <https://doi.org/10.4161/AUTO.23002>.
- Fujiwara, Yuuki, Hisae Kikuchi, Shu Aizawa, Akiko Furuta, Yusuke Hatanaka, Chiho Konya, Kenko Uchida, Keiji Wada, and Tomohiro Kabuta. 2013. “Direct Uptake and Degradation of DNA by Lysosomes.” *Http://Dx.Doi.Org/10.4161/Auto.24880* 9 (8): 1167–71. <https://doi.org/10.4161/AUTO.24880>.
- Ganley, Ian G., Du H. Lam, Junru Wang, Xiaojun Ding, She Chen, and Xuejun Jiang. 2009. “ULK1·ATG13·FIP200 Complex Mediates MTOR Signaling and Is Essential for Autophagy.” *The Journal of Biological Chemistry* 284 (18): 12297. <https://doi.org/10.1074/JBC.M900573200>.
- Gatica, Damián, Vikramjit Lahiri, and Daniel J. Klionsky. 2018. “Cargo Recognition and Degradation by Selective Autophagy.” *Nature Cell Biology* 20 (3): 233–42. <https://doi.org/10.1038/S41556-018-0037-Z>.
- Geng, Jiefei, and Daniel J. Klionsky. 2008. “The Atg8 and Atg12 Ubiquitin-like Conjugation Systems in Macroautophagy. ‘Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects’ Review Series.” *EMBO Reports* 9 (9): 859. <https://doi.org/10.1038/EMBOR.2008.163>.
- Gohel, Raksha, Athanasios Kournoutis, Stavroula Petridi, and Ioannis P. Nezis. 2020. “Molecular Mechanisms of Selective Autophagy in Drosophila.” *International Review of Cell and Molecular Biology* 354 (January): 63–105. <https://doi.org/10.1016/BS.IRCMB.2019.08.003>.
- Gubas, Andrea, and Ivan Dikic. 2022. “A Guide to the Regulation of Selective Autophagy Receptors.” *The FEBS Journal* 289 (1): 75–89. <https://doi.org/10.1111/FEBS.15824>.
- Hansen, Malene, David C. Rubinsztein, and David W. Walker. 2018. “Autophagy as a Promoter of Longevity: Insights from Model Organisms.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19 (9): 579–93. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0033-y>.
- Hegedűs, Krisztina, Szabolcs Takats, Attila Boda, Andras Jipa, Péter Nagy, Kata Varga, Attila L. Kovacs, and Gabor Juhasz. 2016. “The Ccz1-Mon1-Rab7 Module and Rab5 Control Distinct Steps of Autophagy.” *Molecular Biology of the Cell* 27 (20): 3132–42. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-03-0205>.
- Hosamani, Ravikumar, and Muralidhara. 2013. “Acute Exposure of Drosophila Melanogaster to Paraquat Causes Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction.” *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 83 (1): 25–40. <https://doi.org/10.1002/ARCH.21094>.
- Ichimura, Yoshinobu, and Masaaki Komatsu. 2018. “Activation of P62/SQSTM1–Keap1–Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Pathway in Cancer.” *Frontiers in Oncology*

- 8 (JUN). <https://doi.org/10.3389/FONC.2018.00210>.
- Ichimura, Yoshinobu, Satoshi Waguri, Yu-Sin Sou, Shun Kageyama, Jun Hasegawa, Ryosuke Ishimura, Tetsuya Saito, et al. 2013. "Phosphorylation of P62 Activates the Keap1-Nrf2 Pathway during Selective Autophagy." *Molecular Cell* 51 (5): 618–31. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.003>.
- Itakura, Eisuke, Chieko Kishi, Kinji Inoue, and Noboru Mizushima. 2008. "Beclin 1 Forms Two Distinct Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes with Mammalian Atg14 and UVRAG." *Molecular Biology of the Cell* 19 (12): 5360–72. <https://doi.org/10.1091/MBE.E08-01-0080>.
- Jain, Ashish, Tor Erik Rusten, Nadja Katheder, Julianne Elvenes, Jack Ansgar Bruun, Eva Sjøttem, Trond Lamark, and Terje Johansen. 2015. "P62/Sequestosome-1, Autophagy-Related Gene 8, and Autophagy in Drosophila Are Regulated by Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2(NRF2), Independent of Transcription Factor TFEB." *Journal of Biological Chemistry* 290 (24): 14945–62. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.656116>.
- Jipa, András, Viktor Vedelek, Zsolt Merényi, Adél Ürmösi, Szabolcs Takáts, Attila L Kovács, Gábor V Horváth, Rita Sinka, and Gábor Juhász. 2020. "Analysis of Drosophila Atg8 Proteins Reveals Multiple Lipidation-Independent Roles." *Autophagy*, December, 1–11. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1856494>.
- Johansen, Terje, and Trond Lamark. 2011. "Selective Autophagy Mediated by Autophagic Adapter Proteins." *Autophagy* 7 (3): 279–96. <https://doi.org/10.4161/auto.7.3.14487>.
- Juhász, Gábor, Balázs Erdi, Miklós Sass, and Thomas P Neufeld. 2007. "Atg7-Dependent Autophagy Promotes Neuronal Health, Stress Tolerance, and Longevity but Is Dispensable for Metamorphosis in Drosophila." *Genes & Development* 21 (23): 3061–66. <https://doi.org/10.1101/gad.1600707>.
- Juhász, Gábor, Jahda H. Hill, Ying Yan, Miklós Sass, Eric H. Baehrecke, Jonathan M. Backer, and Thomas P. Neufeld. 2008. "The Class III PI(3)K Vps34 Promotes Autophagy and Endocytosis but Not TOR Signaling in Drosophila." *The Journal of Cell Biology* 181 (4): 655–66. <https://doi.org/10.1083/JCB.200712051>.
- Kageyama, Shun, Sigurdur Runar Gudmundsson, Yu-Shin Sou, Yoshinobu Ichimura, Naoki Tamura, Saiko Kazuno, Takashi Ueno, et al. 2021. "P62/SQSTM1-Droplet Serves as a Platform for Autophagosome Formation and Anti-Oxidative Stress Response." *Nature Communications* 12 (1): 16. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20185-1>.
- Katsuragi, Yoshinori, Yoshinobu Ichimura, and Masaaki Komatsu. 2016. "Regulation of the

- Keap1–Nrf2 Pathway by P62/SQSTM1.” *Current Opinion in Toxicology* 1 (December): 54–61. <https://doi.org/10.1016/J.COTOX.2016.09.005>.
- Kiss, Viktória, András Jipa, Kata Varga, Szabolcs Takáts, Tamás Maruzs, Péter Lőrincz, Zsófia Simon-Vecsei, et al. 2020. “Drosophila Atg9 Regulates the Actin Cytoskeleton via Interactions with Profilin and Ena.” *Cell Death and Differentiation* 27 (5): 1677. <https://doi.org/10.1038/S41418-019-0452-0>.
- Korolchuk, Viktor I, Alicia Mansilla, Fiona M Menzies, and David C Rubinsztein. 2009. “Autophagy Inhibition Compromises Degradation of Ubiquitin-Proteasome Pathway Substrates.” *Molecular Cell* 33 (4): 517–27. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.021>.
- Kulkarni, Aditi, Jessica Chen, and Sandra Maday. 2018. “Neuronal Autophagy and Intercellular Regulation of Homeostasis in the Brain.” *Current Opinion in Neurobiology* 51 (August): 29–36. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2018.02.008>.
- Kurucz, Éva, István Andó, Máté Sümegi, Harald Hözl, Barbara Kapelari, Wolfgang Baumeister, and Andor Udvardy. 2002. “Assembly of the Drosophila 26 S Proteasome Is Accompanied by Extensive Subunit Rearrangements.” *Biochemical Journal* 365 (2): 527–36. <https://doi.org/10.1042/BJ20011520>.
- Lee, Jisun, Samantha Giordano, and Jianhua Zhang. 2012. “Autophagy, Mitochondria and Oxidative Stress: Cross-Talk and Redox Signalling.” *The Biochemical Journal* 441 (2): 523–40. <https://doi.org/10.1042/BJ20111451>.
- Levine, Beth, and Guido Kroemer. 2019. “Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective.” *Cell* 176 (2): 11–42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.048>.
- Li, Wen, Pengcheng He, Yuge Huang, Yi Fang Li, Jiahong Lu, Min Li, Hiroshi Kurihara, et al. 2020. “Selective Autophagy of Intracellular Organelles: Recent Research Advances.” *Theranostics* 11 (1): 222–56. <https://doi.org/10.7150/THNO.49860>.
- Lipinszki, Zoltán, Petra Kiss, Margit Pál, Péter Deák, Áron Szabó, Eva Hunyadl-Gulyas, Eva Klement, Katalin F. Medzihradzsky, and Andor Udvardy. 2009. “Developmental-Stage-Specific Regulation of the Polyubiquitin Receptors in Drosophila Melanogaster.” *Journal of Cell Science* 122 (17): 3083–92. <https://doi.org/10.1242/jcs.049049>.
- Liu, Xiao Man, Akinori Yamasaki, Xiao Min Du, Valerie C. Coffman, Yoshinori Ohsumi, Hitoshi Nakatogawa, Jian Qiu Wu, Nobuo N. Noda, and Li Lin Du. 2018. “Lipidation-Independent Vacuolar Functions of Atg8 Rely on Its Noncanonical Interaction with a Vacuole Membrane Protein.” *ELife* 7 (November). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.41237>.
- Lu, Kefeng, Ivan Psakhye, and Stefan Jentsch. 2014. “Autophagic Clearance of PolyQ

- Proteins Mediated by Ubiquitin-Atg8 Adaptors of the Conserved CUET Protein Family.” *Cell* 158 (3): 549–63. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.05.048>.
- Martens, Sascha, and Dorotea Fracchiolla. 2020. “Activation and Targeting of ATG8 Protein Lipidation.” *Cell Discovery* 2020 6:1 6 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0155-1>.
- Mizushima, Noboru, and Masaaki Komatsu. 2011. “Autophagy: Renovation of Cells and Tissues.” *Cell* 147 (4): 728–41. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.10.026>.
- Nagy, Péter, Ágnes Varga, Attila L. Kovács, Szabolcs Takáts, and Gábor Juhász. 2015. “How and Why to Study Autophagy in Drosophila: It’s More than Just a Garbage Chute.” *Methods (San Diego, Calif.)* 75 (March): 151–61. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2014.11.016>.
- Nezis, Ioannis P., Anne Simonsen, Antonia P. Sagona, Kim Finley, Sébastien Gaumer, Didier Contamine, Tor Erik Rusten, Harald Stenmark, and Andreas Brech. 2008. “Ref(2)P, the Drosophila Melanogaster Homologue of Mammalian P62, Is Required for the Formation of Protein Aggregates in Adult Brain.” *Journal of Cell Biology* 180 (6): 1065–71. <https://doi.org/10.1083/jcb.200711108>.
- Nguyen, Tan A., Blake R.C. Smith, Michelle D. Tate, Gabrielle T. Belz, Marilou H. Barrios, Kirstin D. Elgass, Alexandra S. Weisman, et al. 2017. “SIDT2 Transports Extracellular DsRNA into the Cytoplasm for Innate Immune Recognition.” *Immunity* 47 (3): 498–509.e6. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2017.08.007/ATTACHMENT/1CF8C9DC-6C9C-47BD-982E-AB8F5AA1EF39/MMC5.MP4>.
- Novikoff, Alex B., H. Beaufay, and C. De Duve. 1956. “ELECTRON MICROSCOPY OF LYSOSOME-RICH FRACTIONS FROM RAT LIVER.” *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 2 (4): 179. <https://doi.org/10.1083/jcb.2.4.179>.
- Ohsumi, Yoshinori. 2014. “Historical Landmarks of Autophagy Research.” *Cell Research* 24 (1): 9. <https://doi.org/10.1038/CR.2013.169>.
- Orenstein, Samantha J., and Ana Maria Cuervo. 2010. “Chaperone-Mediated Autophagy: Molecular Mechanisms and Physiological Relevance.” *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21 (7): 719. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2010.02.005>.
- Otto, Florian B., and Michael Thumm. 2021. “Mechanistic Dissection of Macro- and Micronucleophagy.” *Autophagy* 17 (3): 626. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1725402>.
- Pandey, Udai Bhan, Zhiping Nie, Yakup Batlevi, Brett A McCray, Gillian P Ritson, Natalia B Nedelsky, Stephanie L Schwartz, et al. 2007. “HDAC6 Rescues Neurodegeneration and

- Provides an Essential Link between Autophagy and the UPS.” *Nature* 447 (7146): 859–63. <https://doi.org/10.1038/nature05853>.
- Pang, Yu, Hayashi Yamamoto, Hirokazu Sakamoto, Masahide Oku, Joe Kimanthi Mutungi, Mayurbhai Himatbhai Sahani, Yoshitaka Kurikawa, et al. n.d. “Evolution from Covalent Conjugation to Non-Covalent Interaction in the Ubiquitin-like ATG12 System.” *Nature Structural & Molecular Biology*. Accessed February 18, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0204-3>.
- Parzych, Katherine R, and Daniel J Klionsky. n.d. “An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation.” Accessed February 7, 2022. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>.
- Pircs, Karolina, Peter Nagy, Agnes Varga, Zsolt Venkei, Balazs Erdi, Krisztina Hegedus, and Gabor Juhasz. 2012. “Advantages and Limitations of Different P62-Based Assays for Estimating Autophagic Activity in *Drosophila*.” *PLOS ONE* 7 (8): e44214. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0044214>.
- Port, Phillip, Hui Min Chen, Tzumin Lee, and Simon L. Bullock. 2014. “Optimized CRISPR/Cas Tools for Efficient Germline and Somatic Genome Engineering in *Drosophila*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (29). <https://doi.org/10.1073/PNAS.1405500111/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201405500SI.PDF>.
- Rana, Anil, Matheus P. Oliveira, Andy V. Khamoui, Ricardo Aparicio, Michael Rera, Harry B. Rossiter, and David W. Walker. 2017. “Promoting Drp1-Mediated Mitochondrial Fission in Midlife Prolongs Healthy Lifespan of *Drosophila Melanogaster*.” *Nature Communications* 8 (1): 448. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00525-4>.
- Ravikumar, Brinda, Coralie Vacher, Zdenek Berger, Janet E. Davies, Shouqing Luo, Lourdes G. Oroz, Francesco Scaravilli, et al. 2004. “Inhibition of MTOR Induces Autophagy and Reduces Toxicity of Polyglutamine Expansions in Fly and Mouse Models of Huntington Disease.” *Nature Genetics* 2004 36:6 36 (6): 585–95. <https://doi.org/10.1038/ng1362>.
- Rutschmann, Sophie, Alain C. Jung, Rui Zhou, Neal Silverman, Jules A. Hoffmann, and Dominique Ferrandon. 2000. “Role of *Drosophila* IKK Gamma in a Toll-Independent Antibacterial Immune Response.” *Nature Immunology* 1 (4): 342–47. <https://doi.org/10.1038/79801>.
- Saftig, Paul, and Albert Haas. 2016. “Turn up the Lysosome.” *Nature Cell Biology* 18 (10): 1025–27. <https://doi.org/10.1038/ncb3409>.
- Sanjuan, Miguel A., Christopher P. Dillon, Stephen W.G. Tait, Simon Moshiah, Frank

- Dorsey, Samuel Connell, Masaaki Komatsu, et al. 2007. "Toll-like Receptor Signalling in Macrophages Links the Autophagy Pathway to Phagocytosis." *Nature* 450 (7173): 1253–57. <https://doi.org/10.1038/NATURE06421>.
- Scherz-Shouval, Ruth, Elena Shvets, and Zvulun Elazar. 2007. "Oxidation as a Post-Translational Modification That Regulates Autophagy." *Autophagy* 3 (4): 371–73. <https://doi.org/10.4161/AUTO.4214>.
- Sheng, Rui, and Zheng Hong Qin. 2019. "History and Current Status of Autophagy Research." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1206: 3–37. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4_1.
- Singh, Rajat, Susmita Kaushik, Yongjun Wang, Youqing Xiang, Inna Novak, Masaaki Komatsu, Keiji Tanaka, Ana Maria Cuervo, and Mark J. Czaja. 2009. "Autophagy Regulates Lipid Metabolism." *Nature* 458 (7242): 1131. <https://doi.org/10.1038/NATURE07976>.
- Sun, Daxiao, Rongbo Wu, Jingxiang Zheng, Pulong Li, and Li Yu. 2018. "Polyubiquitin Chain-Induced P62 Phase Separation Drives Autophagic Cargo Segregation." *Cell Research* 28 (4): 405–15. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0017-7>.
- Sykiotis, Gerasimos P., and Dirk Bohmann. 2008. "Keap1/Nrf2 Signaling Regulates Oxidative Stress Tolerance and Lifespan in *Drosophila*." *Developmental Cell* 14 (1): 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.12.002>.
- Takáts, Szabolcs, Gábor Glatz, Győző Szenci, Attila Boda, Gábor V. Horváth, Krisztina Hegedűs, Attila L. Kovács, and Gábor Juhász. 2018. "Non-Canonical Role of the SNARE Protein Ykt6 in Autophagosome-Lysosome Fusion." *PLoS Genetics* 14 (4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1007359>.
- Tracy, Kirsten, and Eric H. Baehrecke. 2013. "The Role of Autophagy in *Drosophila* Metamorphosis." *Current Topics in Developmental Biology* 103: 101. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385979-2.00004-6>.
- Tusco, Radu, Anne Claire Jacomin, Ashish Jain, Bridget S. Penman, Kenneth Bowitz Larsen, Terje Johansen, and Ioannis P. Nezis. 2017. "Kenny Mediates Selective Autophagic Degradation of the IKK Complex to Control Innate Immune Responses." *Nature Communications* 8: 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01287-9>.
- Varga, Kata, Péter Nagy, Katarina Arsikin Csordás, Attila L Kovács, Krisztina Hegedűs, and Gábor Juhász. 2016. "Loss of Atg16 Delays the Alcohol-Induced Sedation Response via Regulation of Corazonin Neuropeptide Production in *Drosophila* OPEN." <https://doi.org/10.1038/srep34641>.

- Wang, Fang, Ye Zhang, Jianliang Shen, Bin Yang, Weiwei Dai, Junrong Yan, Sara Maimouni, et al. 2021. “The Ubiquitin E3 Ligase TRIM21 Promotes Hepatocarcinogenesis by Suppressing the P62-Keap1-Nrf2 Antioxidant Pathway.” *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 11 (5): 1369. <https://doi.org/10.1016/J.JCMGH.2021.01.007>.
- Wati, Sisca Meida, Daisuke Matsumaru, and Hozumi Motohashi. 2020. “NRF2 Pathway Activation by KEAP1 Inhibition Attenuates the Manifestation of Aging Phenotypes in Salivary Glands.” *Redox Biology* 36 (September). <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2020.101603>.
- White, Eileen. 2012. “Deconvoluting the Context-Dependent Role for Autophagy in Cancer.” *Nature Reviews Cancer* 2012 12:6 12 (6): 401–10. <https://doi.org/10.1038/nrc3262>.
- Yamamoto, Hayashi, Soichiro Kakuta, Tomonobu M. Watanabe, Akira Kitamura, Takayuki Sekito, Chika Kondo-Kakuta, Rie Ichikawa, Masataka Kinjo, and Yoshinori Ohsumi. 2012. “Atg9 Vesicles Are an Important Membrane Source during Early Steps of Autophagosome Formation.” *The Journal of Cell Biology* 198 (2): 219–33. <https://doi.org/10.1083/JCB.201202061>.
- Yamasaki, Akinori, Jahangir Md. Alam, Daisuke Noshiro, Eri Hirata, Yuko Fujioka, Kuninori Suzuki, Yoshinori Ohsumi, and Nobuo N Noda. 2020. “Liquidity Is a Critical Determinant for Selective Autophagy of Protein Condensates.” *Molecular Cell* 77 (6): 1163—1175.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.12.026>.
- Yang, Chonglin, and Xiaochen Wang. 2021. “Lysosome Biogenesis: Regulation and Functions.” *The Journal of Cell Biology* 220 (6). <https://doi.org/10.1083/JCB.202102001>.
- Yim, Willa Wen You, and Noboru Mizushima. 2020. “Lysosome Biology in Autophagy.” *Cell Discovery* 6 (1): 6. <https://doi.org/10.1038/S41421-020-0141-7>.
- Yu, Chao, and Jian Hui Xiao. 2021. “The Keap1-Nrf2 System: A Mediator between Oxidative Stress and Aging.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6635460>.
- Zachari, Maria, and Ian G. Ganley. 2017. “The Mammalian ULK1 Complex and Autophagy Initiation.” *Essays in Biochemistry* 61 (6): 585. <https://doi.org/10.1042/EBC20170021>.
- Zaffagnini, Gabriele, and Sascha Martens. 2016. “Mechanisms of Selective Autophagy.” *Journal of Molecular Biology* 428 (9Part A): 1714. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2016.02.004>.
- Zaffagnini, Gabriele, Adriana Savova, Alberto Danieli, Julia Romanov, Shirley Tremel,

- Michael Ebner, Thomas Peterbauer, et al. 2018. "P62 Filaments Capture and Present Ubiquitinated Cargos for Autophagy." *The EMBO Journal* 37 (5).
<https://doi.org/10.15252/emj.201798308>.
- Zhang, Chao, Lei Yang, Xiao bing Wang, Jun song Wang, Ya di Geng, Chang shui Yang, and Ling yi Kong. 2013. "Calyxin Y Induces Hydrogen Peroxide-Dependent Autophagy and Apoptosis via JNK Activation in Human Non-Small Cell Lung Cancer NCI-H460 Cells." *Cancer Letters* 340 (1): 51–62. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2013.06.021>.
- Zhang, Jiangwei, Durga Nand Tripathi, Ji Jing, Angela Alexander, Jinhee Kim, Reid T. Powell, Ruhee Dere, et al. 2015. "ATM Functions at the Peroxisome to Induce Pexophagy in Response to ROS." *Nature Cell Biology* 17 (10): 1259.
<https://doi.org/10.1038/NCB3230>.
- Zirin, Jonathan, Norbert Perrimon, and Howard Hughes. n.d. "Drosophila as a Model System to Study Autophagy." <https://doi.org/10.1007/s00281-010-0223-y>.

9. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Juhász Gábornak támogatásáért, és hogy megteremtette a feltételeket a PhD értekezésemben részletezett munka elvégzéséhez.

Köszönöm Arindam Bhattaharjee-nak akivel a közösen dolgozhattam ezen a témán és mindig mindenben a segítségemre volt, legyen a munkánk megtervezése, vagy az angol nyelv gyakorlása.

Köszönöm Horváth V. Gábornak, hogy a laborban töltött időm során megtanított több új technikára és fortélyra. Köszönöm Szabó Áronnak, a rengeteg támogatást, türelmet és hogy segített dolgozatom elkészülésében. Köszönöm Jipa Andrásnak, hogy mindig segített a légymunkáim során és bármikor számíthattunk egymásra ha „szüzelni” kellett. Simon-Vecsei Zsófiának, akivel az első évemben együtt dolgozhattam és rengeteget tanultam tőle a klónozás és fehérjék világáról. Kiss Viktóriának, hogy mindig mellettem állt és bevezetett a mikroszkópozás örömeibe, akár szombat estenként is.

Köszönöm az egész szegedi Juhász labornak, Hevérné-Laczkó-Dobos Hajnalkának, Maruzs Tamásnak, Csordás Gábornak, Blastyák Andrásnak, Asha Kiran-nak, Hussein abu Ammar-nak, Lakatos Enikőnek, Börcsök Dalmának, Fehérné Erzsébetnek, Vincze Virágnak, Esküdt Zsombornak, Erdődi Ildikónak és Bozsó Szilviának a rengeteg segítséget, támogatást, mind a szakmában, mind a magánéletben. Az általuk létrehozott közösségben mindig jó hangulat és kellemes légkör fogadott, ahol öröm volt dolgozni.

Szeretném megköszönni Dr. Erdélyi Miklósnak, hogy az ELKH Genetikai Intézetében írhattam PhD tézisemet és az egész Genetikai Intézetnek, hogy bármilyen problémám adódott mindig volt kihez fordulni.

Köszönöm Dr. Sinka Ritának, hogy jelen dolgozatom szakmai elbírálását vállalta. Továbbá másik bírálómnak, Dr. Lipinszki Zoltánnak is köszönöm, hogy értékes szakmai kritikákkal illette munkámat.

Külön szeretném megköszönni a támogatást „szegedi családomnak”, akik befogadtak és támogattak az évek során. Szeretjük és soha el nem tűnő támogatásuk nélkül sok minden nem sikerülhetett volna az életemben. Köszönöm jövődöbéli férjemnek, Zsoltnak, hogy segített és támogatott a nehéz időkben.

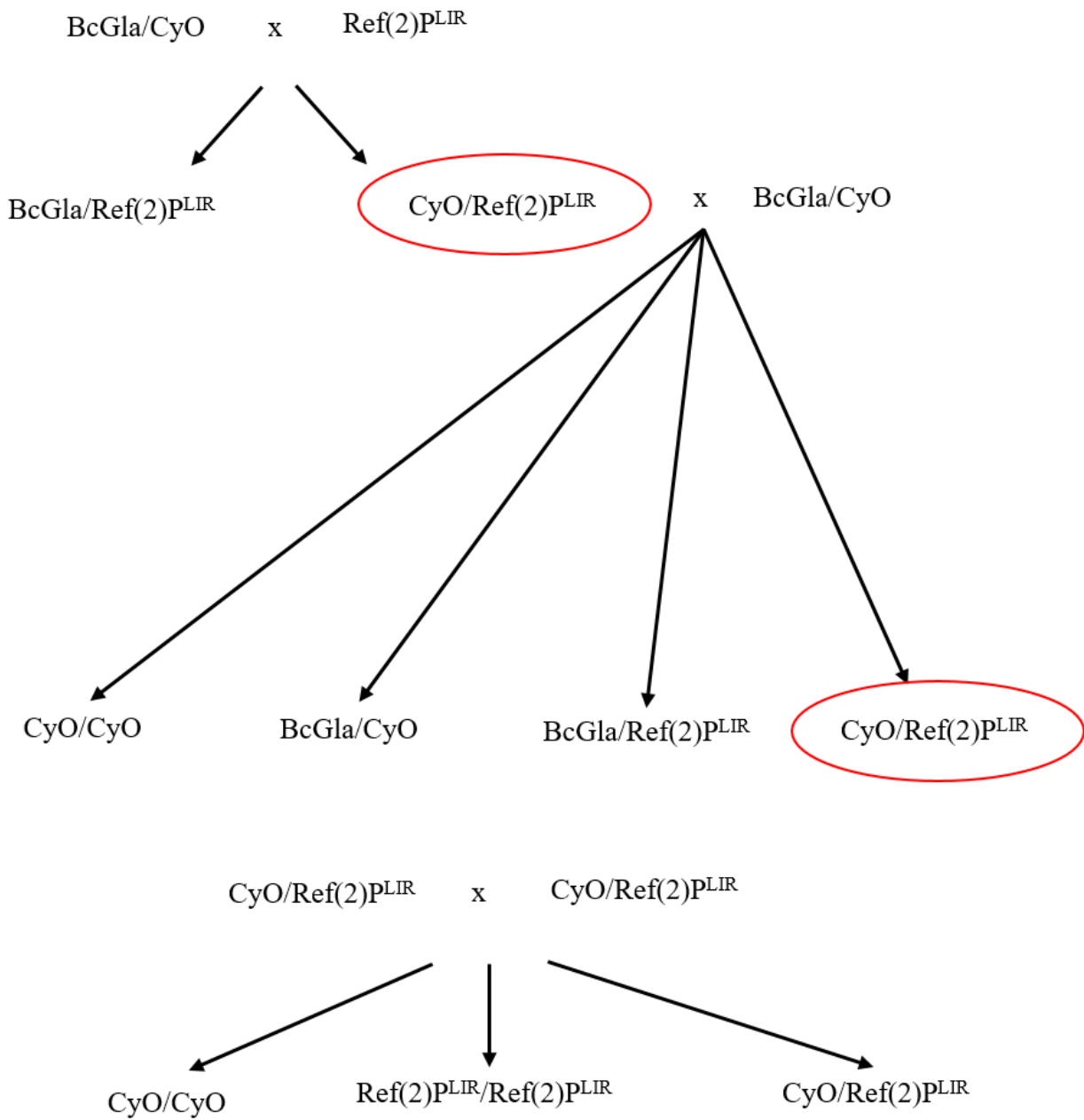
Végül szeretném megköszönni Édesanyámnak, aki mindig mindenben támogatott és végig hitt bennem és a legnehezebb napjaimon is türelmes volt hozzám.

A doktorim során végzett munkát és a dolgozat megírását a következő pályázatok támogatták: Magyar Tudományos Akadémia (Momentum LP2014/2; BO/00078/18; UNKP-20-5; UNKP-19-4), Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Hivatal (GINOP-2.3.2-15-2016-00006; GINOP-2.3.2-15-2016-00032; FK132183; KKP129797), Nemzeti Biotechnológia Labor (PD135587).

10. Saját hozzájárulásom a munkához

- A *Ref(2)^{PLIR}* mutánsok létrehozása CRISPR/Cas9 rendszerrel, a klónozástól, a stabil törzs létrehozásáig
- A *Ref(2)^{PLIR}* mutáns törzs élethossz és mászás tesztek elvégzése
- A *Ref(2)^{PLIR}* mutáns törzs paraquattal kezelt élethossz tesztjének elvégzése
- A RT-Q-PCR tesztekhez a minták elkészítése, a reakció összemérése és lefuttatása
- Lárvák éheztetése, zsírtestjeinek boncolása és festése
- Az adult agyak boncolása elektronmikroszkópos mintákhoz és immuncitokémiához és festése
- Minták készítése a ko-immunoprecipitációhoz és annak futtatása
- Western blot minták készítése és futtatása
- A *Ref(2)^{PLIR}; Atg16^{d129}* törzs létrehozása és vizsgálata
- A *Ref(2)^{PLIR}; tub>GFP-Ub* törzs létrehozása és vizsgálata

11. Függelékek



F1. ábra. A $ref(2)^{PLIR}$ mutáns állatok létrehozásának keresztezési sémája. A CRISPR/Cas9 rendszer segítségével létrehozott $ref(2)^{PLIR}$ mutáns állatokat először a $BcGla/CyO$ törzzsel kereszteztem, majd a kikelt egyedek közül kiválogattam a CyO markert, és a LIR mutációt tartalmazó állatokat. Ezután homozigóta törzset készítettem a $ref(2)^{PLIR}$ mutáns állatokból.