

Stressz-indukált autofágia szabályozási mechanizmusai *Drosophila melanogaster*ben

Doktori értekezés

Manzéger Anna

Biológia Doktori Iskola, iskolavezető: Dr. Nyitray László, egyetemi tanár
Genetika Doktori Program, Programvezető: Dr. Vellai Tibor, egyetemi tanár
Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar



Témavezető: Dr. Vellai Tibor, egyetemi tanár

Készült:

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Genetikai Tanszék

Budapest, 2022

DOI: 10.15476/ELTE.2022.245

Tartalomjegyzék

1. Irodalmi áttekintés	7
1.1. A makroautofágia molekuláris mechanizmusa	11
1.1.1 Az indukciós komplex működése	11
1.1.2 A vezikula nukleációs komplex működése	13
1.1.3 Az ubiquitin-szerű konjugációs komplexek működése	14
1.1.4 Az autolizoszóma képződés - a fúzió mechanizmusa	16
1.1.5 Degradáció és újrahasznosítás	16
1.2. Lipidszignalizáció az autofágiában	17
1.2.1 A foszfoinozitidek metabolizmusa és az autofágia	17
1.2.2 A myotubularinok szerepe az autofágiában	20
1.2.2.1 A myotubularinok Drosophilában	23
1.3. Az autofágia típusai	25
1.3.1 Szelektív és nem szelektív autofágia	25
1.3.2 Bazális és stressz indukált autofágia	28
1.3.2.1 A bazális autofágia - a sejt takarító működése	28
1.3.2.2 Az indukált autofágia - a sejt renováló működése	28
1.3.2.3 A fejlődési autofágia - a sejt átépítő működése	31
Autofágia a fertilizáció és az embriogenezis során	32
Autofágia a poszt-embrionális fejlődés során	33
1.4. <i>Drosophila melanogaster</i>, mint genetikai modell	34
1.4.1 A zsírtest	36
1.4.2 Az összetett szem	37
2 Célkitűzések	39
3 Anyagok és módszerek	40
	2

3.1	Felhasznált ecetmuslica törzsek	40
3.1.1	A dolgozatban jellemzett gének és módosításukra használt konstrukciók	42
3.1.2	A klonális RNS interferencia illetve túltermeléses vizsgálatokhoz használt törzsek	44
3.2	A stressz körülmények kiváltásához használt kezelések	44
3.3	RNS kivonás és PCR	45
3.3.1	Primer szekvenciák	46
3.4	Fehérje izolálás és immunoblot	48
3.4.1	Mintaelőkészítés	48
3.4.2	Immunoblott	48
3.4.3	Az immunoblotthoz használt oldatok	48
3.4.4	Az immunoblottokhoz használt ellenanyagok	49
3.4.5	Kiértékelés	49
3.5	Fluoreszcens mikroszkópia	49
3.6	Elektronmikroszkópia	50
3.7	Statisztika	50
4	Eredmények	52
4.1	A stressz-indukált autofágia szabályozási elemeinek azonosítása <i>Drosophila</i> lárvális zsírtestben	52
4.1.1	Éhezés hatására megnő két myotubularin típusú lipid foszfatáz mRNS expressziója lárvális zsírtestben	52
4.1.2	<i>Drosophila</i> zsírtestben az Mtmr6 gátló faktorként hat, az EDTP pedig nem vesz részt a stressz-indukált autofágia szabályozásban	56
4.1.2.1	Éhezési stressz vizsgálatok	56
4.1.2.2	Hőstressz és oxidatív stressz vizsgálatok	65
4.1.3	Az EDTP és Mtmr6 endocitózisban betöltött szerepének vizsgálata	67
4.2	A fejlődési autofágia szabályozása a <i>Drosophila</i> szemfejlődésben	69

4.2.1	Autofág fehérjék hiánya a morfogenetikai árokban és az osztódási zónában a szemfejlődés zavarához vezet	69
4.2.2	Kompenzációs mechanizmusok segítik a <i>Drosophila</i> szemfejlődés során a szükséges autofág aktivitást	80
5	Megvitatás	85
6.	Összefoglalás	91
7	Summary	92
8	Irodalomjegyzék	93
9	Köszönetnyilvánítás	107

Rövidítések jegyzéke

AEL - *after egg laying*, peterakást követően

AMPK - *AMP-activated protein kinase*, éhezés és stress esetén aktiválódó kináz

ATF6 - *activating transcription factor-6*, ER-stresszben szerepet játszó fehérje

AUTEN-67 - *autophagy enhancer-67*, *MTMR14*-et gátló, autofágia-induktor

AUTEN-99 - *autophagy enhancer-99*, *MTMR14*-et gátló, autofágia-induktor

BMP - *Bone morphogenetic protein*

CALCOCO2/NDP52 - nuclear dot protein 52, szelektív autofágia-receptor

Ccz1 - *Caffeine, calcium, zinc sensitivity 1*

CMA - Chaperone mediált autofágia

CMT4B1 illetve 2 - Charcot Marie-Tooth neuropátia

Cvt - *cytoplasm-to-vacuole targeting* útvonal, élesztőkben leírt szelektív autofág útvonal

EDTP - *egg-derived tyrosine phosphatase*, az *MTMR14 Drosophila* ortológja

ESCRT - *endosomal sorting complexes required for transport*

eMI - endoszómális mikroautofágia

Fip200 - *Focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD*, az indukciós komplex tagja

FOXO3 - forkhead box O3a, transzkripció faktor

HIF - hypoxia-inducible factor, hypoxia esetén az autofágia indukciójához szükséges fehérje

HOPS - homotypic fusion and protein sorting, pányvázó fehérjekomplex

HSP - hő sokk-fehérjék

IRE1 - *inositol requiring enzyme 1*, ER-stresszben szerepet játszó fehérje

LAMP-2A - *lysosome-associated membrane protein type 2A*, CMA-ban szerepet játszó fehérje

LKB1 - *liver kinase B1*

LTR - LysoTracker Red, savas sejtalkotók jelölésére használt festék

MF - *morfogenetic furrow*, morfogenetikai árok a szemdiszkuszban

Mon1 - *Monensin sensitivity 1*

MTMR - MTM related, myotubularin-szerű fehérjecsalád

mTORC - *mechanistic target of rapamycin complex*

NBR1 - *neighbor of BRCA1 gene 1*

NCOA4-et - *Nuclear Receptor Coactivator 4*

PAS - *Phagophore Assembly Site*, a fagofór kialakulásának helye

PE - foszfatidil-etanolamin

PERK - PKR-like eIF2a kinase, ER-stresszben szerepet játszó fehérje

PH-GRAM domén - Pleckstrin Homology-Glucosyl transferases, Rab-like GTPase activators and myotubularins, myozubularinokra is jellemző fehérje interakciós domén

PI - foszfatidilinozitol

PI3P - foszfatidilinozitol 3-foszfát

PTP - *protein tyrosine phosphatase*, a myotubularinok foszfatáz doménje

Rab7 - *Ras-related protein 7*

Ref(2)P - *refractory to Sigma P*, másnéven p62 vagy SQSTM1 (*Sequestosome-1*)

ROS - reaktív oxigéngyökök

SNARE - soluble Nethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors, dokkoló fehérjekomplex

UPR - *unfolded protein response*

UVRAG - *UV irradiation resistance-associated gene*, a II-es típusú Vps34 kináz komplex tagja

Vps34 - *vacuolar protein sorting 34*

1. Irodalmi áttekintés

Az autofágia ógörög eredetű szó, jelentése önemésztés. Christian de Duve használta először az autofágia kifejezést 1963-ban a lizoszómák felfedezésével kapcsolatos munkája során (Duve, 1963). Ma az autofágia kifejezést olyan, az eukarióta sejtekre általánosan jellemző szabályozott, lizoszóma közvetített folyamatokra értjük, amelyek során a hibás, vagy feleslegessé vált citoplazma komponensek lebomlanak és reciklizálódhatnak (Levine és Klionsky, 2004; Mizushima, 2007). Az autofágia a sejtes homeosztázis fenntartása számára nélkülözhetetlen, citoprotektív folyamat. Fokozott működése révén elősegíti a sejt túlélését különböző stresszkörülmények között, mint amilyen például a tápanyaghiány, de a kórokozókkal szembeni védekezésben is fontos szereppel bír. Ezen funkcióin túl az autofágia hozzájárul a felépítő folyamatokhoz szükséges makromolekulák termeléséhez, amikor a sejtes funkciók gyors megváltozására van szükség változó körülmények esetén. Emberben az autofágia hibás (alul- vagy túl-) működése különböző degeneratív elváltozások kialakulásához vezethet. Ilyen patológiás állapot pl. a rák, neurodegeneratív betegségek (pl. Alzheimer, Parkinson és Huntington kórok), szöveti fibrózis és atrófia, és immundeficiencia (Sridhar és mtsai., 2012). Az autofágia mechanizmusának és genetikai szabályozásának kutatása tehát orvosi szempontokból is rendkívül fontos.

Az eukarióta sejtekben a lebontó működések az ubiquitin-proteaszóma rendszer, illetve az autofágia révén valósulnak meg. Az előbbi révén főleg a hibásan feltekeredett, rövid élettidejű fehérjék bomlanak le, míg az autolizoszómális rendszer révén általában a hosszú élettidejű makromolekula komplexek és sejtorganellek degradációja zajlik. Az autofágiának három fő típusa ismert: a mikroautofágia (és endoszómális mikroautofágia), chaperone-közvetített autofágia és a makroautofágia (1. ábra).

Mikroautofágia során a lebontandó citoplazmarészlet a lizoszóma membrán be-, illetve kitűrődései révén kerül a lizoszóma üregébe, ahol a keletkezett membránhólyag a beltartalmával együtt degradálódik. Az autofágia ezen formája leginkább az élesztőben tanulmányozott (Li és Bao, 2012). Nem szelektív működése révén főként a membránok homeosztázisában játszik szerepet (Oku és Sakai, 2018).

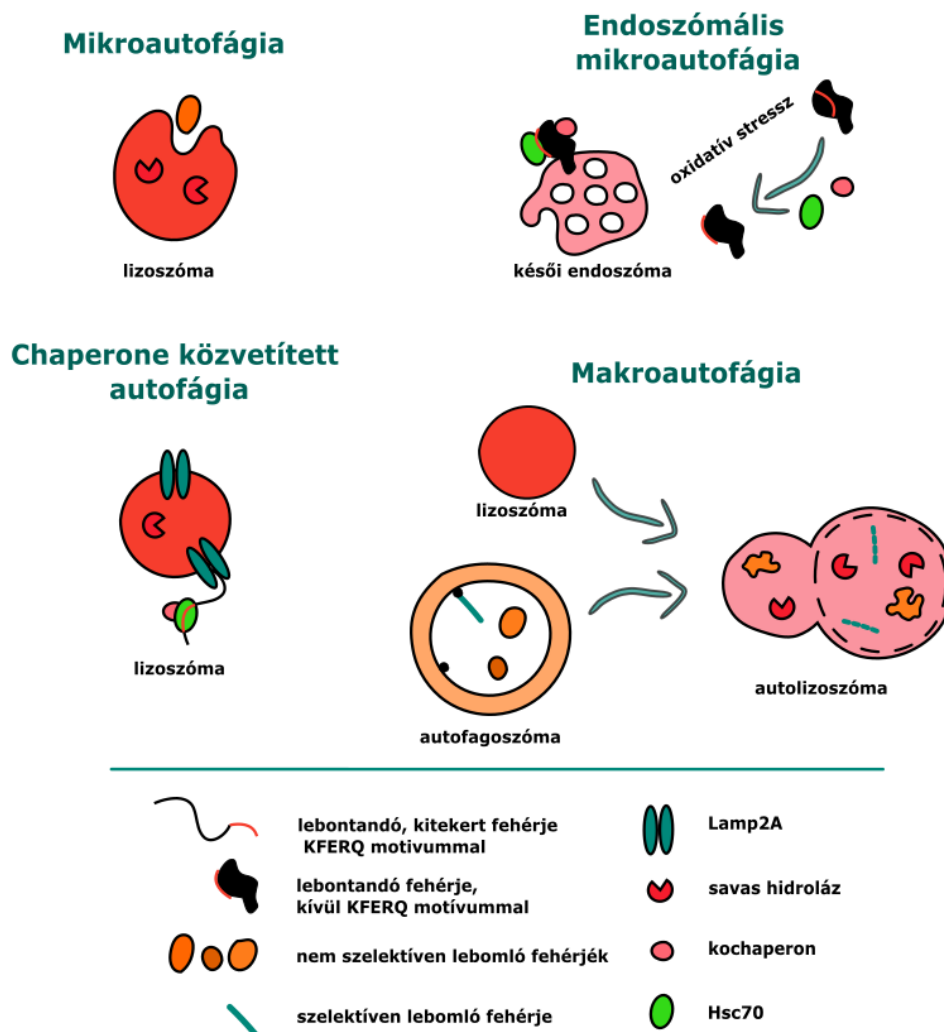
A **chaperone-közvetített autofágia (CMA - chaperone mediated autophagy)** esetén szelektív lebontás zajlik a lizoszóma hidrolázai segítségével (1. ábra). Ilyen módon képesek lebontódni a KFERQ aminosav-motívummal rendelkező fehérjék, melyeket a Hsc70 (*heat shock cognate protein of 70 kDa*) és ko-chaperonjai ismernek fel. Ezután együtt transzlokálódnak a lizoszóma membránjában található LAMP-2A (*lysosome-associated*

membrane protein type 2A) fehérje csatornához, ahol a célfehérjék kitekerednek és bejutnak a lizoszóma üregébe, majd lebontódnak (Kaushik és mtsai., 2011). Szerepét leginkább az éhezéshoz kötött válaszméchanizmusban azonosították, de a sejtes homeosztázis fenntartásában is fontos szerepet játszik, például a lipolízis során (Bejarano és Cuervo, 2010; Ma és mtsai., 2020). Az autofágia ezen típusa a gerincesekben alakult ki, a gerinctelenekben nem találhatóak meg a *Lamp-2* gén ortológjai (Herpin és mtsai., 2020).

Gerinctelenekben a CMA helyett a szelektív módon működő **endoszómális mikroautofágia (eMI)** által bomlanak le a KFERQ-szerű motívumot tartalmazó fehérjék (1. ábra). Ebben az esetben a Hsc70 elektrosztatikus kapcsolat révén juttatja a késői endoszómákba/multivezikuláris testekbe a lebontani kívánt fehérjéket. A folyamat végbemeneteléhez az ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*) komplexek működése szükséges, a lumenbe jutásnak pedig nem feltétele, hogy a megkötött célfehérje kitekert állapotban legyen (Sahu és mtsai., 2011). Általában a KFERQ-szerű motívum a fehérje feltekeredése során rejtve marad, és valamilyen oxidatív stressz hatására kerül a felszínre, és ekkor lesz felismerhető a Hsc70 és ko-chaperonjai által (Bejarano és Cuervo, 2010). Az eMI esetében *Drosophila*-ban a Hsc70-4 fehérje (chaperone-szerű működésétől függetlenül) vesz részt a fehérjék késői endoszómába való juttatásában (Oku és Sakai, 2018). Az ecetmuslica fehérjék körülbelül 40%-a tartalmaz KFERQ-szerű motívumot, melyek képesek eMI általi lebomlani (Mukherjee és mtsai., 2016).

Az autofágia legintenzívebben tanulmányozott típusa a **makroautofágia** (1. ábra). A folyamat során egy kettős membránból álló struktúra képződik, ez a fagofór/omegaszóma, amely elkezd körülnőni a lebontandó citoplazma részletet. Az elongációs lépés végén a kettős membrán záródik és létrejön az autofagoszóma (egy kettős membránnal határolt vezikulum). A benne lévő sejtanyag lebontásához az autofagoszóma savas vezikulákkal fuzionál. Késői endoszómával való fúziójakor úgynevezett amfiszóma jön létre (Fader és Colombo, 2009), ha pedig csak lizoszómával olvad össze, akkor autolizoszómának nevezzük a keletkezett organelumot. Beltartalmukat lizoszómális hidrolázok bontják le. Működésükhöz savas pH szükséges. A lebontással létrejött monomerek felhasználódnak a felépítő folyamatokhoz (reciklizáció). A makroautofágia során akár organelumok vagy bizonyos esetben akár a sejtanyag is képes lebomlani. Utóbbi a több sejttel rendelkező egysejtű eukarióták esetében gyakori. Többsejtűek esetén is például kromoszóma misszeregáció esetén az autofágiának citoprotektív hatása van (Hewitt és Korolchuk, 2017). Az autofág membránhoz adaptorfehérjék

is kapcsolódnak, melyek bizonyos fehérjék megkötésén keresztül képesek azok szelektív lebontását elősegíteni.



1. ábra: Az autofágia főbb típusai. A mikroautofágia és a chaperone-közvetített autofágia során a lebontandó fehérjék közvetlenül a lizoszómába jutnak. KFERQ aminosav-motívummal rendelkező fehérjéket a Hsc70 és kochaperonjai ismerik fel. Ezután együtt transzlokálódnak a lizoszóma membránjában található LAMP-2A csatornához. Az endoszómális mikroautofágia során KFERQ-szerű motívumot tartalmazó fehérjék lebontása már az endoszómális rendszerben megkezdődik, a fehérjék a multivezikuláris testbe/késői endoszómába jutnak a Hsc70 segítségével egy elektrosztatikus kapcsolat révén. A makroautofágia intenzív lebontást tesz lehetővé. A folyamat során egy kettős membránból álló struktúra növi körül a lebontásra szánt citoplazmarészletet, illetve sejtorganellumokat, így jön létre az autofagoszóma, mely lizoszómával vagy endoszómával való fúziója révén hozza létre a lebontást végző autolizozómát.

A különböző autofág folyamatok a lebontó tevékenységben hol közreműködnek egymással, hol pedig gátolják egymást. Az autofagoszóma-lizoszóma fúzió képes a beltartalom

pH-ját módosítani és ezáltal destabilizálni a lizoszómában lévő Lys-Hsc70-et, ezáltal gátolni a CMA-t. Bizonyos esetekben redundáns a szerepük. CMA gátolt sejtvonalon megfigyelték, hogy a makroautofágia képes hiperaktiválódni, ezáltal kompenzálni a kiesett proteolízist, bár a sejtek érzékenyebbek maradtak ezután a különböző stresszfaktorokra (Massey és mtsai., 2006). Ezek a folyamatok általában egymást kiegészítve működnek. *In vitro* kísérletekben megfigyelték, hogy közvetlenül az éhezés kezdetén főleg a makroautofágia aktiválódik, ennek csúcsa órákban, míg a CMA aktivációja és lecsengése inkább napokban mérhető. Ezáltal több hullámban kap a sejt a felépítő folyamataihoz aminosavakat (Kaushik és mtsi., 2008). Hasonlót figyeltek meg *Drosophila* zsírtestben is; az autofagoszómák az éhezés után 1-4 óra között detektálhatóak leginkább, míg az eMI az éhezés után csak 21 órával (Mukherjee és mtsai., 2016).

A makro- és mikroautofágia működésében is lehetnek átfedések. Sok makroautofágiában szerepet játszó fehérje vesz részt a mikroautofágia szabályozásában is. Bizonyos esetekben a mikroautofágia is képes organelumok lebontására. Ilyen például a *Pichia pastoris*-ban megfigyelt metanol lebontásban fontos peroxiszóma degradáció. Metanol hiányában a peroxiszómák mikroautofágia (vakuólum kitűrődés és körülnövés) révén bomlanak (Yuan és mtsai., 1997).

Az utóbbi évtizedek intenzív kutatómunkáinak köszönhetően egyre többet tudunk az autofágia működéséről, molekuláris mechanizmusáról. Ismereteink nagy része makroautofágiához kapcsolt vizsgálatokon alapszik. Ez a mennyiségileg legjelentősebb típus a három alfolyamat közül. A dolgozatban az egyszerűség kedvéért a továbbiakban autofágiaként említem a makroautofágiát.

Az autofagoszóma képződés számos ATG (*autophagy-related*) fehérje összehangolt működésének eredménye (Klionsky és mtsai., 2003). Az első ATG fehérjék felfedezése Oszumi Josinori japán kutató nevéhez fűződik, aki 2016-ban orvosi-élettani Nobel-díjat kapott az autofágia területén végzett kutatásaiért, melyet élesztő sejteken végzett (Tsukada és Ohsumi, 1993). Azóta magasabbrendű eukariótákban is azonosították az *Atg* gének ortológjait. Ma már számos élőlényben ismerjük a folyamat szabályozási mechanizmusait, melyek a különböző fajokban, de akár szövetenként is eltérőek lehetnek. Sok esetben az autofágia szerepe egy sejtben működésben igen komplex és ellentmondásos. Szerepe leginkább egy mérleggel szemléltethető, ahol az egyik oldalon az autofág folyamat intenzitása áll, a másikon pedig a belső és külső körülményekhez köthető igények. Néha a túl nagy mértékű lebontó működés

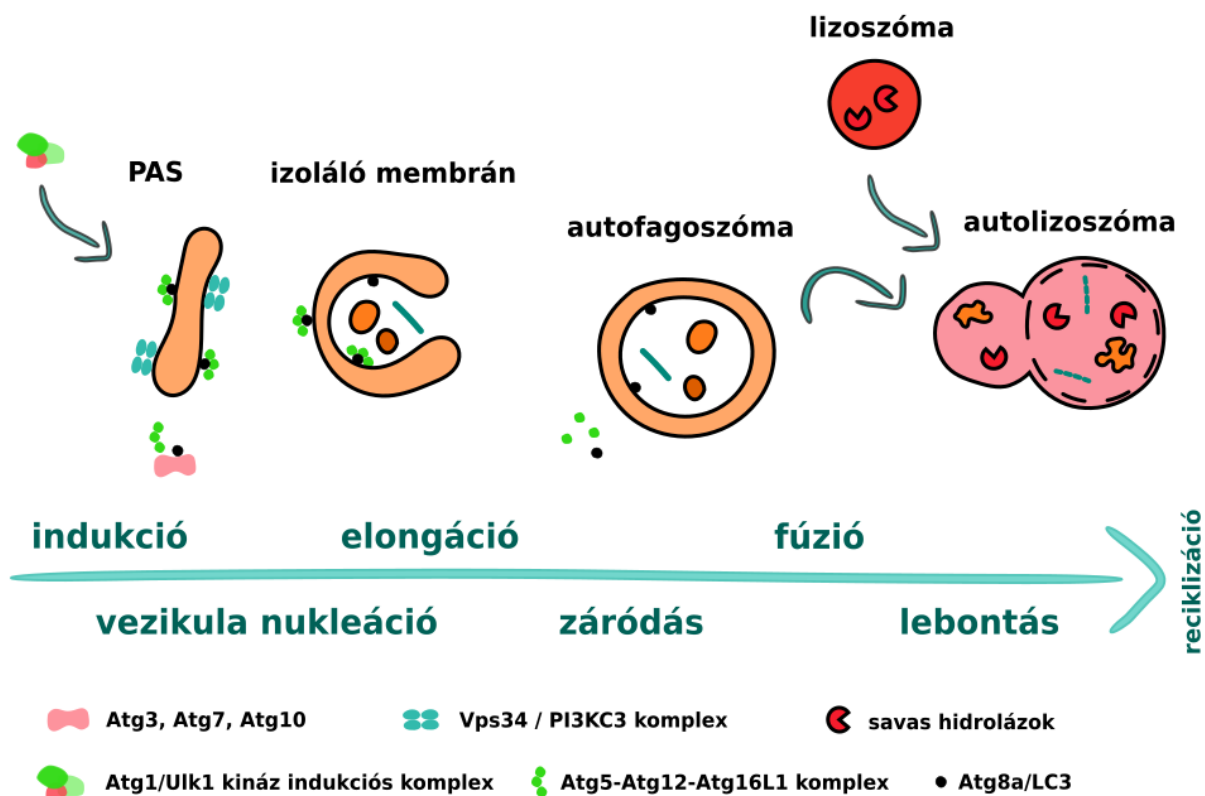
felépítő folyamatok nélkül káros lehet a sejt számára, számos más esetben viszont pont egy intenzíven működő autofágiára van szükség ahhoz, hogy a sejt túlélje az extrém körülményeket.

Noha az autofágia mechanizmusáról sokat tudunk, még mindig nem ismerjük minden aspektusát. Kutatásának fontosságát, relevanciáját mutatja, hogy a témában fellelhető publikációk száma már milliós nagyságrendű (google tudásban az autophagy szó keresés alapján).

1.1. A makroautofágia molekuláris mechanizmusa

1.1.1 Az indukciós komplex működése

A leggyakoribb autofágiát indukáló faktor a patogén támadáson kívül a tápanyaghiány. Élesztőben a legtöbb esszenciális tápanyag (pl. nitrogén, szén, aminosavak és szulfát) megvonása esetén aktiválódik az autofág válasz. Emlősökben bonyolultabb és diverzebb a szabályozási mechanizmus. A legtöbb sejtenyészetben az aminosavak együttes megvonása esetén indukálódik az autofágia. Az egyes aminosavak azonban külön-külön eltérően hathatnak. Ismert továbbá, hogy a különböző szöveteknek is eltérő az aminosav metabolizmusa. Csak a leucin vált ki markáns autofágia indukáló hatást a vázizomban és szívben (Mizushima, 2007). Különböző hormonok és növekedési faktorok szintén hozzájárulnak az autofágia szabályozáshoz. Az aminosavak, inzulin és növekedési faktorok hatása a TOR (*target of rapamycin*) kináz útvonalon konvergálódik (Dibble és Manning, 2013), mely aktív állapotban gátolja az autofágiát. A TOR-nak élesztőben két homológja van (TOR1 és TOR2), melyek eltérő funkcióval rendelkeznek. A TOR1-nek az autofágia gátlásban van szerepe, a TOR2 pedig citoskeletális változásokat szabályoz. Komplexebb élőlényekben egyetlen TOR gén található meg, mely kétféle TOR komplexet képes alkotni, az mTORC1-et és az mTORC2-t (*mechanistic target of rapamycin complex 1 és 2*).



2.ábra: A makroautofágia molekuláris mechanizmusa. Kezdeti lépésként az Atg1/Ulk1 indukciós komplex aktiválódik. Az indukciót követően a megfelelő foszfoinozítid tartalom kialakításáért a Vps34/PI3KC3 komplex felelős, majd további ATG komplexekre van szükség a folyamat végbemeneteléhez: Az Atg5-Atg12-Atg16L1 komplex, valamint az Atg3, Atg7, Atg10 segíti az Atg8a/LC3 konjugációját a membránhoz. A membrán záródását követően a legtöbb ATG komplex disszociál a membránról, a belső membránban található Atg8a/LC3 azonban továbbra is az autofagoszóma maradványában marad. Lizoszómával fuzionálva az autofagoszóma autolizoszóma lesz, és beltartalma a belső membránnal együtt degradálódik. Ezt a lebontást segítik a lizoszómával érkező, savas pH-n működő hidrolázok. A degradációt követően a makromolekulák reciklizálódnak, a membránok pedig újrahasznosulnak.

A TOR jelátviteli útvonal az Atg1/Ulk1 kináz indukciós komplexen keresztül szabályozza az autofágiát (2. ábra). Ennek központi eleme az Atg1/Ulk1 szerin-treonin kináz. Az indukciós komplex elemei továbbá az Atg13, Atg17/Fip200 (*Focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD*) és az Atg101 (Hara és mtsai., 2008; Hosokawa és mtsai., 2009). A komplex működése igen változatos a különböző taxonokban, annak ellenére, hogy az alkotó fehérjék konzerváltak (Mizushima, 2010) A továbbiakban az ecetmuslicában és az emlősökben leírt működést ismertetem részletesebben. Megfelelően magas tápanyagellátottság mellett a TORC1 hozzákapcsolódik az Atg1/Ulk1 komplexhez és foszforilálva tartja az Atg1/Ulk1-et és az Atg13-at mind ecetmuslicában, mind emlősökben (Chang és Neufeld, 2009). Tápanyaghiány esetén a TORC1 gátolt és az Atg1/Ulk1 komplex defoszforilálódik (aktiválódik). Emlősökben

az mTORC1 ilyenkor leválik az Ulk1 komplexekről, mely ekkor áthelyeződik az izoláló membrán képződési helyére. Az Ulk1 ekkor más pozícióban autofoszforylálódik, és foszforylálja az Atg13-at és a FIP200-at, valamint számos más fehérjét (AMBRA1, Beclin-1, Atg14), melyek a vezikula nukleációhoz vagy az autofagoszóma képződéshez kellene. Az Ulk1 szükséges az Atg9 tartalmú vezikulák toborzásához is. A hiperfoszforylált Atg13 éhezés során defoszforylálódik (Hosokawa és mtsai., 2009). Ezzel szemben *Drosophilában* éhezéskor a dTORC1 az Atg1 komplexhez kötötten marad, de az felszabadul a gátlás alól, az Atg1 hiperfoszforylálja az Atg13-at, mely lépés szükséges az autofágia indukciójához (Chang és Neufeld, 2009). *Ecetmuslicában* az Atg17 az Atg1 kináz aktivitásához szükséges, hiányában gátolt az Atg13 hiperfoszforylációja (Nagy és mtsai., 2014b). Ma már ismert, hogy az autofágia képes Atg1-független úton is indukálódni (Braden és Neufeld, 2016)

1.1.2 A vezikula nukleációs komplex működése

Az autofágia indukciójának eredményeként egy speciális membrán jön létre a sejt plazmában, melyet fagofórnak vagy izoláló membránnak nevezünk. Ez kezdetben egy lapos, Golgi ciszternához hasonló szerkezet, mely aztán elongációja során körülövi a citoplazma lebontásra kijelölt részét. (2. ábra) Miután önmagával bezárul, egy kettős membránnal körülvett vezikulum jön létre, ezt hívják autofagoszómának. Az elongációs lépésben fontos szerepe van a foszfatidilinozitol 3-foszfát (PI3P) lipidszignalizációs molekulának. Képződése többnyire a foszfatidilinozitol (PI) átalakulásával történik, melyet a III-as típusú PI3K (foszfatidilinozitol 3 kináz)/Vps34 (*vacuolar protein sorting 34*) katalizál. A Vps34 kináz szintén fehérjekomplexben működik, melynek további tagjai az Atg6/Vps30/Beclin1, Vps15/p150, és az I-es komplex esetén az Atg14/Atg14L, II-es komplex esetén pedig az UVRAG (*UV irradiation resistance-associated gene*) fehérjék. Az autofág vezikulák nukleációjában az I-es komplex vesz részt (Itakura és mtsai., 2008). A II-es komplex az endoszómák kialakulásában, érésében játszik szerepet (Liang és mtsai., 2008). Utóbbi szerepét az autofagoszóma érésében is leírták (Gao és mtsai., 2018). Atg14 hiányában is képes PI3P képződni, amely aktiválja a Mon1-Ccz1 (*Monensin sensitivity 1 - Caffeine, calcium, zinc sensitivity 1*) komplexet az autofagoszómaon. A komplex működése révén Rab7 (*Ras-related protein 7*) toborzódik az autofagoszóma membránjához, ami aztán a későbbi fúziós lépéshez szükséges (Gao és mtsai., 2018). Emlősökben az ATG14L a PI3K komplexet az ER-hez toborozza. A Beclin-1 stabilizáló szereppel bír. A Vps15/p150 feltehetőleg a komplex membránhoz való kapcsolódásához fontos. A DFCP1 (*Double FYVE-containing protein 1*) egy

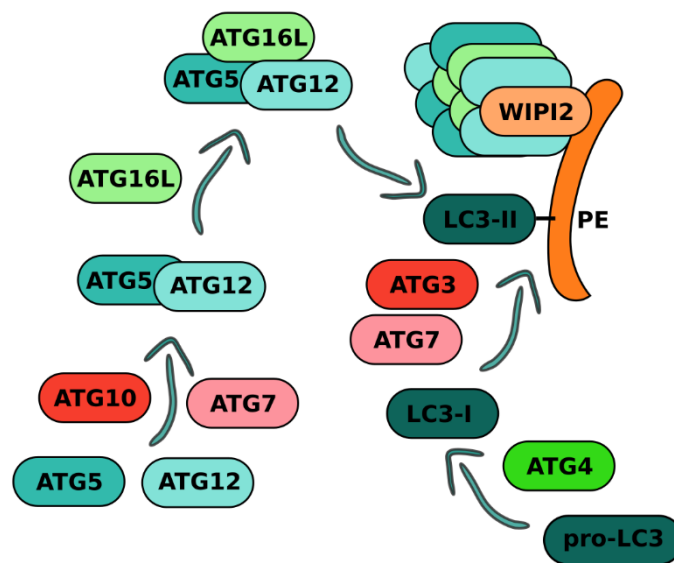
PI3P effektor fehérje, amely az élesztő Atg18 egyik ortológja. *Drosophilában* nem található homológ gén, de bizonyos *Drosophila* fajokban ismert DFCP1 ortológ (Mulakkal és mtsai., 2014). A durvafelszínű endoplazmatikus retikulumnak (DER-nek) azt a riboszómamentes részét, melyből izoláló membrán keletkezik, omegaszómának nevezik. Emlősökben a DFCP1 a tandem FYVE-doménjével képes kötni az omegaszómán lévő PI3P-hez. Lokalizációja igen dinamikusan változik a sejt tápanyagellátottságától függően (Gao és mtsai., 2019). Éhezés hatására már nem kolokalizál a Golgi markerekkel, csak az ER-en található meg, az izoláló membránon, illetve az autofagoszómán (Axe és mtsai., 2008). Funkciójáról keveset tudunk, PAS (*Phagophore Assembly Site*, a fagofór kialakulásának helye) markerként tartják számon. A PI3P-hoz kapcsolódnak még az Atg18 további ortológjai, a WIPI (*WD-repeat protein interacting with phosphoinositides 1-4*) fehérjék. Funkcióikról szintén kevés ismerettel rendelkezünk. A WIPI2B-ről kimutatták, hogy az ATG16L1-gyel kapcsolódik, és az LC3 lipidizációjáért felelős komplexek toborzásában játszik szerepet (Polson és mtsai., 2010). *Drosophilában* az Atg18a és Atg18b fehérjék a WIPI-1 és -2 homológjai, melyek az Atg2 fehérjével kapcsolódnak. A PI3P-hoz kötődés csak az Atg18a esetében ismert. Az Atg18a a Ref(2)P (*refractory to Sigma P* - p62 ortológ), Atg2 és Atg9 kölcsönható partnere, melyek szintén fontosak az autofágiához (Nagy és mtsai., 2014a). Az Atg18b eddigi ismereteink alapján az Atg2-vel lép fizikai interakcióba, és éhezés hatására fokozódik az expressziója (Érdi és mtsai., 2012). Az Atg9 egy transzmembrán fehérje, főleg a membrántranszport folyamatokban van szerepe a fagofór kialakulása során. *Drosophilában* Ref(2)P aggregátumokon halmozódik fel éhező Atg7, Atg8a, és Atg2 mutánsok esetén (Nagy és mtsai., 2014a).

A Vps34 aktivitás gátlásával hatékonyan lehet az autofágiát gátolni. A wortmannin és 3-metiladenin, amelyek a PI3K-k működését gátolják, széles körben használt autofág inhibitorok (Blommaert és mtsai., 1997).

1.1.3 Az ubikvitin-szerű konjugációs komplexek működése

Az izoláló membrán elongációja végén összeolvad, két vége záródik, ezzel létrehozva az elkülönített citoplazmarész körül egy kettős membránt. A membrán növekedés és záródás újabb Atg komplexek (az Atg8 lipidizációs és az Atg12-Atg5-Atg16 konjugációs komplexek) összehangolt működésének eredménye. Az Atg8/LC3 alaphelyzetben a sejtplazmában diffúzan helyezkedik el, ahol az Atg4 cisztein proteáz elhasítja (Hemelaar és mtsai., 2003) (3. ábra). Emlősökben az Atg4B, *Drosophilá*-ban főként az Atg4a-nak ismert ilyen hasító funkciója. Ezen lépést követően a konjugációs komplex további tagjainak működése révén az Atg8 foszfatidil-

etanolaminon (PE) keresztül kovalensen kapcsolódik az izoláló membránhoz (3. ábra). A komplex tagjai egymást E1 - aktiváló (Atg7), E2 - konjugáló (Atg3) és E3 - ligáz (Atg12-5-16) enzimszerű működés révén aktiválják (Tanida és mtsai., 2001; 2002). Maga az Atg12-Atg5-Atg16 heterotetramer is konjugációs lépések során jön létre (Mizushima és mtsai., 2003) (3. ábra). Az Atg7 E1-szerű enzimként aktiválja az Atg12-t is. Az Atg10 ezután képes az Atg12-t az Atg5-höz kapcsolni. A létrejött dimer az Atg16/Apg16L-lel tetramerizálódik és az izoláló membránhoz kapcsolódnak a WIPI2 segítségével, ezáltal jelölődik ki az Atg8/LC3 lipidizáció pontos helye a membránban (Fujita és mtsai., 2008).



3. ábra: Az ubiquitin-szerű konjugációs komplexek működése a makroautofágia során. Az Atg5-öt az Atg10 kapcsolja az Atg7 által aktivált Atg12-höz. A létrejött dimer az Atg16-tal heterotetramert képezve képes az autofág membránhoz kapcsolódni. A kapcsolatot a WIPI2 segíti, mely kijelöli a membránban az Atg8/LC3 lipidizáció pontos helyét. Az LC3 fehérje transzlációját követően pro-LC3 formában található meg a citoplazmában. A létrejött LC3-I-et az Atg4 képes indukción követően hasítani, majd az Atg7 és Atg3 további működése révén az aktivált Atg8a/LC3-I képes az autofág membránban foszfátidil-etanolaminhoz (PE) kapcsolódni (LC3-II).

Az Atg8-PE a fagofór és autofagoszóma külső és belső membránjához horgonyzódik. Az Atg12-5-16 komplex disszociál a membránról, és az Atg4 újabb működése révén lehasítja az Atg8-at is a külső membránról (Tanida és mtsai., 2004), a belső felszínén az autofág lebontásig ott marad (2. ábra). A sejt plazmában diffúzan fellelhető formáját Atg8-I-nek (LC3-I), a membránkötött formát Atg8-II-nek (LC3-II) is nevezik, melyek széles körben alkalmazott markerei az autofágiának (Klionsky és mtsai., 2021). Emlősökben nyolc Atg8 ortológ található

meg, ezek közül a leginkább jellemzett az LC3B szerepe az autofágiában (Wang és mtsai., 2015). *Drosophilában* két Atg8 homológ létezik, az Atg8a és az Atg8b. (Scott és mtsai., 2007).

1.1.4 Az autolizoszóma képződés - a fúzió mechanizmusa

Az autofagoszómák amfiszómává, illetve autolizoszómává alakulásához a vezikulák fúziója szükséges. Az összeolvadás pányvázó és dokkoló fehérjekomplexek, valamint Rab-GTPázok segítségével megy végbe. A HOPS (*homotypic fusion and protein sorting*) pányvázó és SNARE (*soluble Nethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) fehérjék az összeolvadó vezikulák mindkét oldalán megtalálhatóak. Öszekapcsolódásuk, csavarodásuk révén közelítik a két membránt egymáshoz, míg végül megtörténik az összeolvadás. Emlősökben az autofagoszómán elhelyezkedő SNARE fehérje a STX17 (Syntaxin 17), mely képes kapcsolódni a SNAP-29-cel és az endoszóma/lizoszóma SNARE fehérjéjével a VAMP8-cal (Itakura és mtsai., 2012). A HOPS komplex alkotásában többféle fehérje vesz részt: a VPS18 és VPS11 fehérjék stabilizáló szerepűek, a Rab fehérjékhez (Rab7 és Rab2) a VPS41 és VPS39 kötődik (Lőrincz és mtsai., 2019), a SNARE komplexhez kapcsolódás, pedig a VPS33A és VPS16 fehérjék segítségével megy végbe (Kant és mtsai., 2015). *Drosophilában* az autofagoszóma membránjában elhelyezkedő v-SNARE (vakuoláris-SNARE) komplexet a Syx17 és az Usp1 alkotja. A lizoszóma/késői endoszóma oldaláról pedig a Vamp7 fehérje vesz részt a t-SNARE (transz-SNARE) alkotásában (Takáts és mtsai., 2014).

1.1.5 Degradáció és újrahasznosítás

Az autofágia az éhezés során fontos a túléléshez, ilyenkor a sejtek a lebontó működés révén jutnak energiához és makromolekulákhoz. Ma azonban még keveset tudunk az autolizoszómákban lebontásra került makromolekulák reciklizációjáról. A keletkezett aminosavak felhasználására három útvonal tűnik valószínűnek. Egy napig tartó éhezés után a máj glükoneogenezis révén biztosítja az életműködésekhez szükséges cukrot. Amikor a glikogén raktárak kiürülnek, a glükóz-alanin ciklus során alanin képződik a perifériás szövetekben (pl. izom) és a májba szállítódik, ahol glükóz szintézisre használandó el. Az aminosavak másik lehetséges felhasználási módja közvetlenül a sejten belül zajlik, a trikarboxilsav ciklusba (TCA) csatlakozás révén energiatermelési céllal. Harmadrészt a keletkezett aminosavak fehérjeszintézis során is hasznosulhatnak, az éhezésre adott adaptív válasz részeként. Az autofágia másik feladata egyfajta minőségellenőrzés. A hibás, nem megfelelő minőségű fehérjék szelektív degradációjával megelőzhetőek bizonyos sejtfunkció

romlások. Ehhez általában nem szükséges az autofágia indukciója, csak egy folyamatosan működő bazális autofágia. (Mizushima, 2007)

Indukált autofágia esetén a sejtekben megnő az autolizoszómák száma, mely jelentős mennyiségű membránátszerveződést igényel. A folyamat végén nem csak a degradálódott makromolekulák, hanem a lipidek reciklizációja is fontos lépés. Az élesztő Atg15/Aut5/Cvt17 feltételezhetően lipázként működve a belső autofág membrán lebontásában játszik szerepet (Epple és mtsai., 2001). Az élesztő Atg22 (Aut4) fontos a vakuólumban lévő autofág vezikulák eliminációjához (Suriapranata és mtsai., 2000). Feltehetőleg aminosav effluxerként (Yang és mtsai., 2006) más vakuoláris permeázokkal együtt működik. Az emlősökben az Atg22-nek nincs ortológja. A lipidek és szénhidrátok újrahasznosításáról még viszonylag kevés ismerettel rendelkezünk.

Az autofágia folyamatának lecsengéséhez feltehetőleg egy újbóli mTOR aktiváció szükséges. Az autolizoszóma beltartalmának degradációja egyfajta jelként szolgál az mTOR reaktivációhoz, mely aztán elősegíti a lizoszómák újraképződését az autolizoszómákból (Yu és mtsai., 2010).

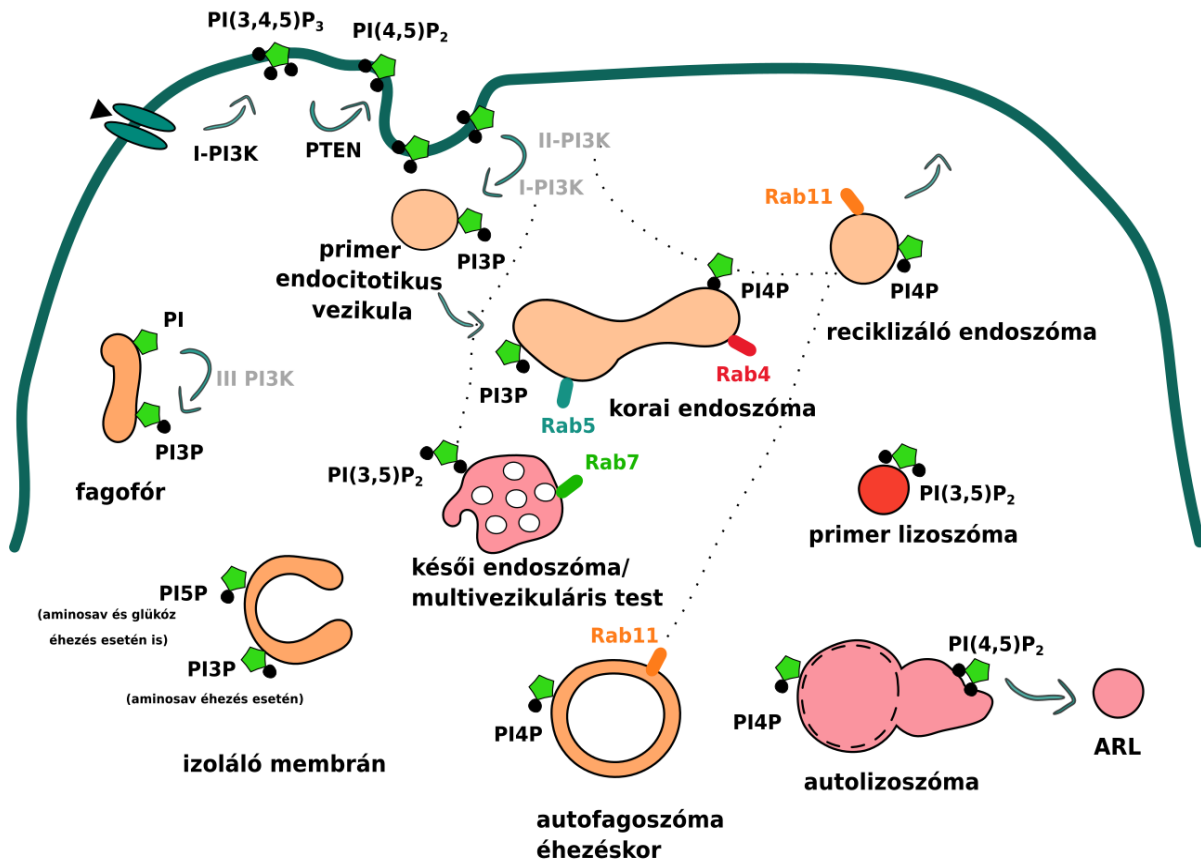
1.2. Lipidszignalizáció az autofágiában

Az intracelluláris folyamatok finomhangolásának fontos szereplői a lipidek. A membránok lipidösszetétele egyrészt fizikailag is meghatározza funkciójukat: a szfingolipidek jelenléte például rendezett és vastag membránt eredményez, amelyek így kevésbé rugalmasak és folyékonyságuk is alacsony. Ezen felül a membránokban lévő lipidek fehérje dokkoló helyként is funkcionálhatnak. A már említett szfingolipidek a koleszterinnel együtt például képesek speciális mikrodoméneket alkotni a membránban. Ezek az ún. lipid tutajok fontos szerepet játszanak a fehérjék, lipidek szétválogatásában a különböző membránok között. A PE-konjugált ATG8, vagy a különböző foszfoinozitidek az autofág-fehérjék toborzása során fontos dokkoló platformok. Így ezen molekulák jelenléte vagy hiánya a membránokon kulcsszereppel bír az autofág folyamat szabályozása szempontjából.

1.2.1 A foszfoinozitidek metabolizmusa és az autofágia

A foszfoinozitidek fontos másodlagos lipidhírvivő molekulák, amelyek részt vesznek a jelátviteli folyamatokban és a fehérjék toborzásában a különböző membránokon. A zsírsavláncaikat az inozitol fejrészrel egy glicerol és egy inorganikus foszfát csoport kapcsolja össze (5. ábra) (Balla és mtsai., 2009).

. Az inozitol eltérő mértékben és pozícióban (D3, D4 és D5) képes foszforilálódni, amihez különféle fehérjék tudnak kapcsolódni. Ezen tulajdonságuk révén elkülöníthetővé teszik az eukarióta sejt membránjait. A foszfoinozitidek kinázok és foszfatázok szabályozott működése révén képesek egymásba átalakulni (Nicot és Laporte, 2008) (4. ábra).



4. ábra: A foszfoinozitidek átalakulási folyamatai. A különböző organelumok foszfoinozítid tartalma eltérő, mely elkülöníthetővé teszi az eukarióta sejt membránjait. A sejtmembránban főként $PI(3,4,5)P_3$ és $PI(4,5)P_2$ található meg. A lefűződő primer endocitotikus vezikulumok $PI3P$ szignállal rendelkeznek. A korai endoszómák tubuláris dománje főként $PI4P$ tartalmú, mely lefűződve reciklizáló endoszómát képezhet. Éhezéskor ezek membránpótléklul szolgálnak az autofágia során. A korai endoszómák $PI3P$ domináns részén fűződnek le a késői endoszómák, bennük a $PI3P$ $PI(3,5)P_2$ -tá alakul át. Az autofágia iniciációja során a PI $PI3P$ -vé alakul. A vezikula elongációja során komplett éhezés esetén $PI5P$ -tartalmú a membrán, amennyiben csak aminosav-éhezés van, $PI3P$ -t is tartalmaz az autofág membrán. Az autofagoszóma záródásakor $PI4P$ tartalmú a membrán, lizoszómákkal való fúziójakor $PI(3,5)P_2$ is megtalálható rajta. A reciklizációhoz pedig $PI(4,5)P_2$ szükséges. ARL: autolizoszóma reciklizálódása lizoszómává (autophagic lysosome reformation). Az ábra Armi és mtsai., 2013 cikke alapján átdolgozva a szerző munkája.

A $PI(3,4,5)P_3$ (PIP_3) számos növekedési faktor hatására keletkezik az I-es típusú $PI3K$ működése révén. Ez a lipidszignalizációs molekula részt vesz a normális növekedésben és fejlődésben. A PIP_3 a plazmamembránban $PTEN$ hatására $PI(4,5)P_2$ -vé alakul, míg a $SHIP2$ 5-

foszfatázként PI(3,4)P₂-vé alakítja a PIP3-at. (4. ábra) A PIP3 és a PI(3,4)P₂ gátló faktorai az autofágiának (Petiot és mtsai., 2000).

Az endolizoszómális rendszerben a foszfatidilinositol-3 foszfát (PI3P) az egyik fő foszfoinozítid komponens. A PI(4,5)P₂-ből képes átalakulni az endocitózis helyéül szolgáló plazmamembrán részen. A periférián lokalizált korai endoszómákon két kináz is hozzájárul a szintéziséhez: a II-es és a III-as típusú PI3K komplexek. Ezek nem redundáns szerepűek. Az előbbi csak kis mértékben (20%) járul hozzá a PI3P mennyiségéhez, viszont a Rab11 aktivitás (ami az endocitotikus reciklizációhoz kell) hiányukban nagy mértékben lecsökken, vagyis főleg a reciklizációhoz járul hozzá (Campa és mtsai., 2018). Magán a reciklizáló endoszómán már nincs jelen a PI3P, helyette PI4P található meg. Itt a PI3P hidrolízisét feltehetőleg az MTM1 végzi, mivel MTM1 csendesített sejtekben megnő a PI3P mennyisége és a Rab11 aktivitás. A PI3P nagy (80%) része a Vps34 révén képződik a periférián lokalizált korai endoszómákon, de Vps34 gátlás esetén a reciklizáció nem szenved zavart (Campa és mtsai., 2018). Míg a lebontás útvonalában szerepet játszó PI3P-pozitív endoszómákon a PI3P 5-kináz (Fab1, PIKFYVE az emlősökben) segítségével PI(3,5)P₂-vé alakulnak át (Odorizzi és mtsai., 1998). A PI(3,5)P₂ ESCRT-III-at toboroznak a membránhoz, majd a multivezikuláris testekbe kerülnek. Az autofágia iniciációja során a III-as típusú PI3K komplex működése révén a PI-ből PI3P lesz, mely ATG fehérjéket toboroz a formálódó autofagoszómához. De egy későbbi lépés során azonban a foszfoinozítidok többféle konverziójára van szükség, hogy az autofagoszómá-lizoszóma fúzió végbemehessen. Például PI4P-ra van szükség az autofagoszóma oldaláról (Wang és mtsai., 2015), míg PI(3,5)P₂ szintézisre a lizoszómán. A fúziót követően megnő a lokális PI(4,5)P₂ koncentráció, ami az autolizoszómák reciklizációjához szükséges. A PI(4,5)P₂ az autofagoszóma-lizoszóma újraképződés során (ALR *autophagic lysosome reformation*) csak egy klatrintartalmú membrán részen dúsul fel, melyből a lizoszómák hasadnak ki (Armi és mtsai., 2013). Élesztőkben a PI3P-5 kináz mutációja nem okoz autofágiában változást, míg *Drosophilában*, *C. elegans*ban és emlősökben felhalmozódnak az Atg8/LC3-pozitív struktúrák a kináz hiányában. Egér neuronokban a PI(3,5)P₂ csökkenés p62 felhalmozódást okoz, ami arra utal, hogy az autofág lebontáshoz szükséges a PI(3,5)P₂ (Ferguson és mtsai., 2009).

A PI(3,5)P₂ autofág funkcióját illetően két elmélet létezik. Az egyik alapján egy érési jelként funkcionál a késői endoszómákon, illetve lizoszómákon jelen lévő PI(3,5)P₂, és a vezikulafúzióhoz szükséges, hogy autolizoszómák keletkezessenek. A másik modell szerint a reciklizációhoz szükséges a PI(3,5)P₂. (Ferguson és mtsai., 2009) Ez esetben a membránok nem képesek újabb autofág folyamatban résztvenni, és ez eredményezi a p62 jel felhalmozódását a

PI(3,5)P₂ hiányában. Ez utóbbit támasztja alá, hogy egér neuronokban a p62 ko-lokalizált a LAMP-2 lizoszóma markerrel, ami azt sugallja, hogy a fúzió lezajlott. Ez persze nem zárja ki annak a lehetőségét, hogy a fúzióhoz is szükséges. Az is lehetséges, hogy a két organelum membránja közel van egymáshoz, de beltartalmuk nem egyesül (Ferguson és mtsai., 2009).

A PI5P-ről viszonylag kevés ismerettel rendelkezünk. Feltételezik, hogy az Akt (vagy Protein kinase B) útvonalon hat, illetve DNS károsodás esetén a sejtmagi válaszreakciókban van szerepe (Rameh és mtsai., 1997). Bizonyos szövetekben a Vps34 hiányában is jól működik az autofág degradáció (Zhou és mtsai., 2010). Bizonyos modellekben (vese, máj és szív) vizsgálva pedig a kináz hiánya teljes autofág gátlást eredményez (Jaber és mtsai., 2011). Ahol nem okoz a Vps34 hiánya autofág gátlást, feltehetőleg más kináz vehet részt a PI PI3P-vé alakításában (Armi, és mtsai., 2013). Vannak arra is bizonyítékok, hogy ilyen esetekben nem szükséges a PI3P jelenléte az iniciáció során (Mcalpine és mtsai., 2013). Glükóz megvonás esetén kimutatták, hogy a PI5P képes elősegíteni az autofagoszómák képződését PI3P hiányában (Vicinanza és mtsai., 2015). A foszfoinozitidek folyamatos átalakulásait kinázok és foszfatázok összehangolt munkája eredményezi. Ezen fehérjék toborzását nagyrészt a Rab fehérjecsalád kontrollálja (4. ábra).

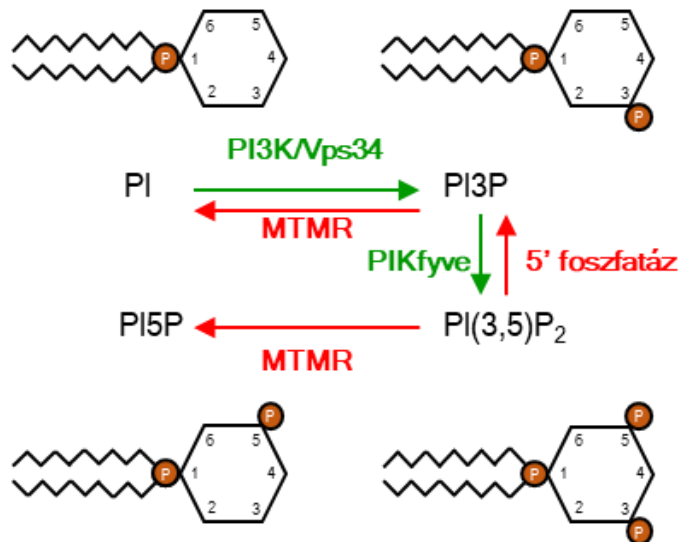
1.2.2 A myotubularinok szerepe az autofágiában

Az eukariótákban a myotubularin konzervált fehérje család a tirozin-foszfatázok szuperfamilájába tartoznak. Emlősökben 16 fehérje alkotja a csoportot. Ide tartozik a névadó MTM1 és még 15 MTMR (*MTM-related*) (Laporte és mtsai., 2003).

Elsőként a hMTM1-et írták le, melynek mutáns allélja myotubuláris myopátiás betegekben fordul elő (Laporte és mtsai., 2003). A betegség elsősorban respirációs defektusokat okoz, és gyakran gyermekkori halálhoz vezet. A betegek vázizomsejtjeinek morfológiája megváltozik, kerekded, dedifferenciálódott izomsejtek figyelhetők meg bennük, ahol a sejtmagok centrálisan helyezkednek el. Az ilyen tüneteket okozó centronukleáris myopátiák bizonyos esetében a hMTMR14 mutációját figyelték meg. A myotubularinok hibás működéséhez ezen kívül más betegségeket is társítottak. Ilyenek például az MTMR2- illetve az MTMR13/Sbf2 mutációja esetén leírt autoszómás recesszív öröklésű Charcot Marie-Tooth neuropátia, ami a Schwann sejtek hibás proliferációjának következtében demyelinizált motoros és szenzoros idegrostokat eredményez (Senderek és mtsai., 2003; Houlden és mtsai., 2001). Az MTMR2 és MTMR5/Sbf1 mutációi hibás spermatogenezishez és azoospermiához vezetnek (Firestein és mtsai., 2002). A myotubularinok molekuláris mechanizmusáról viszonylag keveset

tudunk. A patomechanizmus kapcsán a hibás membránforgalmat szokták feltételezni (Nicot és Laporte, 2008).

A myotubularinok szubsztrátjai a tirozin foszfatáz név ellenére nem fehérjék, hanem foszfoinotitidek. Az inozitolgyűrű D3 pozíciójában lévő foszfátot képesek hasítani, *in vitro* mérések alapján szubsztrátjaik a PI3P, és a PI(3,5)P₂ (Schaletzky és mtsai., 2003; Begley és Dixon, 2005). Ez alapján potenciálisan szerepet játszanak az endo-lizoszómális és az autofág útvonalak szabályozásában (5. ábra).



5. ábra: A myotubularin foszfatázok (MTMR-ek) működése. 3-foszfatáz működésük révén szerepet játszanak az endolizoszómális és autofág folyamatok szabályozásában. A PI3P defoszforilálása révén PI jön létre, míg a PI(3,5)P₂ átalakításával PI5P-t termelnek. A foszfoinotitidek átalakításában más enzimek is közreműködnek. Kinázként működik például a PIKfyve (egy PI3P kináz), illetve a PI3K/Vps34 kináz. Az MTMR-eken kívül más foszfatázok (például 5' foszfatázok) is hozzájárulnak a dinamikus átalakító működésekben. Forrás: (Manzéger és mtsai., 2021).

A PI(3,5)P₂ hidrolízisével PI5P keletkezik, mely alaphelyzetben igen kis mennyiségben van jelen a sejtekben.. *Saccharomyces cerevisiae*-ben az MTMR3 ektopikus expressziójával kimutatták, hogy megnő a PI5P mennyisége a sejtekben, melyet később az MTM1 túltermelés esetén is kimutattak (Walker és mtsai., 2001; Schaletzky és mtsai., 2003). Élesztő sejtekben ozmotikus stressz hatására nő meg a PI5P mennyisége (ekkor lesz kimutatható mennyiségű). A PI5P-pozitív struktúrák azonban nem ko-lokalizálnak az endoszómális markerekkel (Dove és mtsai., 1997).

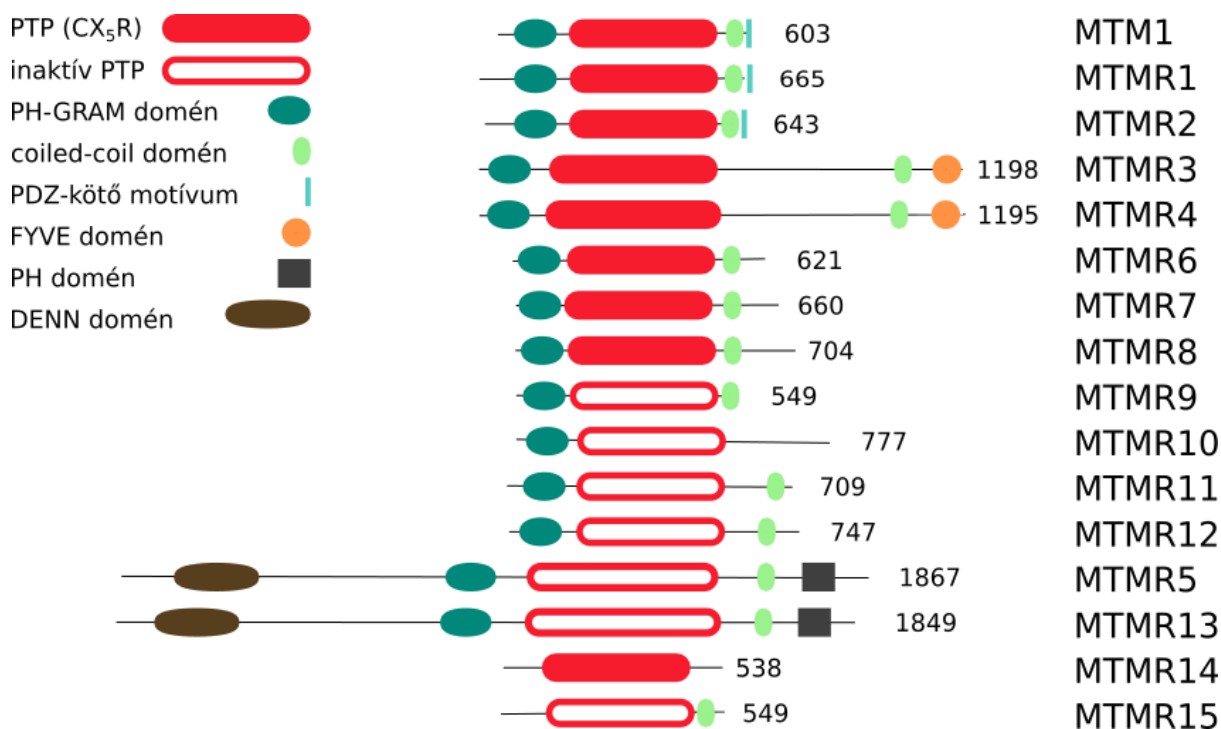
A humán genomban kódolt 16 myotubularin típusú fehérje közül kilenc aktív, CX5R motívumot tartalmazó foszfatáz doménnel (PTP- *protein tyrosine phosphatase*) rendelkezik (6. ábra). A többi fehérje inaktív PTP-t tartalmaz. A fehérjecsalád közös jellemzője továbbá a PH-GRAM domén (*Pleckstrin Homology-Glucosyl transferases, Rab-like GTPase activators and*

myotubularins) és az ún. coiled-coil domén. Előbbi a fehérje-fehérje és fehérje-lipid interakciókért felel. A kapcsolódó partner myotubularinonként változhat. A GRAM domén segítségével például az MTM1 a PI(3,5)P₂-ot ismeri fel, míg az MTMR3 a PI5P-ot preferálja inkább (Doerks és mtsai., 2000; Papers és mtsai., 2006). Némely MTM-nek van PDZ illetve FYVE doménje is (6. ábra).

Az aktív foszfatáz doménnel rendelkező myotubularinok némely esetben heterodimerként működnek együtt az inaktív fehérje rokonaikkal (Clague és Lorenzo, 2005). Az így létrejött dimernek megváltozik az aktivitása, illetve szubcelluláris lokalizációja. Az MTMR6-9, valamint MTMR13-2 esetén leírták, hogy a kapcsolat révén megnő a fehérjepartnerek féléletideje (Zou és mtsai., 2009). A heterodimerizáción kívül előfordulhat, hogy az aktív foszfatázok homodimerként, vagy oligomerként látnak el - feltehetőleg a monomer változattól eltérő - funkciót (Laporte és mtsai., 2003).

Az MTM1 és MTMR2 képesek heterodimerként működni az inaktív PTP-vel rendelkező MTMR12-vel (más néven 3-PAP). Az MTM1-nek a kötés hatására eltűnik a plazmamembrán körüli lokalizációja. Az MTMR2-ről pedig kimutatták K562 és COS-7 sejteken, hogy perinukleárisan helyezkedik el (Nandurkar és mtsai., 2003). Az MTMR2-vel kapcsolatban leírták azt is, hogy képes az MTMR5-tel és MTMR13-mal is kapcsolódni. Az MTMR6 és MTMR7 pedig képesek kötődni az inaktív MTMR9-hez. Ezekhez a fehérje-fehérje kapcsolatokhoz a coiled-coil domén megléte szükséges.

A myotubularinok működésének bonyolultságát mutatja az MTMR3-mal kapcsolatban leírt *feed-forward* mechanizmus is. Egy kísérletben megfigyelték, hogy az MTMR3 PH-GRAM doménjén keresztül a PI(3,5)P₂-hoz kapcsolódva defoszforilálja azt. A keletkező PI5P aktiválja az MTM1-et, ami ezután heptamerként allosztérikusan aktiválja az MTMR3-at, de további myotubularinokra is hat, aktiválja az MTMR6-ot és önmagát a monomer MTM1-et is (Clague és Lorenzo, 2005).



6. ábra: A myotubularinok doménszerkezete. Az emlősökben a myotubularin fehérjecsaldába sorolható az MTM1-en kívül 15 hasonló fehérje (MTMR1-15). Az aktív foszfatáz doménnel (PTP CX₅R) rendelkező fehérjék foszfoinozítideket képesek átalakítani. Az inaktív foszfatáz doménnel (inaktív PTP) rendelkező családtagok képesek heterodimert alkotni az aktív PTP-vel rendelkező myotubularinokkal, és így módosítani a hatásukat. A legtöbb MTM/MTMR rendelkezik PH-GRAM és coiled-coil doménnel. Előbbi révén fehérje-fehérje, illetve fehérje-lipid interakciók valósulnak meg, utóbbi pedig a heterodimerizációhoz fontos. A PDZ, DENN és FYVE csak néhány családtagra jellemző doménszerkezet, melyek további specifikus fehérje-fehérje interakciót, vagy foszfoinozítidekkel való kapcsolódást tesznek lehetővé.

A kép a szerző saját ábrája, Zou és mtsai., 2012a. cikke alapján módosítva.

Konzerváltságuk és hasonló szubsztrátspecifitásuk ellenére mutációik különböző betegségekhez vezetnek. Így felmerül a kérdés, hogy mennyire redundáns a szerepük, illetve miben és hogyan térnek el a molekuláris mechanizmusuk.

1.2.2.1 A myotubularinok *Drosophilában*

Ecetmuslicában 7 tagja van a myotubularin fehérjecsaldának. Négy *Drosophila* myotubularinnak van aktív foszfatáz doménje. A továbbiakban ezekről lesz szó részletesebben. Az *mtm* ortológjai az emlős MTM1, MTMR1 és MTMR2 fehérjék. A plazmamembránon helyezkedik el, illetve olyan membránokon, amikből korai endoszómák lesznek. Szerepét leginkább a sejtvez szabályozása kapcsán írták le (Velichkova és mtsai., 2010). Az aktin mellett a III-as típusú intermedier filamentumhoz, a desminhez kapcsolódik. Részt vesz továbbá a sejtorganellek pozicionálásában. Ezen funkciója konzervált, *Drosophilán* kívül

megfigyelték zebrahalban és egérben is, hogy csökkent működése a sejtmag és a mitokondriumok áthelyeződését eredményezi (Hnia és mtsai., 2012). *mtm1* hiányában megnő az izomsejtek szarkolemmaiban az integrin turnover, ami integrin feldúsuláshoz vezet a PI3P gazdag korai endoszómákon (Ribeiro és mtsai., 2011). Az izomsejteken felül hozzájárul az immunsejtek funkciójához (Velichkova és mtsai., 2010). Mind a sejtmag átrendeződése, mind a felborult integrin transzport megfigyelhető az X kromoszómához kapcsolt centronukleáris myopátiák esetében is.

Az MTMR3 és MTMR4 közös *Drosophila* ortológja a CG3632. Emlős sejtvonalakon az MTMR4-et először a korai endoszómákon mutatták ki, ahol R-SMAD-ok defoszforilálásában játszanak szerepet, ezzel pedig hozzájárulnak a TGF β és a BMP útvonal gátlásához (Yu és mtsai., 2010). Ez a szerepük konzerváltnak tűnik. A *Drosophila* CG3632 specifikusan köti a Smad1-et és annak defoszforilálása révén gátolja a BMP (*Bone morphogenetic protein*) jelátviteli útvonalat, amely többek között a szárnyerezet kialakításában játszik szerepet (Yu és mtsai., 2010). Később leírták szerepüket az endoszómális szállítmán szortírozásában Rab11-függő módon a korai és a reciklizáló endoszómák határfelületén emlős sejtvonalakban (Naughtin és mtsai., 2010).

Az ecetmuslica *Mtmr6* humán ortológjai az MTMR6, MTMR7, MTMR8. Emlősökben a Ca²⁺-aktivált K⁺ csatorna gátlásban írták le szerepét CHO-KCa3.1 hörcsög sejtvonalban (Srivastava és mtsai., 2005). A gátló hatást a coiled-coil és PH-GRAM doménjén keresztül fejt ki. Más myotubularinok erre nem képesek, de egy kiméra *Mtm1* létrehozásával, ami tartalmazza az *Mtmr6* coiled-coil és PH-GRAM doménjét képesek voltak gátolni a KCa3.1 ioncsatornát. (Papers és mtsai., 2006) Továbbá a mikropinocitózis szabályozásban, illetve az apoptózis gátlásban is szerepet játszik (Maekawa és mtsai., 2014; Zou és mtsai., 2009). Mind a fonálféregben, mind az ecetmuslica szárny imaginális korongjában kapcsolatba hozták a gént endocitotikus folyamatokkal. *Mtmr6* mutánsokban zavart szenved a Wnt szekréció (Silhankova és mtsai., 2010). Humán sejtekben az MTMR8-9 komplex képes a PI3P szint csökkentése mellett gátolni az autofágiát (Zou és mtsai., 2012a). A *Drosophila* *Mtmr6* izom-specifikus kiütése esetén sérül a muslicák repülési képessége (Schnorrer és mtsai., 2010).

A EDTP (*egg-derived tyrosine phosphatase*) az emlős MTMR14/Jumpy *Drosophila* homológja. A Jumpy név a motoros funkciók károsodásából eredő fenotípusra utal. Ezzel összhangban számos publikációban jelent meg az emlős MTMR14 esetén, hogy szerepet játszik az izomműködés során a kalcium anyagcserében (Shen és mtsai., 2009; Romero-Suarez és mtsai., 2010). Az MTMR14 funkcióvesztéses egerek kisebb tömegűek, főleg idős korban nagy

a súlykülönbség a vad típushoz képest (Lv és mtsai., 2015). Továbbá leírták szerepét az autofágiában is (Hnia és mtsai., 2012; Gibbs és mtsai., 2010; Vergne és mtsai., 2009; Romero-Suarez és mtsai., 2010). Az MTMR14/Jumpynak főleg az öregedés során van fontos autofágia szabályozó szerepe (Powers és Reid, 2010). Nem csak az izomszövetben van fontos funkciója, mivel szövet-specifikus alulszabályozása a motoneuronokban megnövekedett élettartamot eredményez (Xiao és mtsai., 2019).

Kutatócsoportunk kimutatta, hogy az EDTP gátló faktorként vesz részt az autofágia szabályozásban ecetmuslicában. Az AUTEN-67-tel (*autophagy enhancer-67*) kismolekulával az MTMR14/EDTP specifikus gátlásán keresztül hatékonyan lehet autofágiát indukálni muslicákban, Hela sejtekben, valamint egér szövetekben (vese epithél sejtekben, hasnyálmirigyben és szívizomban) (Papp és mtsai., 2016). Az AUTEN-67 kezelés gátolja az ubiquitinált fehérjék progresszív felhalmozódását a humán Huntingtin fehérje patológiás, 128Q transzgenikus formáját expresszáló *Drosophila* agysejtekben. A vegyület jelentősen javította az állatok mászókéességét, és mérsékelten meghosszabbította élettartamukat (Billes és mtsai., 2016) Hasonlóan autofágia indukáló hatású az AUTEN-99 (*autophagy enhancer-99*) kismolekula is (Kovács és mtsai., 2017). A hatóanyag autofágiát indukáló hatását EDTP túltermeléssel sikeresen lehet antagonizálni. Az AUTEN-99 átjut a vér-agy gáton, így hatékony neuroprotektív gyógyszerjelöltként szolgál különféle neurodegeneratív megbetegedések megelőzésében és kezelésében.

1.3. Az autofágia típusai

1.3.1 Szelektív és nem szelektív autofágia

Az autofág lebontás során a citoplazma komponensek degradációja sok esetben nem szelektív módon megy végbe. Ilyenkor a sejt plazmában kialakuló fagofór körülnövi a sejt komponenseket kialakulásának helyén, melyek aztán lebontásra kerülnek. Ilyen nem szelektív lebontás történik például éhezési stressz során. Számos esetben azonban specifikus komponensek jelölődnek ki a lebontásra. Ilyen szelektív autofágia révén bomlanak le fehérje aggregátumok, organelumok és patogének. Ilyenkor az autofág membránhoz kapcsolódó ún. kargó-receptorok specifikusan kötődnek a lebontásra szánt szállítmányhoz.

Az egyik elsőként azonosított szelektív lebontási útvonal az élesztő Cvt (*cytoplasm-to-vacuole targeting*), melynek például a retrotranszpozonok elleni védekezésben van fontos szerepe (Suzuki és mtsai., 2011). A folyamatban szerepet játszó vezikulák általában kisebb méretűek, mint a nem szelektív, éhezés-indukált autofág struktúrák (Baba és mtsai., 1994).

Később emlős sejtekben is azonosítottak szelektív lebontásban szerepet játszó fehérjéket. Ezek különböző kargó megkötése révén képesek a lebontásra szánt autofág vezikulák beltartalmát szabályozni. Ilyen az NCOA4 (*Nuclear Receptor Coactivator 4*), mely az intracelluláris ferritinnek a kargó-receptora. Amikor nagy mennyiségű vas van a sejtekben, a ferritin segít megakadályozni a káros oxidatív reakciókat. Amint csökken az intracelluláris vas mennyisége, a ferritin szelektív autofágiával (ferritinofágiával) lebontásra kerül (Mancias és mtsai., 2014).

A p62/SQSTM1 [emlősben *Sequestosome-1*; *Drosophilában* Ref(2)P] az egyik leginkább jellemzett szelektív autofágia receptor. Az autofág membránokhoz az LC3-on keresztül képes kapcsolódni, valamint képes megkötni az ubiquitinált fehérjéket is. Egy fehérje különböző ubiquitináltsági állapota eltérő sejtes válaszokat vált ki. Például a K48-as aminosavhoz kötött ubiquitin a proteaszóma rendszer általi lebontást triggereli, a K63-as, pedig inkább az autofágiát. A p62 oligomerek inkább a lineáris és K48-hoz kapcsolt poliubiquitinhez, illetve a monoubiquitinált fehérjékhez kötnek (Wurzer és mtsai., 2015). A p62 az LC3-tól függetlenül is szerepet játszik a kihorgonyozott, ubiquitinált citoplazmatikus komponensek lebontásában. Az eredmények azt sugallják, hogy az autofágia során a p62 képes az LC3 kötés mellett más autofág fehérjéhez is kötődni, mint például az Ulk1-hez (Itakura és Mizushima, 2011).

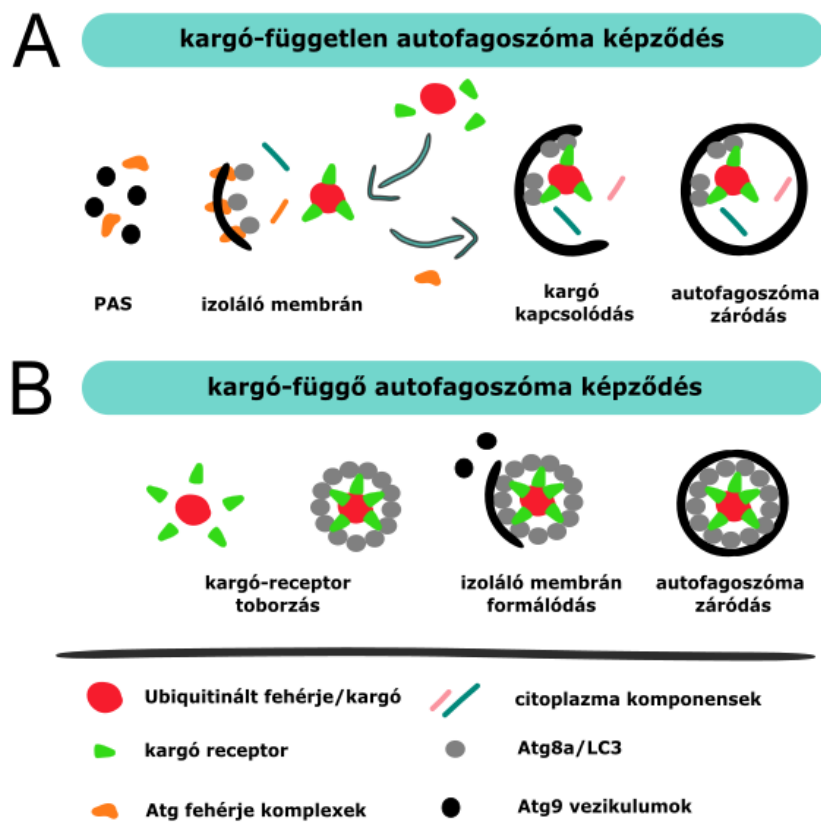
Az NBR1 (*neighbor of BRCA1 gene 1*) a p62-höz hasonló, de tőle függetlenül működő autofág receptor, melynek LC3- és ubiquitin-kötő doménjei vannak (Kirkin és mtsai., 2009).

A CALCOCO2/NDP52 (*nuclear dot protein 52*) szintén egy szelektív autofágiában szerepet játszó fehérje. Az intracelluláris baktériumok eliminálása és sérült mitokondriumok lebontása során tölt be fontos funkciót. Dimer formában a cink-ujj doménon keresztül elsősorban több különböző ubiquitin lánchoz képesek kapcsolódni, mintsem egy láncon több ubiquitinhez (Xie és mtsai., 2015).

A sérült mitokondriumok szelektív lebontásában (mitofágia) azonosított receptor a Nix, mely az eritrociták differenciációjában is fontos szereppel bír (Novak és mtsai., 2010).

Szelektív autofágia esetén a lebontásra szánt fehérje (kargó) triggereli az autofagoszómák kialakulását. A kargó-receptorok szoros kapcsolata az ATG8-szerű lipid-kötött fehérjékkel eredményezi azt, hogy ilyen esetben nem kerül lebontásra más citoplazma-komponens (7/A. ábra). Vannak bizonyítékok arra, hogy az éhezés- vagy rapamycin-indukált autofágiának is van szelektív lebontási módja. Rapamycin hatására például az endoplazmatikus retikulum Atg39- és Atg40-közvetített szelektív autofágiával képes bomlani (Mochida és mtsai., 2015). Éhezés hatására az izoláló membrán a kargótól függetlenül alakul. Később

azonban az ATG8 fehérjecsalád tagjainak lokális koncentráció dúsulása a membránban képes toborozni kargó-receptorokat. (7/A. ábra) Élesztőben például a prApe1 kargó éhezés hatására a vakuólumhoz toborzódik. Emlősökben és *Drosophilában* is az éhező (vagy rapamycinnel kezelt) sejtekben a p62/Ref(2)P receptor az LC3/Atg8 lipidizációt követően toborzódik az autofág membránhoz (Allen és mtsai., 2020; Berger és mtsai., 2006) (7/A. ábra). Ezekben az esetekben a szelektív lebontás mellett a sejt-komponensek nem szelektív módon is képesek degradálódni. Érdeemes tehát kargófüggetlen és kargófüggő autofagoszóma formálódásról beszélni a szelektív és nem szelektív autofágia helyett.



7. ábra: A szállítmány-függő és független autofág útvonalak összehasonlítása. A: Éhezés indukált autofágia esetén az ubiquitinált fehérje aggregátumok először a szállítmány-receptorokhoz (kargó-receptor) kötődnek. Az izoláló membrán ettől függetlenül alakul ki, az Atg fehérjekomplexek működése révén zajlik az Atg8 lipidizáció. Ehhez szelektív módon tud kapcsolódni a kargó-receptor a lebontásra szánt szállítmánnyal. Ez esetben nincs kizárva, hogy más citoplazma komponensek is az autofagoszóma belsejébe kerüljenek, majd degradálódjanak. **B:** Kargó-függő autofagoszóma képződés történik az emlősökben szelektív autofágia során, illetve az élesztő Cvt útvonal is hasonlóan zajlik. Ilyenkor a lebontásra szánt organelumok vagy fehérjék köré toborzódik a kargó-receptor és az azt megkötő adaptor (általában Atg8). Köréjük épül fel az izoláló membrán. A szoros receptor-adaptor kapcsolat miatt ez esetben kizáródnak az autofagoszóma belsejébe más sejt-komponensek, vagyis szelektív

módon csak a kargó-receptor és az általa megkötött szállítmány degradálódik. Az ábra Zaffagnini és Martens, 2016-os cikke alapján készült, a szerző saját munkája.

1.3.2 Bazális és stressz indukált autofágia

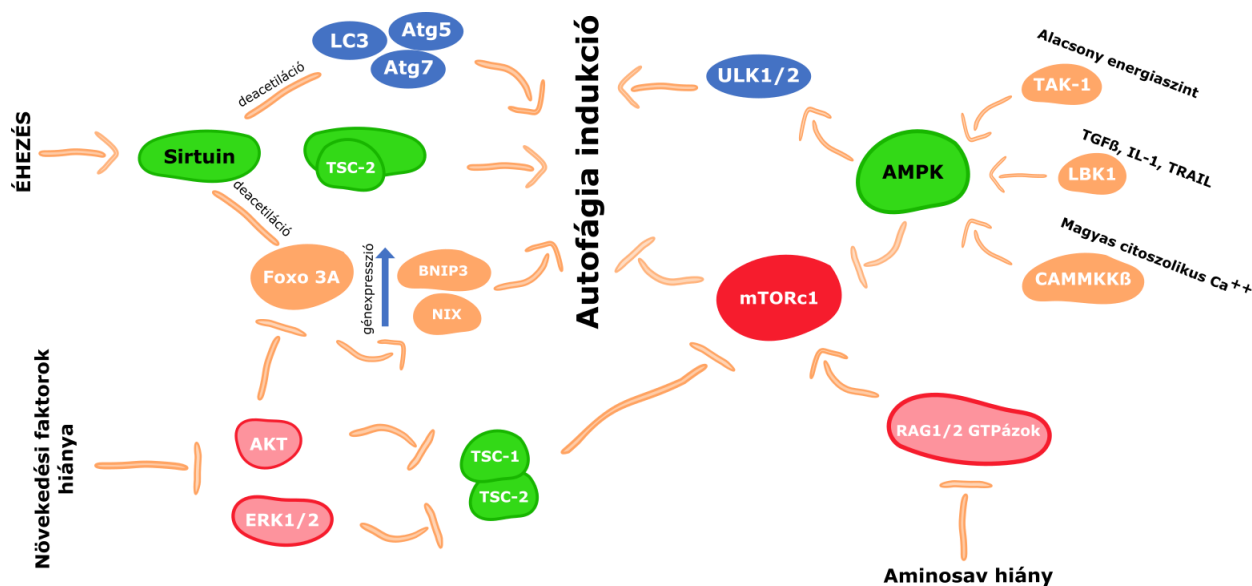
Az autofágia szabályozása és molekuláris mechanizmusa sejtípustól és fiziológias állapottól függően változhat. Néha arra van szükség, hogy a hibás sejt plazma komponensek eliminálódjanak, néha inkább építő kövekre van szüksége a sejtnak a felépítő folyamatokhoz. Bizonyos esetekben pedig a nagy mennyiségű energia szükséglet fedezése miatt van szükség az autofág lebontásra. Bazális autofágia inkább a sejtes homeosztázis fenntartásában játszik szerepet a makromolekulák reciklizációja révén, míg az indukált autofágia inkább a gyors átépítő folyamatokhoz szükséges, valamint stressz során energiával szolgál és segíti a túlélést. Ezen állapotok nem egyértelműen korrelálnak az autofág lebontás mértékével. Bizonyos sejtekben a bazális autofágia mértéke folyamatosan magas lehet. Általában azokban a sejtekben intenzív a bazális autofágia, amelyek ki vannak téve károsító hatásoknak, így folyamatosan szükség van a minőségellenőrzésre. Ilyenek például a vesében a podociták vagy thymusban az epithél sejtek (Mizushima, 2005).

1.3.2.1 A bazális autofágia - a sejt takarító működése

Normális tápanyagellátottság esetén a sejt számára szükséges aminosavakat inkább az ubiquitin-proteaszóma rendszer biztosítja és nem az autofágia (Vabulas és Hartl, 2005). A hibásan működő fehérjék önmagukban, funkcióvesztés következtében vagy aggregátumot képezve vezetnek sejt károsodásokhoz. A bazális autofágia ezen aggregátumok eltávolítása révén járul hozzá a sejtes homeosztázis fenntartásához. A folyamat szabályozása eltérhet a stressz indukált autofágiától. Bazális autofágia során az iniciációhoz szükséges a PI3P, az autofág membránok pedig az ER membránok környékén keletkeznek (Musiwaro és mtsai., 2013).

1.3.2.2 Az indukált autofágia - a sejt renováló működése

Az autofágia indukciója egy stressz hatás (pl. éhezés, oxidatív stressz és magas hőmérséklet) során megy végbe, elősegítve a sejt túlélését (Kroemer és mtsai., 2010).



8. ábra: Az éhezés indukált autofágia indukciójának lehetséges útvonalai. A Sirtuinok aktivitása nagyban függ a sejt NAD^+ szintjétől és metabolikus állapotától. Tápanyaghiány esetén képesek deacetilálni az autofág fehérjéket. A Sirt-1 TSC-2-vel kapcsolódva az mTORC1 gátlásán keresztül szintén autofágia indukcióhoz vezet. Másik fontos éhezés-indukált útvonal a FOXO3 aktiváción keresztül hat. A növekedési faktorok hiánya Akt gátlást eredményez, mely szintén FOXO3 aktivációt okoz, bár más mechanizmuson keresztül. Defoszforilációt követően a FOXO3 áthelyeződik a sejtmagba és több, autofágiával kapcsolatos gén átírását serkenti, mint például az *ULK2*, *Beclin 1*, *VPS34*, *BNIP3*, *NIX*, *ATG12*, *ATG4B* és *LC3*. Az AMPK egy másik fontos éhezési állapot-szenzor. Több útvonalon is képes aktiválódni; éhezés esetén, magas intracelluláris Ca^{2+} mellett, valamint a TGF β útvonalon. Autofágia indukáló hatását főként az mTORC1 gátláson keresztül fejt ki, de képes közvetlenül hatni az ULK1/2 aktiváción keresztül. A növekedési faktorok a Ras útvonalon aktiválják az ERK1/2-t, ami a TSC1/2 foszforiláció révén gátolja az autofágiát. Így a növekedési jelek hiánya az autofágia indukciójához vezet. Aminosavak hiánya a Rag1/2 GTPázok gátlásán keresztül szintén autofág indukciót eredményez. Az ábra Kroemer és mtsai., 2010-es cikke alapján a szerző munkája.

Az éhezés-indukált autofágia fontos szereplői a szirtuinok (8. ábra). Ezen NAD -függő deacetiláz fehérjék képesek környezeti stresszhatásokra autofágiát indukálni. A Sirt1 képes deacetilálni az Atg5, Atg7 és LC3 fehérjéket (Lee és mtsai., 2008). Az autofágia központi szereplőin túl képes a FOXO3 (*forkhead box O3a*) transzkripciós faktort is deacetilálni, mely ezután a sejtmagba jut és számos autofág gén expresszióját fokozza (Mammucari és mtsai., 2007). A növekedési faktorok hiánya szintén autofágiát indukál (8. ábra). Ekkor az Akt útvonal gátlásán keresztül aktiválódik a FOXO3. Az éhezés (energiahiány) egy másik központi szenzora az AMPK (*AMP-activated protein kinase*), mely képes érzékelni az AMP/ATP arányt. Katalitikus alegységén lévő threonint számos kináz képes foszforilálni, és ezáltal aktiválni. Ilyen kináz például az LKB1 (*liver kinase B1*), mely alacsony energiaszint esetén aktiválódik, vagy a CaMKK β (*calcium/calmodulin kinase kinase-b*), melyet a citoplazmatikus Ca^{2+} aktivál.

A TGF β képes aktiválni a TAK-1-et (*TGF β -activated kinase-1*), mely szintén képes az AMPK-t aktiválni (Ruderman és mtsai., 2010). A Sirt1 és AMPK képesek egymást aktiválva, 'feed-forward' indukálni az autofágiát. Az AMPK eddig legjobban tanulmányozott működési útvonala az autofágia indukcióra az mTORC1-gátlásán keresztül vezet, de közvetlenül is hat az autofág-fehérjékre, például az Ulk1/Atg1 foszforilálás révén (Behrends és mtsai., 2010). Az mTORC1 az AMPK útvonalon kívül az inzulin, illetve inzulinszerű-növekedési faktorok hiányában is gátolt az Akt-TSC1/TSC2 (*tuberous sclerosis complex 1/2*) jelátviteli tengelyen keresztül (8. ábra) Specifikus aminosavak a Rag GTPázokon keresztül képesek az mTORC1-et aktiválni (Vellai, 2021) (8. ábra). Az mTORC1 tehát képes integrálni a sejt energia és tápanyagviszonyairól az információkat, és ezáltal szabályozni az autofágiát (Kroemer és mtsai., 2010). Számos kináz részt vesz még az éhezés indukált autofágia szabályozásban, mint például az eIF2a (*eukaryotic initiation factor-2-alfa*) kináz (Tállóczy és mtsai., 2002) és az IKK (*I κ B kinase*) (Criollo és mtsai., 2010) is.

Az ER-stressz egyik fő forrása az ER lumenében felhalmozódó nem feltekeredett, vagy hibásan feltekeredett fehérjék. Ekkor beindul egy válaszmechanizmus, az UPR (*unfolded protein response*), mely során chaperonok képződnek, aktiválódnak, de a többi fehérje transzlációja megáll. A rosszul feltekeredett fehérjék lebontása pedig indukálódik (autofágia indukció). Ezidáig három kanonikus ER-stressz útvonalat ismerünk, melyek modulálják az autofág aktivitást: PERK (*PKR-like eIF2a kinase*), ATF6 (*activating transcription factor-6*) és IRE1 (*inositol requiring enzyme 1*). Mindegyik egy chaperonhoz kapcsolatos van alaphelyzetben, de a hibásan feltekeredett fehérjék hatására felszabadulnak a gátlás alól. Az előbbi kettő aktiválja, míg az utóbbi enzim negatívan szabályozza az autofágiát (Hotamisligil, 2010). Amikor az ER-stressz hosszan fennáll, a fagofór képes részben körülnőni a hibásan működő endoplazmatikus retikulumot és ezáltal degradálni. Az ER fragmentumok aztán újra képesek összeszerelődni.

Hypoxia (< 3% légköri oxigén) vagy anoxia (< 0,1% oxigén) esetén is indukálódhat az autofágia. Az előbbi esetben a HIF (*hypoxia-inducible factor*) aktivációja szükséges, míg anoxia esetén az autofágia indukciója HIF független folyamat. Hypoxia esetén is szükséges a PERK-közvetített eIF2a foszforiláció. Ezen felül a DJ-1 és a PDGF indukciója figyelhető meg az alacsony oxigénszint hatására, melyek szintén autofág induktorok (Mazure és Pouysségur, 2010).

Az oxidatív stressz számos útvonalon keresztül képes az autofágiát indukálni. A hidrogén-peroxid képes közvetlenül oxidálni és ezáltal aktiválni az Atg4-et, illetve a PERK

aktiválásán keresztül is képes autofágiát indukálni. A reaktív oxigéngyökök (ROS) felhalmozódása a MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) és JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) útvonalak aktiválódásához vezet, melyek szintén képesek az autofágiát aktiválni (Wong és mtsai., 2010). A DNS károsodás a p53-on keresztül szintén képes fokozni proautofág gének expresszióját.

A hősokk szintén károsító hatású. A sejtek azonban képesek megbirkózni a hőstressz által kiváltott károsodásokkal azáltal, hogy felülszabályozzák a hősokk-fehérjéknek (HSP) nevezett chaperone-jaikat. A hősokk-faktor 1 (HSF1) egy kulcsfontosságú transzkripciós faktor, amely a *HSP* gének fokozott expresszióját indítja be a magas hőmérsékletnek vagy más stressznek kitett sejtekben. Ezt a folyamatot hősokk-válasznak (HSR) nevezik. *Drosophila* termotoleranciája is erősen összefügg a stressz-indukált gének hősokk esetén történő felülszabályozásával, mint például a *hsf*, *dnaJ-1* és *hsp83* (Neal és mtsai., 2006). A HSR és az autofágia kapcsolatáról azonban még kevés adattal rendelkezünk. Ismereteink nagy része *C. elegans* és emlős sejtekből származó eredményeken alapszik (Barna és mtsai., 2018). Hősokk hatására aktiválódik a autofágia. Patkányokban a hőstressz szubcelluláris sérülésekkel összefüggő autofágiát indukál (Dokladny és mtsai., 2013). Hősokk után mind az LC3-I, mind az LC3-II fehérje szintje jelentősen megemelkedik számos komplett tápközegben tartott sejt vonal esetén (Dokladny és mtsai., 2013). A mutáns HSF1 túltermelése képes elnyomni mind a bazális LC3-II szintet, mind a hő által kiváltott LC3-II növekedést (Zhao és mtsai., 2009). A Hsf-1 célgének között azonosították a p62/SQSTM1-et, valamint az Atg7-et (Watanabe és mtsai., 2017). *C. elegans*-ban a HSF-1 túltermelés képes volt az autofág fehérjék mennyiségének és expressziójának indukálására is (Kumsta és Hansen, 2017).

1.3.2.3 A fejlődési autofágia - a sejt átépítő működése

Az autofágiával kapcsolatos ismereteink a fejlődésbiológia területén is egyre bővülnek (Allen és mtsai., 2020). Számos kutatás bizonyítja, hogy az egyedfejlődés bizonyos pontjain az autofágia indukciójára van szükség a sejt differenciációhoz, vagy amikor bizonyos organellek szelektív lebontására van szükség. Ilyen például az apai mitokondriumok lebontása a fertilizációt követően (anyai öröklődés) (Song és mtsai., 2016). Többsejtű organizmusok esetén az autofágia sokszor az apoptózissal kooperálva vesz részt a szövetátalakító folyamatokban, így az autofágia defektusa gyakran gyulladáshoz és autoimmunitáshoz vezethet.

Számos fajban az *Atg* gének mutációi fejlődési rendellenességeket okoznak. Például *S. cerevisiae*-ben a spóráképzés szenved defektust, *Drosophilában* a bebábozódás, *C. elegans*-ban

a dauer lárva fejlődés lesz abnormális. Sok esetben megfigyelhető a fejlődési állapot változások előtt egy éhezési szakasz, mely során indukált autofágia figyelhető meg. Például az ecetmuslicák táplálkozó lárva állapotban nagy mennyiségű tápanyagot halmoznak fel, majd vándorolni kezdenek és ekkor nagy mértékű autofágia indukálódik bennük. Bebábozódáskor az intenzív lebontó folyamatok révén a lárvális szervek helyett imaginális szervek fejlődnek. Ilyenkor nincs újabb tápanyagfelvétel, az átalakulási folyamatokhoz az autofágia szolgáltatja az energiát (Mizushima, 2005).

Autofágia a fertilizáció és az embriogenezis során

A legtöbb eukariótában a mitokondriumok maternális öröklődésűek annak ellenére, hogy az apai mitokondriumok átjutnak az ooplazmába fertilizációt követően (Mizushima, 2005). *C. elegans*-ban megtermékenyítéskor a paternális mitokondriumok az oocytában LGG1/2 (LC3)-függő módon lebontásra kerülnek, míg számos spermiumból származó fehérje nem degradálódik, ami azt bizonyítja, hogy a lebontás szelektíven zajlik. Egérben hasonlóan allofágia (nem saját sejtalkotók autofág bontása) által bomlanak le a paternális mitokondriumok, a lebontást azonban itt egy ubiquitinációs lépés előzi meg (Sato és Sato, 2011).

Az autofágia a megtermékenyítés után az embriogenezishez is fontos. *C. elegans*-ban például 113 embrionális sejt programozott sejthalállal pusztul el, és ezek törmelékei részben autofágiával takarítódnak el. Ekkor nem szükséges receptor, vagy speciális adaptormolekula a lebontáshoz, vagyis nem-szelektív autofágia történik (Huang és mtsai., 2013). A *Drosophila* embriogenezis során az extraembrionális amnioserosa sejtek eltávolítása szintén programozott sejthalállal történik. A kaszpázfüggő apoptózist időben megelőzi az autofágia indukciója, mely szükséges a megfelelő kaszpáz-aktivitáshoz (Mohseni és mtsai., 2009). Kimutatták továbbá, hogy a csirkék retina fejlődése során a neuronok kialakulásához bizonyos sejtek programozott sejthalálára van szükség. Eddigi ismereteink alapján a fejlődési autofágiának itt is az elhaló sejtek eltakarításában van nagy szerepe, melynek módja térben és időben is szigorúan szabályozott (Mellén és mtsai., 2008). Az autofágia embriogenezisben betöltött fontos szerepét támasztja alá az a kutatás is, ahol oocyta specifikusan *Atg5* génkiütött petesejtet *Atg5*^{-/-} mutáns hímvarsejttel termékenyítették meg, mely korai embrióletalitást okozott (Tsukamoto és mtsai., 2008). Az autofágia fontos a fertilizációt követően az anyai hatású géntermékek eltávolításában, valamint a szóma-csíravonal szétválasztásában *C. elegans*-ban. (Zhang és mtsai., 2009; Borsos és mtsai., 2011).

Autofágia a poszt-embrionális fejlődés során

Az egyedfejlődés posztembrionális szakaszában is fontos szerepe van a fejlődési autofágiának; a sejtsors meghatározáshoz, szövetátépüléshez és a tápanyaghiányos fejlődési stádiumokban a túléléshez egyaránt szükséges a folyamat. Ilyen például a *C. elegans* esetében a dauer lárva állapot kialakulása és fennmaradása. Ez a speciális kitartó larva forma indukciója az L1 lárvastádiumban alakul ki olyan ingerek hatására, mint például a tápanyaghiány, a magas hőmérséklet, vagy a nagy populációsűrűség. A dauer larva állapotban az autofágia mértéke megnő, a szöveti átalakulásokhoz számos *atg* gén működése szükséges (Meléndez és mtsai., 2003).

Az autofág lebontás egy másik aspektusa a miRNS-ek lebontása. A miRNS-ek a poszttranszlációs szabályozás részeként számos génműködést modulálnak. Az utóbbi időben egyre több tanulmány látott napvilágot a miRNS-ek szelektív autofágia általi lebontásával kapcsolatban. *C. elegans*-ban a miRISC-komponens szelektív (kargó-függő) autofágiával bomlik le (Zhang és Zhang, 2013). Hasonlót írtak le HeLa sejtekben is. Kimutatták, hogy a DICER és AGO2 (géncsendesítésben szerepet játszó komponensek) szelektív autofágia révén degradálódnak (Gibbins és mtsai., 2013).

Az *ecetmuslica* metamorfózissal fejlődik. A lárvális szövetek (pl. a nyálmirigy) a bebábozódás során lebomlanak és az imágóra jellemző szervek fejlődnek. A lebontás TOR-függő autofágiával történik és nem szükséges hozzá a fagociták működése. A metamorfózist az ecdizon (20-OH ecdizon) hormon indítja be, mely számos autofág gén indukciójáért is felel (Rusten és mtsai., 2004). A nyálmirigyben a programozott sejthalál autofág gének és kaszpázok által szabályozott folyamat, de kimutatták, hogy az autofágia indukciója elegendő kaszpázgátlás esetén a sejthalál beindításához (Berry és Baehrecke, 2007). miRNS-ek is részt vesznek a szabályozásban, melyek poszttranszkripcionálisan befolyásolják az autofág degradációt. A *mir-14* célmolekulája például a PI(1,4,5)P₃-ot gátló kináz mRNS-e, mellyel aktiválja a Calmodulin szignál útvonalat, ami szükséges az autofágia indukcióért (Nelson és mtsai., 2014). A nyálmirigyben lezajló fejlődési autofágiával ellentétben a *Drosophila* zsírtestben megfigyelhető éhezési autofágia esetén ezen kalcium függő útvonalak aktivitása nem szükséges az autofágia indukciójához (Nelson és mtsai., 2014).

Drosophila lárvális középbél degradációja a metamorfózis elején zajlik, 4 órával a bebábozódás után. Annak ellenére, hogy az autofágia és a kaszpázok is indukálódnak ilyenkor, a sejtek méretének csökkenése és a sejthalál nem függ össze kaszpáz aktiválódással, mert gátlásuk esetén ugyanúgy végbemegy a középbél degradációja. Ezzel ellentétben az autofágia szükséges a középbél sejteinek eltávolításához, gátlása késlelteti a degradációs folyamatot

(Denton és mtsai., 2009). Úgy tűnik, hogy a legtöbb konzervált Atg komponens működése mellett a középbeli sejtekben az autofágia nem a kanonikus útvonalon működik; az Atg3 és Atg7 nem szükségesek a folyamathoz, illetve az Atg8a lipidizációja is nélkülözhető (Chang és mtsai., 2013; Allen és mtsai., 2020).

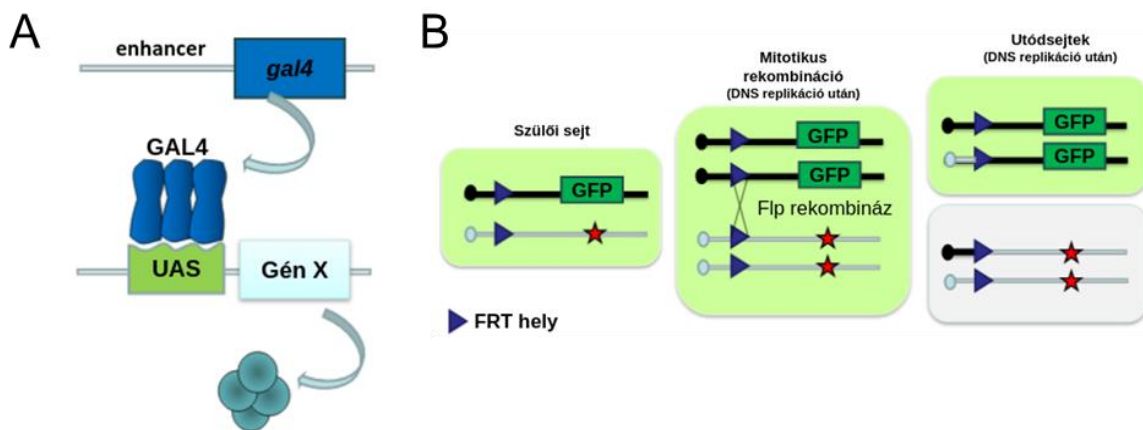
Gerincesekben a fejlődési autofágia posztembrionálisan is megfigyelhető. Egerekben születés után egy-két napig az autofágia nagymértékben indukálódik. Autofágia deficiens mutáns egerek nagy része a születést követő napon meghal. Az elpusztult egerek szöveteiben és vérplazmájában lévő aminosavszintek jóval alacsonyabbak a vad típushoz képest. Ez arra utal, hogy a születést követő tápanyaghiányos időszakban a szervezet az intenzíven működő autofágia révén fedezi az aminosav szükségleteit. Ezen felül a termelt aminosavak révén fenntartja a máj glükoneogenezisét, amely ahhoz szükséges, hogy a vérplazma glükózszintje helyreálljon. A születést követő hipoglikémiás állapotot a szervezet így képes tehát túlélni (Kuma és mtsai., 2004). Az autofágia fontos továbbá az adipociták differenciálódásához (Baerga és mtsai., 2009), illetve a limfocitákéréséhez (Miller és mtsai., 2008).

Az autofágia *Drosophila* szemfejlődésben betöltött szerepe igen vitatott. A TOR hiperaktivációja a szem primórdiumban befolyásolja a felnőtt muslicák szemének morfológiáját és az ommatídiumok mintázatát. Jelentősen lecsökken bennük a fotoreceptor sejtek száma, mely azt sejteti, hogy az autofágiának fontos szerepe van a szemfejlődésben (Hennig és mtsai., 2006). A TOR útvonal aktivációja azonban nem csak az autofágiát gátolja, hanem sok más sejtszintű működést is képes befolyásolni. Az autofágia szabályozásban szerepet játszó Atg7 csendesítése a fejlődő szemdiszkusz egy részében összenőtt és megnagyobbodott ommatídiumokat eredményez (Hennig, 2006). Ezzel szemben az Atg7 funkcióvesztéses mutánsok szeme a vad típushoz hasonlít. Számos más *Atg* gén csendesítésével sem sikerült az ommatídiumok fejlődésében változást megfigyelni (Chen és mtsai., 2012; Velentzas és mtsai., 2013). Ezen eredmények alapján inkább azt lehet feltételezni, hogy az *Atg7* csendesítése során tapasztalt szemfejlődésbeli változás inkább az *off-target* hatás miatt következhetett be.

1.4. *Drosophila melanogaster*, mint genetikai modell

Az ecetmuslica széleskörben tanulmányozott modellorganizmus, melyet számos előnyös tulajdonsága révén érdemelt ki. Rövid az élethossza, és 25 °C-on körülbelül 10 nap alatt egy új generáció jelenik meg. Jó a szaporodóképessége, és laboratóriumban könnyen fenntartható (üvegcsovekben), amelyek révén a biológiai kutatásokban, így az autofágia vizsgálatában is kiemelt szereppel bír. Az ecetmuslica kutatások több, mint száz éves múltra

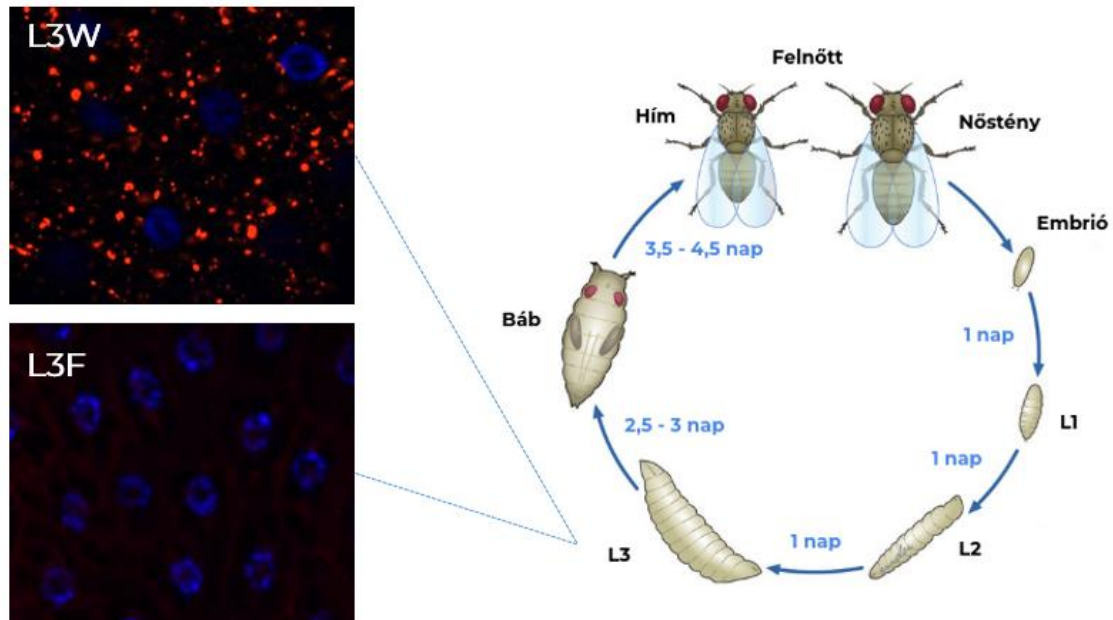
tekintenek vissza, ma már számos törzsközpont létezik, ahol a különböző génekre funkcióvesztéses és funkciónyeréses allélokat tartalmazó törzsei érhetőek el. A mutáns és transzgenikus törzsek létrehozására széles genetikai eszköztár áll rendelkezésre. Ilyenek például a markermutációk, balanszerkromoszómák, vagy az élesztőből származó, széles körben alkalmazott UAS-GAL4 (*upstream activating sequence - galactose-responsive transcription factor 4*) rendszer is (9/A. ábra). Utóbbi révén specifikusan lehet térben és időben szabályozottan géneket túltermeltetni vagy csendesíteni (Brand és Perrimon, 1993). Szintén élesztőből származik az FLP-FRT (Golic és Lindquist, 1989) rendszer, mellyel szomatikus klónokat tudunk létrehozni, így egyazon állaton belül lehet összehasonlítani a vizsgált génre vad típusú és módosított génexpressziójú sejteket (9/B. ábra).



9. ábra: A *Drosophila* genetika gyakran használt eszközei. **A:** Az UAS-Gal4 rendszer vázlatos rajza. A Gal4 fehérje szabályozott kifejeződésével szövet- és sejtspecifikusan, vagy időben szabályozottan lehet az UAS szekvencia utáni gén expresszióját befolyásolni. A hatékony működéshez az állatokat 29°C-on kell tartani. Az X gén helyett RNSi konstrukciókat is ki lehet fejeztetni, mellyel a géncsendesítés válik a fent leírt módon szabályozottá. **B:** A mitotikus rekombináció elvén működő Flp-FRT rendszer vázlatos rajza. A Flp rekombináz (Flp) az FRT szekvencia helyek közötti rekombinációt katalizálja. Így egy heterozigóta állatban vizsgálható például egy homozigóta formában letális mutáció úgy, hogy egy szövetspecifikus promóterrel meghajtott Flp csak az adott szövetben hoz létre genetikai mozaikokat. Ez egyben azt is eredményezi, hogy az adott szövetben össze lehet hasonlítani a homozigóta mutáns és homozigóta vad típusú sejteket. GFP: zöld fluoreszcens fehérje, mely markerként jelzi a vizsgált génre vad típusú sejteket.

Az *ecetmuslica* holometamorfózissal fejlődő rovar. A petéből kikelve a lárvák három fejlődési stádiumon (L1-L3) keresztül érik el a bábállapotot (10. ábra). A harmadik lárvastádiumban két további állapot különböztethető meg: táplálkozó L3F (*feeding* - 72-108h AEL, *after egg laying*, peterakást követően eltelt idő) és vándorló L3W (*wandering* - 108-144h AEL) lárv állapotok. Vándorló fázisban az előző fejlődési szakaszokban felhalmozott tápanyagból intenzív autofágia révén energiát nyernek. A lárvális szervek lebomlanak és

helyettük a bábállapotban kialakulnak a kifejlett egyed (imágó) szervei. A lárvákban megtalálhatóak az úgynevezett imaginális korongok. Ezek olyan speciális sejtszövetek, melyeket elkerül az intenzív lebontás, és belőlük fejlődnek az imágó különböző testrészei.



10. ábra: A *Drosophila melanogaster* életciklusa. Az ecetmuslica teljes átalakulással fejlődik. Az embrionális fejlődés 25°C-on 1 nap alatt játszódik le, majd a lárvállapotok (L1-L3) 4-5 napig tartanak, és a harmadik lárvastádium végén az állatok vándorolni kezdenek, utána következik a bebábozódás. A bából néhány nap múlva kelnek ki a kifejlett imágók (Ong és mtsai., 2015 alapján módosítva). Az ábra bal oldalán látható fluoreszcens felvételeken (saját) megkülönböztethető az L3 lárvaalak további két fejlődési stádiuma: az L3F-táplálkozó állapot, és az L3W-vándorló állapot. Jól láthatóak a poliploid sejtmagok (kék-Hoechst), valamint megfigyelhetők a vándorló állatok esetében a citoplazmában felgyülemelő savas sejtalkotók (piros- LysoTracker Red).

1.4.1 A zsírtest

Az ecetmuslica az autofágia kutatásokhoz is kitűnő modellélőlénynek bizonyult. Az autofágia folyamata konzervált, így a *Drosophilában* megfigyelt szabályozási folyamatokból következtetni lehet az emlős rendszerek működésére. A muslicákban megfigyelhető a fejlődési autofágia, például a szem-antenna imaginális korongban vagy a lárvakori szervek lebontása esetén vándorló lárva állapotban, de jól vizsgálható bennük a stressz-indukált autofágia is, melynek vizsgálatára a lárvális zsírtest poliploid óriássejtjei kiválóan alkalmasak (10. ábra).

Vándorló lárvastádiumban az energianyéréshez szükséges intenzív lebontás egyik áldozata a lárvakori zsírtest. Ez a szerv különböző anyagok raktározása révén fontos metabolikus

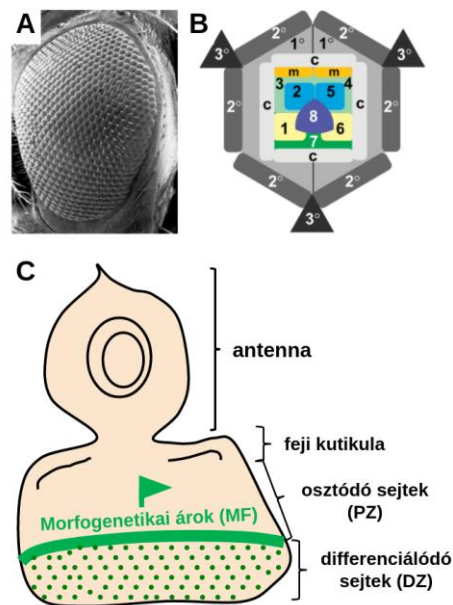
szereppel bír, valamint a hormonháztartásban is igen fontos (Colombani és mtsai., 2003). A zsírtest sejtjei endomitózissal osztódnak, az L3F szakasz végére óriás méretű poliploid sejtek jönnek létre (Mulakkal és mtsai., 2014). Az L3F lárvák zsírtestében fiziológiás körülmények között igen kis mértékű bazális autofágia működik. A vándorló állapotban azonban az ekdizon (20-OH ekdizon) hatására indukálódik bennük az autofágia (fejlődési autofágia). Ha a táplálkozó állapotban nincs elégséges mennyiségű tápanyag, vagy valamilyen stressz éri a lárvákat, akkor az autofágia indukciója figyelhető meg a sejtekben (éhezési illetve stressz indukált autofágia). Az aminosavak megvonásával viszonylag hamar és nagy mértékben indukálható bennük a sejtes önemésztés (Scott és mtsai., 2004). A zsírtestekben tápanyag megvonás hatására a TOR útvonal gátlódik, mely aktiválja az autofág útvonalat. Az ekdizon receptor gátlásával vagy a PI3K I jelátviteli útvonal aktiválásával hatékonyan lehet bennük gátolni a fejlődési autofágiát (Rusten és mtsai., 2004).

1.4.2 Az összetett szem

A *Drosophila* szeme az egyik legintenzívebben kutatott szerv a fejlődésbiológia területén. Az ecetmuslicák összetett szeme igencsak eltér a gerincesek szemének felépítésétől (11/A ábra). Közel 750 (hímekben 700, nőstényekben 750) egyszerű szemből, ún. ommatidiumból áll. Mindegyik ommatídium 8 fotoreceptor neuront tartalmaz, melyeket 4 merevítő sejt (*cone cells*) ölel körbe (11/B ábra). Ezeken kívül 2 primer pigmentsejt vesz részt az 'írisz' kialakításában. Az ommatídiumok között még megtalálható 6 másodlagos pigmentsejt és 3 harmadlagos pigmentsejt, amelyek megakadályozzák, hogy a fény az ommatídiumok között átjusson, ingerelve ezzel a szomszédos egyszerű szemet. A harmadik lárvastádiumban megtalálhatóak továbbá a fejlődő ommatídiumban az úgynevezett misztikus sejtek is, melyek később eltűnnek (11/B ábra). Az ommatídiumok felszínén található a cornea, mely a fény fókuszálására alkalmas. Ez alatt helyezkedik el a pszeudocone nevű kristályos fénytörő rész. A fény ezután jut el az ommatídiumokban található fotoreceptor sejtekhez, amelyeknek az összefekvő részét rhabdomernek nevezzük. (Freeman, 1997).

Az összetett szem az epithéliumból differenciálódik. A harmadik lárvastádiumban kezd kifejlődni a szem-antenna imaginális korongnak (diszkusznak) nevezett szem-primorgiumból (11/C. ábra). E szervből fejlődik később az összetett szemén kívül a feji kutikula, az antenna, az egyszerű szem és a tapogató is. A szem-antenna korong két rétegből áll, az egyik maga a diszkusz, amely hengerhám sejtekből épül fel. A másik réteget a peripodiális membrán alkotja, amely főleg jelátvitel révén szabályozza a hengerhámsejtek fejlődését. A peripodiális membrán

és a diszkusz közötti jelátvitel mikrotubulusok révén valósul meg (Gibson és Schubiger, 2000). A szemdiszkusz sejtjei a fejlődés során először osztódnak, majd egy differenciációs lépésben alakulnak át fotoreceptor-, illetve járulékos sejtekké. Az éppen proliferálódó és differenciálódó sejteket egy úgynevezett morfogenetikai árok (MF - *morfogenetic furrow*) választja el egymástól (11/C. ábra) (Freeman, 1997). A MF a sejtek állapotától függően vándorol a diszkusz poszterior végétől anterior irányba. A MF előtti sejtek egészen addig osztódnak, amíg az árok területére nem kerülnek, ott a G1 fázisban megáll a sejtciklusuk, majd elkezd kialakulni egy öt fotoreceptor sejtből álló csoport (preklaszter). A maradék 3 fotoneuron, illetve a pigmentsejtek és kónuszsejtek csak később jönnek létre egy második mitotikus hullám következtében, ami a morfogenetikai árok mögött néhány sorral zajlik le (Wolff és Ready, 1991). Az ecetmuslica összetett szemének kifejlődése számos transzkripciós faktor összehangolt működésének, időben és térben eltérő génaktiváló, illetve gátló működésének eredménye.



11. ábra: Az ecetmuslica összetett szemének felépítése és fejlődése. **A:** A *Drosophila* összetett szem körülbelül 750 egyszerű szemből (ommatídium) épül fel, az anterior rész bal oldalt található. **B:** Az ommatídiumot felépítő sejtek: 8 fotoneuron (1-8), pigmentsejtek (1° - 3°), c: *cone cells*-merevítő sejtek, m: misztikus sejtek. **C:** Harmadik lárvastádiumban lévő szem-antenna imaginális korong vázlatos felépítése. Az anterior rész van felül. A morfogenetikai árok az osztódó sejtek felé haladva hagyja maga mögött az érett, differenciálódó sejteket (zöld pöttyök), amik aztán csoportokat alkotva létrehozzák az ommatídiumokat. A szem-antenna imaginális korongból fejlődik a kifejlett szemeken kívül a feji kutikularész és az antennák is. Forrás A és B ábra: Freeman, 1997; C ábra: Billes és mtsai., 2018.

2 Célkitűzések

Orvosbiológiai szempontból fontos az olyan autofágiát szabályozó faktorok feltárása, melyek genetikai manipulációjával szabályozott módon lehet autofágiát indukálni. A használt hatóanyagok célpontja leggyakrabban a TOR kináz, amely azonban több sejtszintű folyamat szabályozója is egyben, ezért működésének befolyásolása számos mellékhatással jár.

1. A myotubularinok potenciális autofág degradációt gátló molekulák, melyek a lipidkinázokkal együttműködve különböző membránok specifikus foszfatidilinozitid tartalmának kialakításában vesznek részt. Céljaink között szerepelt két, autofágiában potenciálisan szerepet játszó myotubularin típusú foszfatáz vizsgálata *Drosophila melanogaster* lárvális zsírtestben.

Ehhez az alábbi konkrét célokat tűztük ki:

- Az Mtmr6 és az EDTP szerepének tisztázása az éhezés, a hőstressz, és az oxidatív stressz indukált autofágia szabályozásban.
- Az Mtmr6 és az EDTP endolizoszómális rendszerben betöltött szerepének vizsgálata.

2. Az indukált autofágia egyik specifikus formája a fejlődési autofágia. Célunk volt tisztázni a *Drosophila* összetett szemének fejlődése során az autofágia szerepét.

Ehhez az alábbi célokat tűztük ki:

- A szemdiszkusz sejtjeiben megvizsgálni az Atg fehérjék és az általuk létrehozott autofág stuktúrák eloszlását.
- Megvizsgálni milyen fejlődési zavarokhoz vezet az autofágia hiánya a szemdiszkuszban.

3 Anyagok és módszerek

3.1 Felhasznált *ecetmuslica* törzsek

A kísérleteinkhez használt *Drosophila melanogaster* törzseket az alábbi táblázat foglalja össze:

1. táblázat: A doktori tézisen szereplő törzsek és forrásuk. BDSC: Bloomington *Drosophila* Stock Center, VDRC: Vienna *Drosophila* RNSi Center, és DGRC: *Drosophila* Genetic Resource Center, Kyoto

A tézisen használt rövidítések	Használt törzs és (forrás)
Kontroll; +; w^{1118}	w^{1118} (BDSC5905)
Vad típus, <i>Oregon-R</i>	<i>Oregon-R</i> (DGRC109612), Sinka Rita, SZTE
<i>Mtmr6</i> ^{KG}	<i>Mtmr6</i> ^{KG01267} (BDSC14361)
<i>Mtmr6</i> ^{LL}	w^* ; <i>FRT40A, PBac{SAstopDsRed}Mtmr6LL02467, bw1</i> (kikeresztezett variánsa a DGRC140,628-nek)
<i>EDTP</i> ^{MI}	<i>EDTP</i> ^{MI08496} (BDSC44782)
<i>EDTP</i> ^{EY}	<i>EDTP</i> ^{EY22967} (BDSC22600)
<i>EDTP-RNSi</i>	<i>EDTP-RNSi</i> (Manzéger és mtsai., 2021) ,Lukácsovich Tamás
<i>Syx17</i> ^{LL}	<i>Syx17</i> ^{LL0633} (Takáts Szabolcs, ELTE)
<i>Df161</i>	<i>Df(2R)BSC161</i> (BDSC9596)
<i>Df778</i>	<i>Df(2R)BSC778</i> (BDSC27350)
<i>Mtmr6</i> ^{GD}	<i>Mtmr6</i> ^{GD11001} (II: VDRC26216 és III: VDRC26217)
<i>UAS-Dcr-2, Mtmr6</i> ^{GD}	<i>UAS-Dcr-2, Mtmr6</i> ^{GD11001} (<i>UAS-Dcr-2(II)</i> :BDSC24650)
<i>EDTP</i> ^{TRiP(V22)}	<i>EDTP</i> ^{GL01215} (BDSC41,633)
<i>EDTP</i> ^{TRiP(V20)}	<i>EDTP</i> ^{HMS01577} (BDSC36,917)
<i>UVRAG</i> ^{TRiP(V20)}	<i>Uvrage</i> ^{HMS01577} (BDSC36,917)
<i>GFP</i> ^{TRiP(V20)} II. és <i>GFP</i> ^{TRiP(V20)} III.	<i>GFP</i> ^{dsRNA.shRNA.UAS.V20.4} (II.krom: BDSC41,552 és III.krom: BDSC41,553)
<i>EDTP</i> ^{GSV6}	<i>EDTP</i> ^{GSV6} (DGRC202,239)
<i>Act5C-Gal4</i>	<i>Act5C-Gal4</i> (BDSC3954)
<i>Cg-Gal4</i>	w^{1118} ; <i>P{Cg-GAL4.A}2</i> (BDSC7011)
<i>Mtmr6</i> ^{menekítő}	<i>Mtmr6</i> ^{rescue} (Manzéger és mtsai., 2021), Erdélyi Miklós, SzBK

<i>2xFYVE-GFP</i>	<i>UAS-GFP-2xFYVE</i> (BDSC42,712)
<i>GFP-ref(2)P</i>	<i>TubGFP-ref(2)P^{3-4M}</i> (Pircs és mtsai. 2012)
<i>Tub-YFP-Rab4</i>	<i>w¹¹¹⁸; P{αTub84B-Rab4.EYFP}</i> (Marois, Mahmoud, és Eaton 2005)
<i>Tub-CFP-Rab5</i>	<i>w¹¹¹⁸; P{αTub84B-Rab5.CFP}</i> (Marois, Mahmoud, és Eaton 2005)
<i>Atg1 RNSi</i>	<i>Atg1^{JF02273}</i> (BDSC26731)
<i>Atg2 RNSi</i>	<i>Atg2^{HMS01198}</i> (BDSC34719)
<i>Atg3 RNSi</i>	<i>Atg3^{HMS01348}</i> (BDSC34359)
<i>Atg4a RNSi</i>	<i>Atg4a^{JF03003}</i> (BDSC28367)
<i>Atg5 RNSi</i>	<i>Atg5^{JF02703}</i> (BDSC27551)
<i>Atg6 RNSi</i>	<i>Atg6^{JF02897}</i> (BDSC28060)
<i>Atg7 RNSi</i>	<i>Atg7^{JF02787}</i> (BDSC27707)
<i>Atg8a RNSi (V20)</i>	<i>Atg8a^{HMS01328}</i> (BDSC34340)
<i>Atg8a RNSi (GD)</i>	<i>Atg8a^{GD4654}</i> (VDRC43097)
<i>Atg8a RNSi (TRiP-1)</i>	<i>Atg8a^{JF02895}</i> (BDSC28989)
<i>Atg9 RNSi</i>	<i>Atg9^{JF02891}</i> (BDSC28055)
<i>Atg13 RNSi</i>	<i>Atg13^{KK100340}</i> (VDRC103381)
<i>Atg14 RNSi</i>	<i>Atg14^{KK100903}</i> (VDRC108559)
<i>Atg16 RNSi</i>	<i>Atg16^{HMS01347}</i> (BDSC34358)
<i>Atg17 RNSi</i>	<i>Atg17^{HMS01611}</i> (BDSC36918)
<i>Atg18a RNSi</i>	<i>Atg18a^{JF02898}</i> (BL2806)
<i>Atg101 RNSi</i>	<i>Atg101^{KK101226}</i> (VDRC106176)
<i>Vps15 RNSi</i>	<i>Vps15^{HMS00908}</i> (BDSC34092)
<i>Vps34/Pi3K59F RNSi</i>	<i>Vps34^{HMS00261}</i> (BDSC33384)
<i>ey-Gal4(II)</i>	<i>w*</i> ; <i>P{Gal4-ey.H}</i> , 3-8 (BDSC5534)
<i>ey-Gal4(III)</i>	<i>w*</i> ; <i>P{GAL4-ninaE.GMR}I2</i> (BDSC1104)
<i>c311-Gal4</i>	<i>c311-Gal4 (y^l; P{GawB}c311)</i> (BDSC5937)
<i>so7-Gal4</i>	<i>so7-Gal4 III</i> (BDSC26810)
<i>Atg1^{KG}</i>	<i>y d2, w¹¹¹⁸, ey-FLP, GMR-lacZ; Atg1^{KG07993}, FRT80B/TM6B</i> (DGRC111645)
<i>Atg1²⁵</i>	<i>Atg1²⁵, FRT80B/TM6B</i> (Tamas Maruzs, Szeged)

<i>Atg4^{MB}</i>	<i>w¹¹¹⁸; Mi{ET1}Atg4^{MB03551}</i> (BDSC23542)
<i>Atg18a^{KG}</i>	<i>w*; P{SUPor-P}Atg18KG⁰³⁰⁹⁰ ry 506/TM6B</i> (BDSC13945, módosított)
<i>Atg3¹⁰</i>	<i>Atg3¹⁰</i> (Nagy és mtsai., 2015)
<i>Atg7^{Δ77}</i>	<i>Atg7^{Δ77}</i> (Nagy és mtsai., 2015)
<i>Atg8a^{KG}</i>	<i>Atg8aKG⁰⁷⁵⁶⁹</i> (BDSC14639, kikeresztezett), Juhász Gábor, ELTE
<i>Atg8a^{d4}</i>	<i>Atg8a^{d4}</i> (Pircs és mtsai., 2012)
<i>Atg13^{Δ81}</i>	<i>Atg13^{Δ81}</i> (Chang és Neufeld, 2009)
<i>Atg14^{Δ5.2}</i>	<i>(hs-FLP; FRT82B, Atg14Δ5.2/TM6C)</i> (Katheder és mtsai., 2017)
<i>Atg17^{d130}</i>	<i>Atg17^{d130} (w*; FRT2A, FRT82B, Atg17^{d130})</i> (Nagy és mtsai., 2014b)
<i>DC352</i>	<i>w¹¹¹⁸; Dp(1;3) DC352, PBac{DC352}VK00033</i> (BDSC30762)
<i>g-Atg14</i>	<i>g-Atg14</i> (Katheder és mtsai., 2017)
<i>gfp-Atg8a</i>	<i>gfp-Atg8a</i> (Billes és mtsai. 2018)
<i>UAS-Atg17-GFP</i>	<i>UAS-Atg17-GFP, Atg17^{d130} (w*; FRT2A, FRT82B, Atg17^{d130})</i> (Nagy és mtsai., 2014b)

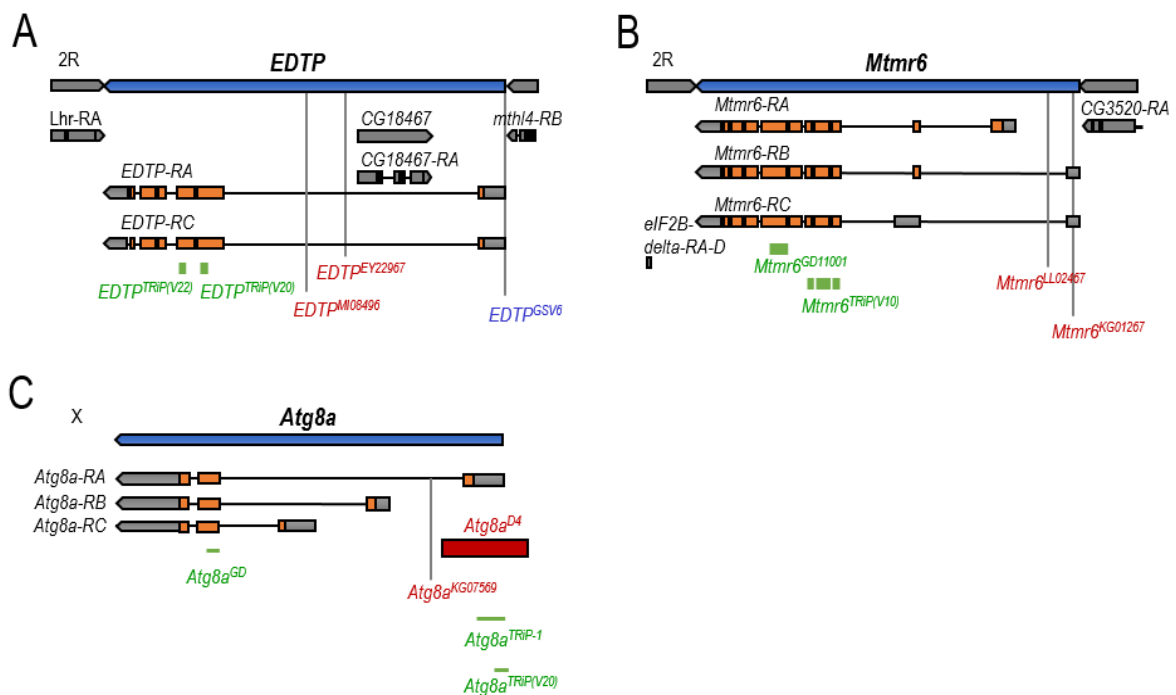
A kísérleti munkák során használt törzseket és a keresztezéseket 18-25°C között tartottuk. Egy-egy kísérlet esetén ettől eltérő hőmérsékletet is alkalmaztunk, ezeket az anyagok és módszerek fejezet későbbi részében fejtem ki.

A *Drosophilák* táplálására az alábbi táptalajt használtuk: 66,85 g kukoricaliszt, 32,59 g szacharóz, 10 g agar, 26 g porított élesztő, melyet 1 l vízben csomómentesre keverünk. Az agar teljes feloldódásáig 800W-os mikrohullámú sütőben melegítjük. Visszahűlést követően 10 mL 25 vegyes% nipagin (4-hidroximetil-benzoát) (96%-os etanolban oldva) kerül hozzáadásra.

3.1.1 A dolgozatban jellemzett gének és módosításukra használt konstrukciók

Drosophilában az *EDTP* (12/A. ábra) és az *Mtmr6* (12/B. ábra) is a II. kromoszóma jobb karján található. Előbbinek kettő, utóbbinak három izoformája (transzkriptum variánsa) ismert. Az *Mtmr6*-A és -C izoformát felnőtt fejből (Rubin és mtsai., 2000), a -B izoformát pedig embriókból izolálták (Hoskins és mtsai., 2011). Doktori disszertációmban ezen gének autofágiában betöltött szerepét vizsgáltam meg. A vizsgálataink során különböző géncsendesítő

konstrukciókkal és transzpozon inszerciós allélokkal dolgoztunk (12. ábra). Az *EDTP* esetében a géncsendesítő kísérletekben a TRiP(V22) és TRiP(V20) konstrukciókat használtuk. A mutációs vizsgálatokban használt *EY22967* allél egy P{EPgy2} transzpozon inszerciót tartalmaz, benne egy UAS szekvenciával, így túltermelésre is alkalmas. Az *MI08496* allél egy *Mi{MIC}* inszerciót tartalmaz, amelyben egy STOP kód található három különböző leolvasási keretben. Azokban a kísérletekben, ahol az *EDTP^{MI}* mutánsokat és kontrolljaikat vizsgáltuk, a P generációt peterakás előtt 2-3 nappal 29°C-ra helyeztük a megfelelő hatékonyság miatt.



12. ábra.: A disszertációban jellemzett főbb gének, mRNS variánsaik és az expressziójuk módosítására használt konstrukciók. A: Az *EDTP* génről kétféle mRNS átírat készül (*EDTP-RA* és *EDTP-RC*), melyek egy exonjuk szekvenciájában térnek el egymástól. A géncsendesítő konstrukciók (zöld) mindkét variánst képesek csendesíteni. A pirossal jelölt inszerciós allélok géncsapsdaként működve gátolják meg, hogy az *EDTP*-ről vad típusú mRNS termék képződjön. Az *EDTP^{GSV6}* túltermelésre alkalmas allél (kék). **B:** Az *Mtmr6* génről 3 különböző RNS átírat készül (*Mtmr6-RA*, *-RB*, *-RC*). Az RNS interferenciára használt konstrukciók (GD és TRiP-1) mindhárom izoformát csendesítik (zöld). Az inszerciós allélok pirossal vannak jelölve. A *KG01267* allél az *Mtmr6* génextpresszió mellett a *CG3520* kifejeződését is befolyásolja. **C:** Az X kromoszómás *Atg8a*-ról három izoforma expresszálódik. A szemdiszkuš sejtekben az *Atg8aA* az abundáns forma. A disszertációban említett allélok közül a *Atg8a^{d4}* egy deléziós allél, az *Atg8a^{KG}* pedig egy inszerciós allél. Mindkettő az RA splice-variáns 5' végiját érinti. A géncsendesítő konstrukciók közül a GD mindhárom izoforma csendesítésére alkalmas, míg a TRiP-ek az A izoformával interferálnak. Az ábrák a flybase adatbázis GBrowse géntérképe alapján készültek.

Az *Mtmr6* esetén is használtunk géncsendesítést, valamint inszerciós mutánsokat. A TRiP.JF01885-ös valium10-es RNSi konstrukció (továbbiakban TRiP-1) kifejeződése a testi

sejtekre jellemző, a GD allél esetén Dicer (Dcr) szükséges a hatékony géncsendesítéshez. A transzpozon inszerciós allélok közül az *LL02467* egy PBac{SAstopDsRed} elemet tartalmaz, mely korai transzláció terminációt eredményez. Az *LL02467* allélt tartalmazó törzs kezdetben több ilyen inszerciót tartalmazott (az *Mtmr6* lokuszon kívül), kikeresztezés útján tartottuk meg a háttérmutációtól mentes változatot. A dolgozatban leírt kísérletek már ez utóbbi törzssel készültek. A *KG01267* allél egy P{SUPor-P} transzpozon inszerciós elemet tartalmaz, melyben megtalálható a su(Hw) (*suppressor of Hairy-wing*) kromatin izolátor, mely egyben gátolja az 5' szabályozó elemek transzkripciót befolyásoló hatását. Saját méréseink alapján az inszerció az *Mtmr6* génextpresszió kivül a szomszéd gén, a *CG3520* kifejeződését is befolyásolja.

A kísérletek során használt inszerciós mutánsokat sok esetben nagy, átfedő deléció tartalmazó alléllal szemben vizsgáltuk, így csökkentve az esetleges háttérmutációs hatásokat. *EDTP* mutánsokat *Df161*-gyel kereszteztük, míg az *Mtmr6* mutáns alléleket *Df778*-cal. Az *Mtmr6* menekítésre használt transzgenikus törzsből megtalálható az *Mtmr6*-tal átfedő genomi régió (CH322-185K17).

Az *Atg8a* az X. kromoszómán helyezkedik el. A *KG* allélt egy P{SUPor-P} transzpozon inszercióval hozták létre, mely az *RA* forma 5' intronikus régiójában található. A *d4* egy deléciós allél, mely szintén az *RA* variánst érinti, az 5' UTR és 1 exon hiányzik belőlük (12/C. ábra).

3.1.2 A klonális RNS interferencia illetve túltermeléses vizsgálatokhoz használt törzsek

Az mCherry-*Atg8a* klonális mikroszkópos mérésekhez a *hsFlp; pAct<CD2<Gal4, UAS-nlsGFP, r4-mCherry-Atg8a* állatokat használtunk. Az mCherry-*Atg18a* riportert mikroszkópia esetén használt törzs: *hsFLP; UAS-Dcr-2; r4-mCherry-Atg18a, Act<CD2<Gal4, UAS-nlsGFP*. A LysoTracker Red klonális *RNSi/overexpresszió* mérések esetén használt törzs: *hsFlp; pAct<CD2<Gal4, UAS-nlsGFP*. Az *Mtmr6^{GD}* esetén a vizsgált F1 állatok tartalmaztak a fentiekén túl UAS-Dcr-2-t is a hatékony géncsendesítés végett. A 2xFYVE-GFP mikroszkópiához az UAS-GFP-2xFYVE transzgent Cg-Gal4 driverrel hajtottuk meg. A Ref(2)P aggregátumok vizsgálatához a TubGFP-ref(2)P^{3-4M} volt segítségünkre.

3.2 A stressz körülmények kiváltásához használt kezelések

Éhezési stressz vizsgálatához 74-92 órás harmadik lárvastádiumban lévő táplálkozó lárvákat használtunk. Az aminosav megvonásos éhezés kiváltásához 20%-os szacharózoldatba helyeztük a lárvákat a kísérlet előtt 3 órával. A komplett éhezés esetén PBS (*phosphate buffered*

saline; Sigma-Aldrich P4417) oldalba kerültek a lárvák a vizsgálat előtt 3 órával. Az oxidatív stressz kiváltásához a lárvákat friss kukoricalisztes-cukros-élesztős táptalajra (0,825 g kukoricaliszt, 0,405 g szacharóz, 0,585 g szárított élesztő, 3 ml víz) helyeztük 3 órával a vizsgálat előtt, melyhez 50 mM paraquatot (1,1'-dimethyl-4-4'-bipyridiniumdichloride; Sigma-Aldrich, 180,858) kevertünk. Hőstressz vizsgálatához a táptalajhoz élesztőszuspenziót adtunk (2,5 ml víz + 0,5 g élesztő), majd a lárvákat a felhasználás előtt 1 óra hosszan 32°C-on tartottuk. A GFP-Ref(2)P vizsgálatokhoz a lárvákat 4 órás éhezésnek, illetve 4 órás paraquat kezelésnek tettük ki felhasználás előtt.

3.3 RNS kivonás és PCR

A lárvális zsírtest vizsgálatokhoz mintánként 10-20 lárva (L3F 74-92 h illetve L3W esetén 110-120h) zsírtestét izoláltuk PBS-ben, majd TRI reagensbe (Zymo Research, R2050-1-50) helyeztük és homogenizáltuk a mintákat. A szemfejlődés vizsgálatához mintánként 30 pár szem-antenna imaginális korongot izoláltunk TRI reagensbe, majd homogenizáltuk. Az RNS kivonást a Direct-zol™ RNA MiniPrep kit (Zymo Research, R2050) protokollja szerint végeztük el, majd a mintákat DNÁzzal emésztettük. A megfelelő tisztaságú RNS mintákat a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, K1621) segítségével írtuk át cDNS-re. A gélelektroforézissel egybekötött PCR esetén a primerek úgy lettek tervezve, hogy 100-150 bp amplikont adjanak, a PCR program a 2. táblázatban olvasható. Gélelektroforézist követően a kapott pixelintenzitásokat a belső kontroll eredményéhez normalizáltuk. Minden esetben $n \geq 3$ biológiai párhuzamossal végeztük a kísérleteket. qPCR (quantitatív polimeráz láncreakció) esetén SYBR Green I alapú PCR-t használtunk (2. táblázat), a detektálás pedig LightCycler® 96 (Roche) készülék segítségével történt. A qPCR-hez használt primerek 70-120 bp amplikont képeznek. A qPCR esetén a mintákból három technikai párhuzamost használtunk a megfelelő pozitív és negatív kontrollok mellett. A biológiai párhuzamosok száma az adott kísérletnél van feltüntetve. A qPCR specifitás az olvadási görbék alapján ellenőrizve lett minden esetben.

2. táblázat: A disszertációban szereplő polimeráz láncreakciók típusai és részletei

PCR típusa	Szemiquantitatív PCR	Quantitatív PCR
Használt protokoll	2 µl cDNS (50 ng/µl) + 1,5 µl 10x DreamTaq Green Buffer (Thermo Fisher Scientific, EP0712) + 1,5 -1,5 µl <i>forward</i> és <i>reverse</i> primerek (5 -5 µM) + 0,3 µl dNTP (10 mM) + 0,15 µl DreamTaq™ Green DNA Polymerase (Thermo Fisher	10 µl 2x FastStart Essential DNA Green Master (Roche, 06402712001) + 1 µl DNáz/RNáz mentes víz + 100 ng cDNS + 4 µl reverse és forward primer

	Scientific, EP0712) + 8,05 µl DNáz/RNáz mentes víz	
PCR program	- 95°C 3 perc - 34x: 95°C 30 s; 58°C 30 s; 68°C 5 perc - 68°C 10 perc - 4°C	-95°C 10 perc -45x: 95°C 10 s; 58°C 10 s; 72°C 20 s
kiértékelés	-0,01% ethidium-bromid tartalmú, 1%-os agaróz gélen futtatva -ImageJ 1.46r programban pixelintenzitás méréssel	2 ^{-ΔΔCT} módszer szerint a Gapdh értékekkel normalizálva

3.3.1 Primer szekvenciák

A zsírtestben mért kísérletekhez használt primereket a 3. táblázat foglalja össze.

3. táblázat: A disszertációban szereplő, zsírtesthez köthető PCR-ek során használt primer szekvenciák

Primer név	Forward szekvencia	Reverz szekvencia
<i>gapdh</i>	5'-AAA AAG CTC CGG GAA AAG G-3'	5'-AAT TCC GAT CTT CGA CAT GGC-3'
<i>Mtmt6-A</i>	5'-ATC GAG GAG GAG TTC AAC GA-3'	5'-CCG TGG GAT TTT TGG TAT TG-3'
<i>Mtmt6-B</i>	5'-ACG AAA TAA AGC TCG CCA AG-3'	5'-CAA GGG AAG CTT CTC AAT GC-3'
<i>Mtmt6-C</i>	5'-CGG TTG AGT GGG GAA AAG T-3'	5' - CAA GGG AAG CTT CTC AAT GC-3'
<i>Mtmt6-C</i>	5'-GAG GAA GAC AGC GGT TGA GT-3'	5' - CAA GGG AAG CTT CTC AAT GC-3'
<i>EDTP</i> qPCR	5'-GGG CTG TGA GTT CTT CAA AAA G-3'	5'-GGG AAT GTT GAT ATT CGC ATC G-3'
<i>EDTP</i> sqPCR	5' - TAC TTC ATG GCC GTT TCC TC-3'	5'- AGA TCC CAA TCC CGG TAC TC-3'
<i>ref(2)P</i>	5'-TGG ATC GAC GCT GAT AAA GAT G-3'	5'-TGG TGA AAT TGC TCG GAT CG-3'
<i>atg8a</i>	5'-CGT GAT GTT CCT GGT ACA GGG A-3'	5'-CAA TAC AAG GAG CAC GC-3'

A szemdiszkusz kísérletek során használt primerek szekvenciáit a 4. táblázat foglalja össze.

4. táblázat: A disszertációban szereplő, szemdiszkusz PCR-ek során használt primer szekvenciák

Primer név	Forward szekvencia	Reverz szekvencia
<i>Act-5C sq</i>	5'-GGA TAC TCC CGA CAC AA 3	5'-GAG CAG CAA CTT CGT CA-3'
<i>Act-5C q</i>	5'-CCA GAG ACA CCA AAC CGA AAG-3'	5'-GAG CAG CAA CTT CGT C-3'
<i>RpL 32</i>	5'- GCT AAG CTG TCG CAC AAA TGG 3'	5'-GTA GCC AAT GCC TAG CTT GTT C 3'
<i>atg4a</i>	5'-TGG TCA GAT GGT TCT CGC C-3'	5'-TTC AAG GCA GCG CTT TAA GG-3'
<i>atg4b</i>	5'-TGG TCA GAT GGT TCT CGC C-3'	5'-AAG GCA CAT GGG GTT TTG G-3'
<i>atg18a</i>	5'-CAG AAA CCA TGA GCC TGC-3'	5'-AGA CGC TCG ATG AGG AAC AG-3'
<i>atg18b</i>	5'-CTT TAC TTC CCT GTC CGT GC-3'	5'-TAA AGT GCA TCT TGA GGC-3'- 3'
<i>atg3</i>	5'-CAA GTC AAT TGA GAG AGC CAT C-3'	5'-TGT CGC TAT CTG GAG TGT GC-3'
<i>atg14</i>	5'-CCA TCT GGA CGT GAA CAA TG-3',	5'-GCA GAG AGT TTT CGT CCT CTG-3'
<i>atg101</i>	5'-CAC CTG ACG ACC CTC CAT-3'	5'-GGG ATC CAA AGT CAC AAT ACT GA-3'
<i>htt</i>	5'-GGT GGT CAA TAG TGG AGT GC-3'	5'-GCG ATT ATC TCC GGG TCA TC-3'
<i>atg8aA sq</i>	5'-CGT GAT GTT CCT GGT ACA GGG A-3'	5'-CAA TAC AAG GAG CAC GC-3'
<i>atg8aA q</i>	5'-GGT CAG TTC TAC TTC CTC ATT CGC-3'	5'-ATA GTC CTC GTG ATG TTC CTG-3'
<i>atg8aB</i>	5'-CGT GAT GTT CCT GGT ACA GGG-3'	5'-AGT CAT AGA TGC GCT GA-3'
<i>atg8aB</i>	5'-CGT GAT GTT CCT GGT ACA GGG-3'	5'-ATT CCA GAG CCA AGG AAA TG-3'
<i>atg8b</i>	5'-ATC CGC AAG CGT ATC AAT CT-3'	5'-TGA CGA CGT TGT CTG CTT CT-3'

3.4 Fehérje izolálás és immunoblot

3.4.1 Mintaelőkészítés

A zsírtestből származó fehérjemintákhoz mintánként 20-20 L3F, illetve L3W lárva zsírtestét használtuk fel. A szöveteket hideg PBS-be gyűjtöttük, melyet a lízis előtt eltávolítottunk. A mintákhoz ezt követően 40 µl lízis puffert (Fly lysis buffer) és 40 µl 2x SDS mintafelvívő oldatot adtunk, majd homogenizáltuk a zsírtesteket. Szemdiszkuszból származó fehérjeminták esetén 30 pár L3W szemdiszkuszt izoláltunk mintánként, melyhez 30-30 µl lízis puffer és proteináz inhibitor került hozzáadásra. Mindegyik fajta szövet esetén 5 perc, 95°C-os denaturálással fejeztük be a mintaelőkészítést.

3.4.2 Immunoblott

A western-blot protokoll alapjául Piracs és mtsai., 2012. publikációja szolgált. Mintánként 20 µl-t pipettáztunk a gélbe. A fehérjék szétválasztása elektroforézissel történt gradiens akrilamid gélben (4-20%-os gradiens gélen BioRad #456-1093), futtató pufferben. A nedves blottolás transzfer pufferben, 100 V-on, és 1 óra alatt ment végbe. A fehérjék ekkor a nitrocellulóz membránra kerültek át. Majd az egy órás blokkolást (3 tömeg%-os tejporos TBST-ben, billegő tálcán, szobahőmérsékleten) követően került rá az elsődleges ellenanyag (egy éjszakán át 4°C-on, billegőn) 2. nap 3 x 10 perces mosás TBST-ben, szobahőmérsékleten, billegőn. Ezt követően 1 óra másodlagos ellenanyag jelölés következett szintén szobahőn. Majd újabb 3 x 10 perc TBST mosás után előhívás következett. 5 perc mosás AP pufferben. Előhívó oldat: 6ml AP puffer, 120 µl NBT/Bcip (Sigma-Aldrich #72091)-pel történt. Az előhívás leállításához a membránt 3 x öblítettük desztillált vízzel.

3.4.3 Az immunoblotthoz használt oldatok

- *Ecetemuslica* lízis puffer (Fly lysis buffer): 1 % Tween20, 50 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, bidesztillált víz. 10 ml lízis pufferhez 1 db proteináz gátló tableta került (Roche, complete Mini)
- 2x SDS-es mintafelvívő: 950 µl 2x Laemmler Sample Buffer (Bio-Rad #161-0737), 50 µl β-mercaptoethanol
- 10x futtató puffer: 30,3 g Tris base (Sigma-Aldrich #T1503), 144 g glicin (VWR #24403.290), 5 g SDS (Sigma-Aldrich #L-4390), 1 literben oldva kétszer desztillált vízzel. A futtatás 1X futtató pufferben történt

- 10x transzfer puffer: 30,3 g Trisma base (Sigma-Aldrich #T1503), 144 g glicin (VWR #24403.290), 1 liter kétszer desztillált vízben oldva.
- 1x transzfer puffer: 800 ml kétszer desztillált víz, 100 ml metanol, 100 ml 10x transzfer puffer.
- 10x TBS (pH 7,6): 15,175 g Trisma base (Sigma-Aldrich #T1503), 54 g NaCl, 500 ml kétszer desztillált vízben oldva
- 1x TBST: 100 ml 10x TBS (pH 7,6), 900 ml kétszer desztillált víz
- 3% tejpóros TBST: 3 tömeg %-os tejpóros (BioRad #170-6404) TBST-ben
- AP puffer: 1 M MgCl₂, 5 M NaCl, 1 M Tris (pH 9,5)

3.4.4 Az immunoblottokhoz használt ellenanyagok

Elsődleges antitestek: 3%-os tejpóros TBST-ben hígítva

- patkány anti-EDTP 1:500 (Papp és mtsai., 2016),
- nyúl anti-Ref(2)P 1:2500 (Pircs és mtsai., 2012),
- egér anti- α Tub84B 1:2500 (Sigma-Aldrich #T6199),
- nyúl anti-Atg8a 1:2500 (Takáts és mtsai., 2013),
- patkány anti-Atg13 1:5000 (Nagy és mtsai., 2014b)

Másodlagos antitestek:

- anti-nyúl IgG alkalikus foszfatázzal 1:1000 (Sigma-Aldrich A11008),
- anti-patkány IgG alkalikus foszfatázzal 1:1000 (Sigma-Aldrich A8438),
- anti-egér IgG alkalikus foszfatázzal 1:1000 (Sigma-Aldrich A5153)

3.4.5 Kiértékelés

Az előhívás után lefotózott képeket Image Studio Lite 5.2 (Li-Cor Bioscience) szoftver segítségével dolgoztuk fel és értékeltük ki. 2-6 biológiai párhuzamost és 2 technikai párhuzamost vizsgáltunk minden esetben.

3.5 Fluoreszcens mikroszkópia

A megfelelő kezelések után az L3F stádiumú lárvákból zsírtestet, illetve szem-antenna imaginális korongot boncoltunk PBS-ben. A fluoreszcens transzgént tartalmazó mintákat fedő folyadékkal fedtük egyből glicerin:PBS 4:1 arányú oldatával, melyhez 50 μ M-os Hoechst (H-1399, Molecular Probes 1mg/ml) magfestéket kevertünk. A LysoTracker Red (L-7528, Life Technologies) festés esetén 1:1000-ben hígítást alkalmaztunk, a mintákat mosás után fedtük.

A fluoreszcens képek Zeiss AxioImager Z1 típusú epifluoreszcens mikroszkóppal, ApoTome szemikonfokális feltétellel készültek (ELTE, Budapest), 100, 200 illetve 400-szoros nagyítással. A fotózáshoz és a képek feldolgozásához (Cut View képek előállításához $1\ \mu\text{m}$ -es optikai szeletekből *maximum intensity projection* eljárással) Zeiss AxioVision 4.82 programot használtunk, (Plan-NeoFluar 10x 0,3 NA, Plan-NeoFluar 20x 0,5 NA és Plan-Apochromat 63x 1,4 NA objektívekkel). A kiértékelést pedig ImageJ 1.45s szoftver segítségével végeztük. A kiértékelés során a háttér kivonását és a jel (pontos szerű struktúrák) kijelölését minden esetben az adott képnél külön állítottuk be, majd a szoftver segítségével leszámoltuk a fluoreszcens terület arányát illetve megnéztük a markerekkel jelölt struktúrák/pöttyök számát sejtenként is. Némely esetben a struktúrák átlagos méretét is összehasonlítottuk.

3.6 Elektronmikroszkópia

Az L3W szem-antenna diszkuszok illetve L3F zsírtestek izolálása PBS-ben történt. A mintákat 1 óra hosszan fixáltuk szobahőmérsékleten 2%-os formaldehid, 0,5% glutáraldehid oldatban (3mM CaCl_2 , 1% szacharóz, 0,1 M Na-kakodilát, pH 7,4). 0,1 M kakodilát pufferrel történő mosást követően a mintákat 0,5% ózmium-tetroxiddal, majd fél órán át uranil-acetáttal inkubáltuk. A víztelenítés felszálló alkoholsor használatával történt. A beágyazás LR white-tal történt, 24h-át 60°C -on. Az ultravékony metszetek (70-80 μm) festéséhez 4% uranil acetát-methanolt (1:1) használtunk 8 percig, majd ólom-citrátot 3 percig. Az ultrastukturális képek Jeol JEM-1011 transzmissziós elektronmikroszkóppal (ELTE, Budapest) készültek.

3.7 Statisztika

A statisztikai kiértékelést RStudio 4.1.2-ben végeztük. A mintákon először normalitás tesztet végeztünk, melyhez a Shapiro-Wilk tesztet alkalmaztunk. Klonális vizsgálatok esetén, ahol a géncsendesítés hatását a kontroll, környező sejtekhez hasonlítottuk, ott normál eloszlás esetén kétmintás páros t -próbát végeztünk. Amennyiben az egyik csoport vagy mindkettő nem normál eloszlást mutatott, ott a Wilcoxon-féle előjeles rang próbát alkalmaztunk. Független minta csoportok összehasonlítása során a normál eloszlású minták esetén F tesztet vizsgáltuk a varianciájukat. Amennyiben a varianciák megegyeztek, kétmintás független t -próbát alkalmaztunk, ellenkező esetben Welch-tesztet. Nem normál eloszlású független minták esetén Mann-Whitney U tesztet használtunk.

Amennyiben szükséges volt, Bonferroni post hoc korrekciót is alkalmaztunk. A disszertációban a szignifikancia szintek jelölését az alábbiak szerint tüntettem fel: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

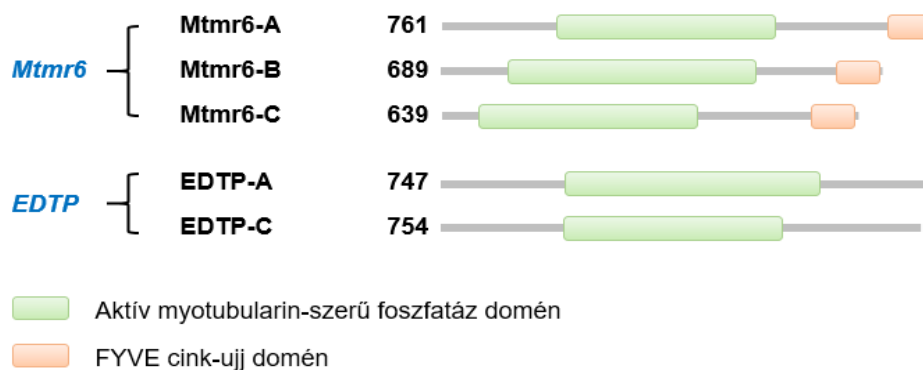
Az adatok ábrázolására használt ggplot2 diagramok szintén az RStudio 4.1.2 szoftver segítségével készültek (Wickham 2016). A vízszintes vonalak a mediánt jelölik. Az oszlopok mutatják 25-75 percentilisig az adatokat, rajta az egyedileg mért adatpontokkal. A szakáll a minimum és a maximum értékeket mutatja az extrém kiugró értékek nélkül.

4 Eredmények

4.1 A stressz-indukált autofágia szabályozási elemeinek azonosítása *Drosophila* lárvális zsírtestben

4.1.1 Éhezés hatására megnő két myotubularin típusú lipid foszfatáz mRNS expressziója lárvális zsírtestben

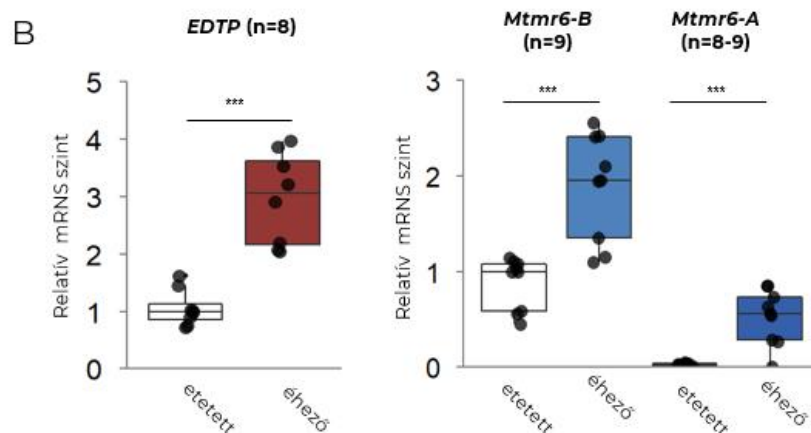
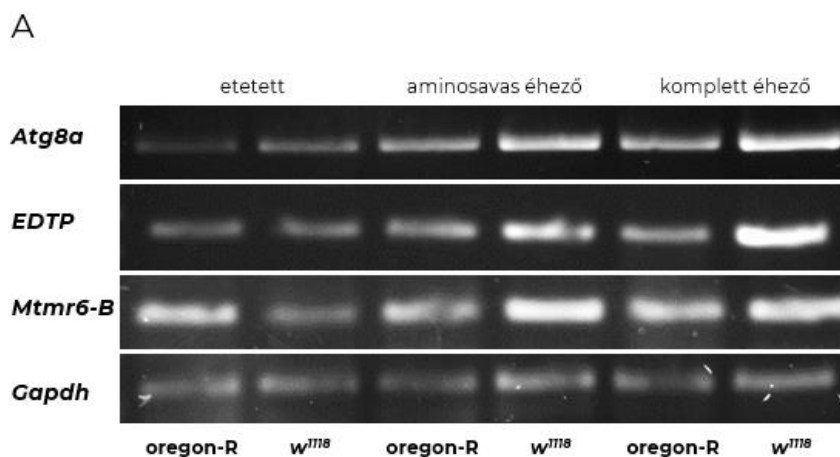
A szakirodalomban fellelhető adatok alapján feltételeztük, hogy az MTMR14 ortológ **EDTP** és az *Mtmr6,-7,-8* közös *Drosophila* ortológja, az **Mtmr6** 3-foszfatázként antagonizálnak az autofágiában szerepet játszó bizonyos foszfoinozitidek [PI3P és PI(3,5)P₂] képződésével, és ezáltal gátló faktoraik lehetnek az autofág lebontásnak (Vergne és mtsai., 2009; Dowling és mtsai., 2010; Zou és mtsai., 2012 a és b). Az *EDTP* génről a Flybase adatbázis szerint két, nagy mértékben hasonló *splice* variáns (mRNS izoforma) képződik. Szekvenciájában a Pfam adatbázis predikciója szerint megtalálható az aktív foszfatáz domén (13. ábra). Az *Mtmr6*-nak három *splice* variánsa ismert, melyek a PTP doménon kívül egy FYVE domént is tartalmaznak (13. ábra). Így elképzelhető, hogy az *Mtmr6* a FYVE doménjén keresztül a PI3P-hez kapcsolódik, míg *EDTP* esetén ez nem valószínű.



13. ábra: A *Drosophila* Mtmr6 és EDTP fehérjék izoformái és domén szerkezetük. A Pfam adatbázis predikciója. Az *Mtmr6*-nak 3 izoformája ismert, mindegyikben megtalálható az aktív foszfatáz és FYVE domének. Az *EDTP*-nek két izoformája ismert, melyek közel hasonló méretűek, megtalálható bennük is az aktív PTP (foszfatáz) domén.

Autofág vizsgálatainkhoz a *Drosophila* lárvális zsírtestet választottuk modellszövetként, melynek poliploid sejtjeiben viszonylag könnyen megfigyelhető a bazális- és stressz-indukált autofágia (lásd Irodalmi áttekintés, A zsírtest fejezet) (Scott és mtsai., 2004). Először azt vizsgáltuk meg, hogy az *EDTP* illetve az *Mtmr6* kifejeződnek-e a lárvális zsírtestben. Továbbá kérdésünk az volt, hogy e gének expressziójában van-e különbség jól

táplált és a stressz körülmények között. Ennek eldöntésére jól táplált, aminosavaktól megvonatott és teljesen éheztetett környezetben tartott L3F lárvák zsírtestéből RNS kivonást követően RT-PCR-t végeztünk (hagyományos agaróz-gélelektroforézises módszerrel és valós idejű/*real-time* PCR-rel) (lásd anyagok és módszerek). Vizsgálatainkat kétféle muslica törzsen végeztük el: a vad típusú Oregon-R-rel és a legtöbb mérés során kontrollként használt izogemizált w^{1118} törzsszel. Annak ellenőrzésére, hogy a lárvák valóban éheztek-e, az *Atg8a* expresszióját is megvizsgáltuk, mely az irodalom alapján mindkét éhezési forma esetén megnő (Zinke és mtsai., 2002). Az általunk izolált mintákban is megnőtt az *Atg8a* mRNS mennyisége a kétféle éhezési hatására körülbelül hasonló mértékben (14. ábra). Különbség adódott azonban a két *Drosophila* törzs között: a w^{1118} állatok zsírtestében nagyobb az *Atg8a* mRNS expresszió mértéke. Méréseink alapján az *EDTP* és az *Mtmr6* mindkét törzsben egyaránt kifejeződik lárvális zsírtestben (14. ábra). Az *EDTP* mRNS mennyisége éhezési hatására nő, melynek mértéke a w^{1118} zsírtestben kifejezettebb az Oregon-R-hez képest. A PCR primereket úgy terveztük, hogy mindkét izoforma egyszerre sokszorozódjon fel a reakció során.

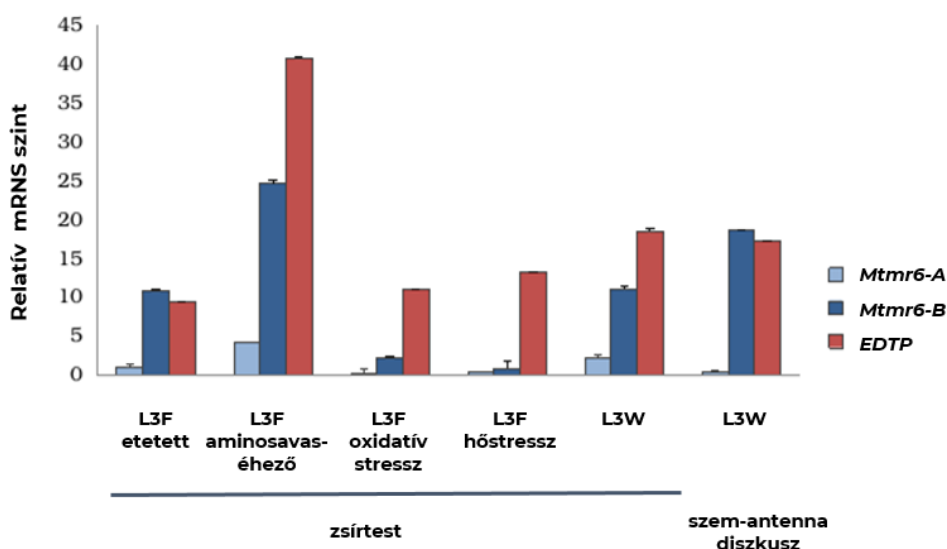


14. ábra: Myotubularin génexpresszió etetett és éheztetett mintákból származó *Drosophila* lárvális zsírtestben. **A:** szemi-kvantitatív PCR Oregon-R és izogenizált w^{1118} állatokból származó zsírtest mintákon. Mind az *EDTP*, mind az *Mtmr6* kifejeződik, expressziójuk éhezés hatására megnő, melynek mértéke a w^{1118} zsírtestben kifejezettebb az Oregon-R-hez képest. **B:** qRT-PCR w^{1118} állatokból származó zsírtest mintákon. Az aminosav-éhezés hatására mind az *EDTP*, mind az *Mtmr6-A* és *-B* mRNS mennyisége megnő. Az *Mtmr6-C* izofoma jelenléte nem detektálható. A normalizálásra *Gapdh*-t használtuk.

Az *Mtmr6* splice variánsaira külön terveztünk primereket. Ezek közül az L3F lárvák zsírtestében etetett körülmények között főként a *B* izoforma kimutatható, melynek kifejeződése éhezés hatására szintén megnő a w^{1118} lárvák zsírtestében. Oregon-R-ben nincs különbség a *B* izoforma mennyiségében. A qRT-PCR méréseket etetett és aminosav-éheztetett w^{1118} lárvákból származó mintákon végeztük el (14/B. ábra). Az *Mtmr6-A* jelenléte csak qRT-PCR segítségével volt kimutatható etetett lárvák esetén. Éheztetett körülmények között azonban az *A* splice variáns kifejeződése is megnő. A *C* splice variánst több, specifikus primerpárral is próbáltuk amplifikálni, de nem volt kimutatható mennyiségben a lárvális zsírtestben.

Vándorló lárvák zsírtestéből (L3W) kinyert RNS mintán is végeztünk qRT-PCR mérést (15. ábra). Ebben a kísérletben csak technikai párhuzamosok ($n=3$) állnak rendelkezésre (20 lárva zsírteste / mintacsoport) így szignifikancia vizsgálatot nem végeztem. Az *EDTP* expressziója az etetett L3F lárvákéhoz képest növekedést mutat a vándorló lárvákban (ugyanannyi cDNS mennyiségre vetítve, belső kontrollal, a *Gapdh*-val normálva). Az *Mtmr6-B* mennyisége a táplálkozó stádiumban mért értékhez képest nem változik, az *Mtmr6-A* szintén növekvő tendenciát mutat (15. ábra), a *C* variáns itt sem volt kimutatható.

Lárvális (L3W) szem-antenna imaginális korongból is kivontunk RNS-t. Ezen imaginális korongban is kifejeződik mindkét myotubularin. Az *Mtmr6* izoformái közül szintén a *B* splice-variáns jelenléte markáns, míg az *Mtmr6-C* nem fejeződik ki (15. ábra).



15. ábra: AZ EDTP és Mtmr6 mRNS expresszió összevetése L3F zsírtest mintákon különböző stressz körülmények között qRT-PCR-rel. Az EDTP mennyisége aminosavas-éhezést követően indukálódik. Az Mtmr6-B és -A mRNS mennyisége szintén éhezett körülmények között indukálódik. A B izoforma oxidatív stressz és hőstressz esetén csökkenő tendenciát mutat. Vándorló (L3W) zsírtestben is kifejeződik mindkét gén. Az EDTP mennyisége több az Mtmr6-B-hez képest. Az imaginális szem-antenna diszkuszban az Mtmr6-A mennyisége nem számottevő, a B izoforma dominál, az EDTP-vel közel hasonló mennyiségben van jelen. Az oszlopok az átlagot mutatják a technikai párhuzamosokból mért szórással (n=3).

Az éhezési stresszen kívül vizsgálatainkba bevontunk az oxidatív- és hőstresszt is, melyeknek szintén autofágia indukáló hatása van. A paraquat (1,1'-dimethyl-4-4'-bipyridiniumdichloride) széles körben alkalmazott oxidatív-stresszt kiváltó hatóanyag *in vivo* vizsgálatokhoz (Rzezniczak és mtsai., 2011). A paraquat kezelés hatására megnő a sejtekben a reaktív oxigéngyökök mennyisége. Hatására *Drosophila* zsírtestben indukálódik az autofágia (Wu és mtsai., 2009). Érdekes módon a paraquat kezeléssel kiváltott oxidatív stressz esetén eltérő expressziót mértünk az általunk vizsgált két myotubularin esetén az éhező mintákkal összevetve (15. ábra). Az Mtmr6-B mRNS mennyisége nem nő, hanem inkább csökkenő tendenciát mutat oxidatív stressz hatására a jól táplálthoz képest, az A-variáns pedig eltűnik bennük. Az EDTP kifejeződése nem mutat eltérést oxidatív-stressz hatására.

Hőstressznek kitett L3F lárvák zsírtestéből is izoláltunk RNS-t. A bennük mért EDTP expresszió az etetett körüli értéket mutatja. Az Mtmr6 izoformák (A és B) expressziója pedig csökkenést mutat (15. ábra).

4.1.2 *Drosophila* zsírtestben az Mtmr6 gátló faktorként hat, az EDTP pedig nem vesz részt a stressz-indukált autofágia szabályozásban

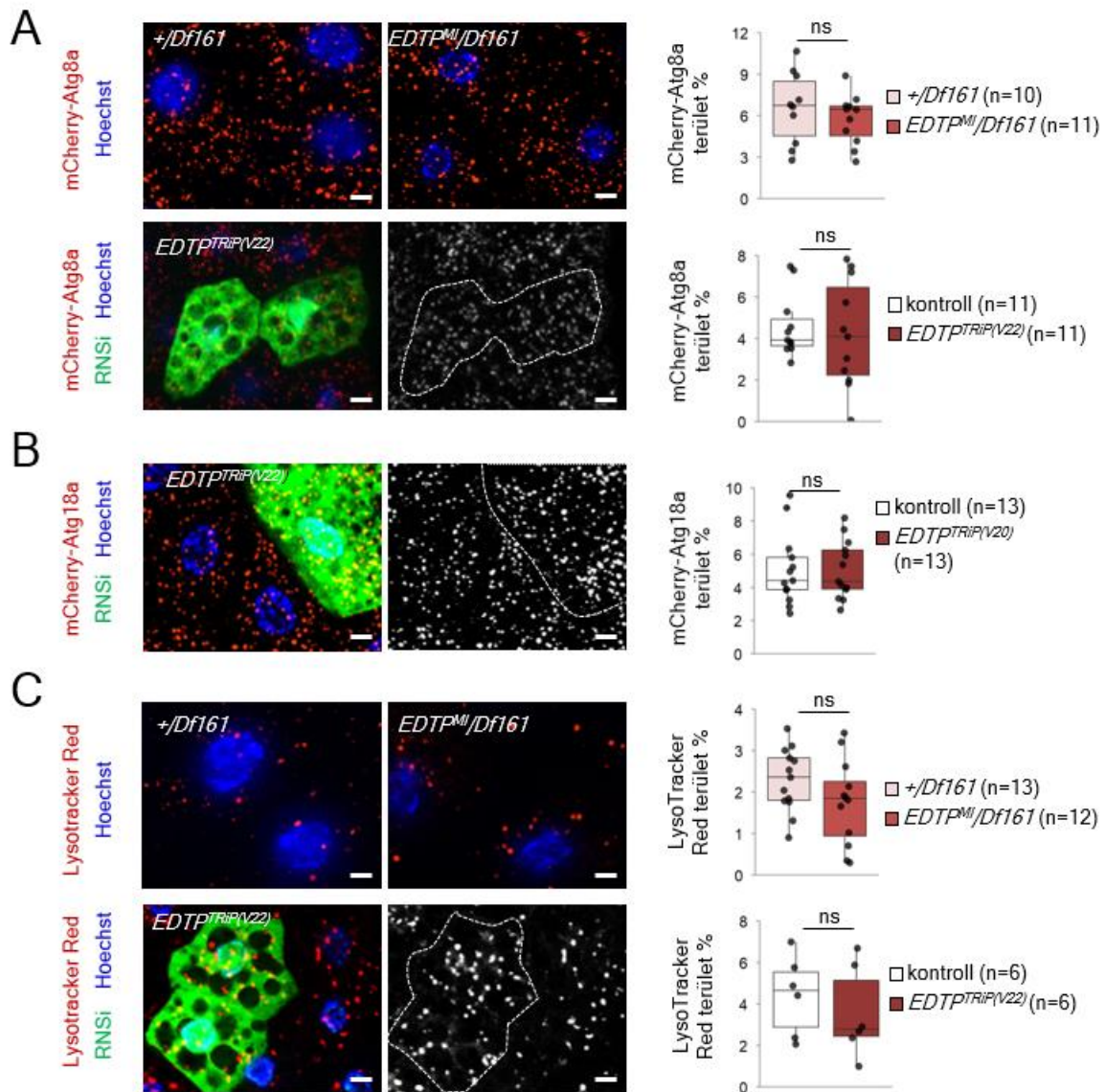
4.1.2.1 Éhezési stressz vizsgálatok

Az EDTP autofágiában betöltött szerepének vizsgálatához funkciócsökkenéses/funkcióvesztéses mutáns-, EDTP-RNSi- és a fehérjét túltermelő törzs is rendelkezésünkre állt. Az általunk használt allélokról bővebb információ az anyagok és módszerek fejezetben olvasható (3.1.1 fejezet). A géncsendesítő konstrukciók mindegyik esetben hatékonyak bizonyultak. Megállapítottuk továbbá, hogy a transzpozon inszerciós allélokról csökkent mennyiségű mRNS képződik vagy nem mutatható ki termék. A konstrukció validálási eredmények bemutatása Tagscherer Kinga doktori disszertációjának részét képezi, így azt a továbbiakban nem ismertetem. A fluoreszcens vizsgálatok során használt allélok mindegyike megfelelőnek bizonyult a funkcióvesztéses és funkciócsökkenéses vizsgálatokhoz, illetve EDTP esetén sikeres volt a túltermelés (*EDTP^{GSV6}*).

Az autofágia vonatkozású vizsgálatokat különböző fluoreszcens markerek felhasználásával végeztük el. Az mCherry-Atg8a riporter képes hozzákapcsolódni a különböző autofág struktúrákhoz, így képes jelölni a fagofórt, autofagoszómákat, amfiszómákat és autolizozómákat (Lőrincz és mtsai., 2017). Mivel ezen struktúrák mérete eltérő, így a riporter fehérjével detektálható pontszerű struktúrák is eltérő méretűek (Szatmári és mtsai., 2014). Kiértékeléseink során mértük a fluoreszcens jel területarányában a különbségeket. Az mCherry-Atg18a riporter a PI3P-t tartalmazó korai autofág struktúrákat jelöli (Klionsky és mtsai., 2021). A LysoTracker Red (LTR) savas kompartmentumokat jelölő marker, mely nem csak a savas autofág struktúrákat jelöli, de a savas lizoszómákat is. Etetett körülmények között L3F stádiumú lárvák zsírtestében ezen struktúrák nem, vagy alig detektálhatóak konfokális és szemikonfokális mikroszkóppal. Éhezés-indukált vagy fejlődési autofágia esetén azonban jelentősen megnő a sejtekben megfigyelhető LTR-pozitív terület aránya (Nagy és mtsai., 2015).

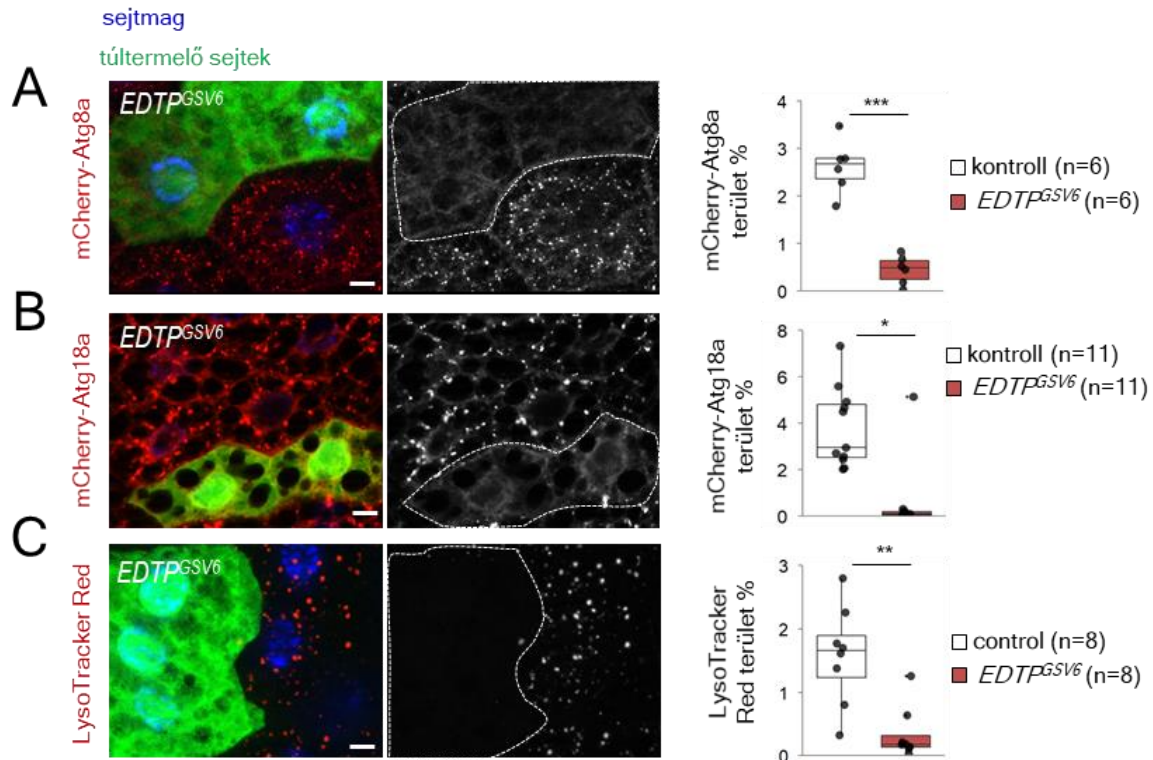
Aminosavas éhezés hatására az autofágia indukálódik az L3F stádiumú lárvák zsírtestében. Ezzel összhangban az mCherry-Atg8a, mCherry-Atg18a és LysoTracker Red riporterekkel mérhető autofág struktúrák területaránya nőtt a jól táplált körülményekhez képest (Manzéger és mtsai., 2021). Kutatócsoportunk korábbi eredményei szerint 2 órás éhezés során *EDTP* csendesített háttérben az autofág markerek területaránya megnő a kontroll éhező sejtekben mérthez képest (Papp és mtsai., 2016). 3-4 órás éhezést követően azonban sem *EDTP* deficiens genetikai háttérben, sem *EDTP* csendesített sejtekben nem tapasztaltunk eltérést a kontrollokhoz viszonyítva egyik autofág-marker használatával sem (16. ábra). Ezzel

összhangban az autofágia által lebomló Ref(2)P mennyiségében sem mértünk immunoblottal szignifikáns különbséget (19/B. ábra). Ezek alapján az EDTP hiánya az éhezés-indukált autofágia folyamatában nem okoz zavart.



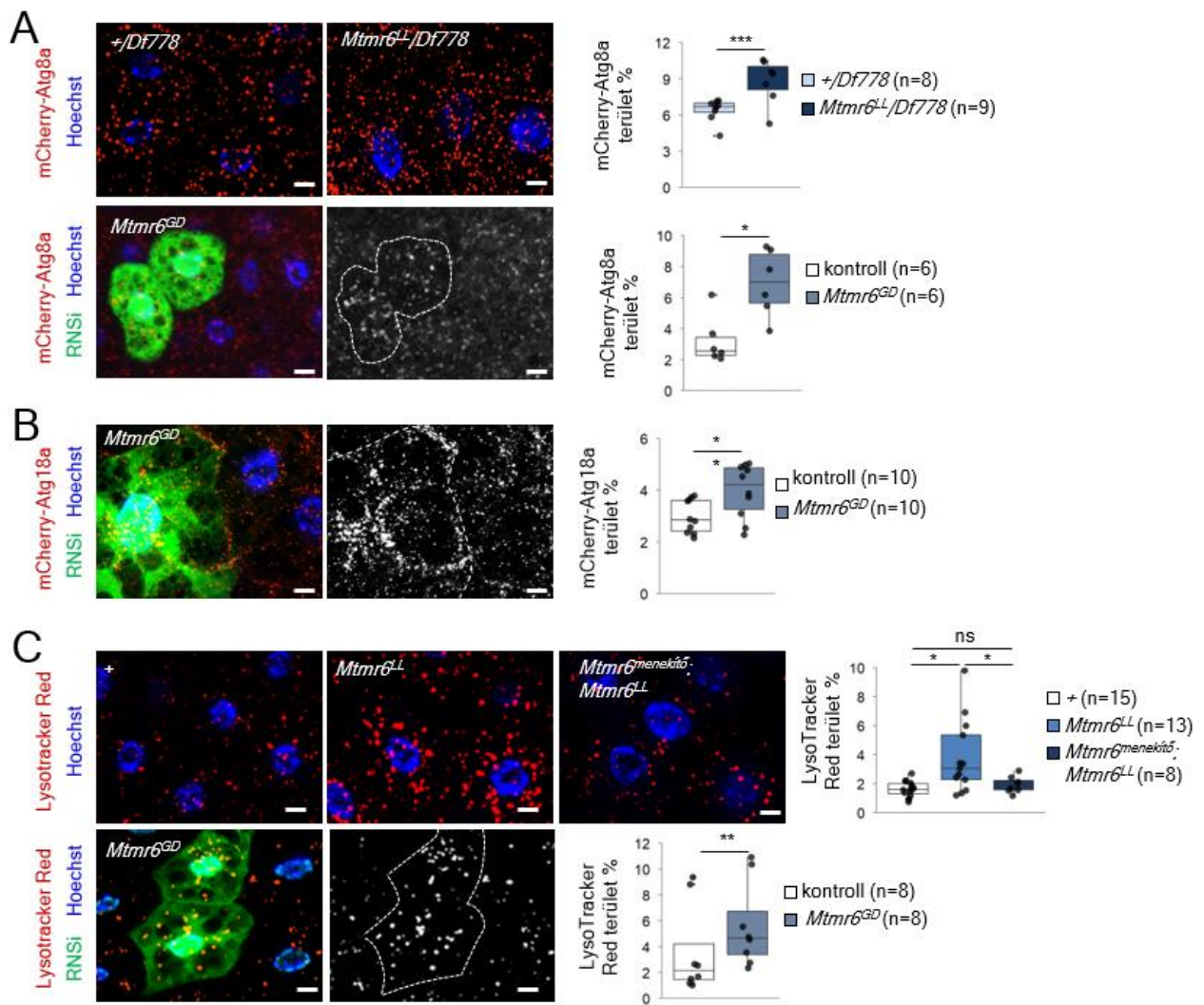
16. ábra: Éhező körülmények között az EDTP nem befolyásolja az autofágiát lárvális zsírtestben. A: Nem mutatható ki változás az mCherry-Atg8a riporter mennyiségben *EDTP* mutáns és géncsendesített genetikai háttérben sem. **B:** Nincs szignifikáns különbség az mCherry-Atg18a területarányban géncsendesítés hatására. **C:** Az *EDTP* mutáció, illetve géncsendesítés nem befolyásolja a savas (LysoTracker Red-pozitív) kompartmentumok területarányát. A géncsendesítés klonális vizsgálattal történt minden esetben, a mérésekhez a géncsendesített (zöld-GFP-pozitív) sejtek környezetében található sejtek szolgáltattak kontrollként (a genotípusok részletesen az anyagok és módszerek fejezetben olvashatóak). Méretskála: 10 μ m. Az ábrán látható szemikonfokális mikroszkópos képek több optikai szeletről készült felvétel egyesítéséből jöttek létre. *EDTP^{M1} / Df161*: *EDTP* mutáns allél hemizigóta formában. Hoechst: sejtmagok. A vizsgálatokhoz tartozó kvantifikálások eredménye az ábra jobb oldalán látható. ns: $p > 0,05$

Az *EDTP* overexpressziója azonban volt képes az indukált autofágia gátlására, mindhárom marker területaránya szignifikánsan csökkent az *EDTP* túltermelt sejtekben a szomszédos kontroll sejtekhez képest (17. ábra).



17. ábra: Éhező körülmények között az *EDTP* túltermelés képes csökkenteni az autofágiag aktivitást lárvális zsírtestben. **A:** Az mCherry-Atg8a területarány szignifikánsan csökken *EDTP* túltermelő sejtekben. **B:** Szignifikánsan csökken az mCherry-Atg18a területarány overexpresszió hatására. **C:** Az *EDTP* túltermelés szignifikánsan csökkenti a savas (LysoTracker Red pozitív) kompartmentumok területarányát. Az *EDTP* túltermelés klonális vizsgálattal történt minden esetben, a mérésekhez az *EDTP*-t overexpresszáló (zöld GFP-pozitív) sejtek környezetében található sejtek szolgáltak kontrollként (a genotípusok részletesen az anyagok és módszerek fejezetben olvashatóak). Méretskála: 10 μ m Az ábrán látható szemikonfokális fluoreszcens mikroszkópos képek több optikai szelet egyesítéséből állnak össze. A vizsgálatokhoz tartozó kvantifikálások eredménye az ábra jobb oldalán látható. Kék: Hoechst. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

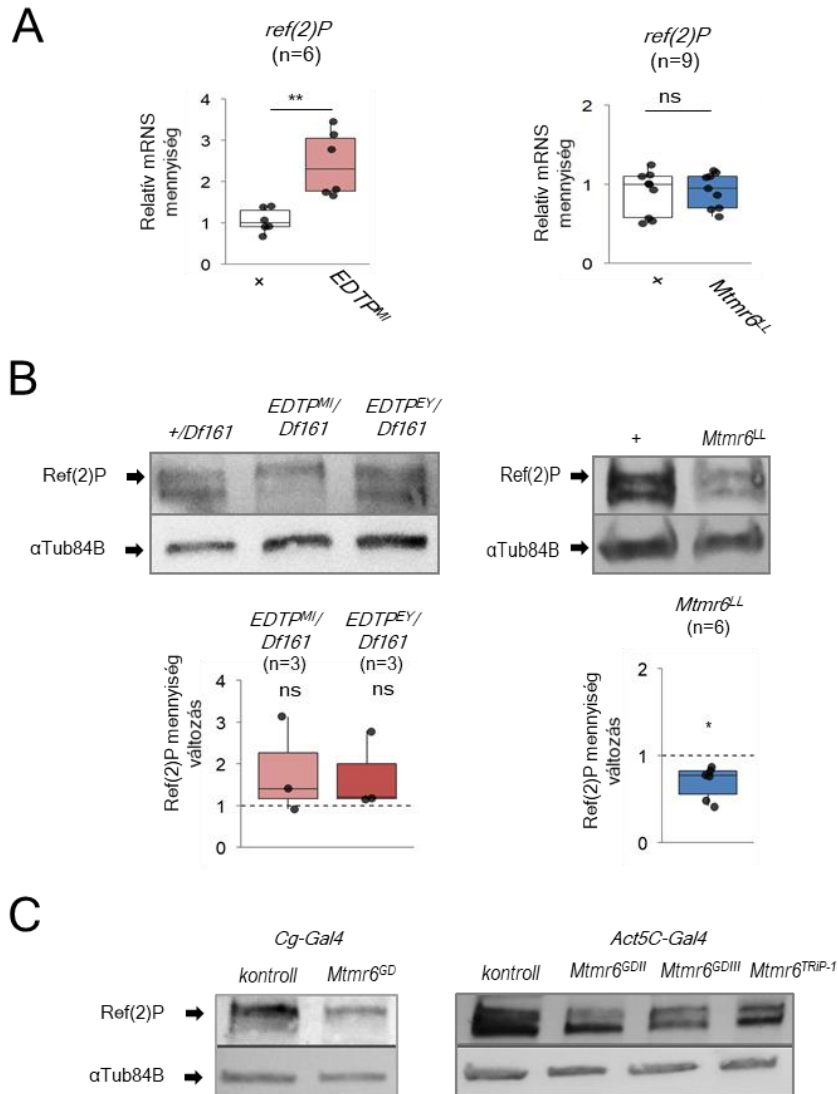
Az *Mtmr6* esetén eltérő működést figyeltünk meg. Az *Mtmr6* mutáció és géncsendesítés hatására is megnő az mCherry-Atg8a, az mCherry-Atg18a és a LTR pontszerű struktúrák területaránya a kontrollokhoz képest. (18. ábra) *Mtmr6* menekített háttérben a savas kompartmentumok területaránya a kontrollhoz hasonló. Így feltételezhető, hogy az *Mtmr6* hiánya az autofág stuktúrák mennyiségének növekedéséhez vezet.



18. ábra: Éhező körülmények között az *Mtmr6* autofágia-gátló hatású lárvális zsirtestben. A: Az mCherry-Atg8a területarány szignifikánsan nő *Mtmr6* mutáns és RNSi sejtekben. **B:** Az *Mtmr6*-RNSi hatására szignifikánsan nő az mCherry-Atg18a területarány. **C:** A savas (LysoTracker pozitív) kompartmentumok területarányát az *Mtmr6* mutációja és a géncsendesítés (*Mtmr6^{GD}*) is szignifikánsan növeli. *Mtmr6* menekítő konstrukció hatására a savas autofág struktúrák területaránya visszaáll a kontroll szintre. A géncsendesítés klonális vizsgálattal történt minden esetben, a mérésekhez a géncsendesített (zöld-GFP-pozitív) sejtek környezetében található sejtek szolgáltak kontrollként (a genotípusok részletesen az anyagok és módszerek fejezetben olvashatóak). Méretskála: 10 μ m Az ábrán látható szemikonfokális fluoreszcens mikroszkópos képek több optikai szelet egyesítéséből állnak össze. *Mtmr6^{LL}/Df778*: *Mtmr6* inszerciós mutáns allél hemizigóta formában. Hoechst: sejtmagok. A vizsgálatokhoz tartozó kvantifikálások eredménye az ábra jobb oldalán látható. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ns: $p > 0,05$.

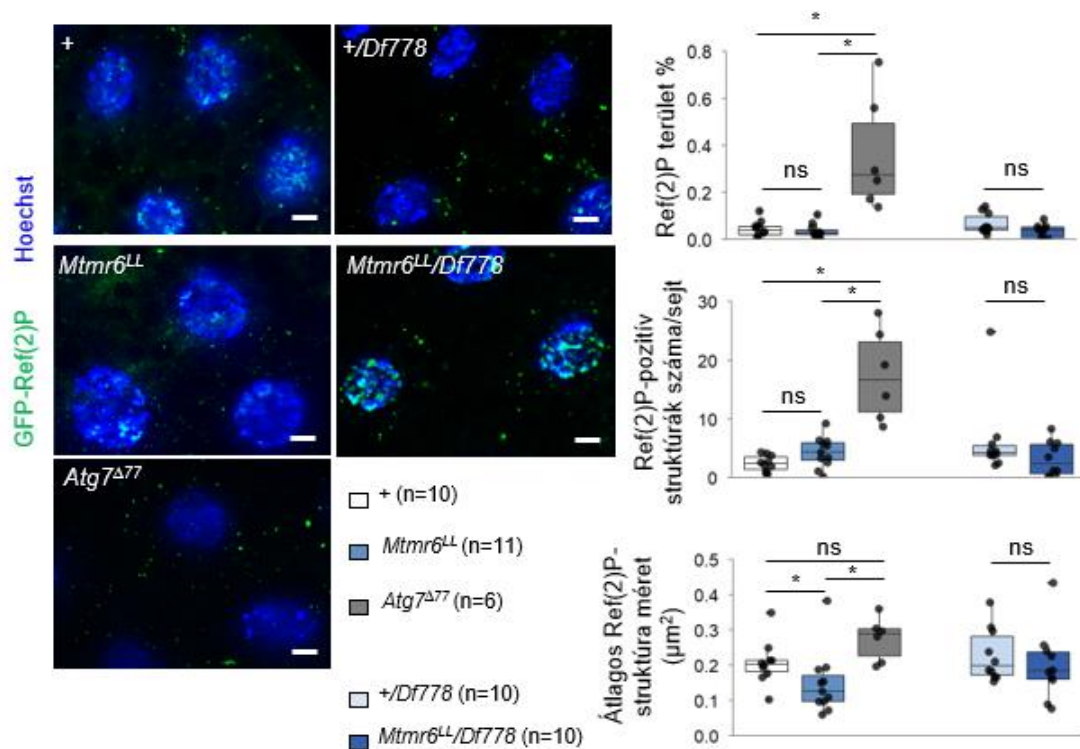
Ez a felhalmozódás lehet egy elakadt lebontó aktivitás miatt is vagy eredhet egy fokozott autofág működésből. A kérdés megválaszolásához megvizsgáltuk az autofágia által bomló Ref(2)P mennyiségét a sejtekben immunoblott segítségével. Változatlan génkifejeződés mellett (19/A. ábra) a szolubilis Ref(2)P mennyisége csökkent *Mtmr6^{LL}* genetikai háttérben (19/B.

ábra) és különböző géncsendesítések hatására (*GDII*, *GDIII*, *TRiP-1*, 19/C. ábra), ami arra utal, hogy *Mtmr6* hiányában nő a *Ref(2)P* degradációja, így nő az autofág fluxus.



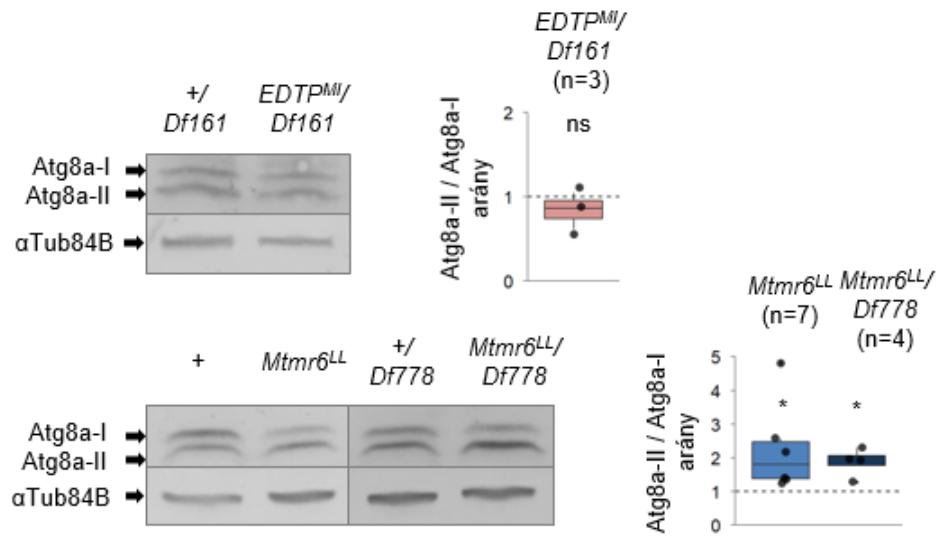
19. ábra: Éhezéskor a *Ref(2)P* mennyisége *EDTP* mutánsokban nem változik meg, *Mtmr6* deficiencia hatására azonban lecsökken. **A:** qRT-PCR eredménye, L3F zsírtest mintákban a *Ref(2)P/p62* mRNS mennyisége megnő *EDTP^{MI}* mutánsokban, míg *Mtmr6^{LL}* zsírtestben nem változik az mRNS expresszió. **B:** *Ref(2)P* mennyiségének vizsgálata immunoblottal. Az ábra alján a párhuzamosokból származó kiértékelés (pixelintenzitás változás a kontrollhoz képest) látható. *Mtmr6* mutánsokban az autofágia által bomló *Ref(2)P* mennyisége csökken. + : *w¹¹¹⁸*. **C:** *Mtmr6-RNSi* hatására a *Ref(2)P* mennyisége csökken a zsírtest sejtekben. Kétféle promóterrel meghajtott géncsendesítés esetén is hasonló eredményt kaptunk. A kontrollokban a *Gal4* forrás kifejeződik *RNSi* konstrukció nélkül. *Cg-Gal4*: zsírtestben, lymphoid szövetben és hemocitákban kifejeződő *Gal4*. *Act5C-Gal4*: általános kifejeződést mutató *Gal4*. *alfaTub84B*: normalizáló kontroll. *: $p < 0,05$. ns: $p > 0,05$.

A GFP-Ref(2)P-vel nagyrészt a sejtekben felhalmozódó Ref(2)P aggregátumokat lehet jelölni (Mauvezin és mtsai., 2014). *Atg7^{Δ77}* mutáns genetikai háttérben, ahol az autofagoszóma formálódás zavart szenved, megnő ezen aggregátumok mennyisége. Kísérleteinkben ezt használtuk pozitív kontrollként az aggregátumok jelölésére. *Mtmr6^{LL}* mutánsokban a kontrollhoz hasonlóan nem halmozódnak fel aggregátumok. A GFP-pozitív struktúrák méretében megfigyelhető egy kis mértékű csökkenés, mely csak a homozigóta mutánsokban adódott szignifikáns különbségnek (20. ábra). Ezen megfigyelések tovább erősítik azt a feltételezést, hogy *Mtmr6* hiánya nem befolyásolja az autofág lebontást.



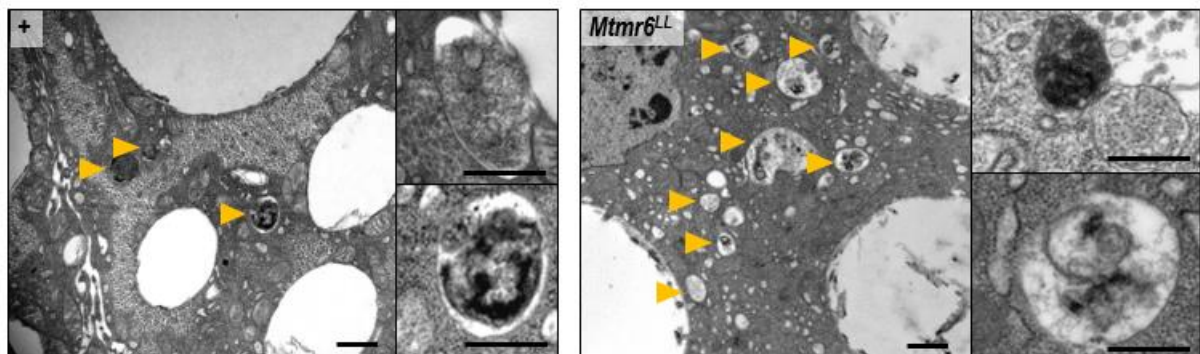
20. ábra: Éhezéskor a GFP-Ref(2)P mennyisége nem változik meg *Mtmr6* mutánsokban. A riportterrel jelölt aggregátumok mérete kisebbek. + : *w¹¹¹⁸*. *Atg7^{Δ77}* : az elakadt autofág folyamat pozitív kontrollja. *Mtmr6^{LL}/Df778*: *Mtmr6^{LL}* mutáció hemizigóta formában, nagy delécióval szemben (a genotípusok részletesen az anyagok és módszerek fejezetben olvashatóak). Méretskála: 10 μm. Hoechst: sejtmagok. Az ábrán látható szemikonfokális fluoreszcens képek több optikai szelet egyesítéséből állnak össze. *: $p < 0,05$; ns: $p > 0,05$.

Gyakran használt marker az autofágia folyamatának mérésére az *Atg8a* citoplazmatikus és membrán-kötött formájának immunoblottal való jelölése és arányuk vizsgálata (Mauvezin és mtsai., 2014). *Mtmr6* hiányában a membrán-kötött forma (*Atg8a-II*) aránya a citoplazmatikus *Atg8a-I*-hez képest megnőtt (21. ábra). EDTP hiányában a vártan megfelelően nem változott a két *Atg8a*-forma aránya (21. ábra).



21. ábra: Éhezéskor *EDTP* mutánsokban nem változik az *Atg8aII/Atg8aI* arány. *Mtmr6* mutánsokban megnő a membrán-kötött *Atg8a* aránya a citoszolikus formához viszonyítva. Az ábra bal oldalán az anti-*Atg8a* immunoblott eredménye látható, az ábra jobb oldalán pedig a párhuzamosokból származó kiértékelés (pixelintenzitás változás a kontrollhoz képest). *Atg8a-I*: citoplazmatikus *Atg8a* forma, *Atg8a-II*: autofág membránhoz kötött forma. α Tub84B: normalizáló kontroll. + : *w¹¹¹⁸*. *EDTP^{MI}/Df161*: *EDTP^{MI}* mutáció hemizigóta formában, nagy delécióval szemben. *Mtmr6^{LL}/Df778*: *Mtmr6^{LL}* mutáció hemizigóta formában, nagy delécióval szemben. *: $p < 0,05$. ns: $p > 0,05$.

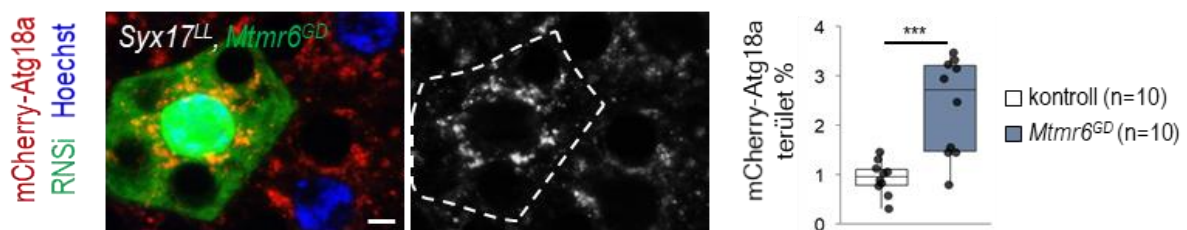
Fluoreszcens mikroszkópos eredményeinket ultrastrukturális vizsgálatokkal is alátámasztottuk. Éhezés-indukált autofágia során a sejtek citoplazmájában jól láthatóak elektronmikroszkópos felvételen a savas, elektrondenz autofág struktúrák, melyek mennyisége *Mtmr6^{LL}* mutánsokban megnő (22. ábra). A sejtekben megtalálhatóak korai, még lebontás előtti autofág struktúrák és késői, degradáló autolizoszómák is (22. ábra). Sok esetben membrán felhalmozódást figyeltünk meg a sejtmag körül *Mtmr6* hiányában.



22. ábra: Ultrastrukturális felvétel éhező L3F lárvákból származó zsírtestekről. A kontroll (+ - *w¹¹¹⁸*) citoplazmában megtalálható néhány autofág struktúrákhoz képest *Mtmr6* mutáns (*Mtmr6^{LL}*) genetikai háttérben

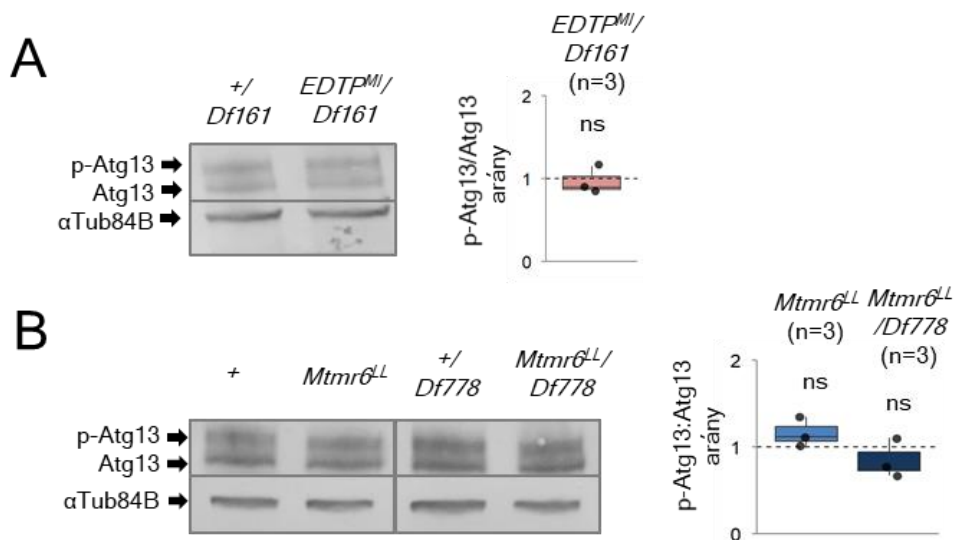
megnő az autofagoszómák száma (felső nagyítás) és az emésztett citoplazma komponenseket tartalmazó (alsó nagyítás) autofagoszómák száma. A sárga nyilak autofág struktúrákat jelölnek. méretek: 500 nm.

Megvizsgáltuk továbbá, hogy az *Mtmr6* vajon melyik lépésnél fejt ki gátló hatását az autofágiára. *Syx17* mutáns genetikai háttérben az autofagoszómák és lizoszómák fúziója gátolt (Takáts és mtsai., 2013). mCherry-Atg18a-t expresszáló *Syx17^{LL}* mutánsokban meg lehet vizsgálni, hogy az *Mtmr6* csendesítése hogyan hat a korai autofág struktúrák mennyiségére. Az *Mtmr6-RNSi* klónsejtekben megnőtt (körülbelül háromszorosára) az mCherry-Atg18a-pozitív területarány (23. ábra), így feltételezhetően éhező körülmények között az *Mtmr6* gátolja az autofagoszómák képződését.



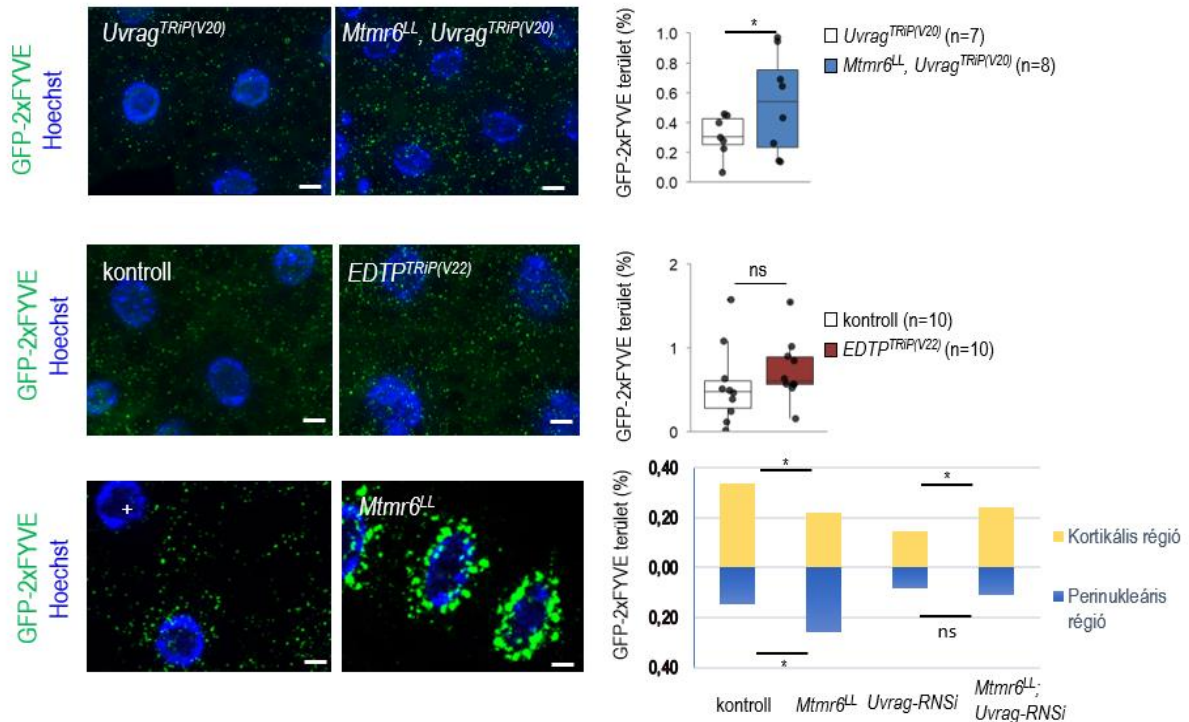
23. Ábra: Az autofagoszóma-lizoszóma fúzió gátlásakor *Mtmr6-RNSi* hatására nő a korai autofág struktúrák területe zsírtest sejtekben. *Syx17^{LL}* mutánsokban klonálisan csendesítettük az *Mtmr6*-ot (zöld- GFP-pozitív sejtek). Ennek hatására felhalmozódtak a sejtmag körül az mCherry-Atg18a-jelölt korai autofagoszómák mennyisége. Az ábrán látható szemikonfokális mikroszkópos képek több optikai szeletről készült felvétel egyesítéséből jöttek létre. Méretek: 10 μ m. ***: $p < 0,001$.

Az *Mtmr6* valószínűleg nem az indukciós komplexnél fejt ki a hatását, az *Mtmr6* hiánya ugyanis nem befolyásolja az Atg13 hiperfoszforilációs állapotát. Immunoblottal vizsgálva nem különbözik szignifikánsan az *mtmr6^{LL}* homozigóta mutánsokban, sem hemizigóta mutáns háttérben a foszforilált- és nem foszforilált-Atg13 fehérjék mennyiségének aránya (24. ábra). EDTP hiányában szintén nem változik meg az Atg13 foszforiláció (24. ábra).



24. ábra: Éhezés során nem változik meg az autofág aktivitáshoz fontos Atg13 foszforiláció mértéke Mtmr6 és EDTP mutáció hatására sem lárvális zsírtestben. A két myotubularin foszfatáz nem az indukciós lépések szabályozásában játszik szerepet. **A:** EDTP mutánsokban nem változik a foszforilált-Atg13/Atg13 arány. **B:** Mtmr6 mutánsokban sem mutatható ki szignifikáns változás az Atg13 foszforiláció mértékében. Az ábra bal oldalán az anti-Atg13 immunoblott eredménye látható, az ábra jobb oldalán pedig a párhuzamosokból származó kiértékelés (pixelintenzitás változás a kontrollhoz képest). alfaTub84B: normalizáló kontroll. + : w¹¹¹⁸. Mtmr6^{LL}/Df778: Mtmr6^{LL} mutáció hemizigóta formában, nagy delécióval szemben. EDTP^{MI}/Df161: EDTP^{MI} mutáció hemizigóta formában, nagy delécióval szemben. ns: p > 0,05.

A GFP-2xFYVE marker (Wucherpennig és mtsai., 2003) a PI3P-hez köt, és ezáltal képes jelölni a PI3P-pozitív autofág és endocitotikus struktúrákat is. Ezzel együtt blokkolja a downstream effektorok kapcsolódását ezen struktúrákhoz, így használata körültekintést igényel. Uvrag géncsendesített sejtekben a PI3K komplex működése az endocitózisban blokkolt (Lőrincz és mtsai., 2014), így a GFP-2xFYVE-pozitív struktúrák területarányában történő változás ez esetben feltehetően az autofág útvonalról érkezik. Az Uvrag csendesített sejtekben Mtmr6 deficiencia hatására megnő a GFP-2xFYVE riporter mennyisége, mely nagyrészt a kortikális régiót érinti (25. ábra). Ha az endo-lizoszómális rendszert nem blokkoljuk, akkor Mtmr6 mutánsokban a PI3P főleg a perinukleáris régióban halmozódik fel (25. ábra). Az EDTP éheztetve nem befolyásolja szignifikánsan a PI3P mennyiségét (25. ábra).



25. ábra: Éhezés során az *Mtmr6* befolyásolja a sejtek PI3P mennyiségét és lokalizációját, míg az EDTP nem okoz szignifikáns PI3P szint változást. *Uvrage* géncsendesített (*Uvrage^{TRIP(V20)}*) sejtekben a PI3K komplex működése az endocitózisban blokkolt, így a GFP-2xFYVE marker az autofág membránokon lévő PI3P-t jelöli. *Mtmr6^{LL}* mutánsokban *Uvrage-RNSi* esetén a kortikális régióban nő a PI3P, mely funkcionális endocitózis esetén perinukleáris lokalizációt mutat. Éhezés esetén az EDTP nem befolyásolja a sejtek PI3P mennyiségét. Az ábrán látható szemikonfokális mikroszkópos képek több optikai szeletről készült felvétel egyesítéséből jöttek létre. Méretskála: 10 μ m. *: $p < 0,05$; ns: $p > 0,05$.

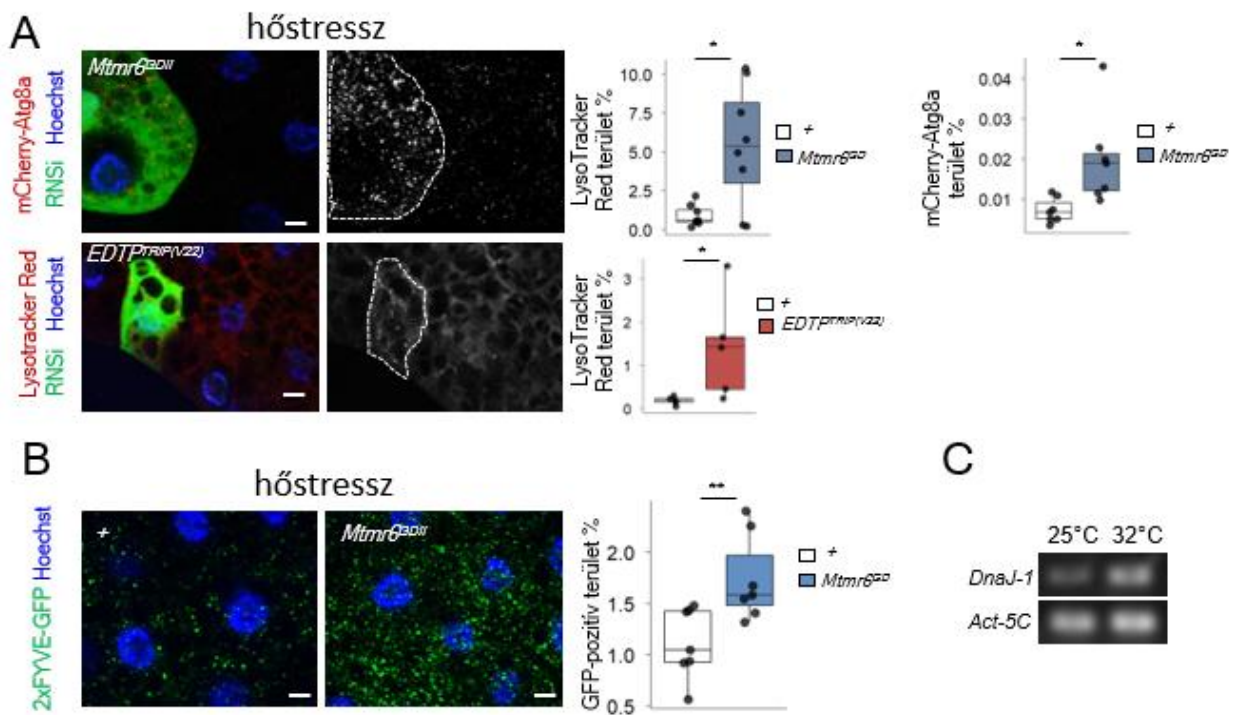
Ezen eredmények alapján az *Mtmr6* képes csökkenteni a PI3P mennyiségét és módosítani eloszlását a sejtekben, hiányában feldúsulnak a PI3P tartalmú membránok a sejtmag körül. Összességében elmondható, hogy az *Mtmr6* foszfatázként egyfajta fékentartó faktorként hathat az éhezés-indukált autofágia szabályozásban *Drosophila* lárvális zsírtestben.

4.1.2.2 Hőstressz és oxidatív stressz vizsgálatok

Génexpressziós vizsgálatok alapján az *EDTP* és az *Mtmr6* kifejeződése is eltér különböző stressz hatásokra (15. ábra). A továbbiakban arra voltunk kíváncsiak, hogy az éhezésen túl más stressz-indukált autofágia szabályozásban is részt vesz-e a két vizsgált myotubularin-szerű lipid foszfatáz.

Vizsgálataink során a hőstressz kiváltásához mikroszkópia előtt egy órán át 32°C-on tartottuk az L3F lárvákat. A hő sokkot követően a kontroll sejtekben nem fokozódik nagy mértékben az mCherry-Atg8, valamint a LTR-pozitív struktúrák területaránya. *Mtmr6* deficiens

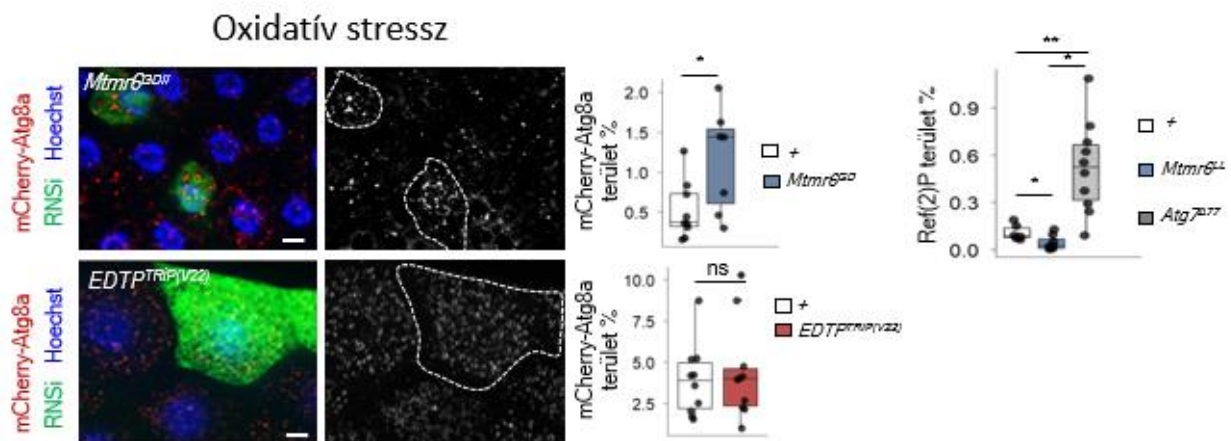
hátterben azonban megnőtt a jelölt struktúrák területaránya (26/A. ábra). A GFP-2xFYVE-pozitív struktúrák területarányában is szignifikáns növekedést tapasztaltunk (26/B. ábra). Az *EDTP* csendesítése szintén fokozta a savas kompartmentumok számát (26/A. ábra). Ez eltérést mutat az éhezöben tapasztaltnál képest. Az *EDTP* ez alapján vagy gátló faktorként hat a hőstressz során, de az is elképzelhető, hogy csak abban az esetben hat a sejtes önmérsztésre, amikor bazális (nem indukált) szinten van jelen a sejtekben az autofág folyamat. Mivel a kontrollokban alacsony autofág aktivitást mértünk, elképzelhető, hogy a kezelés nem váltott ki hőstressz-választ a sejtekben. A hősokek kezelését követően ezért RNS kivonást is végeztünk, és megvizsgáltuk, hogy aktiválódik-e a stresszválaszban szerepet játszó *DnaJ-1* expressziója. Az izolálás előtt 32°C-on tartott *w¹¹¹⁸* lárvák esetén a zsírtestsejtekben megnőtt a *DnaJ-1* mRNS mennyisége (26/C. ábra), tehát feltételezhetően beindult a stresszválasz a sejtekben. Elképzelhető azonban, hogy ez az időtartam nem elegendő az autofágia indukálására. Ennek tisztázására további kísérletekre lenne szükség.



26. ábra: Myotubularinok hatása az autofágiára hőstressz esetén. **A:** Hőstressz hatására a *Mtmr6* csendesített sejtekben megnő az autofág struktúrák területaránya. *EDTP*-RNSi sejtekben hőstressz esetén nő a savas kompartmentumok területaránya. **B:** A PI3P-pozitív autofág és endocitotikus struktúrák területaránya szignifikánsan nő *Mtmr6*-RNSi hatására a hősokeknek kitett sejtekben. A géncsendesítés klonális vizsgálattal történt, a mérésekhez a géncsendesített (zöld- GFP-pozitív) sejtek környezetében található sejtek szolgáltattak kontrollként (a genotípusok részletesen az anyagok és módszerek fejezetben olvashatóak) **C:** A hőstressz esetén szerepet játszó *DnaJ-1* kifejeződése megnő az egy órás 32°C-on hősokekolt lárvák zsírtestében. A minták L3F *w¹¹¹⁸* zsírtestekből származnak. Belső kontrollként Act-5C-t használtunk. Méretskála: 10 µm. Az ábrán látható

szemikonfokális fluoreszcens mikroszkópos képek több optikai szelet egyesítéséből állnak össze. Hoechst: sejtmagok. A vizsgálatokhoz tartozó kvantifikálások eredménye az ábra jobb oldalán látható. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ genotípusok: +: $w^*;cgGal4, UAS-GFP-2xFYVE/+$.

A négy órás paraquat kezelés oxidatív stresszt indukál a lárvális zsírtestben, ennek hatására fokozódik a sejtekben az autofág aktivitás. *Mtmr6* géncsenedesítés hatására - az éhezéshez hasonlóan - indukálódik bennük az autofágia: a kontroll sejtekhez képest szignifikánsan fokozódik az mCherry-Atg8a-pozitív struktúrák területaránya és csökken bennük a GFP-Ref(2)P-pozitív területarány (27. ábra). Az *EDTP* csenedesítés hatására nem változott szignifikáns mértékben az mCherry-Atg8a-pozitív struktúrák területaránya (27. ábra). Így feltehetően az *Mtmr6* különböző stressz kondíciók esetén is gátló faktorként vesz részt az autofágia szabályozásban. Az *EDTP* indukált autofágiára gyakorolt hatása nem szignifikáns.



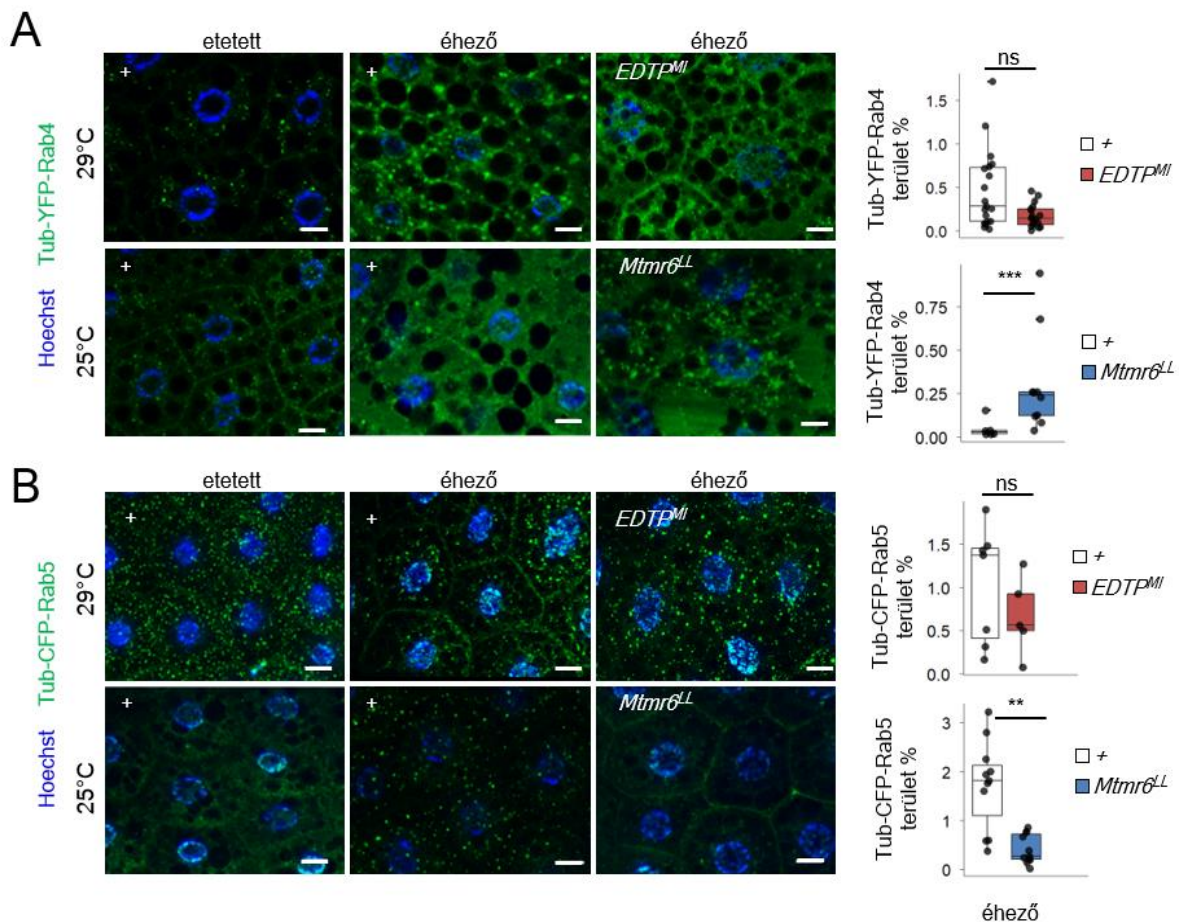
27. ábra: Myotubularinok hatása az autofágiára oxidatív stressz esetén. Paraquat kezelés hatására *Mtmr6* csenedesített sejtekben megnő az mCherry-Atg8a-pozitív struktúrák területaránya, míg a Ref(2)P aggregátumok területaránya csökken. *Atg7^{A77}* : az elakadt autofág folyamat pozitív kontrollja. *EDTP-RNSi* sejtekben paraquat kezelést követően nem változik az mCherry-Atg8a-pozitív struktúrák területaránya. A géncsenedesítés klonális vizsgálattal történt, a mérésekhez a géncsenedesített (zöld- GFP-pozitív) sejtek környezetében található sejtek szolgáltak kontrollként (a genotípusok részletesen az anyagok és módszerek fejezetben olvashatóak). Méretskála: 10 μm . Az ábrán látható szemikonfokális fluoreszcens mikroszkópos képek több optikai szelet egyesítéséből állnak össze. Hoechst: sejtmagok. A vizsgálatokhoz tartozó kvantifikálások eredménye az ábra jobb oldalán látható. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ns: $p > 0,05$.

4.1.3 Az *EDTP* és *Mtmr6* endocitózisban betöltött szerepének vizsgálata

Az autofágia és az endocitózis folyamata egymással sok lépésben kapcsolódik, szabályozási mechanizmusuk nem függetleníthető egymástól. Ezért fontosnak tartottuk

megvizsgálni, hogy az EDTP és *Mtmr6* foszfatázok vajon az endocitózis szabályozásán keresztül képesek-e befolyásolni az autofágiát.

A Rab fehérjék olyan GTPáz aktivitású kis G fehérjék, melyek az endomembránok közötti anyagforgalom szabályozásában és vezikulák szállításában vesznek részt (Stenmark és Olkkonen, 2001). Ezen membránok elülönítésére alkalmasak a Rab riporterek, ha általános kifejeződést és alacsony expressziót eredményező tubulin promóterről fejeződnek ki. A korai endoszómák jelölésére a YFP-Rab4 markert használtuk. Etetett kontroll állatokban a Rab4 pontszerű struktúrákat jelöl, míg éheztetve inkább diffúz jelet ad a sejt plazmában (28/A. ábra). Feltehetőleg azért mutat ilyen különbséget, mert etetett körülmények között a szortírozó endoszómák nagyobb részt vakuoláris doménből állnak, amit pontszerűnek látunk, míg éhező körülmények között a tubuláris része dominál. *EDTP^{MI}* mutánsokban éheztetés során nem változott meg a Rab4-pozitív struktúrák területaránya (28/A. ábra). *Mtmr6* deficiens háttérben a Rab4-pozitív struktúrák területaránya megnő (28/A. ábra).



28. ábra: Myotubularinok hatása a Rab4 illetve Rab5 tartalmú endocitotikus vezikulálkra. A: Etetett L3F kontroll állatok zsírtestében a Rab4 pontszerű struktúrákat jelöl, míg éheztetve inkább diffúz jelet ad a

sejtplazmában. Éhező *Mtmr6* deficiens háttérben a Rab4⁺ struktúrák területaránya szignifikánsan nő a kontroll éhezőhöz hasonlítva, míg *EDTP* mutánsokban nem változik. +: *w¹¹¹⁸; tub-YFP-Rab4/+* **B**: A korai endoszómákra és autofagoszómákra jellemző Rab5 etetve 25°C-on kevésbé kifejezett, éheztetett mintákban (valamint 29°C-on etetve) a citoplazmában pontszerű jelet ad. *Mtmr6^{LL}* mutánsokban szignifikánsan lecsökken, *EDTP^{MI}* mutánsokban pedig nem változik a Rab5-pozitív struktúrák területaránya éhező körülmények között. +: *w¹¹¹⁸; tub-CFP-Rab5/+*. Méretskála: 10 µm. Az ábrán látható szemikonfokális fluoreszcens mikroszkópos képek több optikai szelet egyesítéséből állnak össze. Hoechst: sejtmagok. A vizsgálatokhoz tartozó kvantifikálások eredménye az ábra jobb oldalán látható. ns: p > 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001.

A Rab5 fehérje főként a korai endoszómákon és autofagoszómákon helyezkedik el (Hegedűs és mtsai., 2016), ahol aktiválja a PI3K komplexet, aminek segítségével PI3P jön létre PI-ből (28/B. ábra). Etetés során a lárvális zsírtestben kimutatható a GFP-Rab5 jel a sejtfelszínen és citoplazmában szórtan. Hosszabb éhezést követően leginkább csak a sejtfelszín közelében találhatóak meg, a riporter területaránya megnő (Hegedűs és mtsai., 2016). Saját vizsgálatainkhoz Tub-CFP-Rab5 markert használtunk, mely a fentebb leírtakhoz hasonló eloszlást mutat azzal a különbséggel, hogy az éheztetett minták esetén a citoplazmában is detektáltunk jelet. Valamint a kontrollok esetén a 29°C-on tartott lárvákban erős Rab5-kifejeződést lehet megfigyelni a zsírtestben. *Mtmr6* mutánsokban éheztetve szignifikánsan lecsökkent a Rab5⁺-pozitív struktúrák területaránya, míg *EDTP* mutánsokban nem változott (28/B. ábra). Ez alapján az feltételezhető, hogy az *Mtmr6* hat a korai endoszómák membrántartalmára. Jelenlétében a Rab4-jelölt tubuláris szortírozó endoszómák mértéke (száma vagy nagysága) kisebb lesz, míg a Rab5-pozitív korai endoszómákból pedig több.

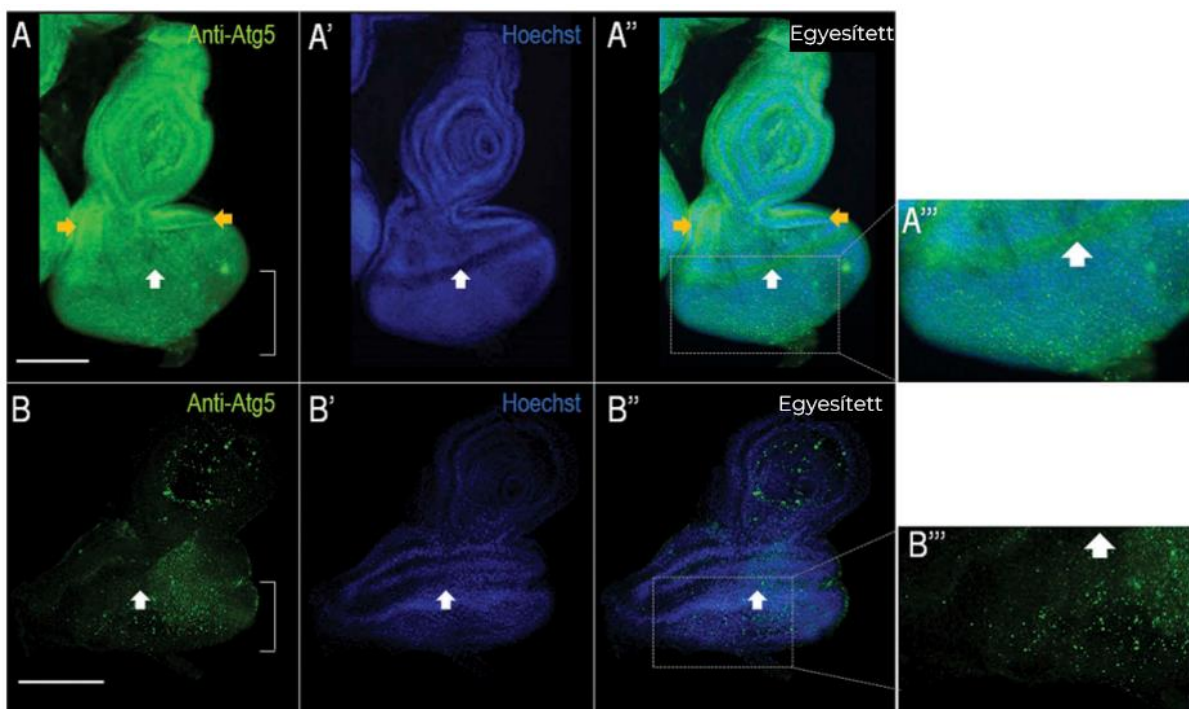
4.2 A fejlődési autofágia szabályozása a *Drosophila* szemfejlődésben

4.2.1 Autofág fehérjék hiánya a morfogenetikai árokban és az osztódási zónában a szemfejlődés zavarához vezet

Fejlődési autofágiára nem a sejtek túlélése miatt van szükség, hanem inkább egyfajta programozott sejtelhalál megy végbe ilyenkor. Bizonyos szöveti sejtek intenzív autofágia által energiát szolgáltatnak a szervezet számára, amelyből új szövet vagy szerv alakul ki. Fejlődési autofágiáról beszélünk akkor is, ha az autofág degradáció kismértékű (nem hal bele a sejt), de valamilyen szignálként szolgál jelátviteli folyamatok során és ezáltal sejtsors meghatározó szereppel bír. Az ecetmuslicák összetett szemének fejlődése egy soktényezős, térben és időben szabályozott folyamat. A fejlődő szemben működő autofágia fejlődési szerepéről kevés

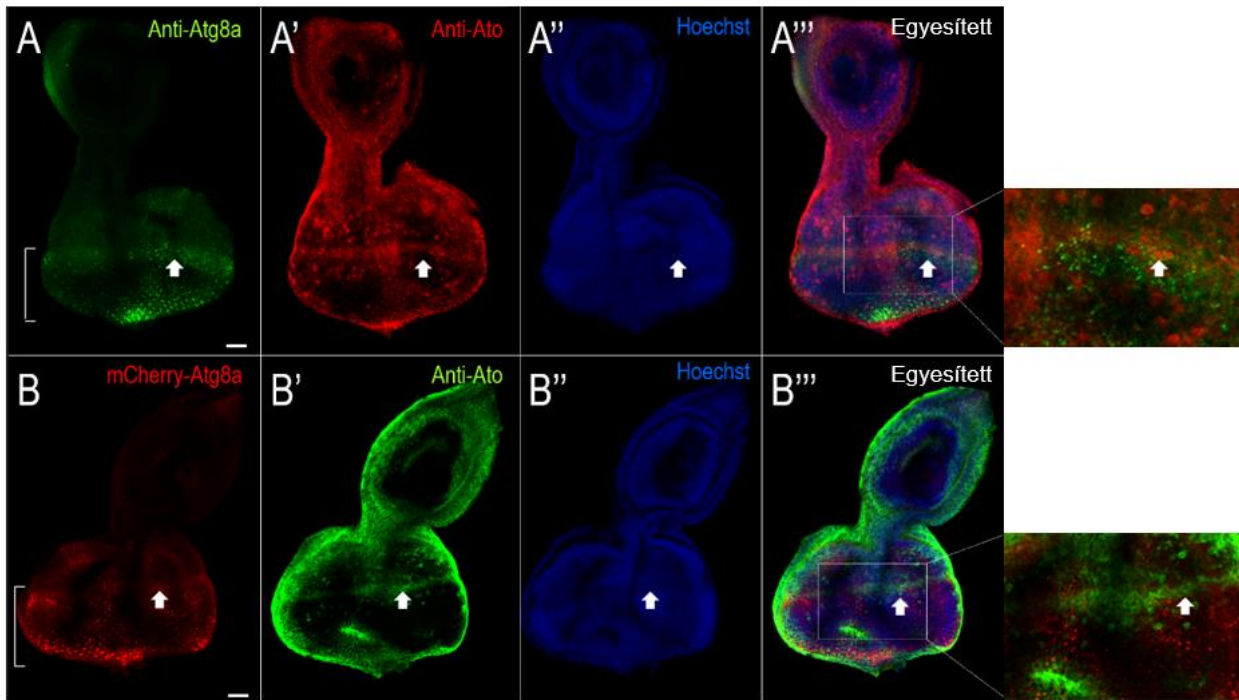
információval rendelkezünk (Nisoli és mtsai., 2010; Nandi és mtsai., 2014; Lőrincz és mtsai., 2016).

Kutatómunkánk során célunk volt meghatározni az autofágia szemfejlődésben betöltött szerepét. Elsőként megvizsgáltuk, hogy az autofágiában szerepet játszó fehérjék mutatnak-e eltérést, vagy valamilyen mintázatot a fejlődő szem-antenna imaginális korong sejtjeiben. Ehhez L3W stádiumú lárvák szem-antenna korongját izoláltuk, melyen anti-Atg5 és anti-Atg8a immunjelölést alkalmaztunk. Konvencionális mikroszkópia segítségével detektáltuk az Atg5 és Atg8 kifejeződését. Konfokális mikroszkóppal pedig az Atg5- illetve Atg8-pozitív autofág struktúrákat lehet vizualizálni. Az Atg5 (29/A-A''') ábra) és az Atg8a (31/D. ábra) kifejeződik a teljes szemdiszkuszban, főleg a leendő feji kutikula területén. Atg5-pozitív korai autofág struktúrák jellemzően a morfogenetikai árok környékén (MF-*morfogenetic furrow*), illetve a differenciálódó sejtek területén (DZ-*differentiation zone*), az MF-től poszterior (29/B-B''') ábra) található meg.



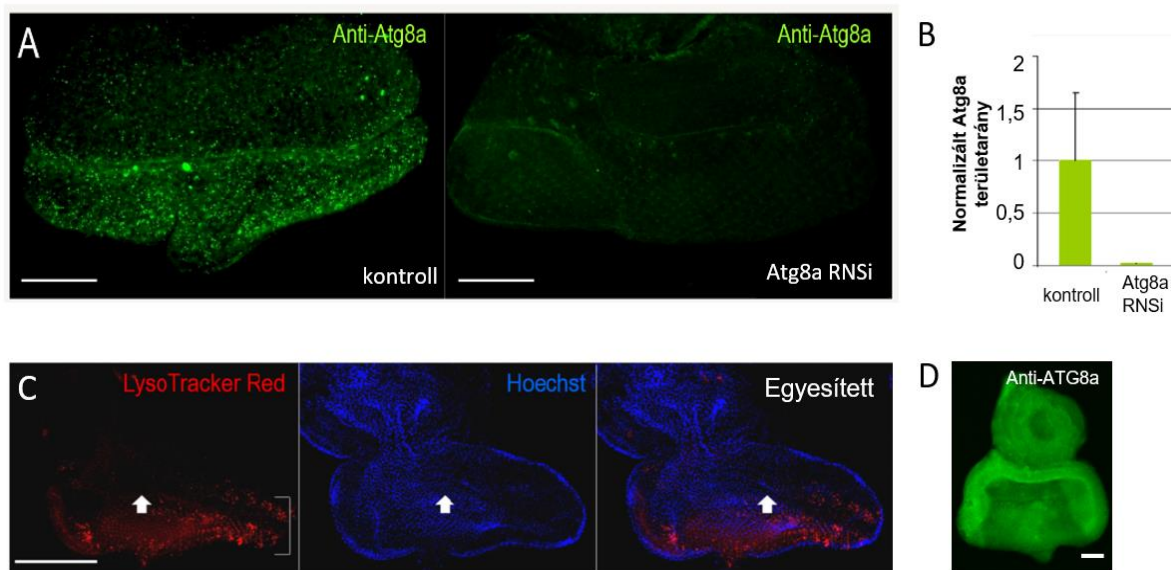
29. ábra: Az Atg5 fehérje és az Atg5-pozitív struktúrák megoszlása a szemdiszkuszban. A-A''': Az Anti-Atg5 immunjelölés mutatja, hogy az Atg5 fehérje a teljes szem-antenna diszkusz területén kifejeződik. Sárka nyíl jelzi a leendő feji kutikulát, ahol a legmagasabb az *Atg5* expresszió. A felvétel hagyományos fluoreszcens mikroszkóppal készült. A''' panel egy nagyobb nagyítás a morfogenetikai árokról (fehér nyíl), ahol Atg5 fehérjék halmozódnak fel. **B-B''':** Szemikonfokális mikroszkópos felvétel az Anti-Atg5-pozitív autofág struktúrákról a szem-antenna diszkuszban. A fehérje eloszlással ellentétben a leendő szem területén főleg a differenciálódó sejtek mutatnak immunpozitivitást. B''' nagyobb nagyítás a morfogenetikai árokról (fehér nyíl). Hoechst: sejtmagok. A méretskála: 100 μ m.

Atg8a-pozitív autofág struktúrák főleg a morfogenetikai árok mentén és mögött (DZ) akkumulálódnak nagyobb mennyiségben, de megtalálhatóak a proliferációs zónában (PZ) is (30. ábra).



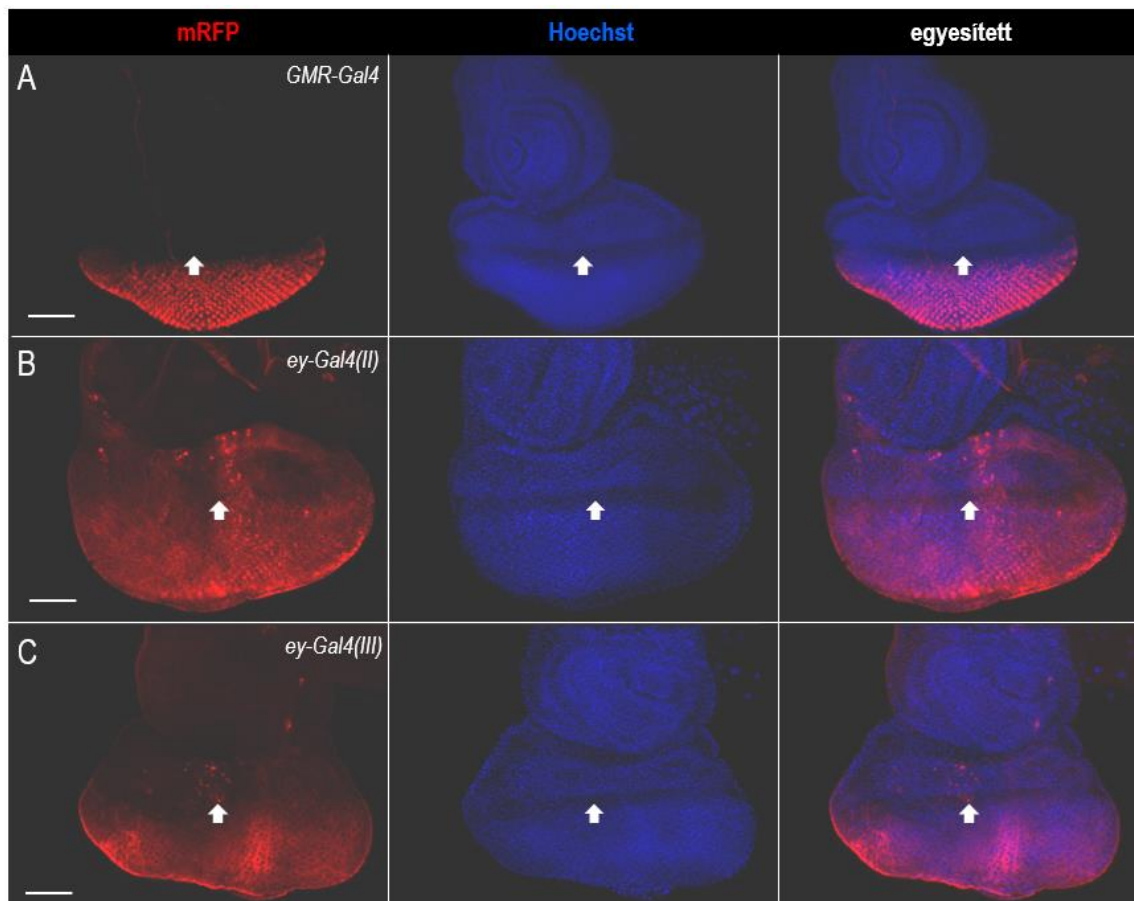
30. ábra: Az Atg8a-pozitív struktúrák megoszlása a szemdiszkuszban. **A:** Az Anti-Atg8a immunjelölt autofág struktúrák (zöld pöttyök) főleg a morfogenetikai árok területén és mögött (DZ) figyelhetőek meg. A szemdiszkuszok L3W stádiumú *w¹¹¹⁸* lárvákból származnak. **B:** Az *ey-Gal4(II)*-vel meghajtott mCherry-Atg8a-pozitív struktúrák (piros pöttyök) főleg a differenciálódó régióban figyelhetőek meg. Az anti-Atonal (A' és B') immunjelölt szeletek az MF területét mutatják. A Hoechst (A'' és B'') a sejtmagokat mutatja. A méretek 10 μm -t jelöl. A felvételek konfokális mikroszkóppal készültek.

Az immunfestéssel kimutatott struktúrák Atg8 fehérjére specifikusnak tekinthetőek, az *Atg8a-RNSi* hatására nem mutatható ki anti-Atg8a-val pozitív struktúra a szemdiszkusz területén (31/A. és B. ábra).



31. ábra: Az Atg8a-pozitív struktúrák megoszlása hasonló a savas kompartmentumokkal a szemdiszkusz területén. **A** és **B**: Az anti-Atg8a immunjelölés specifikusnak tekinthető, *Atg8a-RNSi* hatására eltűnik a detektálható jel a szemdiszkuszban. **C**: A LysoTracker Red festéssel kimutatható savas sejtakotók főleg a morfogenetikai árok területén és utána (DZ) találhatóak meg. Hoechst: sejtmagok. **D**: Az anti-Atg8a immunjelölt szemdiszkusz hagyományos fluoreszcens mikroszkóppal fotózva: az Atg8a kifejeződik a teljes szem imaginális korongban, főleg a leendő feji kutikula területén. A méretskála 100 μm -t jelöl. A nyilak a morfogenetikai árkot jelölik.

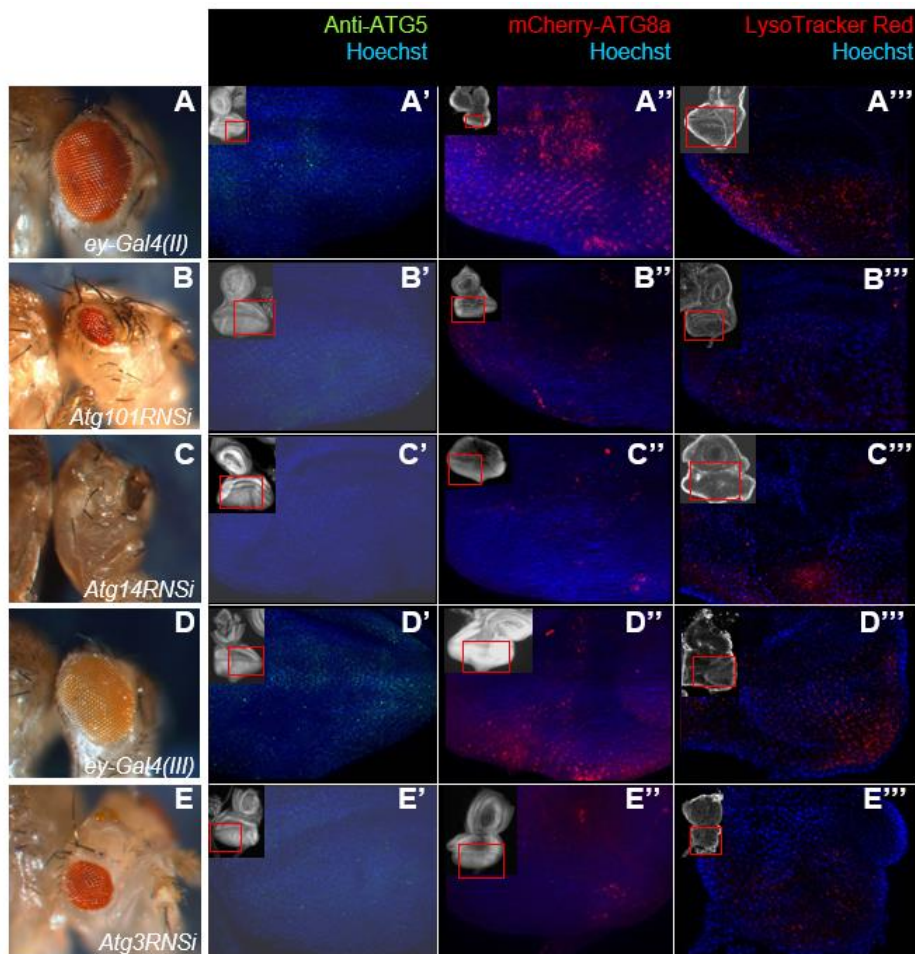
LysoTracker Reddel jelölt savas kompartmentumokat (autolizoszómák, multivezikuláris testek) szintén főként a DZ területén mutattunk ki (31/C. ábra). Ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy a differenciálódó sejtekben aktiválódik az autofágia, de feltehetően a szemdiszkusz más területein is működik bazális szinten. Annak kiderítésére, hogy ez milyen módon játszik szerepet a szemfejlődésben, megvizsgáltuk, hogy különböző *Atg* gének csendesítése milyen változást eredményez a szemdiszkuszban. Korábbi tanulmányokban *GMR-Gal4* forrást használtak az UAS-*Atg* RNSi konstrukciók meghajtására (Chen és mtsai., 2012). Ezzel a módszerrel azonban csak a MF után, a DZ-ben érhető el géncsendesítés (32/A. ábra). Továbbá a driver kifejeződése önmagában befolyásolja a szemfejlődést (Kramer és Staveley, 2003). Kísérleteinkben szerettük volna megvizsgálni, hogy milyen hatással van a szemfejlődésre, ha a teljes szemdiszkuszban csendesítjük a vizsgált *Atg* géneket. Ehhez első körben kétféle *ey-Gal4* drivert (*ey-Gal4(II)* és *(III)*) használtunk, melyek kifejeződnek a DZ-n kívül más területein is a szemdiszkuszban: vizsgálható velük géncsendesítés a PZ és a morfogenetikai árok területén egyaránt (32/B. és C. ábra).



32. ábra: Különböző promóterrel meghajtott *Gal4* kifejeződési mintázatai a *Drosophila* szemdiszkuszban. A: *GMR-Gal4*-gyel meghajtott mRFP a differenciálódó sejtek területén kifejezett, a morfogenetikai árokban és a proliferációs zónában nem fejeződik ki. **B:** A második kromoszómás *ey-Gal4* driver kifejeződik a teljes szemdiszkusz területén kivéve a leendő feji kutikula területét. **C:** A harmadik kromoszómás *ey-Gal4* driverrel meghajtott riporter kisebb mértékű expressziót mutat, de megjelenik a teljes szemdiszkuszban. mRFP: *Gal4*-gyel meghajtott UAS-Apoliner riporter, Hoechst: sejtmagok. A méretskála 50 μm -t jelöl. A kísérletben heterozigóta állatokat használtunk.

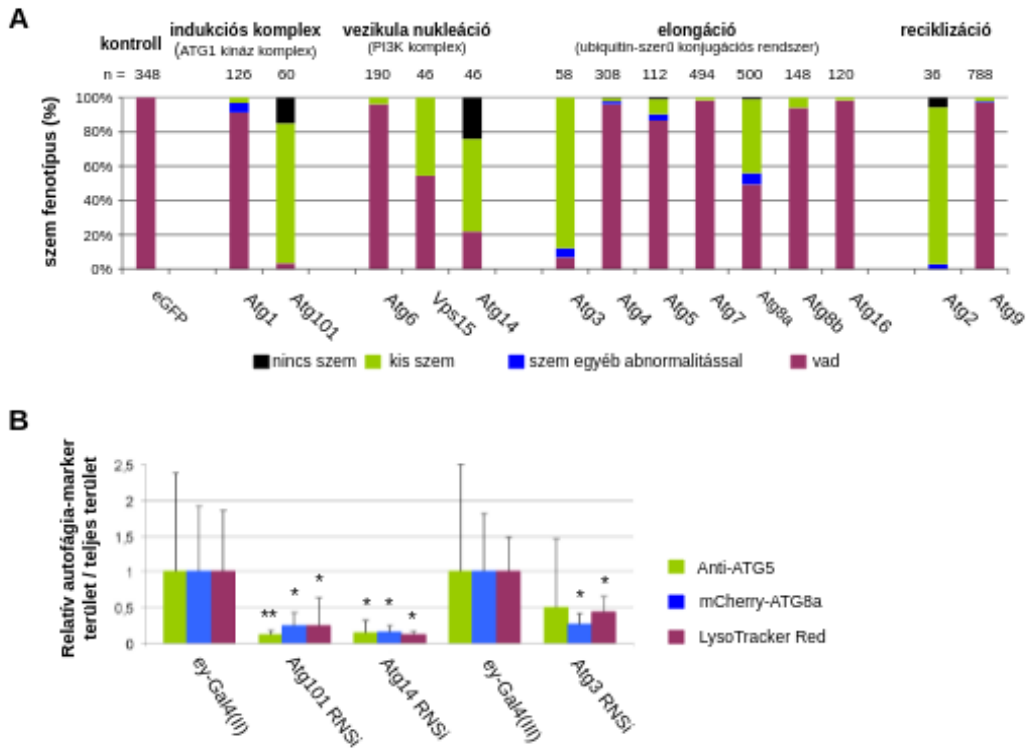
Megvizsgáltuk, hogy a riporterok kifejeződésük önmagában befolyásolja-e a szemfejlődést. Az *ey-Gal4* önmagában nem okozott változást a szem morfológiájában (33/A, D ábra). Ezután a különböző autofág komplexekből kiválasztottunk egy-egy gént és kifejeződésüket csendesítettük. A legtöbb esetben abberánsan fejlődött a szeme a géncsendesített állatoknak: kicsi, megváltozott morfológiájú szemkorongot, illetve kifejlett szemet figyeltünk meg, mely néhány esetben pedig teljesen eltűnt a fejlődés folyamán (33. és 34. ábrák). Az indukciós komplexben például szerepet játszó *Atg101* csendesítése 96,67%-ban aberráns szemet eredményezett (33/B. ábra és 34. ábra). A PI3K komplex működését *Atg14-RNSi*-vel befolyásolva az esetek 78,26%-ában változott meg a kifejlett állatok szemének morfológiája (33/C. ábra és 34. ábra). Az Atg8-konjugációs komplexben működő *Atg3*

csendesítése *ey-Gal4(II)* driverrel bábleletalitást eredményez, valamint a lárvák szemdiszkuszának hiányában nyilvánul meg. Az *ey-Gal4(III)* használatával az *Atg3-RNSi* a többi *Atg-RNSi*-hez hasonlóan abnormális morfológiájú szemet eredményez (33/E. ábra). A többi vizsgált *Atg* gén csendesítésének eredménye az 34. ábrán látható. Nem csak a szem morfológiában okozott az ATG fehérjék hiánya változást, hanem az autofág működésben is. Mind az ATG5 immunjelölt struktúrák, mind az mCherryAtg8a- és LysoTracker-pozitív struktúrák területaránya szignifikánsan lecsökkent géncsökkentés hatására (34/B. ábra).



33. ábra: Az *ey-Gal4* önmagában nem változtatja meg a szemfejlődést, de az *Atg* géncsökkentő konstrukciókat meghajtva aberráns szemet eredményez. **A-A'''**: Az *ey-Gal4(II)* kifejeződése önmagában nem okoz változást a szemfenotípusban, és a vad típushoz hasonló autofág aktivitást lehet detektálni a szemdiszkusz sejtjeiben. **B-B'''**: Az *ey-Gal4(II)*-vel meghajtott *Atg101-RNSi* kisméretű szemfenotípust eredményez, és a szemdiszkusz sejtekben csökken az Atg5, Atg8 és savas kompartmentumok mennyisége. **C-C'''**: Az *ey-Gal4(II)*-vel meghajtott *Atg14-RNSi* hatására sok esetben hiányzik a szem a felnőtt állatokban, a szemdiszkusz sejtekben csökken az Atg5, Atg8 és savas kompartmentumok mennyisége. **D-D'''**: A harmadik kromoszómás *ey-Gal4* kifejeződése önmagában nem okoz szemfenotípus változást, a vad típushoz hasonló mértékű autofág aktivitást lehet detektálni a szemdiszkusz sejtjeiben. **E-E'''**: Az *ey-Gal4(III)*-mal meghajtott *Atg3* csökkentés kis méretű szemfenotípust eredményez, valamint a szemdiszkusz sejtekben csökken az Atg5, Atg8 és savas

kompartimentumok mennyisége. A Hoechst (kék) a sejtmagokat jelöli. Genotípusok: A, A' és A''': w^* ; *ey-Gal4(II)/+*. A'': w^* ; *ey-Gal(II), UAS-mCherry-Atg8a/+*. B, B' és B''': w^* ; *ey-Gal4(II)/Atg101^{KK101226}*. B'': w^* ; *ey-Gal(II), UAS-mCherry-Atg8a/Atg101^{KK101226}*. C, C' és C''': w^* ; *ey-Gal4(II)/Atg14^{KK100903}*. C'': w^* ; *ey-Gal(II), UAS-mCherry-Atg8a/Atg14^{KK100903}*. D, D' és D''': w^* ; *ey-Gal4(III)/+*. D'': w^* ; *UAS-mCherry-Atg8a/+; ey-Gal4(III)/+*. E, E' és E''': w^* ; *ey-Gal4(III)/Atg3^{HMS01348}*. E'': w^* ; *ey-Gal4(II), UAS-mCherry-Atg8a/+; Atg3^{HMS01348}/+*.

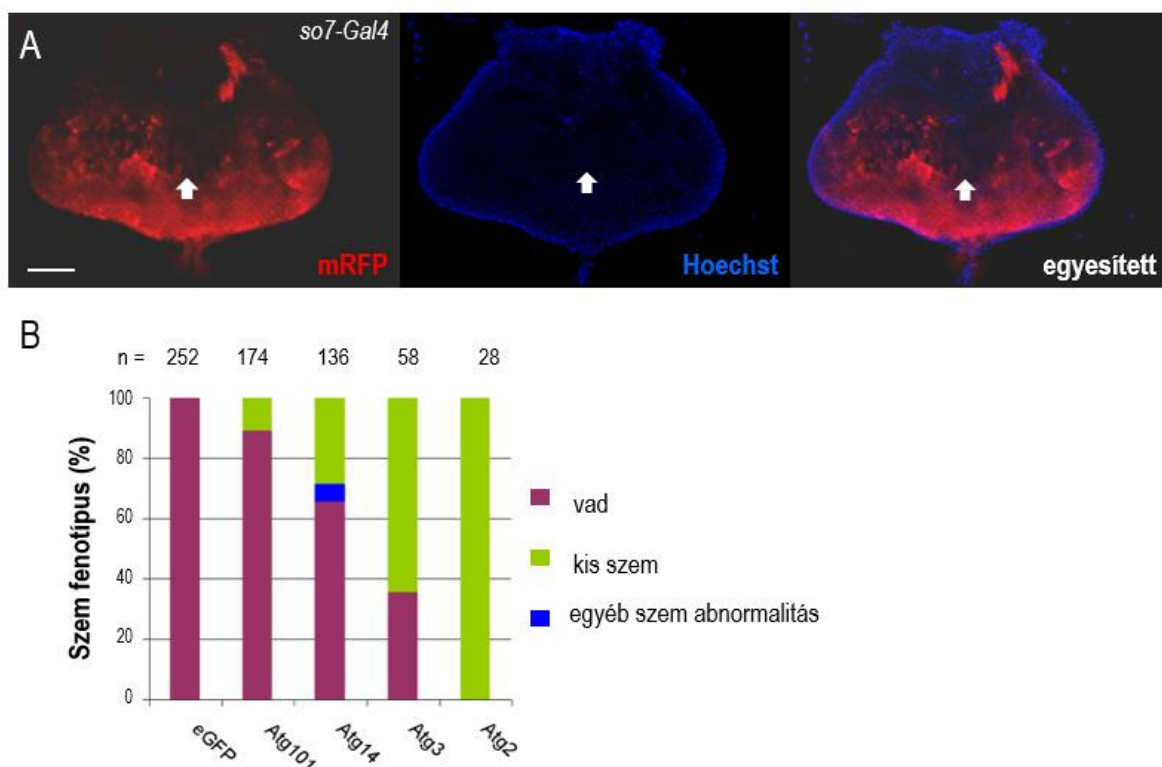


34. ábra: Különböző autofág gének csendesítése megváltoztatja az autofágia folyamatát és a szem fenotípusát. A: A különböző autofág komplexekben működő *Atg* gének csendesítése eltérő mértékben, de befolyásolja a szemfejlődést. *Atg101*, *Atg14*, *Atg3* és *Atg2* esetében az állatok több mint a felének aberráns szeme fejlődik ki, vagy egyáltalán nem alakul ki szeme. Hoechst: sejtmagok. eGFP: *ey-Gal4(II)/+*; eGFP^{VALIUM20shRNA}(III)/+. *Atg1*: *ey-Gal4(II); Atg1^{JF02273}* *Atg101*: *ey-Gal(II), UAS-Dcr2/Atg101^{KK101226}*. *Atg6*: *ey-Gal(II), UAS-Dcr2/UAS-Dcr2*; *Atg6^{JF02897}/+*. *Vps15*: *ey-Gal(II)/+*; *Vps15^{HMS00908}/+*. *Atg14*: *ey-Gal(II), UAS-Dcr2/Atg14^{KK100903}*. *Atg3*: *ey-Gal4(II)/Atg3^{HMS01348}* *Atg4*: *ey-Gal(II); Atg4a^{JF03003}* *Atg5*: *ey-Gal4(II); Atg5^{JF02703}*. *Atg7*: *ey-Gal4(II); Atg7^{JF02787}*. *Atg8a*: *ey-Gal4(II); UAS-Dcr-2/+; Atg8a^{JF02895}/+*. *Atg8b*: *ey-Gal4(II)/+; Atg8b^{HMS01245}/+*. *Atg16*: *ey-Gal4(II)/+; Atg16^{HMS01347}/+*. *Atg2*: *ey-Gal4(III)/Atg2^{HMS01198}*. *Atg9*: *ey-Gal4(II); Atg9^{JF02891}*. **B:** *Atg101*, *Atg14*, *Atg3* RNSi hatására csökken az autofág sturktúrák területaránya a szemdiszkuszban. A diagramon a szórás van feltüntetve. *: $p < 0,05$ **: $p < 0,01$.

Genotípusok: *ey-Gal4(II)* (kontroll az *Atg101*-hez és az *Atg14*-hez): w^* ; *ey-Gal4(II)/+*. *Atg101* RNSi: w^* ; *ey-Gal4(II)/Atg101^{KK101226}*. *Atg14*: w^* ; *ey-Gal4(II)/Atg14^{KK100903}*. *ey-Gal4(III)* kontroll az *Atg3* RNSi esetén: w^* ; *ey-Gal4(III)/+*. *Atg3* RNSi: w^* ; *ey-Gal4(III)/Atg3^{HMS01348}*. Kontroll az *Atg5* és *Atg13* RNSi esetén: w^* ; *ey-Gal4(II), UAS-Dcr-2/+* *Atg5* RNSi: w^* ; *ey-Gal4(II), UAS-Dcr-2/Atg5^{JF02703}*. *Atg13* RNSi: w^* ; *ey-Gal4(II), UAS-Dcr-2/Atg13^{KK100340}*.

Az *ey-Gal4(II)* kifejeződik a peripodiális membránban is. Felvetődhet a kérdés, hogy az *Atg-RNSi* esetekben kapott abnormális szem-morfológia esetleg a peripodiális membránban történő csendesítés miatt alakul ki. Ennek kiderítése véget *c311-Gal4* forrás segítségével is csendesítettünk különböző *Atg* géneket. Ennek hatására specifikusan a peripodiális membránban érhető el géncsendesítés, mely a szemdiszkusz egyéb területét nem érinti (Gibson és Schubiger, 2000). A *c311-Gal4*-gyel meghajtott *Atg-RNSi* konstrukciók esetén nem tapasztaltunk változást a szem morfológiájában. A megvizsgált *Atg* csendesítések (n=100-600/genotípus) minden esetben 1% alatt mutattak a normálistól eltérő szem fenotípust (Billes és mtsai., 2018).

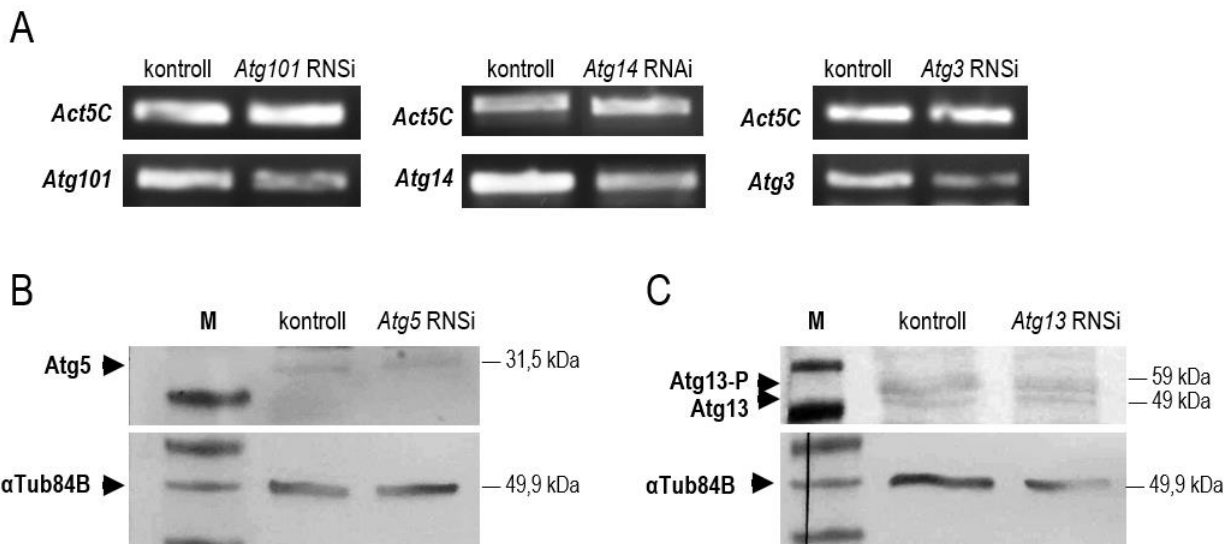
Az *ey-Gal4*-gyel kapott eredményekhez hasonló változásokat kaptunk *so7-Gal4*-gyel való csendesítések esetén is. A *Gal4* kifejeződik a teljes szemdiszkusz területén, kivéve a peripodiális membránt (35/A. ábra). A *so7-Gal4*-gyel meghajtott *Atg* géncsendesítés a legtöbb esetben kisméretű szemfenotípust eredményezett (35/B. ábra). Ezen eredmények alapján valószínűsíthető, hogy a megfigyelt abnormális szemfenotípusok nem a transzgén vagy egyéb aspecifikus hatás miatt alakulnak ki, hanem inkább a szemdiszkusz sejtjeiben az autofágia hiánya, illetve az *Atg* gének csendesítése okozza a fejlődési zavart.



35. ábra: Szemfenotípus változás *so-Gal4*-gyel meghajtott *Atg* géncsendesítések esetében. A: A *so-Gal4*-gyel meghajtott riporter fehérje kifejeződik majdnem a teljes szemkorongban. A fehér nyíl a morfogenetikai árok helyét jelöli. A Hoechst (kék) a sejtmagokat jelöli. A piros csatorna (mRFP) esetén *so7-Gal4*-gyel meghajtott UAS-

Apolinert használtunk. Az expressziós vizsgálatához heterozigóta állatokat használtunk. A méretskála 50 μm -t jelöl. **B:** *Atg* gének csendesítése *so7-Gal4* használatával sok esetben abnormális morfológiájú vagy kis méretű szemfenotípust eredményez, míg önmagában a GFP csendesítése nem okoz változást a kifejlett szem morfológiájában. eGFP: *eGFP^{pVALIUM20shRNS}/so7-Gal4*. *Atg101*: *Atg101^{KK101226}/+; so7-Gal4/+*. *Atg14*: *Atg14^{KK100903}/+; so7-Gal4/+*. *Atg3*: *Atg3^{HMS01348}/so7-Gal4*. *Atg2*: *Atg2^{HMS01198}/so7-Gal4*.

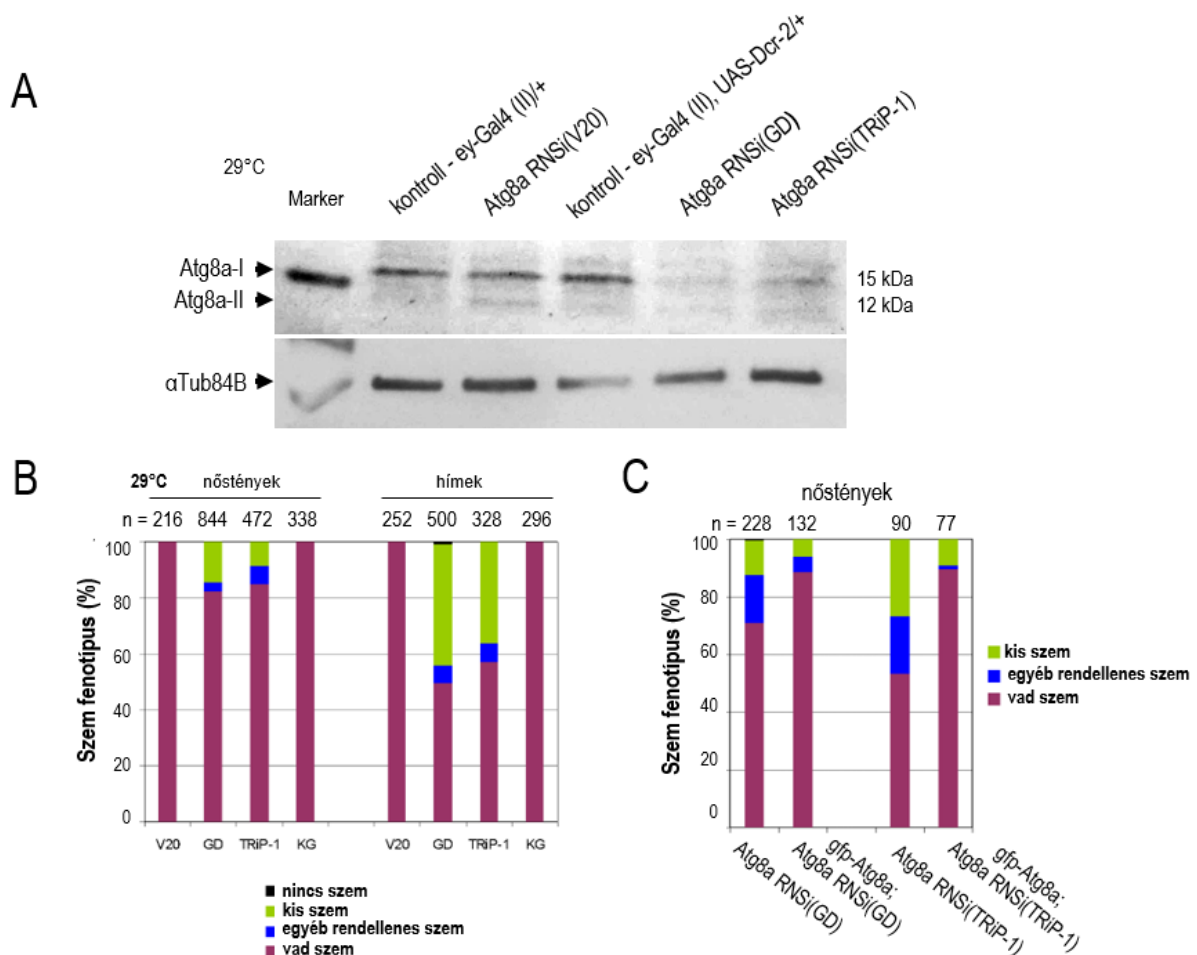
Különböző *Atg* gének csendesítésével azonban nem minden esetben kaptunk rendellenes szemfenotípust. Annak kiderítésére, hogy ezen utóbbi esetekben a géncsendesítés rossz hatékonysággal működik-e, vagy ezen *Atg* fehérjék hiánya nem okoz változást a szemfejlődésben, a különböző *Atg-RNSi* szemdiszkuszokból RNS és fehérje kinyerést követően megvizsgáltuk a géncsendesítés hatékonyságát. Azt tapasztaltuk, hogy azon esetekben, ahol a szemfejlődés nem megfelelően zajlott, a géncsendesítés hatékonyan működött (36/A. ábra). Megjegyzendő továbbá, hogy a géncsendesítés hatékonyságának mérése nem pontos (feltehetőleg alábecsült), mivel az RNS kivonást a teljes szem-antenna diszkuszából végeztük, míg a géncsendesítések csak a szem mezőt érintik. Azokban az esetekben pedig, ahol a szemfejlődés normálisan ment végbe, a géncsendesítés nem volt hatékony. *Atg5-RNSi* (36/B. ábra) és *Atg13-RNSi* (36/C. ábra) esetében például nem mutatható ki nagymértékű csökkenés a fehérje mennyiségben.



36. ábra: Abnormális szemet okozó *Atg-RNSi* konstrukciók csökkentik, míg a normális fejlődést mutató esetekben nem változik az *Atg* gének expressziója a szem-antenna diszkuszban. A: szemikvantitatív RT-PCR-rel az *Atg101*, *Atg14* és *Atg3* RNSi konstrukciók képesek csökkenteni a jelölt *Atg* transzkriptumok mennyiségét. *Act5C*-normalizáló kontroll. **B:** anti-*Atg5*-tel jelölt immunobloton nem mutatható ki változás az *Atg5* fehérje mennyiségében a szemdiszkuszban. **C:** anti-*Atg13*-mal jelölt immunobloton nem mutatható ki változás sem az *Atg13*, sem a foszforilált-*Atg13* fehérjék mennyiségében a szemdiszkuszban. Belső kontrollként az alfaTub84B mennyiség szolgál. M: fehérje méret marker. Használt törzsek: kontroll az *Atg101* és *Atg14* RNSi esetén: *w**; *ey-*

Gal4(II)/+. Atg101 RNSi: *w**; *ey-Gal4(II)/Atg101^{KK101226}*. *Atg14*: *w**; *ey-Gal4(II)/Atg14^{KK100903}*. Kontroll az *Atg3* RNSi esetén: *w**; *ey-Gal4(III)/+. Atg3* RNSi: *w**; *ey-Gal4(III)/Atg3^{HMS01348}*. Kontroll az *Atg5* és *Atg13* RNSi esetén: *w**; *ey-Gal4(II), UAS-Dcr-2/+ Atg5* RNSi: *w**; *ey-Gal4(II), UAS-Dcr-2/Atg5^{JF02703}*. *Atg13* RNSi: *w**; *ey-Gal4(II), UAS-Dcr-2/ Atg13^{KK100340}*.

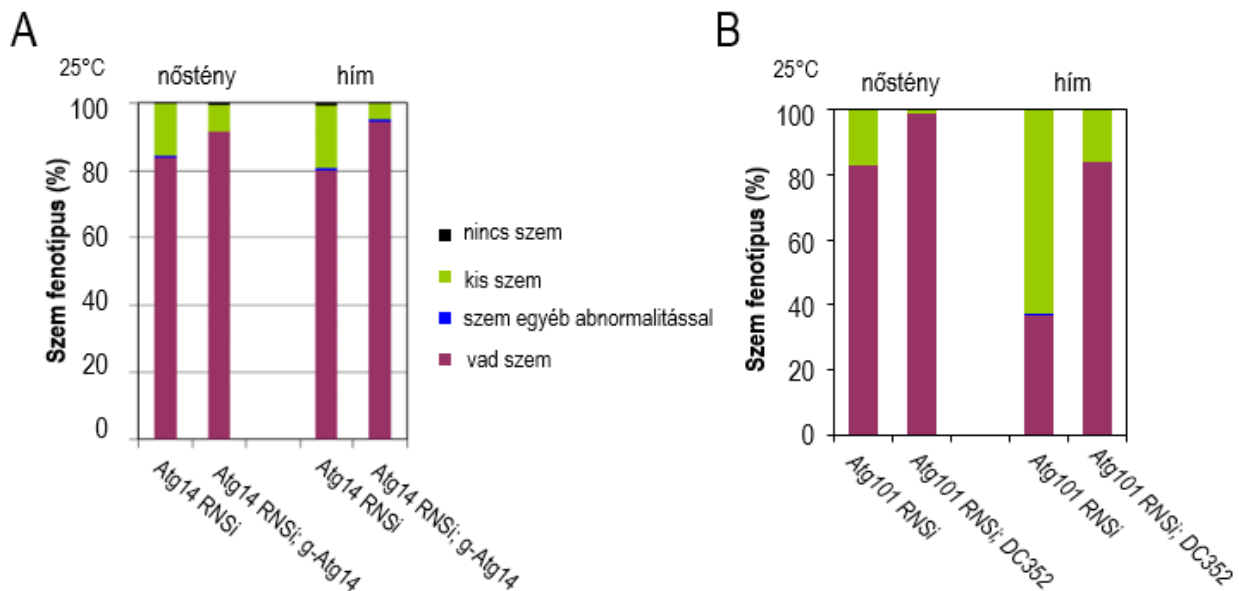
Hasonlót tapasztaltuk az *Atg8a* vizsgálatokor. *Atg8a-RNSi* konstrukciók közül a Valium 20 (V20) géncsenedesítő konstrukció használatával nem mutattunk ki jelentős változást sem fehérje szinten (37/A. ábra), sem a szem morfológiájában (37/B. ábra). Másik két esetben (GD és TRiP-1) pedig jelentősen lecsökkent az *Atg8a*-I mennyisége a szemdiszkuszban (37/A. ábra). Az utóbbi két esetben, ahol sikeres volt a géncsenedesítés, magas volt az abnormalis szemfenotípus penetranciája is (37/B. ábra). Az abnormalis szemfenotípust részben képes menekíteni egy olyan transzgen, amely tartalmazza a teljes *Atg8a* szekvenciát (*gfp-Atg8a*) (37/C. ábra). Így feltehetően nem *off target* hatás okozta a változást a szem morfológiájában az *Atg8a* GD és TRiP-1 használatakor, hanem az *Atg8a* csökkent mennyisége.



37. ábra: Az *Atg8* csenedesítés hatékonysága konstrukció-függő. Ahol hatékony a géncsenedesítés, ott nagy mértékben zavart szenved a szemfejlődés. **A:** Az *Atg8* csenedesítés eredményét mutató immunoblot. A GD és TRiP1 konstrukciók használatával nagy mértékben lecsökkent a nem membrán-kötött *Atg8a* fehérje (15kDa)

mennyisége. Belső kontrollként alfa-Tub84B-t használtunk. M: fehérje méret marker **B:** *Atg8a* csendesítés (V20, GD, TRiP1) és *Atg8a* mutáció (KG) hatására bekövetkezett változás a szem morfológiájában. A géncsökkentés a GD (hímekben több mint 50%) és a TRiP1 (hímekben kb. 42%) esetén okozott kis/rendellenes szemfenotípust. **C:** A GD és TRiP-1 által okozott szemfenotípust képes részben menekíteni a *gfp-Atg8a* transzgen. A kísérleteket az *UAS-Gal4* rendszer működésének elősegítése - vagyis a hatékony géncsökkentés - végett 29°C-on végeztük el. V20: *w**; *ey-Gal4(II)/+*; *Atg8a^{HMS01328}/+* GD: *w**; *ey-Gal4(II)/UAS-Dcr-2*; *Atg8a^{GD4654}/+* TRiP-1: *w**; *ey-Gal4(II)/UAS-Dcr-2*; *Atg8a^{JF02895}/+* KG: *Atg8a^{KG03090}*.

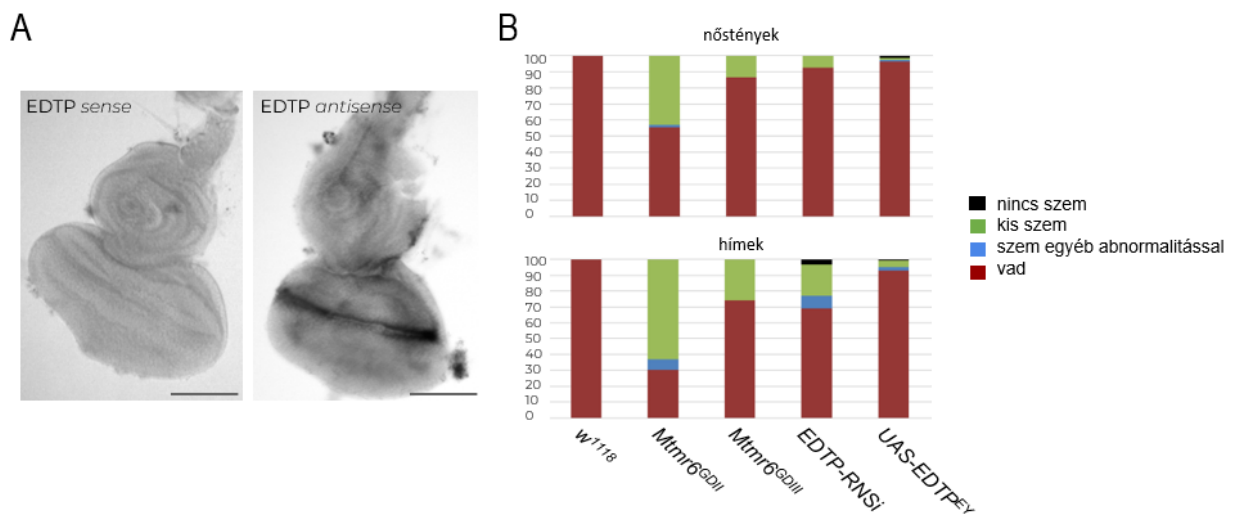
Az *Atg14*-RNSi mellett az *Atg14-g* (*Atg14* lokuszt tartalmazó inszerció a genomban; Katheder és mtsai., 2017) is kifejeződik a szemben, és részben menekíti a szem fenotípusát (38/A. ábra). Az *Atg101*-gyel átfedő genomi régió (DC352) duplikációja szintén képes volt az *Atg101*-RNSi által okozott szemfejlődési zavarokat menekíteni (38/B. ábra). A DC352 jelenléte a szemdiszkuszban továbbá képes volt az autofág aktivitást is visszaállítani majdnem a kontroll szintre (Billes és mtsai., 2018).



38. ábra: Az *Atg14* és *Atg101* genomi kópiája képes menekíteni a géncsökkentés szemfenotípusra gyakorolt hatását. **A:** Az *Atg14* RNSi hatására mindkét nemben nagymértékű a kis méretű szemfenotípus megjelenése, mely lecsökken az *Atg14* transzgen kifejeződése esetén. **B:** Az *Atg101* géncsökkentés főként a hímekben kis méretű szemfenotípust eredményez, ami menekíthető az *Atg101*-et tartalmazó inszercióval (DC352). *Atg14* RNSi: *w**; *ey-Gal4(II)/Atg14^{KK100903}*. *Atg14* RNSi; *g-Atg14*: *w**; *ey-Gal4(II)/Atg14^{KK100903}*; *g-Atg14/+*. *Atg101* RNSi: *w**; *ey-Gal4(II)/Atg101^{KK101226}*. *Atg101* RNSi; DC352: *w**; *ey-Gal4(II)/Atg101^{KK101226}*; *DC352/+*.

Megvizsgáltuk továbbá, hogy a lárvális zsírtestben bazális autofágia gátló faktorként azonosított EDTP, valamint éhezés során autofág-inhibitor Mtmr6 is kifejeződik-e a szemdiszkuszban (15. ábra). A lárvális zsírtesthez hasonlóan főként a Mtmr6B izoforma

fejeződik ki. Megvizsgáltuk továbbá, hogy a szemdiszkuszon belül milyen eloszlást mutat az EDTP expressziója *in situ* hibridizációs technikával (39/A. ábra).



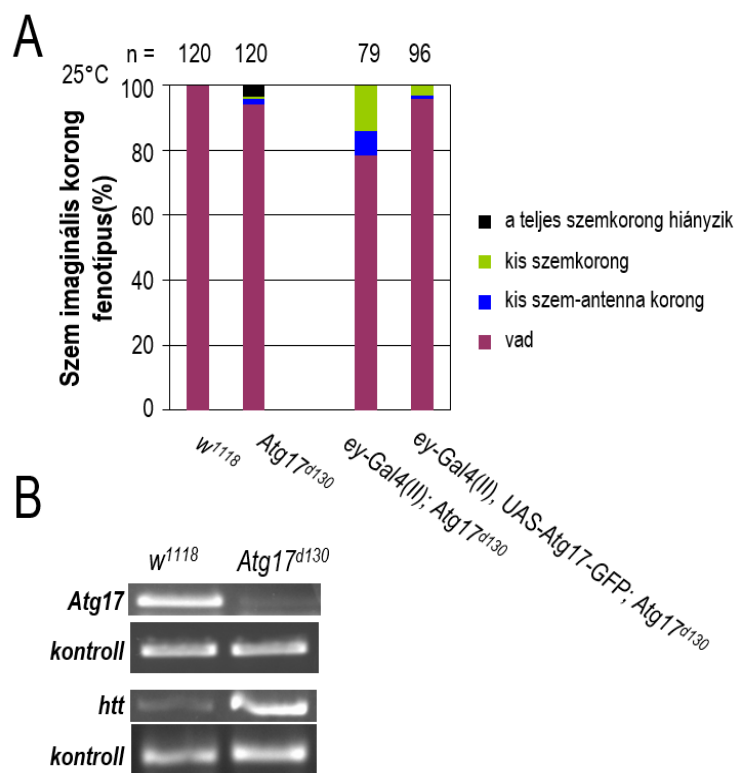
39. ábra: Myotubularinok csendesítése befolyásolja a szemfejlődést. A: Az *EDTP* mRNS-sel megegyező (*EDTP-sense* -kontroll) és komplementer szál (*EDTP antisense*) *in situ* hibridizációja *w¹¹⁸* szemdiszkuszonban. Az *EDTP* kifejeződik a teljes szem-antenna korongban, a morfogenetikai árok környékén kifejezettebb. A méretskála: 100 μ m. **B:** Az *Mtmr6* csendesítése (*GDI* és *GDI*) mindkét nemben képes kis méretű szemet eredményezni. Az *EDTP-RNSi* szintén befolyásolja a szemfejlődést; hímekben előfordul, hogy nem alakul ki szem a fejlődés során. *EDTP* túltermelés hatására kisebb penetranciával, de szintén előfordulnak abnormalis szemfenotípusok. n=150-400. *RNSi* mérések 29°C-on történtek, az *EDTP* túltermelés 25°C-on ment végbe. *Mtmr6^{GDI}*: *w**; *ey-Gal4(II)*, *UAS-Dcr-2/Mtmr6^{GDI}*. *Mtmr6^{GDI}*: *w**; *ey-Gal4(II)*, *UAS-Dcr-2/+*; *Mtmr6^{GDI}*+/+. *EDTP-RNSi*: *w**; *ey-Gal4(II)*, *UAS-Dcr-2/+*; *EDTP-RNSi*+/+. *UAS-EDTP^{EY}*: *w**; *ey-Gal4(II)*, *UAS-EDTP^{EY}*.

Az *EDTP* mRNS a szem-antenna diszkusz területén szórt eloszlást mutat, kifejeződése a morfogenetikai árok területén a legmarkánsabb. Géncsendesítése és túltermeltetése esetén is zavart szenved a szem fejlődése (39/B. ábra). Az *Mtmr6* *RNSi* 29°C-on, ahol a géncsendesítés a leghatékonyabb, a kifejlődő szemek több mint fele kisebb méretű a vad típushoz képest. *EDTP* *RNSi* esetén szintén gyakori volt a kis méretű szemfenotípus (7,83%). Az *EDTP* túltermelése is okoz változást a szem morfológiájában: a vizsgált muslicák 1%-ának nem fejlődött ki a szeme, 1,27%-ának volt abnormalis szeme, míg 2,18%-ban kis méretű szeme alakult ki (39/B. ábra).

4.2.2 Kompenzációs mechanizmusok segítik a *Drosophila* szemfejlődés során a szükséges autofág aktivitást

Munkánk során az autofágia szemfejlődésben betöltött szerepének vizsgálatához nem csak *Atg* géncsendesítések, hanem *Atg* mutációk hatását is vizsgáltuk. Mivel az autofágia a

korai fejlődésben is fontos szereppel bír, az *Atg* mutációk homozigóta formában letálisak (McPhee és Baehrecke, 2009), így bennük a szemfejlődés nem vizsgálható. Annak érdekében, hogy az állatok túléljék a korai fejlődési stádiumokat, genetikai mozaikokat hoztunk létre, ahol a szemben klonálisan vizsgálható a homozigóta *Atg* mutációk hatása. *Atg17* hiányában az L3W stádiumú lárvák egy részének teljesen hiányzik a szemdiszkusza, kis százalékban pedig kis méretű szem fejlődik ki (40/A. ábra). Felmerült azonban a kérdés, hogy a géncsendesítés miért okoz a muslicák esetén nagyobb százalékban abnormalis szemet, mint a mutáció. *Atg17* mutánsokban lecsökken az mRNA termék szintje (40/B. ábra). Ugyanezen állatokban azonban overexpresszálódik a *htt*. A huntingtin fehérje az *Atg17*-hez hasonlóan adaptor (*scaffold*) szerepet tölt be az autofág folyamatban. Feltehetőleg ezen funkcionális kompenzáció miatt nem okoz sok esetben az *Atg17* mutáns muslicák szemében fenotípusos változást. Megvizsgáltuk továbbá, hogy az *Atg17* mutáns állatok esetén tapasztalt szemfenotípus valóban a génhány miatt van-e. A vad típusú *Atg17* allél UAS-Gal4 rendszer segítségével történő kifejeztetése képes volt menekíteni a kisméretű szemfenotípust (40/A. ábra).

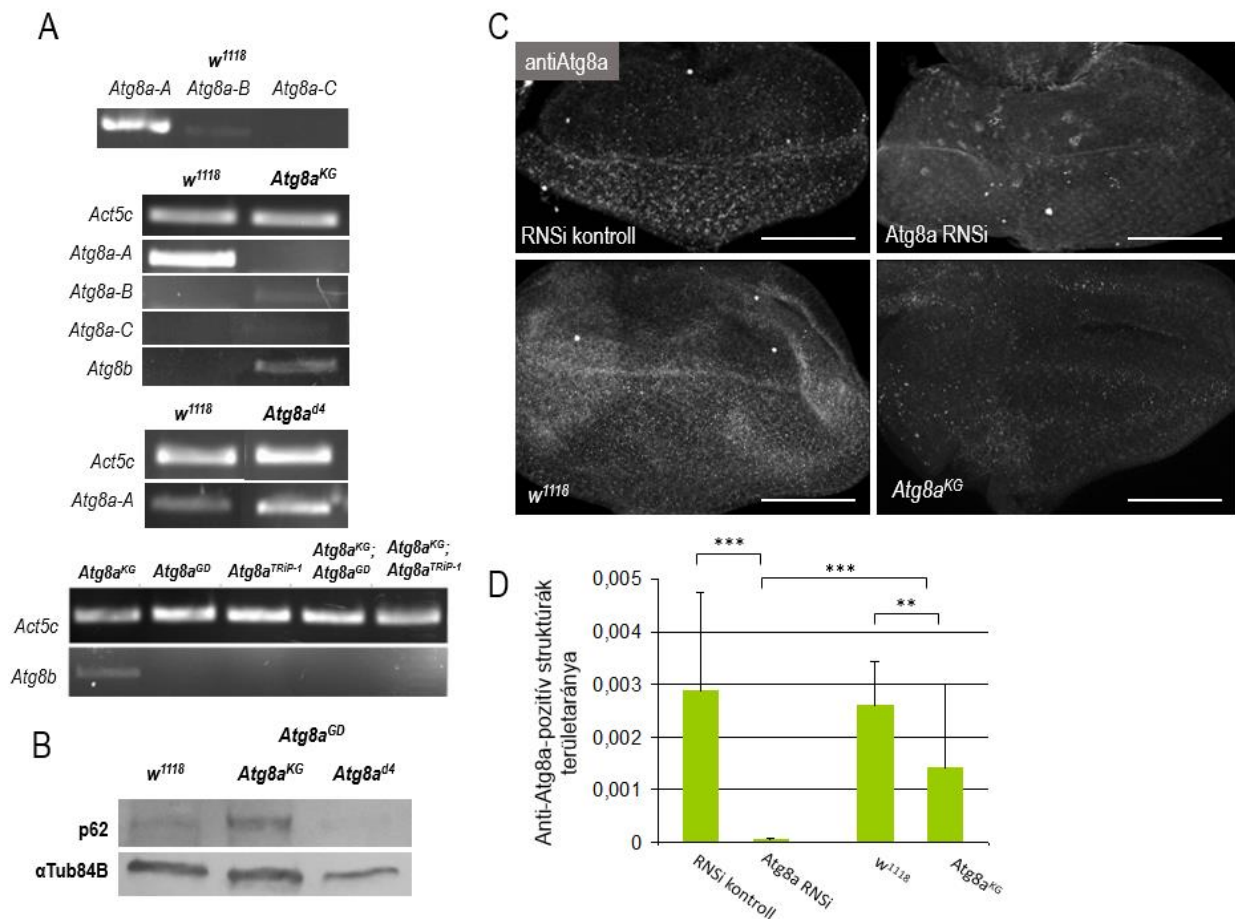


40. ábra: Az *Atg17* mutációja kis százalékban zavart okoz a szemfejlődésben. *Atg17* deficiens állatokban overexpresszálódik egy funkcionális analóg gén, a *htt*. **A:** Az *Atg17* mutációja (*Atg17^{d130}*) kis százalékban okoz zavart a szemfejlődésben, de egyes esetekben akár a teljes szem-antenna korong hiányában nyilvánul meg. Az *Atg17*-et túltermelő állatokban (*ey-Gal4(II); UAS-Atg17-GFP; Atg17^{d130}*) a kontroll csoporthoz képest (*ey-Gal4(II); Atg17^{d130}*) kevesebb százalékban fordult elő kisméretű szemkorong, a lárvák nagyrészt vad

típushoz hasonló szem-antenna korong fejlődött. **B:** Szemiquantitatív PCR alapján az *Atg17* mutánsokban lecsökken az *Atg17* mRNS termék mennyisége, a *htt* mRNS pedig túltermelődik bennük. Belső kontrollnak Act-5C-t illetve Rpl32-t használtunk. Használt genotípusok: *ey-Gal4(II)*; *Atg17d130*: *ey-Gal4(II)/+*; *FRT82B*, *Atg17d130*. *ey-Gal4(II)*, *UAS-Atg17-GFP*; *Atg17^{d130}*: *ey-Gal4(II)/+*; *FRT82B*, *Atg17d130/FRT82B*, *Atg17d130*, *UAS-Atg17-GFP*.

Az *Atg8a* génről három splice-variáns íródik át. Az L3W stádiumú lárvák szemdiszkuszában ezek közül az *Atg8a-A* expresszálódik nagyobb mennyiségben, a *B* izoforma kevésbé abundáns, míg a *C* variáns mennyisége a detektálási küszöb alatt van (41/A. ábra). A *KG07569* egy inszerció, melynek pozíciója az *Atg8a-A*-t érinti. Megvizsgáltuk, hogy *Atg8a^{KG}* mutánsokban hogyan változik a különböző izoformák kifejeződése. A vártak megfelelően az *A* mRNS variáns nem expresszálódik bennük, viszont a *B* izoforma mennyisége megnő a vad típushoz képest. Az *Atg8a-C* is kimutatható bennük (41/A. ábra). Az *Atg8a*-nak létezik egy paralógja, az *Atg8b*, mely normális körülmények között nem expresszálódik a szemdiszkuszban (vagy a detekciós küszöb alatti mennyiségben van jelen) (41/A. ábra). *Atg8a^{KG}* mutánsokban is megvizsgáltuk az *Atg8b* expresszióját, és azt tapasztaltuk, hogy a paralóg gén transzkripcionálisan aktiválódik bennük, de *Atg8a* géncsendesítés (GD és TRiP-1) hatására eltűnik (41/A. ábra). Vizsgálatainkba bevontunk egy deléciós allélt is, a *d4*-et, mely az *atg8a-A* első exonját érinti (12/C. ábra). Bennük a kontrollhoz képest nagyobb mennyiségű *A* mRNS-t mutattunk ki. A PCR olyan primerpárral lett megtervezve, ahol az egyik primer a delécióval átfedő szekvenciára tud bekötni, így a reakció végén nem vártunk terméket. Feltehetőleg az ampikon egy transz-splice-szerű mechanizmus következtében keletkezhet. *Atg8a^{KG}* és *Atg8a^{d4}* mutánsokban is megvizsgáltuk az autofág aktivitást. Az autofágia által bomló Ref(2)P mennyisége immunobloton az *Atg8a^{KG}* mutánsok szemdiszkuszában nőtt, ezzel ellentétben *d4* esetében lecsökkent (41/B. ábra). Ez utóbbi szintén azt mutatja, hogy a deléció ellenére nincs szó funkcióvesztésről.

A szemdiszkuszokban *Atg8a* ellenanyaggal jelöltünk autofág struktúrákat, és azt tapasztaltuk, hogy *Atg8a^{KG}* mutánsokban az immunjelölt struktúrák mennyisége kevesebb a kontroll diszkuszokhoz képest, de ez a csökkenés jóval kisebb mértékű az *Atg8a-RNSi* hatásához képest, ahol szinte teljesen eltűnnek az *Atg8a*-pozitív struktúrák (41/C., D. ábra). Ezen eredmények azt sejtetik, hogy az *Atg8a* funkcióvesztését különböző sejtes kompenzációs mechanizmusok képesek menekíteni, splice-variánsok vagy paralóg gén ektopikus aktiválásán keresztül.

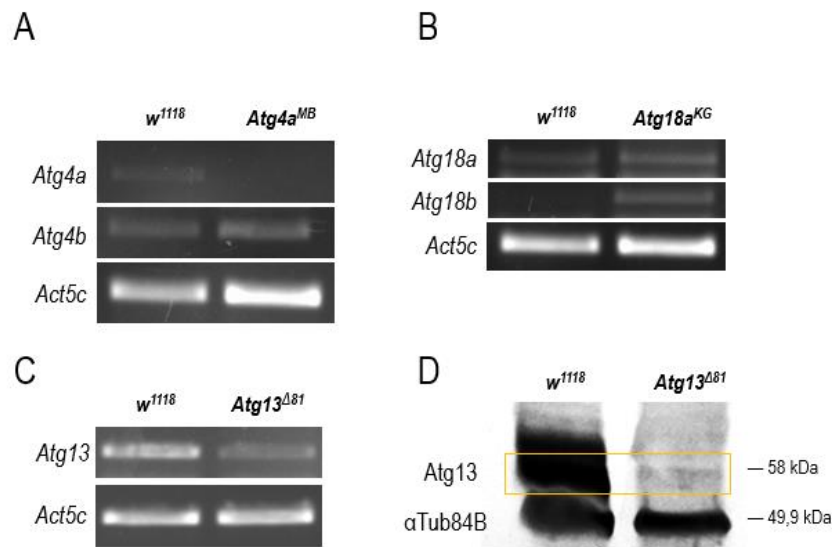


41. ábra: *Atg8a* mutáns allélek funkcionális vizsgálata. **A:** sq-RT-PCR Kontroll állatok (*w¹¹¹⁸*) szemdiszkuszában az *Atg8a* génnek az A slice variánsa dominál, de kifejeződik a B izoforma is. *Atg8a^{KG}* mutánsokban az A izoforma eltűnik, de a B izoforma mennyisége megnő, a C variáns pedig megjelenik. Az *Atg8b* paralóg gén a kontroll csoportban nem fejeződik ki, de KG mutánsokban kimutatható mennyiségű az mRNS expressziója. Az *Atg8a^{KG}* mutánsokban megjelenő *Atg8b* géntermék a géncsendesítés hatására eltűnik. *Atg8a^{d4}* mutánsokból kimutatható az *Atg8a-A* mRNS termék, így nem tekinthető funkcióvesztéses allélnak. **B:** Az immunoblott segítségével jelölt Ref(2)P/p62 fehérje mennyisége *Atg8a^{KG}* mutáns szemdiszkuszokban megnő, míg *Atg8a^{d4}* mutánsokban lecsökken. **C:** Az anti-*Atg8a* antitestfestéssel jelölt autofág struktúrák a szemdiszkuszban *Atg8a-RNSi* hatására nagyrészt eltűnnek, míg *Atg8a^{KG}* mutánsokban csak mérsékelt csökkenés figyelhető meg. **D:** A C ábrán látható immunjelölés kiértékelése. A géncsendesítés és mutáció hatására szignifikánsan csökken az *Atg8a*-pozitív struktúrák területaránya a szemdiszkuszban. PCR-nél használt belső kontroll: Act5C. Az immunoblottnál használt belső kontroll: alfa-Tub84B. Méret skála: 50 μ m. ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$.

Hasonló kompenzációs mechanizmust mutattunk ki az *Atg4a* és *Atg18a* gének esetén is. *Atg4a* mutáns genetikai háttérben (*Atg4^{MB}*) vizsgálva megnő az *Atg4b* paralóg gén kifejeződése, míg *Atg18a^{KG}* mutánsokban megnő az *Atg18b* mRNS mennyisége (42/A. és B. ábra).

Az *Atg13* és *Atg17* gének esetében lárvális zsírtestből származó adatok alapján azt feltételeztük, hogy mutációik funkcióvesztést eredményeznek, mivel a mutáns allélról nem detektálható géntermék. A heterozigóta szülők keresztezéséből származó homozigóta *Atg13 ^{Δ 81}* vagy

Atg17^{d130} mutáns háttérben azonban L3W stádiumú lárvák szemdiszkuszaiban kimutathatók az *Atg* gének vad típusú mRNS-ei, illetve fehérjetermékek (40/B., 42/C. és D. ábrák). Mivel mindkét esetben egy-egy nagy delécióról van szó, így az RNS és fehérje termékek feltehetően csak anyai hatás következtében vannak jelen a szemdiszkuszokban.



42. ábra: Szemfenotípust nem mutató *Atg* mutánsokban megtalálható az adott *Atg* mRNS termék vagy paralógjának túltermelése figyelhető meg. A: *Atg4a^{MB}* mutánsokban nem mutatható ki *Atg4a* mRNS, de a paralóg *Atg4b* expressziója megnő (sq-RT PCR-t követően a kontroll *Act5C*-vel normált pixelintenzitás mérés alapján 1,4-szeresére nő). **B:** *Atg18a^{KG}* mutánsokban pixelintenzitás mérés alapján felére csökken (*Act5C*-vel normálva) az mRNS termék, és megjelenik a paralóg géntermék (*Atg18b*) is a szemdiszkuszban. **C és D:** Az *Atg13*-mal átfedő nagy genomi deléciót tartalmazó *Atg13^{Δ81}* mutánsokban megtalálható az anyai *Atg13* mRNS termék (C), és csökkent mennyiségben, de kimutatható a fehérje is (D). *Atg18a^{KG}* = *Atg18KG⁰³⁰⁹⁰*. *Atg4a^{MB}* = *Atg4^{MB03551}*.

5 Megvitatás

Irodalmi adatok alapján gerincesekben az MTMR14/Jumpy csendesítése képes fokozni az autofágiát, vagyis a fehérje gátló hatással van az autofágiára (Vergne és mtsai., 2009; Dowling és mtsai., 2010). Vizsgálataink azonban arra világítottak rá, hogy az EDTP aminosavhiányos állapotban, illetve oxidatív stressz esetén nem befolyásolja az autofág folyamatot *ecetmuslica* zsírtestben (16, 19. és 21. ábra). A dolgozatban nem szereplő eredményeink alapján úgy tűnik, hogy az EDTP-nek inkább a bazális autofágia szabályozásban van szerepe a *Drosophila* zsírtest sejtekben (lásd Tagscherer Kinga doktori tézise). Kutatócsoportunk egy korábbi publikációban bemutatta, hogy az EDTP csendesítésével éhezõ körülmények között is lehet kismértékû autofág-indukciót elérni (Papp és mtsai., 2016). A cikkben leírt eredmények azonban két órás aminosav éhezésnek kitett lárvák zsírtestébõl származtak. A doktori tézisemben leírt eredmények pedig a három órás éhezõ állapotot mutatják be, és EDTP mutánsokban (homozigóta és hemizigóta $EDTP^{MI}$, $EDTP^{EY}$) és többféle géncsökkentõ konstrukcióva is megerõsítettük ezt az állításunkat ($EDTP^{TRiP(V22)}$ és $EDTP^{TRiP(V20)}$). Így elképzelhetõ, hogy a két órás aminosavmegvonás még nem indukálja azokat a jelátviteli rendszereket, amelyek a hosszabb éhezés során kellenek az autofágia indukciójához/fennmaradásához. Elképzelhetõ, hogy az EDTP hat éhezés során is, de csak annak kezdeti szakaszában. A hõ- és oxidatív stressz vizsgálatokból az úgy tûnik valószínûbbnek, hogy az EDTP akkor fejt ki hatását, amikor az autofág degradáció alacsony mértékû (26. és 27. ábra). Hõstressz vizsgálataink során az autofágia kismértékben indukálódott a kontroll sejtekben, az EDTP csendesítés pedig képes volt fokozni a savas sejtalkotók mennyiségét. Négy órás paraquat kezelést követõen pedig nem mérhetõ különbség az autofág struktúrák területarányában. EDTP túltermeléssel azonban hatékonyan lehet gátolni az éhezés-indukált autofágiát (17. ábra). Korábbi kísérleteinkben az EDTP túltermeléséhez az $EDTP^{EY}$ allélt használtuk (Papp és mtsai., 2016). Az inszerciós allél tartalmaz egy UAS szekvenciát is, így adott esetben alkalmas a fehérje túltermelésére (Gal4-gyel meghajtva), de az elsõ exon ilyenkor hiányzik a fehérjébõl. Az EDTP-inhibitor AUTEN-99 hatóanyag kezelés hatását (autofágia indukció) a túltermelt $EDTP^{EY}$ alléllal képesek voltunk mérsékelni (Kovács és mtsai., 2017). A doktori munkám során az $EDTP^{GSV6}$ allélt használtuk a fehérje túltermelésére, melyrõl olyan fehérje képzõdik, ami az elsõ exont is tartalmazza. Ez esetben is hasonló eredményt kaptunk; a nagyobb mennyiségû fehérje képes volt gátolni az éhezés-indukált autofágiát.

Az EDTP-vel ellentétben az *Mtmr6* éhezéskor gátolja az autofágiát (18, 19. és 21. ábra). Feltehetőleg más stressz-kondíciók esetén is hasonlóan működik a fehérje (26. és 27. ábra). Nem az indukciós lépések során hat, lévén az Atg13 foszforilációját nem befolyásolja (24. ábra). Az indukciós komplextől downstream hat, de a PI3P szintet befolyásolja, így feltehetőleg (részben) a vezikulanukleációs lépésben fejt ki autofágia gátló hatását. Ezen eredményeinket 2021-ben publikáltuk (Manzéger és mtsai., 2021). Ezzel párhuzamosan jelent meg egy publikáció (Allen és Baehrecke, 2020), melyben szintén a *Drosophila* *Mtmr6* szerepét vizsgálták különböző szövetekben. Mind etette, mind éheztetve azt tapasztalták, hogy a megnövekedett mCherry-Atg8a-pozitív struktúrák területarányának változása és autofág-struktúra mérete mellett a Ref(2)P is hasonlóan nő a zsírtest és bélsejtekben. Utóbbi kimutatására Ref(2)P ellenanyagfestést alkalmaztak kizárólag géncsendesítés esetén. Ezen vizsgálataikhoz egy olyan konstrukciót használtak (*Mtmr6*^{HMS01807}), mely a saját méréseink alapján nem csendesítette hatékonyan az *Mtmr6*-ot (nem mutatott változást). Az általunk használt GD és TRiP-1 konstrukciókkal viszont hatékonyan csökkent az *Mtmr6* mRNS szintje (19. ábra). Mindkettővel hasonló eredmények jöttek ki, a Ref(2)P mennyisége immunobloton csökkent, akárcsak a mutáns allél esetén (19. ábra). A TubGFP-ref(2)P jelölt struktúrákban azonban nem tapasztaltunk felhalmozódást. Allen és munkatársai (2020) a funkcióvesztéses mutáns vizsgálataikban *dMtmr6^A/dMtmr6^{KG01267}* genetikai háttért használtak. A KG allélról pedig kimutattuk, hogy befolyásolja a szomszédos gén (*CG3520*) expresszióját is.

Silhankova és munkatársai szerint az *Mtmr6* hat az endoszómális rendszerre (Silhankova és mtsai., 2010). Allen és munkatársai szerint az *Mtmr6* az endolizoszómális rendszert befolyásolva hat az autofágiára (Allen és Baehrecke, 2020). Saját eredményeink is ezt támasztják alá. Bár úgy tűnik, hogy az UVRAG nélküli membránokon is képes hatni (25. ábra), a kortikális régióban növeli a PI3P mennyiségét. Hiányában megnő a Rab4⁺-pozitív struktúrák területaránya, míg a Rab5⁺-pozitív struktúrák területaránya lecsökken (28. ábra). Elképzelhető, hogy a korai/szortírozó endoszómák membránjában lévő foszfoinozítidek defoszforilálásával befolyásolja az ott lévő Rab fehérjék mennyiségét. Ismert, hogy a Rab5 képes toborozni a PI3K komplexet a korai endoszómákra (Hegedűs és mtsai., 2016). A kináz működésével pedig megkezdődik az endoszómák érése, a keletkező PI3P hatására a Rab7 toborzódik a membránhoz, amely a HOPS komplex effektor. Ez teszi lehetővé, hogy az érett endoszómák fúzionálhassanak autofagoszómákkal. Ez alapján nehezen értelmezhető, hogy *Mtmr6* hiányában éhező körülmények között miért fokozódik az autofágia, hiszen *Mtmr6* defektus esetén lecsökken a Rab5-pozitív endoszómák területaránya. Kimutatták azonban, hogy

éhező körülmények között a fúzió Rab5 hiányában is végbemegy, a folyamathoz Ccz1, Mon1 és Rab7 szükségesek (Hegedűs és mtsai., 2016). Így elképzelhető, hogy a fent említett Rab5-függő útvonal a bazális autofágiához fontos, az éhezés során az indukcióhoz, pedig más szabályozási utakra van szükség. Ez magyarázatul szolgálhat arra a megfigyelésünkre, hogy jól táplált körülmények között az Mtmr6 miért segíti elő az autofágiát (ezt részletesebben Tagscherer Kinga doktori disszertációjában olvasható) (Manzéger és mtsai., 2021).

Aminosav éhezés-indukált autofágia során a fokozott lebontás miatt megnő az autofagoszómákhoz szükséges membránok mennyisége. A sejtek ilyenkor a reciklizáló endoszómák membránját használják a fokozott igény fedezésére. Számos tanulmányban kimutatták, hogy éhezés során a Rab11 az Atg9 tartalmú RE-ről képes az autofagoszómához transzlokálódni *Drosophilában* és emlős sejt kultúrákban (Szatmári és mtsai., 2014; Puri és mtsai., 2013). *Drosophila* zsírtestben a Hook éhezés hatására Rab11-függő módon transzlokálódik a késői (Rab7⁺)-endoszómákról az autofagoszómákra. A Hook egy az endoszómák érésében szerepet játszó fehérje. Képes a késői endoszómákat kihorgonyozni a mikrotubulushoz, és gátolni az érési folyamatot. A Rab11 kötés hatására a Hook átkerül az éretlen autofagoszómákra, és ez elősegíti az endoszómák érését és későbbi fúzióját az autofagoszómákkal (Szatmári és mtsai., 2014). A Rab11-pozitív reciklizáló endoszómák a korai endoszómák Rab5 mentes és Rab4-pozitív területéről fűződnek le. Feltételezhető tehát, hogy éhező körülmények között inkább ez az útvonal biztosítja a megnövekedett membránigényt, és elősegíti a Hook transzlokációja révén az autofagoszómák és késői endoszómák fúzióját. Ez magyarázatot adhat arra, hogy az Mtmr6 működése révén éheztetve miért gátolja az autofágiát: növeli a Rab5 pozitivitást és csökkenti a Rab4 pozitivitást az endoszómákon. Aminosavhiányos állapotban a sejtekben inkább a Rab4-Rab11-Rab7 útvonal látszik fontosnak. Elképzelhető, hogy ez egy nagyobb volumenű, gyorsabb lebontást tesz lehetővé, mint a bazális autofágia során fontos Rab5-Rab7 útvonal. Az Mtmr6 ezáltal kettős szereppel bír az autofágia szabályozásában: működése révén serkenti a bazális autofágiát, az éhezés-indukált autofágia során pedig nagyobb mennyiségben van jelen a sejtekben, és egyfajta fékentartó faktorként hat az autofágia folyamatára. Hiányában stressz esetén egy intenzívebb degradáció indulna be a sejtekben, ami esetleg károsan hat a sejtek homeosztázisára.

Kísérleti eredményeink alapján az autofágia fontos szereppel bír a szemfejlődés során is. Hibás működése kisméretű vagy abnormális morfológiájú szemet eredményez a felnőtt állatokban. Autofág struktúrákat főleg a morfogenetikai árok területén, illetve a differenciálódó

sejtekben azonosítottunk, de a folyamatban részt vevő Atg fehérjék (Atg8a és Atg5) expresszálnak a teljes szemdiszkuszban, így az osztódó sejtek régiójában is (29. és 30. ábrák).

Az autofágia az egyedfejlődéshez kiemelkedően fontos, így hibás működése már korai fejlődési rendellenességekhez vezethet. Ahhoz, hogy vizsgálni tudjunk az autofágia szemfejlődésben betöltött potenciális szerepét, az állatnak túl kell élnie a kritikus korai stádiumokat, vagyis a szemfejlődés időszakát. Ezt géncsendesítéssel úgy lehet megvalósítani, hogy *Atg* géneket nem az összes sejtben csendesítjük, hanem valamilyen szem (primordiális) sejtekre specifikus driverrel hajtjuk meg. Ugyanígy az *Atg* gének mutációi sok esetben letálisak a korai egyedfejlődés során, de klonálisan kifejeztetve a szemsejtekben vizsgálható a hatásuk. Néhány korábbi vizsgálat szerint, az *Atg* gének mutációi nem okoznak a szemfejlődésben zavart, vagyis itt az autofágiának nincs nagy szerepe (Juhász és mtsai., 2007; Velentzas és mtsai., 2013; Pérez és mtsai., 2015). Eredményeink alapján például az *Atg17* inaktivációja befolyásolja a szem fejlődését, néhány esetben teljesen hiányzik a fejlődő szemkorong. Ez azonban csak kis penetranciával nyilvánul meg. Chen és munkatársai egy GMR-Gal4 forrást használva (mely főleg a differenciálódó sejtekben teszi lehetővé a csendesítést) azt írták le, hogy az *Atg7* RNSi hatására rögzös szem fejlődik, ahol az ommatídiumok fúziója figyelhető meg. *Atg4*, *-5*, *-8*, *-9*, *-12* vagy *-18* esetén viszont nem okoz a géncsendesítés változást a szem morfológiájában (Chen és mtsai., 2012; Velentzas és mtsai., 2013). Saját vizsgálatainkhoz azonban olyan drivereket (*ey-Gal4II és III*, *so-Gal4*) használtunk, amivel a teljes szemdiszkusz területén érhető el géncsendesítés (PZ, MF, DM) (32. ábra). Az *Atg* gének a teljes szemdiszkusz területén csendesítve nagy százalékban okoznak zavart a szemfejlődésben (34. ábra). Így adódik a kérdés, hogy melyik módszer mutatja jobban az autofágia szemfejlődési szerepét. A géncsendesítés során felléphet *off-target* hatás, vagyis az RNSi konstrukció más gén(ek)e)t is csendesíthet. Kísérleteinkben azonban többféle típusú RNSi konstrukciót használtunk. Az *Atg8a* csendesítésére például GD, TRiP1 konstrukciókat is használtunk, melyek az *Atg8a* mRNS eltérő szekvencia részével komplementálnak. Így ha van is *off-target* hatás, kis valószínűséggel okoznak ugyan olyan fenokópiát.

Atg mutánsokkal végzett kísérleti eredményeink inkább arra engednek következtetni, hogy az RNS interferencia megbízhatóbb magyarázatot ad az autofágia szemfejlődésben betöltött szerepére. A legtöbb vizsgált *Atg* mutáns genetikai háttér (*Atg8a*, *Atg4a*, *Atg18a*, *Atg13* és *Atg17*) esetén ugyanis azonosítottunk kompenzációs mechanizmust a sejtekben. Zebrahalban írták le először, hogy genetikai nullallélek fenotípus hatását elfedik (vagy csökkentik) a sejtekben kialakuló kompenzációs mechanizmusok (Rossi és mtsai., 2015). Vizsgálataink

alapján az *Atg8a*, *Atg4a* és *Atg18a* esetében paralóg gének túltermelése figyelhető meg (41. és 42. ábrák). Az *Atg13* és *Atg17* gének esetében pedig anyai mRNS termékek/fehérjék segítik a szemsejteket a fejlődésben (40. és 42. ábrák). Így egyedi *Atg* mutánsok esetén nem jelenthetjük ki egyértelműen, hogy az autofág folyamat valóban hiányzik bennük. Ezt támasztja alá az az eredmény is, ahol az *Atg8a* *RNSi* és az *Atg8a*^{KG} mutáns szemdiszkuszokban összehasonlítottuk az anti-*Atg8a* területarányt (41. ábra). Az *Atg8a*^{KG} szemdiszkuszban nem nulla a mért immunjel aránya. Ez azzal magyarázható, hogy az *Atg8aA* hiánya mellett túltermelődnek egyéb splice variánsok (pl. *Atg8a B* és *C*), illetve paralóg géntermék (*Atg8b*), melyek képesek részben átvenni a kiesett *A* izoforma szerepét az autofág folyamatban. Különböző *Atg*-komplexek alkotóinak csendesítése ugyanakkor nagy mértékben csökkentette a szemdiszkuszban mért autofág struktúrák jelenlétét (34/B. ábra). Összességében elmondható, hogy az autofágia hiánya vagy csökkent működése zavart okoz a *Drosophila* összetett szemének fejlődésében.

A csirke szemfejlődése során szintén vizsgálták az autofágia szerepét. A neurogenesis során programozottan elhaló sejtek maradványainak eltakarításában játszik jelentős szerepet az autofág degradáció (Mellén és mtsai., 2008). Autofágia inhibitorokkal történő kezelés után apoptotikus sejtek halmozódtak fel a neuroepithélium azon területén, ahol az addig osztódó sejtek befejezik a sejtciklusukat és differenciálódni kezdenek (Mellén és mtsai., 2008). A disszertációmban leírt eredményekből arra következtethetünk, hogy az *ecetmuslica* összetett szemének fejlődéséhez is a morfogenetikai árok mentén, és azt követően, ott fontos az autofágia, ahol a sejtek befejezik a sejtciklusukat és megkezdődik a differenciálódás folyamata.

Emlősökben is igen intenzíven kutatott terület az autofágia és retina kapcsolata (Boya és mtsai., 2016). Az autofágia szerepét leírták a fényhez-való akkomodáció során: a pigmentek képesek autofágia által bomlani (Remé és mtsai., 1999). A különböző *ATG* mutáns egerek nem élnek túl a korai egyedfejlődést. *ATG4B* null mutáns egerek azonban életképesek, a retinájukban csökkent az LC3 lipidizáció, és p62 felhalmozódás mutatható ki. Az *Atg4B* hiánya azonban nem okozott az egerek retinájában funkcionális változást (Rodríguez-Muela és Boya, 2012). Hasonlóan nem okoz gondot a retina működésében a *Beclin1* +/- mutációja sem (Chen és mtsai., 2013). Ez azonban csak stresszmentes környezetben igaz, ha például intenzív fénynek vannak kitéve az állatok, akkor a vad típusú társaikkal ellentétben súlyos retina sérülést szenvednek. Ez alapján úgy tűnik, hogy a retinasejtekben főleg a stressz-indukált autofágia fontos a sejtek túléléséhez. A képet azonban árnyalja, hogy *ATG5*^{lox/lox} nestin-Cre rekombinázzal előállított mutáns egerekben fotoreceptor degenerációt figyeltek meg p62 felhalmozódás mellett (Rodríguez-Muela és mtsai., 2013). *ATG7*^{lox/lox}, *VMD2-rtTA-Cre* egereknél azonban nem

figyeltek meg szövettani eltérést a retinafejlődésük során, sem funkcionális elváltozást a vizuális képességeikben (Perusek és mtsai., 2015). Így az autofágia szerepéről az emlős szemfejlődésben még nem mondhatunk biztosat. A doktori munkámban feltárt kompenzációs mechanizmusok azonban azt sugallják, hogy a különböző *Atg*^{-/-} mutáns állatokat nem minden esetben tekinthetjük autofágia szempontjából funkcióvesztéses mutánsnak. Így az emlősökben leírt eredményeket is érdemes ennek tükrében értelmezni.

6. Összefoglalás

Az autofágia az eukarióta sejtek szabályozott, lizoszóma közvetített lebontó folyamata, mely során a hibás, feleslegessé vált sejtplazma komponensek lebontásra kerülnek, és a keletkezett autolizozómák tartalma reciklizálódik. Az autofágia a sejtek számára nélkülözhetetlen, citoprotektív folyamat. Részt vesz a sejteket ért stresszhatásokkal szembeni válaszméchanizmusban is. Ezért az autofágia kutatása orvosbiológiai szempontokból fontos.

Myotubularin-szerű lipid foszfatázok az autofágia folyamatában is szerepet játszó foszfoinozitidek átalakító folyamataiban vesznek részt. Doktori munkám során az emlősökben autofágiát szabályozó myotubularinok, az MTMR6, -7 és -8, valamint az MTMR14 *Drosophila* ortológjainak indukált autofágiában betöltött szerepét vizsgáltam. A harmadik lárvastádiumú táplálkozó állatok zsírtestében éhezés hatására megnő az Mtmr6-A és -B izoformák kifejeződése, valamint az EDTP expresszió is indukálódik.

Különböző stressz körülmények (éhezés, oxidatív stressz, hőstressz) között az *Mtmr6* inszerciós mutánsokban, valamint géncsendesítés hatására a kontrollt meghaladó mértékű autofágiát detektáltunk. Ez alapján az Mtmr6 egyfajta fékentartó faktorként hat a stressz-indukált autofágiára. Működését részben a korai endoszómák területén fejt ki, jelenlétében a Rab4-tartamú tubuláris szortírozó endoszómák területaránya kisebb lesz, a Rab5-tartalmú korai endoszómáké pedig nagyobb. Hosszabb éhezés során az EDTP hiánya az indukált autofágia folyamatában nem okoz zavart, EDTP deficiens háttérben nem detektáltunk változást az autofágia mértékében. Az EDTP overexpressziója azonban képes az indukált autofágiát visszaszorítani.

A fejlődési autofágia sejtors meghatározó szerepű, lebontó működése által energiát szolgáltat a szervezetnek az átépítő működéséhez, valamint befolyásolja a jelátviteli folyamatokat citokinek lebontása révén. Doktori munkám során kimutattuk, hogy a *Drosophila* szemdiszkuszban az autofág fehérjék hiánya a morfogenetikai árok mentén, illetve az osztódási zónában a szemfejlődés zavarához vezet. Az autofágiában szerepet játszó Atg komponensek csendesítése markánsabban befolyásolta a szem fenotípusát, mint az inszerciós/deléciós mutáns allélek. Kimutattuk, hogy sok esetben ezek a mutációk nem tekinthetőek funkcióvesztéses alléleknek, mert különböző mechanizmusok (anyai hatás, splice variánsok vagy paralóg gén ectopikus expressziója) segítik a szemfejlődés során kompenzálni a szükséges autofág aktivitást.

7 Summary

Autophagy is a conserved, lysosome-mediated self-degradative process of eukaryotic cells, during which damaged, dysfunctional cellular components are degraded, and the contents of autolysosomes are recycled. In addition to its housekeeping role, autophagy can be upregulated during stress conditions, and acts as an adaptive mechanism essential for cell survival. Therefore, research on autophagy is also important from a biomedical standpoint.

Acting as lipid phosphatases, myotubularins are involved in the phosphoinositide conversion processes that are also involved in autophagy. In my PhD work, I examined two *Drosophila* MTMRs, EDTP and Mtmr6, the fly orthologs of mammalian MTMR14 and MTMR6-8, respectively. Upon starvation, the expression of Mtmr6-A and -B isoforms increased and EDTP expression became induced in the fatbody cells of third larval stage feeding animals.

Under different stress conditions (starvation, oxidative stress, heat stress), we detected increased autophagy in *Mtmr6* insertion mutants and in *Mtmr6-RNAi* animals. This suggests that Mtmr6 functions as a restraining factor on stress-induced autophagy. It exerts its function partly in the area of early endosomes. In the presence of Mtmr6, the Rab4-containing tubular sorting endosomes area-percentage will be less and the Rab5-containing early endosome area will be larger. During prolonged starvation, EDTP does not influence stress-induced autophagy, no significant difference in autophagy markers can be detected in EDTP-deficient backgrounds as compared with control. However, EDTP overexpression is able to repress induced autophagy.

Developmental autophagy plays a crucial role in cell fate specification, providing energy to the organism for its remodeling functions through its degradative action. It can influence signaling processes through the degradation of cytokines. Here, we have shown that in the *Drosophila* eye-antennal-disc, the lack of autophagic proteins along the morphogenetic furrow and in the differentiation zone leads to severe defects in eye development. Silencing of Atg components involved in autophagy had a more pronounced effect on the eye phenotype than insertional mutant alleles. However, we have shown that in many cases these mutations behave as not loss-of-function alleles because different mechanisms (maternal effect, ectopic expression of a paralogous genes or splice variants) help to compensate for the required autophagic activity during eye development.

8 Irodalomjegyzék

- Allen EA, Amato C, Fortier TM, Velentzas P, Wood W, Baehrecke EH (2020) A conserved myotubularin-related phosphatase regulates autophagy by maintaining autophagic flux. *Journal of Cell Biology* **219**, e201909073. <https://doi.org/10.1083/jcb.201909073>
- Allen EA, Baehrecke EH (2020) Autophagy in animal development. *Cell Death and Differentiation* **27**, 903–918. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-0497-0>.
- Armi CD, Devereaux KA, Paolo GD (2013) The Role of Lipids in the Control of Autophagy Review. *Current Biology* **23**, R33–R45. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.10.041>.
- Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, Griffi G, Ktistakis NT (2008) Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum **182**, 685–701. <https://doi.org/10.1083/jcb.200803137>.
- Baba M, Takeshige K, Baba N, Ohsumi Y (1994) Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: Detection of autophagosomes and their characterization. *Journal of Cell Biology* **124**, 903–913. <https://doi.org/10.1083/jcb.124.6.903>.
- Baerga R, Zhang Y, Chen PH, Goldman S, Jin S (2009) Targeted deletion of autophagy-related 5 (atg5) impairs adipogenesis in a cellular model and in mice. *Autophagy* **5**, 1118–1130. <https://doi.org/10.4161/auto.5.8.9991>.
- Balla T, Szentpetery Z, Kim YJ (2009) Phosphoinositide Signaling: New Tools and Insights. *Physiology* **24**, 231–244. <https://doi.org/10.1152/physiol.00014.2009>.
- Barna J, Csermely P, Vellai T (2018) Roles of heat shock factor 1 beyond the heat shock response. *Cellular and Molecular Life Sciences* **75**, 2897–2916. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2836-6>.
- Begley MJ, Dixon JE (2005) The structure and regulation of myotubularin phosphatases. *Current Opinion in Structural Biology* **15**, 614–620. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.10.016>.
- Bejarano E, Cuervo AM (2010) Chaperone-Mediated Autophagy. *Proceedings of the American Thoracic Society* **7**, 29–39. <https://doi.org/10.1513/pats.200909-102JS>.
- Berger Z, Ravikumar B, Menzies FM, Oroz LG, Underwood BR, Pangalos MN, Schmitt I, Wullner U, Evert BO, O’Kane CJ, Rubinsztein DC (2006) Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins. *Human Molecular Genetics* **15**, 433–442. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi458>.
- Berry DL, Baehrecke EH (2007) Growth Arrest and Autophagy Are Required for Salivary Gland Cell Degradation in *Drosophila* 1137–1148. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.048>.
- Billes V, Kovács T, Manžéger A, Lőrincz P, Szincsák S, Regős Á, Kulcsár PI, Korcsmáros T, Lukácsovich T, Hoffmann G, Erdélyi M, Mihály J, Takács-vellai K, Sass M, Vellai T (2018) Developmentally regulated autophagy is required for eye formation in *Drosophila*. *Autophagy* **14**, 1499–1519. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1454569>.
- Billesa V, Kovacs T, Hotzi B, Manžeger A, Tagscherer K, Komlos M, Tarnocia A, Padar Z, Erdos A, Bjelik A, Legradi A, Gulya K, Gulyas B, Vellai T (2016) AUTEN-67 (Autophagy Enhancer-67) Hampers the Progression of Neurodegenerative Symptoms in a *Drosophila* model of Huntington’s Disease. *Journal of Huntington’s Disease* **5**, 133–147. <https://doi.org/10.3233/JHD-150180>
- Blommaert EFC, Krause U, Schellens JPM, Vreeling-sindelarova H, Meijer AJ (1997) The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY 294002 inhibit autophagy

- in isolated rat hepatocytes **246**, 240–246. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.0240a.x>.
- Borsos É, Erdélyi P, Vellai T (2011) Autophagy and apoptosis are redundantly required for *C. elegans* embryogenesis. *Autophagy* **7**, 557–559. <https://doi.org/10.4161/auto.7.5.14685>.
- Boya P, Esteban-Martínez L, Serrano-Puebla A, Gómez-Sintes R, Villarejo-Zori B (2016) Autophagy in the eye: Development, degeneration, and aging. *Progress in Retinal and Eye Research* **55**, 206–245. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2016.08.001>.
- Braden CR, Neufeld TP (2016) Atg1-independent induction of autophagy by the *Drosophila* Ulk3 homolog, ADUK. *FEBS Journal* **283**, 3889–3897. <https://doi.org/10.1111/febs.13906>.
- Brand a H, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)* **118**, 401–15.
- Campa CC, Margaria JP, Derle A, Del Giudice M, De Santis MC, Gozzelino L, Copperi F, Bosia C, Hirsch E (2018) Rab11 activity and PtdIns(3)P turnover removes recycling cargo from endosomes. *Nature Chemical Biology* **14**, 801–810. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0086-4>.
- Chang T-K, Shrivage BV, Hayes SD, Powers CM, Simin RT, Wade Harper J, Baehrecke EH (2013) Uba1 functions in Atg7- and Atg3-independent autophagy. *Nature Cell Biology* **15**, 1067–1078.
- Chang Y-Y, Neufeld TP (2009) An Atg1/Atg13 Complex with Multiple Roles in TOR-mediated Autophagy Regulation. *Molecular Biology of the Cell* **20**, 2004–2014. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.06.029>.
- Chen SF, Kang ML, Chen YC, Tang HW, Huang CW, Li WH, Lin CP, Wang CY, Wang PY, Chen GC, Wang HD (2012) Autophagy-related gene 7 is downstream of heat shock protein 27 in the regulation of eye morphology, polyglutamine toxicity, and lifespan in *Drosophila*. *Journal of Biomedical Science* **19**, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-52>.
- Chen Y, Sawada O, Kohno H, Le Y-Z, Subauste C, Maeda T, Maeda A (2013) Autophagy Protects the Retina from Light-induced Degeneration. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 7506–7518. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.439935>.
- Clague MJ, Lorenzo O (2005) The myotubularin family of lipid phosphatases. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **6**, 1063–9. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00338.x>.
- Colombani J, Raisin S, Pantalacci S, Radimerski T, Montagne J, Léopold P (2003) „A Nutrient Sensor Mechanism Controls *Drosophila* Growth”. *Cell* **114**, 739–49. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00713-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00713-X).
- Criollo A, Senovilla L, Authier H, Maiuri MC, Morselli E, Vitale I, Kepp O, Tasmir E, Galluzzi L, Shen S, Tailler M, Delahaye N, Tesniere A, De Stefano D, Younes AB, Harper F, Pierron G, Lavandro S, Zitvogel L, Israel A, Baud V, Kroemer G (2010) The IKK complex contributes to the induction of autophagy. *The EMBO Journal* **29**, 619–631. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.364>.
- De Duve C (1963) The lysosome. *Scientific American* **208**, 64–72. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0563-64>.
- Denton D, Shrivage B, Simin R, Mills K, Berry DL, Baehrecke EH, Kumar S (2009) Autophagy, Not Apoptosis, Is Essential for Midgut Cell Death in *Drosophila*. *Current Biology* **19**, 1741–1746. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.08.042>.
- Dibble CC, Manning BD (2013) Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. *Nature Cell Biology* **15**, 555–564. <https://doi.org/10.1038/ncb2763>.
- Doerks T, Strauss M, Brendel M, Bork P (2000) GRAM, a novel domain in glucosyltransferases, myotubularins and other putative membrane-associated proteins.

- Trends in Biochemical Sciences* **25**, 483–485. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01664-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01664-9).
- Dokladny K, Zuhl MN, Mandell M, Bhattacharya D, Schneider S, Deretic V, Moseley PL (2013) Regulatory Coordination between Two Major Intracellular Homeostatic Systems. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 14959–14972. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.462408>.
- Dove SK, Cooke FT, Douglas MR, Sayers LG, Parker PJ, Michell RH (1997) Osmotic stress activates phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate synthesis. *Nature* **390**, 187–192. <https://doi.org/10.1038/36613>.
- Dowling JJ, Low SE, Busta AS, Feldman EL (2010) Zebrafish MTMR14 is required for excitation-contraction coupling, developmental motor function and the regulation of autophagy. *Human Molecular Genetics* **19**, 2668–2681. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq153>.
- Epple UD, Suriapranata I, Eskelinen E-L, Thumm M (2001) Aut5/Cvt17p, a Putative Lipase Essential for Disintegration of Autophagic Bodies inside the Vacuole. *Journal of Bacteriology* **183**, 5942–5955. <https://doi.org/10.1128/JB.183.20.5942-5955.2001>.
- Érdi B, Nagy P, Zvara Á, Varga Á, Pircs K, Ménesi D, Puskás LG, Juhász G (2012) Loss of the starvation-induced gene Rack1 leads to glycogen deficiency and impaired autophagic responses in *Drosophila*. *Autophagy* **8**, 1124–1135. <https://doi.org/10.4161/auto.20069>.
- Fader CM, Colombo MI (2009) Autophagy and multivesicular bodies: Two closely related partners. *Cell Death and Differentiation* **16**, 70–78. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.168>.
- Ferguson CJ, Lenk GM, Meisler MH (2009) Defective autophagy in neurons and astrocytes from mice deficient in PI(3,5)P2. *Human molecular genetics* **18**, 4868–78. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp460>.
- Filimonenko M, Isakson P, Finley KD, Anderson M, Jeong H, Melia TJ, Bartlett BJ, Myers KM, Birkeland HCG, Lamark T, Krainc D, Brech A, Stenmark H, Simonsen A, Yamamoto A (2010) The Selective Macroautophagic Degradation of Aggregated Proteins Requires the PI3P-Binding Protein Alfy. *Molecular Cell* **38**, 265–279. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.04.007>.
- Firestein R, Nagy PL, Daly M, Huie P, Conti M, Cleary ML (2002) Male infertility, impaired spermatogenesis, and azoospermia in mice deficient for the pseudophosphatase Sbf1. *Journal of Clinical Investigation* **109**, 1165–1172. <https://doi.org/10.1172/JCI0212589>.
- Freeman M (1997) Cell determination strategies in the *Drosophila* eye. *Development* **124**, 261–270.
- Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T (2008) The Atg16L Complex Specifies the Site of LC3 Lipidation for Membrane Biogenesis in Autophagy **19**, 2092–2100. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07>.
- Gao G, Sheng Y, Yang H, Chua BT, Xu L (2019) DFCP1 associates with lipid droplets **43**, 1492–1504. <https://doi.org/10.1002/cbin.11199>
- Gao J, Langemeyer L, Kümmel D, Reggiori F, Ungermann C (2018) Molecular mechanism to target the endosomal Mon1-Ccz1 GEF complex to the pre-autophagosomal structure. *eLife* **7**, 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.31145>.
- Gibbins D, Mostowy S, Jay F, Schwab Y (2013) Europe PMC Funders Group Selective autophagy degrades DICER and AGO2 and regulates miRNA activity **14**, 1314–1321. <https://doi.org/10.1038/ncb2611.Selective>.
- Gibbs EM, Feldman EL, Dowling JJ (2010) The role of MTMR14 in autophagy and in muscle disease. *Autophagy* **6**, 819–820. <https://doi.org/10.4161/auto.6.6.12624>.

- Gibson MC, Schubiger G (2000) Peripodial Cells Regulate Proliferation and Patterning of *Drosophila* Imaginal Discs. *Cell* **103**, 343–50. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00125-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00125-2).
- Golic KG, Lindquist S (1989) The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* **59**, 499–509.
- Hara T, Takamura A, Kishi C, Iemura SI, Natsume T, Guan JL, Mizushima N (2008) FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *Journal of Cell Biology* **181**, 497–510. <https://doi.org/10.1083/jcb.200712064>.
- Hegedűs K, Takáts S, Boda A, Jipa A, Nagy P, Varga K, Kovács AL, Juhász G (2016) The Ccz1-Mon1-Rab7 module and Rab5 control distinct steps of autophagy. *Molecular Biology of the Cell* **27**, 3132–3142. <https://doi.org/10.1091/mbc.e16-03-0205>.
- Hemelaar J, Lelyveld VS, Kessler BM, Ploegh HL (2003) A Single Protease, Apg4B, Is Specific for the Autophagy-related Ubiquitin-like Proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 51841–51850. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308762200>.
- Hennig KM, Colombani J, Neufeld TP (2006) TOR coordinates bulk and targeted endocytosis in the *Drosophila melanogaster* fat body to regulate cell growth. *Journal of Cell Biology* **173**, 963–974. <https://doi.org/10.1083/jcb.200511140>.
- Herpin A, Lescat L, Bobe J, Jenny A, Seiliez I (2020) Lighting chaperone-mediated autophagy (CMA) evolution with an ancient LAMP: the existence of a functional CMA activity in fish. *Autophagy* **16**, 1918–1920. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1797344>.
- Hewitt G, Korolchuk VI (2017) Repair , Reuse , Recycle : The Expanding Role of Autophagy in Genome Maintenance. *Trends in Cell Biology* **27**, 340–351. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.11.011>.
- Hnia K, Kretz C, Amosii L, Böhm J, Liu X, Messaddeq N, Qu C-K, Laporte J (2012a) Primary T-tubule and autophagy defects in the phosphoinositide phosphatase Jumpy/MTMR14 knockout mice muscle. *Advances in Biological Regulation* **52**, 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.advenzreg.2011.09.007>.
- Hnia K, Vaccari I, Bolino A, Laporte J (2012b) Myotubularin phosphoinositide phosphatases: cellular functions and disease pathophysiology. *Trends in molecular medicine* **18**, 317–27. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.04.004>.
- Hoskins R a, Landolin JM, Brown JB, Sandler JE, Takahashi H, Lassmann T, Yu C, Booth BW, Zhang D, Wan KH, Yang L, Boley N, Andrews J, Kaufman TC, Graveley BR, Bickel PJ, Carninci P, Carlson JW, Celniker SE (2011) Genome-wide analysis of promoter architecture in *Drosophila melanogaster*. *Genome research* **21**, 182–92. <https://doi.org/10.1101/gr.112466.110>.
- Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan J-L, Oshiro N, Mizushima N (2009a) Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Molecular Biology of the Cell* **20**, 1981–1991. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-12-1248>.
- Hosokawa N, Sasaki T, Iemura SI, Natsume T, Hara T, Mizushima N (2009b) Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy* **5**, 973–979. <https://doi.org/10.4161/auto.5.7.9296>.
- Hotamisligil GS (2010) Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. *Cell* **140**, 900–917. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.034>.
- Houlden H, King RHM, Wood NW, Thomas PK, Reilly MM (2001) Mutations in the 5' region of the myotubularin-related protein 2 (MTMR2) gene in autosomal recessive

- hereditary neuropathy with focally folded myelin. *Brain* **124**, 907–915.
<https://doi.org/10.1093/brain/124.5.907>.
- Huang S, Jia K, Wang Y, Zhou Z, Levine B, Huang S, Jia K, Wang Y, Zhou Z, Levine B (2013) Autophagy genes function in apoptotic cell corpse clearance during *C. elegans* embryonic development *Autophagy* **9**, 138–49. <https://doi.org/10.4161/auto.22352>.
- Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N (2008) Beclin 1 Forms Two Distinct Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes with Mammalian Atg14 and UVRAG. *Molecular Biology of the Cell* **19**, 5360–5372. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08>.
- Itakura E, Kishi-itakura C, Mizushima N (2012) The Hairpin-type Tail-Anchored SNARE Syntaxin 17 Targets to Autophagosomes for Fusion with Endosomes / Lysosomes. *Cell* **151**, 1256–1269. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.001>.
- Itakura E, Mizushima N (2011) p62 targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding **192**, 17–27.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201009067>.
- Jaber N, Dou Z, Chen J-S, Catanzaro J, Jiang Y-P, Ballou LM, Selinger E, Ouyang X, Lin RZ, Zhang J, Zong W-X (2012) Class III PI3K Vps34 plays an essential role in autophagy and in heart and liver function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 2003–2008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112848109>.
- Juhász G, Erdi B, Sass M, Neufeld TP (2007) Atg7-dependent autophagy promotes neuronal health, stress tolerance, and longevity but is dispensable for metamorphosis in *Drosophila*. *Genes & development* **21**, 3061–6. <https://doi.org/10.1101/gad.1600707>.
- Kant RVD, Jonker CTH, Wijdeven RH, Bakker J, Janssen L, Klumperman J, Neefjes J (2015) Characterization of the Mammalian CORVET and HOPS Complexes and Their Modular Restructuring for Endosome. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 30280–30290. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.688440>.
- Katheder NS, Khezri R, O’Farrell F, Schultz SW, Jain A, Schink MKO, Theodossiou TA, Johansen T, Juhász G, Bilder D, Brech A, Stenmark H, Rusten TE (2017) Microenvironmental autophagy promotes tumour growth. *Nature* **541**, 417–420.
<https://doi.org/10.1038/nature20815>.
- Kaushik S, Bandyopadhyay U, Sridhar S, Kiffin R, Martinez-Vicente M, Kon M, Orenstein SJ, Wong E, Cuervo AM (2011) Chaperone-mediated autophagy at a glance. *Journal of Cell Science* **124**, 495–499. <https://doi.org/10.1242/jcs.073874>.
- Kaushik S, Massey AC, Mizushima N, Cuervo AM (2008) Constitutive Activation of Chaperone-mediated Autophagy in Cells with Impaired Macroautophagy. *Molecular Biology of the Cell* **19**, 2179–2192. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-11-1155>.
- Kirkin V, Lamark T, Sou Y-S, Bjørkøy G, Nunn JL, Bruun J-A, Shvets E, McEwan DG, Clausen TH, Wild P, Bilusic I, Theurillat J-P, Øvervatn A, Ishii T, Elazar Z, Komatsu M, Dikic I, Johansen T (2009) A Role for NBR1 in Autophagosomal Degradation of Ubiquitinated Substrates. *Molecular Cell* **33**, 505–516.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.020>.
- Klionsky DJ, Abdel-Aziz AK, Abdelfatah S, Abdellatif M, Abdoli A, Abel S, Abeliovich H, Abildgaard MH, Abudu YP, Acevedo-Arozena A, Adamopoulos IE, Adeli K, Adolph TE, Adornetto A, Aflaki E, Agam G, ... Tong CK (2021) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). *Autophagy* **17**, 1–382.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1797280>.
- Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M, Ohsumi Y (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental Cell* **5**, 539–545.
[https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00296-x](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00296-x).

- Kovács T, Billes V, Komlós M, Hotzi B, Manzóger A, Tarnóci A, Papp D, Szikszai F, Szinyákovics J, Rácz Á, Noszál B, Veszelka S, Walter FR, Deli MA, Hackler L, Alföldi R, Huzian O, Puskas LG, Liliom H, Tárnok K, Schlett K, Borsy A, Welker E, Kovács AL, Pádár Z, Erdos A, Legradi A, Bjelik A, Gulya K, Gulyás B, Vellai T (2017) The small molecule AUTEN-99 (autophagy enhancer-99) prevents the progression of neurodegenerative symptoms. *Scientific Reports* **7**, 1–17. <https://doi.org/10.1038/srep42014>.
- Kramer JM, Staveley BE (2003) GAL4 causes developmental defects and apoptosis when expressed in the developing eye of *Drosophila melanogaster*. *Genetics and molecular research: GMR* **2**, 43–47.
- Kroemer G, Mariño G, Levine B (2010) Autophagy and the Integrated Stress Response. *Molecular Cell* **40**, 280–293. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.023>.
- Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhiya T, Mizushima N (2004) The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* **432**, 1032–1036. <https://doi.org/10.1038/nature03029>.
- Kumsta C, Hansen M (2017) Hormetic heat shock and HSF-1 overexpression improve *C. elegans* survival and proteostasis by inducing autophagy. *Autophagy* **13**, 1076–1077. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1299313>
- Laporte J, Bedez F, Bolino A, Mandel JL (2003) Myotubularins, a large disease-associated family of cooperating catalytically active and inactive phosphoinositides phosphatases. *Human Molecular Genetics* **12**, 285–292. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg273>.
- Laporte J, Hu LJ, Kretz C, Mandel JL, Kioschis P, Coy JF, Klauck SM, Poustka A, Dahl N (1996) A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nature Genetics* **13**, 175–182. <https://doi.org/10.1038/ng0696-175>.
- Lee S-J, Ryter SW, Xu J-F, Nakahira K, Kim HP, Choi AMK, Kim YS (2011) Carbon Monoxide Activates Autophagy via Mitochondrial Reactive Oxygen Species Formation. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **45**, 867–873. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2010-0352OC>.
- Li WW, Li J, Bao JK (2012) Microautophagy: Lesser-known self-eating. *Cellular and Molecular Life Sciences* **69**, 1125–1136. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0865-5>.
- Liang C, Lee J, Inn K, Gack M, Li Q (2008) Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nature cell ...* **10**, 776–787. <https://doi.org/10.1038/ncb1740>.
- Lőrincz P, Kenéz LA, Tóth S, Kiss V, Varga Á, Csizmadia T, Simon-Vecsei Z, Juhász G (2019) Vps8 overexpression inhibits HOPS-dependent trafficking routes by outcompeting Vps41/Lt. *eLife* **8**, e45631. <https://doi.org/10.7554/eLife.45631>.
- Lőrincz P, Lakatos Z, Maruzs T, Szatmári Z, Kis V, Sass M (2014) Atg6/UVRAG/Vps34-Containing Lipid Kinase Complex Is Required for Receptor Downregulation through Endolysosomal Degradation and Epithelial Polarity during *Drosophila* Wing Development. *BioMed Research International* **2014**, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2014/851349>.
- Lőrincz P, Takáts S, Kárpáti M, Juhász G (2016) iFly: The eye of the fruit fly as a model to study autophagy and related trafficking pathways. *Experimental Eye Research* **144**, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.06.013>.
- Lőrincz P, Tóth S, Benkő P, Lakatos Z, Boda A, Glatz G, Zobel M, Bisi S, Hegedűs K, Takáts S, Scita G, Juhász G (2017) Rab2 promotes autophagic and endocytic lysosomal degradation. *Journal of Cell Biology* **216**, 1937–1947. <https://doi.org/10.1083/jcb.201611027>.

- Lv Y, Xue L, Cai C, Liu QH, Shen J (2015) Deficiency of myotubularin-related protein 14 influences body weight, metabolism, and inflammation in an age-dependent manner. *Cell and Bioscience* **5**, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13578-015-0062-6>.
- Ma SY, Sun KS, Zhang M, Zhou X, Zheng XH, Tian SY, Liu YS, Chen L, Gao X, Ye J, Zhou XM, Wang JB, Han Y (2020) Disruption of Plin5 degradation by CMA causes lipid homeostasis imbalance in NAFLD. *Liver International* **40**, 2427–2438. <https://doi.org/10.1111/liv.14492>.
- Maekawa M, Terasaka S, Mochizuki Y, Kawai K, Ikeda Y, Araki N, Skolnik EY, Taguchi T, Arai H (2014) Sequential breakdown of 3-phosphorylated phosphoinositides is essential for the completion of macropinocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, E978–987. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311029111>.
- Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, Goldberg AL, Schiaffino S, Sandri M (2007) FoxO3 Controls Autophagy in Skeletal Muscle In Vivo. *Cell Metabolism* **6**, 458–471. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.11.001>.
- Mancias JD, Wang X, Gygi SP, Harper JW, Kimmelman AC (2014) Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy. *Nature* **508**, 105–109. <https://doi.org/10.1038/nature13148>.
- Manzéger A, Tagscherer K, Lőrincz P, Szaker H, Lukácsovich T, Pilz P, Kméczik R, Csikós G, Erdélyi M, Sass M, Kovács T, Vellai T, Billes VA (2021) Condition-dependent functional shift of two *Drosophila* Mtmr lipid phosphatases in autophagy control. *Autophagy* **17**, 4010–4028. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1899681>.
- Marois E, Mahmoud A, Eaton S (2006) The endocytic pathway and formation of the Wingless morphogen gradient. *Development* **133**, 307–317. <https://doi.org/10.1242/dev.02197>.
- Massey AC, Kaushik S, Sovak G, Kiffin R, Cuervo AM (2006) Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 5805–5810. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507436103>.
- Mauvezin C, Ayala C, Braden CR, Kim J, Neufeld TP (2014) Assays to monitor autophagy in *Drosophila*. *Methods* **68**, 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.03.014>.
- Mazure NM, Pouyssegur J (2010) Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? *Current Opinion in Cell Biology* **22**, 177–180. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.11.015>.
- McAlpine F, Williamson LE, Tooze SA, Chan EYW (2013) Regulation of nutrient-sensitive autophagy by uncoordinated 51-like kinases 1 and 2. *Autophagy* **9**, 361–373. <https://doi.org/10.4161/auto.23066>.
- McPhee CK, Baehrecke EH (2009) Autophagy in *Drosophila melanogaster*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1793**, 1452–1460. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.02.009>.
- Meléndez A, Tallóczy Z, Seaman M, Eskelinen E-L, Hall DH, Levine B (2003) Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science (New York, N.Y.)* **301**, 1387–91. <https://doi.org/10.1126/science.1087782>.
- Mellén MA, Rosa EJ de la, Boya P (2008) The autophagic machinery is necessary for removal of cell corpses from the developing retinal neuroepithelium. *Cell Death and Differentiation* **15**, 1279–1290. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.40>.
- Miller BC, Zhao Z, Stephenson LM, Cadwell K, Pua HH, Lee HK, Mizushima N, Iwasaki A, He YW, Swat W, Virgin IV HW (2008) The autophagy gene ATG5 plays an essential

- role in B lymphocyte development. *Autophagy* **4**, 309–314. <https://doi.org/10.4161/auto.5474>.
- Mizushima N (2005) The pleiotropic role of autophagy: From protein metabolism to bactericide. *Cell Death and Differentiation* **12**, 1535–1541. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401728>.
- Mizushima N (2007) Autophagy: Process and function. *Genes and Development* **21**, 2861–2873. <https://doi.org/10.1101/gad.1599207>.
- Mizushima N (2010) The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Current Opinion in Cell Biology* **22**, 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.12.004>.
- Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, Natsume T, Ohsumi Y, Yoshimori T (2003) Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *Journal of Cell Science* **116**, 1679–1688. <https://doi.org/10.1242/jcs.00381>.
- Mochida K, Oikawa Y, Kimura Y, Kirisako H, Hirano H, Ohsumi Y, Nakatogawa H (2015) Receptor-mediated selective autophagy degrades the endoplasmic reticulum and the nucleus. *Nature* **522**, 359–362. <https://doi.org/10.1038/nature14506>.
- Mohseni N, McMillan SC, Chaudhary R, Mok J, Reed BH (2009) Autophagy promotes caspase-dependent cell death during Drosophila development. *Autophagy* **5**, 329–338. <https://doi.org/10.4161/auto.5.3.7444>.
- Mukherjee A, Patel B, Koga H, Cuervo AM, Jenny A (2016) Selective endosomal microautophagy is starvation-inducible in Drosophila. *Autophagy* **12**, 1984–1999. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1208887>.
- Mulakkal NC, Nagy P, Takats S, Tusco R, Juhász G, Nezis IP (2014) Autophagy in Drosophila: from historical studies to current knowledge. *BioMed Research International* **2014**, 273473. <https://doi.org/10.1155/2014/273473>.
- Musiwaro P, Smith M, Manifava M, Walker SA, Ktistakis NT (2013) Characteristics and requirements of basal autophagy in HEK 293 cells. *Autophagy* **9**, 1407–1417. <https://doi.org/10.4161/auto.25455>.
- Nagy P, Hegedűs K, Piracs K, Varga Á, Juhász G (2014a) Different effects of Atg2 and Atg18 mutations on Atg8a and Atg9 trafficking during starvation in Drosophila. *FEBS Letters* **588**, 408–413. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.12.012>.
- Nagy P, Kárpáti M, Varga Á, Piracs K, Venkei Z, Takáts S, Varga K, Érdi B, Hegedus K, Juhász G (2014b) Atg17/FIP200 localizes to perilyosomal Ref(2)P aggregates and promotes autophagy by activation of Atg1 in Drosophila. *Autophagy* **10**, 453–467. <https://doi.org/10.4161/auto.27442>.
- Nagy P, Varga Á, Kovács AL, Takáts S, Juhász G (2015) How and why to study autophagy in Drosophila: It's more than just a garbage chute. *Methods* **75**, 151–161. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.11.016>.
- Nandi N, Tyra LK, Stenesen D, Krämer H (2014) Acinus integrates AKT1 and subapoptotic caspase activities to regulate basal autophagy. *The Journal of Cell Biology* **207**, 253–268. <https://doi.org/10.1083/jcb.201404028>.
- Nandurkar HH, Layton M, Laporte J, Selan C, Corcoran L, Caldwell KK, Mochizuki Y, Majerus PW, Mitchell CA (2003) Identification of myotubularin as the lipid phosphatase catalytic subunit associated with the 3-phosphatase adapter protein, 3-PAP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 8660–8665. <https://doi.org/10.1073/pnas.1033097100>.
- Naughtin MJ, Sheffield DA, Rahman P, Hughes WE, Gurung R, Stow JL, Nandurkar HH, Dyson JM, Mitchell CA (2010) The myotubularin phosphatase MTMR4 regulates sorting from early endosomes. *Journal of Cell Science* **123**, 3071–3083. <https://doi.org/10.1242/jcs.060103>.

- Neal SJ, Karunanithi S, Best A, Ken-Choy So A, Tanguay RM, Atwood HL, Timothy Westwood J (2006) Thermoprotection of synaptic transmission in a *Drosophila* heat shock factor mutant is accompanied by increased expression of Hsp83 and DnaJ-1. *Physiol Genomics* **25**, 493–501. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics>.
- Nelson C, Ambros V, Baehrecke EH (2014) Article miR-14 Regulates Autophagy during Developmental Cell Death by Targeting ip3-kinase 2. *Molecular Cell* **56**, 376–388. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.011>.
- Nicot A-S, Laporte J (2008) Endosomal phosphoinositides and human diseases. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **9**, 1240–1249. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00754.x>.
- Nisoli I, Chauvin JP, Napoletano F, Calamita P, Zanin V, Fanto M, Charroux B (2010) Neurodegeneration by polyglutamine Atrophin is not rescued by induction of autophagy. *Cell Death & Differentiation* **17**, 1577–1587. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.31>.
- Novak I, Kirkin V, McEwan DG, Zhang J, Wild P, Rozenknop A, Rogov V, Löhr F, Popovic D, Occhipinti A, Reichert AS, Terzic J, Dötsch V, Ney PA, Dikic I (2010) Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO reports* **11**, 45–51. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.256>.
- Odorizzi G, Babst M, Emr SD (1998) Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body. *Cell* **95**, 847–858. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81707-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81707-9).
- Oku M, Sakai Y (2018) Three Distinct Types of Microautophagy Based on Membrane Dynamics and Molecular Machineries. *BioEssays* **40**, 1–6. <https://doi.org/10.1002/bies.201800008>.
- Ong C, Yung L-YL, Cai Y, Bay B-H, Baeg G-H (2015) *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. *Nanotoxicology* **9**, 396–403. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.940405>.
- Papers JBC, Doi M, Choudhury P, Srivastava S, Li Z, Ko K, Albaqumi M, Narayan K (2006) Specificity of the Myotubularin Family of Phosphatidylinositol-3-phosphatase Is Determined by the PH / GRAM Domain *. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 31762–31769. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)84091-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)84091-7).
- Papp D, Kovács T, Billes V, Varga M, Tarnóci A, Hackler L, Puskás LG, Liliom H, Tárnok K, Schlett K, Borsy A, Pádár Z, Kovács AL, Hegedűs K, Juhász G, Komlós M, Erdős A, Gulyás B, Vellai T (2016) AUTEN-67, an autophagy-enhancing drug candidate with potent antiaging and neuroprotective effects. *Autophagy* **12**, 273–286. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1082023>.
- Pérez E, Das G, Bergmann A, Baehrecke EH (2015) Autophagy regulates tissue overgrowth in a context-dependent manner. *Oncogene* **34**, 3369–3376. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.285>.
- Perusek L, Sahu B, Parmar T, Maeno H, Arai E, Le YZ, Subauste CS, Chen Y, Palczewski K, Maeda A (2015) Di-retinoid-pyridinium-ethanolamine (A2E) accumulation and the maintenance of the visual cycle are independent of Atg7-mediated autophagy in the retinal pigmented epithelium. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 29035–29044. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.682310>.
- Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaert EFC, Meijer AJ, Codogno P (2000) Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 992–998. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.2.992>.

- Pircs K, Nagy P, Varga A, Venkei Z, Erdi B, Hegedus K, Juhasz G (2012) Advantages and limitations of different p62-based assays for estimating autophagic activity in *Drosophila*. *PLoS one* **7**, e44214. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044214>.
- Polson HEJ, Lartigue J de, Rigden DJ, Reedijk M, Urbé S, Clague MJ, Tooze SA (2010) Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy* **6**, 506–522. <https://doi.org/10.4161/auto.6.4.11863>
- Powers SK, Reid MB (2010) MIP/MTMR14 and muscle aging. *Aging* **2**, 538–538. <https://doi.org/10.18632/aging.100193>.
- Puri C, Renna M, Bento CF, Moreau K, Rubinsztein DC (2013) Diverse autophagosomal membrane sources coalesce in recycling endosomes. *Cell* **154**, 1285–1299. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.044>.
- Rameh LE, Toliaf KF, Duckworth BC, Cantley LC (1997) A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* **390**, 192–196. <https://doi.org/10.1038/36621>.
- Remé CE, Wolfrum U, Imsand C, Hafezi F, Williams TP (1999) Photoreceptor autophagy: effects of light history on number and opsin content of degradative vacuoles. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **40**, 2398–2404.
- Ribeiro I, Yuan L, Tanentzapf G, Dowling JJ, Kiger A (2011) Phosphoinositide regulation of integrin trafficking required for muscle attachment and maintenance. *PLoS Genetics* **7**. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001295>.
- Rodríguez-Muela N, Boya P (2012) Axonal damage, autophagy and neuronal survival. *Autophagy* **8**, 286–288. <https://doi.org/10.4161/auto.8.2.18982>.
- Rodríguez-Muela N, Koga H, García-Ledo L, Villa P de la, Rosa EJ de la, Cuervo AM, Boya P (2013) Balance between autophagic pathways preserves retinal homeostasis. *Aging Cell* **12**, 478–488. <https://doi.org/10.1111/accel.12072>.
- Romero-Suarez S, Shen J, Brotto L, Hall T, Mo CL, Valdivia HH, Andresen J, Wacker M, Nosek TM, Qu CK, Brotto M (2010) Muscle-specific inositol phosphatase (MIP/MTMR14) is reduced with age and its loss accelerates skeletal muscle aging process by altering calcium homeostasis. *Aging* **2**, 504–513. <https://doi.org/10.18632/aging.100190>.
- Rossi A, Kontarakis Z, Gerri C, Nolte H, Hölper S, Krüger M, Stainier DYR (2015) Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature* **524**, 230–233. <https://doi.org/10.1038/nature14580>.
- Rubin G, Hong L, Brokstein P, Evans-Holm M (2000) A *Drosophila* complementary DNA resource. *Science* **222**. <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2222>.
- Ruderman NB, Julia Xu X, Nelson L, Cacicedo JM, Saha AK, Lan F, Ido Y (2010) AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **298**, E751–E760. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00745.2009>.
- Rusten TE, Lindmo K, Juhász G, Sass M, Seglen PO, Brech A, Stenmark H (2004) Programmed autophagy in the *Drosophila* fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway. *Developmental cell* **7**, 179–92. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.07.005>.
- Rzezniczak TZ, Douglas LA, Watterson JH, Merritt TJS (2011) Paraquat administration in *Drosophila* for use in metabolic studies of oxidative stress. *Analytical Biochemistry* **419**, 345–347. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.08.023>.
- Sahu R, Kaushik S, Clement CC, Cannizzo ES, Scharf B, Follenzi A, Potolicchio I, Nieves E, Cuervo AM, Santambrogio L (2011) Microautophagy of Cytosolic Proteins by Late

- Endosomes. *Developmental Cell* **20**, 131–139.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.12.003>.
- Sato M, Sato K (2011) Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos. *Science* **334**, 1141–1144.
<https://doi.org/10.1126/science.1210333>.
- Schaletzky J, Dove SK, Short B, Lorenzo O, Clague MJ, Barr FA (2003) Phosphatidylinositol-5-Phosphate Activation and Conserved Substrate Specificity of the Myotubularin Phosphatidylinositol 3-Phosphatases. *Current Biology* **13**, 504–509.
[https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00132-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00132-5).
- Schnorrer F, Schönbauer C, Langer CCH, Dietzl G, Novatchkova M, Schernhuber K, Fellner M, Azaryan A, Radolf M, Stark A, Keleman K, Dickson BJ (2010) Systematic genetic analysis of muscle morphogenesis and function in *Drosophila*. *Nature* **464**, 287–291.
<https://doi.org/10.1038/nature08799>.
- Scott RC, Juhász G, Neufeld TP (2007) Direct Induction of Autophagy by Atg1 Inhibits Cell Growth and Induces Apoptotic Cell Death. *Current Biology* **17**, 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.10.053>.
- Scott RC, Schuldiner O, Neufeld TP (2004) Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Developmental cell* **7**, 167–78.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.07.009>.
- Senderek J, Bergmann C, Weber S, Ketelsen UP, Schorle H, Rudnik-Schöneborn S, Büttner R, Buchheim E, Zerres K (2003) Mutation of the SBF2 gene, encoding a novel member of the myotubularin family, in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 4B2/11p15. *Human Molecular Genetics* **12**, 349–356. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg030>.
- Shen J, Yu WM, Brotto M, Scherman JA, Guo C, Stoddard C, Nosek TM, Valdivia HH, Qu CK (2009) Deficiency of MIP/MTMR14 phosphatase induces a muscle disorder by disrupting Ca²⁺ homeostasis. *Nature Cell Biology* **11**, 769–776.
<https://doi.org/10.1038/ncb1884>.
- Silhankova M, Port F, Harterink M, Basler K, Korswagen HC (2010) Wnt signalling requires MTM-6 and MTM-9 myotubularin lipid-phosphatase function in Wnt-producing cells. *The EMBO journal* **29**, 4094–105. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.278>.
- Simonsen A, Birkeland HCG, Gillooly DJ, Mizushima N, Kuma A, Yoshimori T, Slagsvold T, Brech A, Stenmark H (2004) Alfy, a novel FYVE-domain-containing protein associated with protein granules and autophagic membranes. *Journal of Cell Science* **117**, 4239–4251. <https://doi.org/10.1242/jcs.01287>.
- Song W-H, Yi Y-J, Sutovsky M, Meyers S, Sutovsky P (2016) The ART and science of sperm mitophagy. *Autophagy* **12**, 2510–2511.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1239004>.
- Sridhar S, Botbol Y, Macian F, Cuervo AM (2012) Autophagy and disease: always two sides to a problem. *The Journal of Pathology* **226**, 255–273.
<https://doi.org/10.1002/path.3025>.
- Srivastava S, Ko K, Choudhury P, Li Z, Johnson AK, Nadkarni V, Unutmaz D, Coetzee W a, Skolnik EY (2006) Phosphatidylinositol-3 phosphatase myotubularin-related protein 6 negatively regulates CD4 T cells. *Molecular and cellular biology* **26**, 5595–602.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00352-06>.
- Stenmark H, Olkkonen VM (2001) The Rab GTPase family. *Genome Biology* **2**, 1–7.
<https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-5-reviews3007>.
- Suriapranata I, Epple UD, Bernreuther D, Bredschneider M, Sovarasteanu K, Thumm M (2000) The breakdown of autophagic vesicles inside the vacuole depends on Aut4p. *Journal of Cell Science* **113**, 4025–4033. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.22.4025>.

- Suzuki K, Morimoto M, Kondo C, Ohsumi Y (2011) Selective Autophagy Regulates Insertional Mutagenesis by the Ty1 Retrotransposon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Developmental Cell* **21**, 358–365. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.023>.
- Szatmári Z, Kis V, Lippai M, Hegedus K, Faragó T, Lorincz P, Tanaka T, Juhász G, Sass M (2014) Rab11 facilitates cross-talk between autophagy and endosomal pathway through regulation of Hook localization. *Molecular Biology of the Cell* **25**, 522–531. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-10-0574>.
- Takáts S, Nagy P, Varga Á, Pircs K, Kárpáti M, Varga K, Kovács AL, Hegedús K, Juhász G (2013) Autophagosomal Syntaxin17-dependent lysosomal degradation maintains neuronal function in *Drosophila*. *Journal of Cell Biology* **201**, 531–539. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211160>.
- Takáts S, Pircs K, Nagy P, Varga Á, Kárpáti M, Hegedus K, Kramer H, Kovács AL, Sass M, Juhász G (2014) Interaction of the HOPS complex with Syntaxin 17 mediates autophagosome clearance in *Drosophila*. *Molecular Biology of the Cell* **25**, 1338–1354. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-08-0449>.
- Tallóczy Z, Jiang W, Virgin HW, Leib DA, Scheuner D, Kaufman RJ, Eskelinen E-L, Levine B (2002) Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2 α kinase signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 190–195. <https://doi.org/10.1073/pnas.012485299>.
- Tanida I, Tanida-Miyake E, Komatsu M, Ueno T, Kominami E (2002) Human Apg3p/Aut1p Homologue Is an Authentic E2 Enzyme for Multiple Substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and Facilitates the Conjugation of hApg12p to hApg5p. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 13739–13744. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200385200>.
- Tanida I, Tanida-Miyake E, Ueno T, Kominami E (2001) The Human Homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p Is a Protein-activating Enzyme for Multiple Substrates Including Human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 1701–1706. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000752200>.
- Tsukada M, Ohsumi Y (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **333**, 169–174. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80398-E](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80398-E).
- Tsukamoto S, Kuma A, Murakami M, Kishi C, Yamamoto A, Mizushima N (2008) Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science* **321**, 117–120. <https://doi.org/10.1126/science.1154822>.
- Vabulas RM, Hartl FU (2005) Cell biology: Protein synthesis upon acute nutrient restriction relies on proteasome function. *Science* **310**, 1960–1963. <https://doi.org/10.1126/science.1121925>.
- Velentzas PD, Velentzas AD, Pantazi AD, Mpakou VE, Zervas CG, Papassideri IS, Stravopodis DJ (2013) Proteasome, but Not Autophagy, Disruption Results in Severe Eye and Wing Dysmorphia: A Subunit- and Regulator-Dependent Process in *Drosophila*. *PLoS ONE* **8**, e80530. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080530>.
- Velichkova M, Juan J, Kadandale P, Jean S, Ribeiro I, Raman V, Stefan C, Kiger AA (2010) *Drosophila* Mtm and class II PI3K coregulate a PI(3)P pool with cortical and endolysosomal functions. *The Journal of cell biology* **190**, 407–25. <https://doi.org/10.1083/jcb.200911020>.
- Vellai T (2021) How the amino acid leucine activates the key cell-growth regulator mTOR. *Nature* **596**, 192–194. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-01943-7>.
- Vergne I, Roberts E, Elmaoued R a, Tosch V, Delgado M a, Proikas-Cezanne T, Laporte J, Deretic V (2009) Control of autophagy initiation by phosphoinositide 3-phosphatase Jumpy. *The EMBO journal* **28**, 2244–58. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.159>.

- Vicinanza M, Korolchuk VI, Clarke JH, Rubinsztein DC, Regulates PIP, Biogenesis A, Vicinanza M, Korolchuk VI, Ashkenazi A, Puri C, Menzies FM, Clarke JH (2015) PI(5)P Regulates Autophagosome Biogenesis. *Molecular Cell* **57**, 219–234. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.007>.
- Walker DM, Urbé S, Dove SK, Tenza D, Raposo G, Clague MJ (2001) Characterization of MTMR3: an inositol lipid 3-phosphatase with novel substrate specificity. *Current Biology* **11**, 1600–1605. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00501-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00501-2).
- Wang H, Sun H-Q, Zhu X, Zhang L, Albanesi J, Levine B, Yin H (2015) GABARAPs regulate PI4P-dependent autophagosome: lysosome fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 7015–7020. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507263112>.
- Watanabe Y, Tsujimura A, Taguchi K, Tanaka M (2017) HSF1 stress response pathway regulates autophagy receptor SQSTM1/p62-associated proteostasis. *Autophagy* **13**, 133–148. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1248018>.
- Wickham, Hadley. (2016). ggplot2: elegant graphics for data analysis. *Springer*. Cham. 189–201
- Wolff T, Ready DF (1991) The beginning of pattern formation in the Drosophila compound eye: The morphogenetic furrow and the second mitotic wave. *Development* **113**, 841–850. <https://doi.org/10.1242/dev.113.3.841>.
- Wong CH, Iskandar KB, Yadav SK, Hirpara JL, Loh T, Pervaiz S (2010) Simultaneous Induction of Non-Canonical Autophagy and Apoptosis in Cancer Cells by ROS-Dependent ERK and JNK Activation. *PLoS ONE* **5**, e9996. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009996>.
- Wu H, Wang MC, Bohmann D (2009) JNK protects Drosophila from oxidative stress by transcriptionally activating autophagy. *Mechanisms of Development* **126**, 624–637. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2009.06.1082>.
- Wucherpennig T, Wilsch-Bräuninger M, González-Gaitán M (2003) Role of Drosophila Rab5 during endosomal trafficking at the synapse and evoked neurotransmitter release. *Journal of Cell Biology* **161**, 609–624. <https://doi.org/10.1083/jcb.200211087>.
- Wurzer B, Zaffagnini G, Fracchiolla D, Turco E, Abert C, Romanov J, Martens S (2015) Oligomerization of p62 allows for selection of ubiquitinated cargo and isolation membrane during selective autophagy. *eLife* **4**, 1–28. <https://doi.org/10.7554/eLife.08941>.
- Xiao C, Qiu S, Li X, Luo D-J, Liu G-P (2019) EDTP/MTMR14: A novel target for improved survivorship to prolonged anoxia and cellular protein aggregates. *Neuroscience Letters* **705**, 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.04.053>.
- Xie X, Li F, Wang Y, Wang Y, Lin Z, Cheng X, Liu J, Chen C, Pan L (2015) Molecular basis of ubiquitin recognition by the autophagy receptor CALCOCO2. *Autophagy* **11**, 1775–1789. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1082025>.
- Yamamoto A, Mizushima N, Tsukamoto S (2014) Fertilization-induced autophagy in mouse embryos is independent of mTORC1. *Biology of Reproduction* **91**, 1–7. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.115816>.
- Yang Z, Huang J, Geng J, Nair U, Klionsky DJ (2006) Atg22 Recycles Amino Acids to Link the Degradative and Recycling Functions of Autophagy. *Molecular Biology of the Cell* **17**, 5094–5104. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-06-0479>.
- Yu J, Pan L, Qin X, Chen H, Xu Y, Chen Y, Tang H (2010a) MTMR4 attenuates transforming growth factor β (TGF β) signaling by dephosphorylating R-smads in endosomes. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 8454–8462. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.075036>.
- Yu L, McPhee CK, Zheng L, Mardones GA, Rong Y, Peng J, Mi N, Zhao Y, Liu Z, Wan F, Hailey DW, Oorschot V, Klumperman J, Baehrecke EH, Lenardo MJ (2010b)

- Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* **465**, 942–946. <https://doi.org/10.1038/nature09076>.
- Yuan W, Tuttle DL, Shi YJ, Ralph GS, Dunn WA (1997) Glucose-induced microautophagy in *Pichia pastoris* requires the α -subunit of phosphofructokinase. *Journal of Cell Science* **110**, 1935–1945. <https://doi.org/10.1242/jcs.110.16.1935>.
- Zaffagnini G, Martens S (2016) Mechanisms of Selective Autophagy. *Journal of Molecular Biology* **428**, 1714–1724. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.02.004>.
- Zhang P, Zhang H (2013) Autophagy modulates miRNA-mediated gene silencing and selectively degrades AIN-1/GW182 in *C. elegans*. *EMBO reports* **14**, 568–576. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.53>.
- Zhang Y, Yan L, Zhou Z, Yang P, Tian E, Zhang K, Zhao Y, Li Z, Song B, Han J, Miao L, Zhang H (2009) SEPA-1 Mediates the Specific Recognition and Degradation of P Granule Components by Autophagy in *C. elegans*. *Cell* **136**, 308–321. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.022>.
- Zhao Y, Gong S, Shunmei E, Zou J (2009) Induction of macroautophagy by heat. *Molecular Biology Reports* **36**, 2323–2327. <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9451-4>.
- Zhou X, Wang L, Hasegawa H, Amin P, Han B-X, Kaneko S, He Y, Wang F (2010) Deletion of PIK3C3/Vps34 in sensory neurons causes rapid neurodegeneration by disrupting the endosomal but not the autophagic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 9424–9429. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914725107>.
- Zinke I, Schütz CS, Katzenberger JD, Bauer M, Pankratz MJ (2002) Nutrient control of gene expression in *Drosophila*: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response. *The EMBO Journal* **21**, 6162–6173. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf600>.
- Zou J, Chang S-C, Marjanovic J, Majerus PW (2009) MTMR9 increases MTMR6 enzyme activity, stability, and role in apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **284**, 2064–71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804292200>.
- Zou J, Majerus PW, Wilson DB, Schrade A, Chang S-C, Wilson MP (2012a) The role of myotubularin-related phosphatases in the control of autophagy and programmed cell death. *Advances in Biological Regulation* **52**, 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.advenzreg.2011.10.001>.
- Zou J, Zhang C, Marjanovic J, Kisseleva MV, Majerus PW, Wilson MP (2012b) Myotubularin-related protein (MTMR) 9 determines the enzymatic activity, substrate specificity, and role in autophagy of MTMR8. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 9539–44. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207021109>.

9 Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni elsősorban témavezetőmnek **Vellai Tibor** Professzornak a doktori munkám során nyújtott segítőkész támogatását, tanácsait és iránymutatásait, illetve, hogy lehetőséget és helyet biztosított nekem a Genetikai Tanszéken.

Kiemelt köszönet illeti **Billes Viktor András**t és **Kovács Tibor**t, akik a kezdetek kezdetén befogadtak és végig támogattak mindenben, akiknek köszönhetően elsajátíthattam a *Drosophila* genetika csínját-bínját. Köszönöm nekik azt a sok időt és energiát, amit rámfordítottak, és teszik azt a mai napig is.

Hálás vagyok azért a kutatócsoportért, akikkel együtt dolgozhattam a Genetikai Tanszéken oly sokáig, akikkel fejtegethettük a myotubularinok csodás világát. Kiváltképp köszönöm **Tagscherer Kingának** és Billes Viktornak a sok szakmai megbeszélést, vitát, együttműködést. Nélkülük ez a doktori disszertáció sem jöhetett volna létre. Köszönöm továbbá Szinyákovics Jankának, Szaker Henriknek, Szincsák Sárának a kutatásaimban nyújtott segítségét, illetve köszönöm az asszisztenseknek a munkájukat: Pénzes Tündének, Preisinger Reginának, Simon Rezsőné Sári néninek, Supauer Beatrixnak, és Takátsné Botond Juditnak. Köszönettel tartozom továbbá az ELTE, Genetikai Tanszék további munkatársainak a tanácsaiért, kérdéseikért, amik mindig előrevittek a kutatásban.

Köszönöm továbbá az Anatómia Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék munkatársainak, hogy használatunkra bocsátották az eszközeiket, és törzseket, de főként Lőrincz Péternek köszönöm a munkám során nyújtott sok segítséget.

Szeretnék köszönetet mondani jelenlegi főnökömnek, Dr. Kökény Gábornak a szakmai lektorálásban nyújtott segítségért, és hogy elnéző volt velem szemben a tézisírás alatt.

Végül, de nem utolsó sorban hatalmas köszönet illeti családomat: **Édesanyámnak** köszönöm, hogy végig hitt bennem, támogatott a döntéseimben és büszke volt rám, nagyon sokat jelent ez számomra! **Férjemnek**, Tamásnak hálás vagyok a sok lelki támogatásért, amit kapok tőle, valamint az inspiráló szakmai eszmecsereért. **Lányomnak**, Liának szeretném a leginkább megköszönni, amiért sokszor kellett eltűrnie, hogy “anya hosszúnapozik”. A túlórák ellenére is sok szeretetet kapok tőlük, ebből merítettem mindvégig erőt, ez segített, hogy ne adjam fel nehéz, pandémiás időkben sem.