

# A nem-centroszomális MTOC autofágiában betöltött szerepe

37. OTDK Biológia szekció

készítette:

**Fürstenhoffer Fanni**

biológus mesterszak, 1. évfolyam

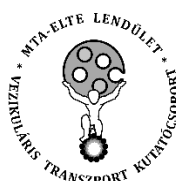
témavezető:

**Dr. Boda Attila**

tudományos munkatárs

Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR  
BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2025

## Tartalomjegyzék

|                                                                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Összefoglaló.....</b>                                                                                            | <b>3</b>  |
| <b>Rövidítésjegyzék.....</b>                                                                                        | <b>4</b>  |
| <b>1. Bevezetés .....</b>                                                                                           | <b>5</b>  |
| <b>1.1 Mikrotubulusok .....</b>                                                                                     | <b>5</b>  |
| <b>1.2 A centroszóma.....</b>                                                                                       | <b>6</b>  |
| <b>1.3 Centroszomális és nem-centroszomális MTOC összehasonlítása .....</b>                                         | <b>6</b>  |
| <b>1.4 Az autofágia.....</b>                                                                                        | <b>7</b>  |
| <b>2. Célkitűzések .....</b>                                                                                        | <b>8</b>  |
| <b>3. Anyagok és módszerek.....</b>                                                                                 | <b>8</b>  |
| <b>3.1 A Drosophila melanogaster, mint modellszervezet .....</b>                                                    | <b>8</b>  |
| <b>3.2 Fluoreszcens mikroszkópia.....</b>                                                                           | <b>10</b> |
| <b>3.3 Immunhisztokémia .....</b>                                                                                   | <b>10</b> |
| <b>3.4 Western Blot.....</b>                                                                                        | <b>10</b> |
| <b>3.5 Élethossz vizsgálat .....</b>                                                                                | <b>11</b> |
| <b>3.6 Adatok kvantifikálása és statisztikai kiértékelése .....</b>                                                 | <b>11</b> |
| <b>4. Eredmények és megvitatásuk.....</b>                                                                           | <b>13</b> |
| <b>4.1 A nem-centroszomális MTOC fehérjekomponenseinek szerepe az autofág<br/>    struktúrák eloszlásában .....</b> | <b>13</b> |
| <b>4.2 Az ncMTOC szerepe az autofág lebontásban .....</b>                                                           | <b>18</b> |
| <b>4.3 Az egyes ncMTOC-komponensek hiányának hatása az ncMTOC helyzetére .....</b>                                  | <b>20</b> |
| <b>5. Köszönetnyilvánítás .....</b>                                                                                 | <b>22</b> |
| <b>6. Hivatkozások.....</b>                                                                                         | <b>23</b> |

## Összefoglaló

A mikrotubulus-organizálást két nagy kategóriába sorolhatjuk: centroszóma általi, vagy nem centroszomális mikrotubulus-nukleálás. A centroszomális MTOC-ra a mikrotubulusok radiális szervezése jellemző, míg az ncMTOC a mikrotubuláris vázat akár parallel vagy antiparallel módon is szervezheti. A mikrotubulus-organizáló központ típusa és funkciója függ a sejt típusától, differenciációjától és a sejtciklustól. Az ncMTOC komponenseinek működése az MTOC-ot alkotó fehérjékhez képest még kevésbé ismert. Az ncMTOC-nak kell olyan fehérjéket tartalmaznia, melyek képesek kölcsönhatni a mikrotubulusok mínuszvégeivel, illetve olyan adaptereket, amelyek képesek ezeket a megfelelő szubcelluláris helyhez pozicionálni, illetve rögzíteni.

Kutatásunk célja az ncMTOC komponenseinek karakterizálása, ezek szerepének vizsgálata az autofág organellumok pozicionálásában és a lebontásban. Kísérleteinket az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) lárvális zsírtest-sejtjein végezzük. Megvizsgáltuk, hogy az egyes komponensek hogyan vesznek részt az ncMTOC működésében és ezáltal az autofág struktúrák pozicionálásában. Az autofágia jelentőségét mutatja, hogy számos súlyos kórképpel kapcsolatba hozták, például a rákkal, neurodegeneratív betegségekkel, mikrobiális fertőzésekkel, illetve az öregedéssel. Ezáltal az autofágia mechanizmusának pontosabb megismerése jelentős érdeklődésre tarthat számot.

## **Rövidítésjegyzék**

MTOC – Microtubule Organizing Center, mikrotubulus-organizáló központ

ncMTOC – non-centrosomal Microtubule Organizing Center, nem-centroszómális mikrotubulus-organizáló központ

PCM - Pericentriolar Material, pericentrioláris anyag

Msp300 - Muscle-specific protein 300 kDa

Shot - Short stop

Msps - Mini-spindles

CAMSPAP - Calmodulin-regulated Spectrin-Associated Protein

RNSi - RNS interferencia

Vps16 - Vacuolar protein sorting-associated protein 16

Flp – Flip rekombinááz

CD2 - Cluster of Dedifferentiation 2

FRT - Flippase Recognition Target

UAS - Upstream Activating Sequence

GFP - Green Fluorescent Protein

Atg8a - Autophagy-related 8a

Lamp1 - Lysosomal associated membrane protein 1

PBS - Phosphate Buffered Saline

PBTX - PBS és Triton X-100 oldata

FCS - Fetal Calf Serum, magzati szarvasmarha szérum

TBST - Tris Buffered Saline, pH 7,4 + 0,1% Tween20

AP - Alkaline phosphatase, alkalikus foszfatáz

## 1. Bevezetés

A mikrotubulus-organizálást két nagy kategóriába sorolhatjuk: centroszóma általi, vagy nem centroszomális mikrotubulus-nukleálás. A centroszomális MTOC-ra (= Microtubule Organizing Center, mikrotubulus-organizáló központ) a mikrotubulusok radiális szervezése jellemző, míg az ncMTOC (= non-centrosomal Microtubule Organizing Center, nem-centroszomális mikrotubulus-organizáló központ) a mikrotubuláris vázat akár parallel vagy antiparallel módon is szervezheti. A mikrotubulus-organizáló központ típusa és funkciója függ a sejt típusától, differenciációjától és a sejtciklustól. Az ncMTOC komponenseinek működése az MTOC-ot alkotó fehérjékhez képest még kevésbé ismert. Az ncMTOC-nak kell olyan fehérjéket tartalmaznia, melyek képesek kölcsönhatni a mikrotubulusok mínuszvégeivel, illetve olyan adaptereket, amelyek képesek ezeket a megfelelő szubcelluláris helyhez pozicionálni, illetve rögzíteni (Wu és Akhmanova, 2017).

Azon sejtekben, ahol a mikrotubulus-hálózat radiálisan rendezett, a mikrotubulusok plusz vége a sejthatár (plazmamembrán) felé orientált, míg a mínusz végük az alább bemutatott MTOC/ncMTOC-ba ágyazott (Goodson és Jonasson, 2018).

Dolgozatomban bemutatásra kerül a nem-centroszomális mikrotubulus organizáló-központ (ncMTOC). Annak ellenére, hogy az ncMTOC-ok számos sejttypusban és élőlényben megtalálhatók, molekuláris összetételük és szerkezetük nagyrészt még ismeretlen (Sanchez és Feldman, 2017). Kutatásomban a már leírt, bizonyított szereppel rendelkező fehérje komponenseinek szerepét vizsgáltam az autofág lebontásban az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) lárvális zsírtestében.

### 1.1 Mikrotubulusok

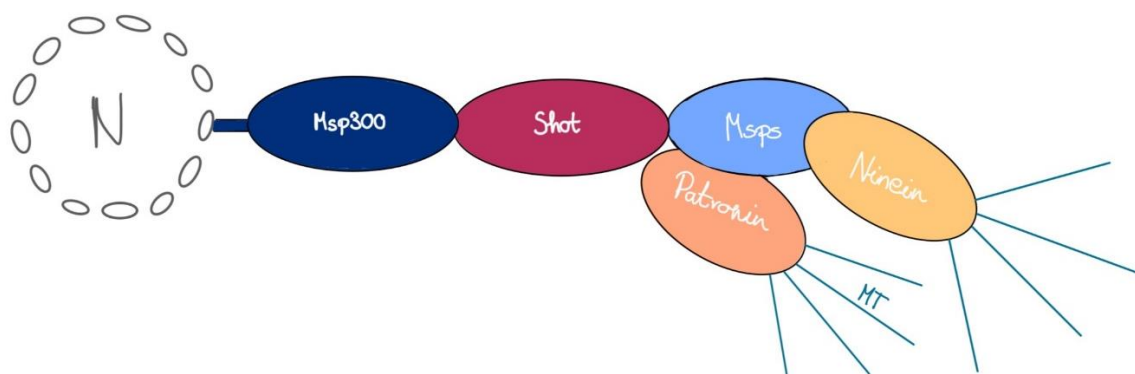
A mikrotubulusok  $\alpha$ -, illetve  $\beta$ -tubulinból álló heterodimerekből felépülő hosszú polimerrek, melyek csőszerűek, belsejük üreges. Ezek hossza alig 1  $\mu\text{m}$ -tól akár több mint 100  $\mu\text{m}$ -ig terjedhet, körülbelül 25 nm szélesek.) Oly módon kapcsolódnak egymáshoz, hogy a szálak egymáshoz képest 0,9 nm-rel legyenek elcsúsztatva, ennek köszönhetően képes kialakulni a mikrotubulusok hengerformája, illetve ezáltal polarizáltak lesznek. Rendelkeznak egy ún. „gyors” („fast-growing”), vagy plusz véggel, amelyen szabad  $\beta$ -alegységek találhatóak. A „lassú” („slow-growing”), vagy mínusz vég pedig szabad  $\alpha$ -tubulint hordoz (Sui és Downing, 2010).

## 1.2 A centroszóma

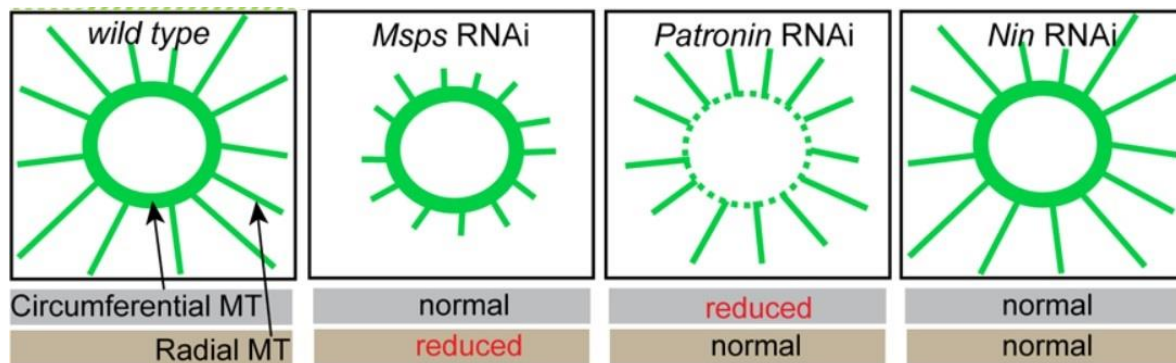
A centroszóma egy membrán nélküli sejtorganelum, amely a főszervezője a mikrotubuláris citoszkeletonnak az eukarióta sejtekben. Kettő hordó alakú struktúrából áll, melyeket centriólumnak nevezünk. A centriólumok hengeres felépítésűek, melyek kilencszeres szimmetriával rendelkeznek. Ezeket egy fehérjemátrix veszi körül, melyet pericentrioláris anyagnak (PCM = Pericentriolar Material) hívunk. A PCM a  $\gamma$ -tubulin gyűrű komplexet toborzó fehérjék mátrixa. Ezáltal platformként szolgál a mikrotubulusok nukleálásához, illetve kihorgonyzásához. Amennyiben a mikrotubulusok a centroszómában lettek nukleálva, centroszómális mikrotubulusnak nevezhetjük azokat, illetve amikor a centroszóma mikrotubulust nukleál, azt mikrotubulus organizáló központnak nevezzük (Hannaford és Rusan, 2024).

## 1.3 Centroszómális és nem-centroszómális MTOC összehasonlítása

Általánosan elmondható, hogy a ncMTOC-ok esetében is a nukleátor szerepet a  $\gamma$ -tubulin gyűrűkomplex tölti be. *Drosophila* zsírtestben a nem-centroszómális MTOC-ot a Nesprin családba tartozó Msp300 horgonyozza ki a sejtmaghártyához, illetve toborozza a Shot-ot (=Short stop). Muslicában a Shot az egyedüli spectraplakin, hiányában a perinukleáris ncMTOC helyett egy ektopikus organizáló központ alakul ki a citoszól egy pontján. A zsírtest-sejtekben található MTOC-nál szükséges az Msps a mikrotubulusok nukleálásához (Zheng és mtsai., 2020). A Shot-hoz asszociálódik a Patronin nevű fehérje, mely stabilizátorként van jelen, a CAMPSAP/Nezha/Patronin családba tartozó fehérje, amely a  $\gamma$ -tubulin-hoz hasonlóan megvédi a mínuszvégeket a depolimerizációtól, azonban nem képes mikrotubulus-nukleálásra, vagy a centroszómához kapcsolásra. A kihorgonyzásért a Ninein felelős, bár ennek ellenére nem mutatható ki, hogy közvetlen interakcióba tudna lépni a mikrotubulusok mínusz végeivel (Sanchez és Feldman, 2017) (**1. ábra**). A zsírtest-sejtekben található ncMTOC egyes komponenseinek hiánya a mikrotubulushálózatra különféle hatást gyakorol (**2. ábra**).



1. ábra: a *Drosophila* zsírtestben már ismert funkcióval rendelkező ncMTOC fehérjekomponensek. N - Nucleus; MT – Mikrotubulus (saját készítésű ábra, (Zheng és mtsai., 2020) alapján).



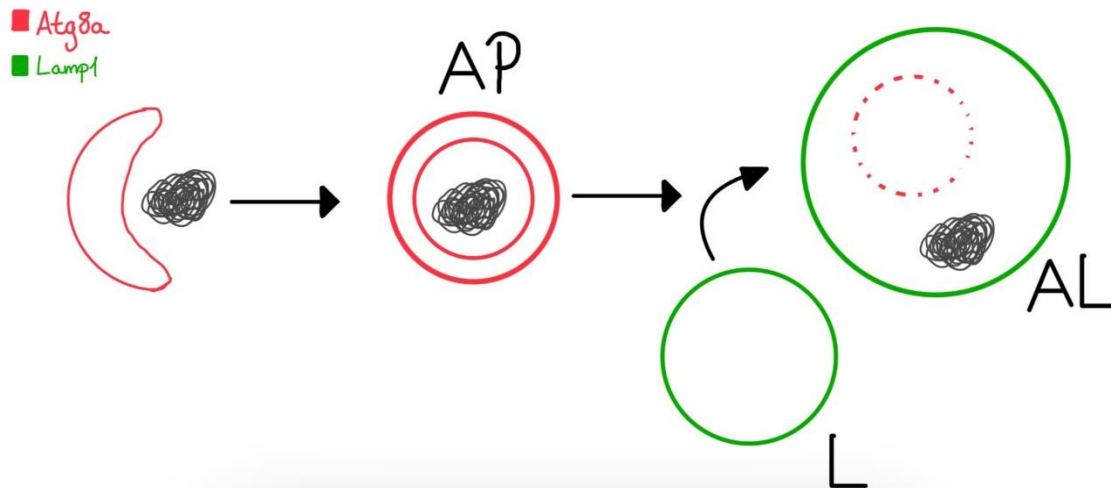
2. ábra: különböző ncMTOC komponensek hatása a mikrotubuláris hálózatra (Zheng és mtsai., 2020).

Vad típusú, azaz ép mikrotubulus-hálózat esetén *Drosophila* lárvális zsírtest-sejtekben jelen vannak a sejtmag körül futó körkörös, illetve radiális mikrotubulusok (2. ábra) (Zheng és mtsai., 2020). *Msps*-csendesítés esetén a körkörök változatlanul megvannak, míg a radiálisak rövidebbek, redukáltak. Ennek ellentétje tapasztalható *Patronin* RNS-interferencia esetében, itt a radiálisak megmaradnak, a körkörök pedig redukáltak lesznek. *Ninein* hiány esetén a vad-típushoz hasonló fenotípust mutat a mikrotubulus hálózat.

Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy az egyes komponensek hogyan vesznek részt az autofág struktúrák pozicionálásában és az autofágia működésében.

## 1.4 Az autofágia

A makroautofágia egy konzervált katabolikus folyamat, melyet minden eukarióta élőlényben megfigyelhetünk. A folyamat során a sejt saját, kiválasztott celluláris komponensei szállítódhatnak a lizoszómákhoz, majd bomlanak le bennük. Ez a feleslegessé vált, sérült anyagok autofagoszómák általi felvételével kezdődik, majd ezt követi az autofagoszóma-lizoszóma fúzió (Lőrincz és Juhász, 2020) (3. ábra). Az autofág lebontás helyes működése igényli többek között az abban résztvevő organellek mikrotubuláris mozgatását is (Lőrincz és Juhász, 2020). Az autofágia jelentőségét mutatja, hogy számos súlyos kórképpel kapcsolatba hozták, például a rákkal, neurodegeneratív betegségekkel, mikrobiális fertőzésekkel, illetve az öregedéssel. A felsorolt példák is szemléltetik, hogy érdemes vizsgálni és ezáltal jobban megismerni az autofágia mechanizmusát (Mizushima és mtsai., 2008).



3. ábra: a makroautofágia sematikus mechanizmusa. AP - autofagoszóma, L – lizoszóma, AL- autolizoszóma (saját készítésű ábra).

## 2. Célkitűzések

Kutatásom célja a *Drosophila melanogaster* lárvális zsírtest-sejtekben lévő ncMTOC fehérjekomponenseinek karakterizálása immunjelölésekkel és fluoreszcens riporterfehérjék felhasználásával, géncsendesítések segítségével. Emellett ncMTOC-riporter használatával (Khc-nod-LacZ) vizsgáltam, hogy egyes csendesítések hogyan befolyásolják az ncMTOC pozícionálását.

## 3. Anyagok és módszerek

Kutatásom során a felhasznált ecetmuslicákat üvegcsővekben, cukrot, agart és élesztőt tartalmazó, kukoricaliszból készült táptalajon tartottam fenn. A keresztezéseket 25 °C-on, 60%-os páratartalommal biztosító termosztátban tároltam. A vizsgálatokhoz korai L3-as stádiumú lárvák zsírtestét használtam, mint modellszerv. A lárvákat 3 órán át éheztettem 20%-os szacharóz-oldatban a nagy mértékű autofág indukció érdekében (Scott és mtsai., 2004).

### 3.1 A *Drosophila melanogaster*, mint modellszervezet

A funkcióvesztéses vizsgálatokhoz olyan törzseket használtam, amelyek valamelyik ncMTOC fehérjekomponens RNS-interferenciával (RNSi) történő csendesítését lehetővé tevő konstrukciót tartalmaztak. Ezek hatását mozaikos szövetet létrehozó törzsekkel keresztezve vizsgáltam, amelyek fúziót megengedő, illetve gátló (Vps16A RNSi) genetikai hátteret biztosítottak. A mozaikos rendszer működésének alapja, hogy az embriók sejtjeiben egy hősokk-promoter véletlenszerűen aktiválódik, ezáltal ezekben a sejtekben képes kifejeződni az Flp-re-

kombináz (hs-Flp), ami képes eltávolítani a CD2 spacer régiót egy konstitutív aktin5C-promoter és egy Gal4- transzgén közül, a CD2-t határoló FRT (= Flippase Recognition Target) szekvenciák miatt. Ezáltal az aktin-promoter képes megindítani a Gal4 expresszióját, amely egy transzkripciós aktivátor. A Gal4 köt az UAS-enhanszer (= Upstream Activating Sequence) elemhez. Tehát a szövet mozaikossága az által képes kialakulni, hogy csak azokban a sejtekben, ahol a hősokk-promoter éppen aktiválódott, képes az UAS-mediált transzgén-kifejeződés létrejönni.

Az általam használt mozaikos Drosophila törzsek mindegyike tartalmazott valamiféle UAS-GFP (zöld) fluoreszcens riportert, illetve emellett UAS-DCR2-t (Dicer2), mely fokozza az RNSi hatását. Maguk az RNSi-konstrukciók is UAS-enhanszer által voltak szabályozottak. A fluoreszcens riporter teszi lehetővé számunkra a mozaikosan létrehozott csendesítő sejtek könnyű beazonosítását.

Az autofagoszómák egyéb autofág struktúráktól való elkülönítésére két olyan törzs áll rendelkezésünkre, melyben a már ismertetett mozaikos rendszer mellett a HOPS-komplex Vps16A alegységének csendesítése által gátoljuk az autofagoszóma-lizoszóma fúziót (Takáts és mtsai., 2014). A kettő között a különbség az, hogy az egyikben található egy zsírtestben kifejeződő promoterről expresszázó mCherry-Atg8a transzgént. Ez a piros fluoreszcens riporter vizualizálja számunkra az autofág struktúrákat.

A mozaikos törzsek pontos genotípusai az alábbiak:

- hsFLP; 3xmCherry-Atg8a, UAS-2xEGFP; actin<CD2<GAL4, UAS-DCR2
- hsFLP; Vps16A RNSi, UAS-DCR2; actin<CD2<Gal4, r4-mCherry-Atg8a, UAS-GFPnls
- hsFLP; Vps16A RNSi, UAS-DCR2; actin<CD2<Gal4, UAS-GFPnls
- hsFLP; 3xmCherry-Atg8a, UAS-GFP-Lamp1; actin<CD2<Gal4, UAS-DCR2

Ezeket kereszteztem az alábbi, RNS-interferencia-alapú géncsökkentő konstrukciót hordozó törzsekkel: Msp300 RNSi HMS 32377, Msp300 RNSi HMS 32848, Msps RNSi HMS 38990, Ninein RNSi HMJ 62414, Shot RNSi HMJ 64041, Shot RNSi JF 28336 (BDSC, Bloomington Drosophila Stock Center); Patronin KK 108927, Patronin GD 27654 (VDRC, Vienna Drosophila Resource Center). A mozaikos törzsekben szereplő Vps16A RNSi szintén a VDRC-ből származott (GD 23769).

Kontrollként luciferáz RNS-interferenciát (JF 31603) alkalmaztam (BDSC).

### 3.2 Fluoreszcens mikroszkópia

A fluoreszcens mikroszkópiát igénylő vizsgálatokhoz Plan-Apochromat 40x (NA=0,95) objektívvel (Zeiss), Orca Flash 4.0 LT sCMOS kamerával (Hamamatsu Phototonics), Apotome2-egységgel (Zeiss) és ZEN 2.3 szoftverrel (Zeiss) ellátott Zeiss AxioImager M2 fluoreszcens mikroszkópot használtam.

A 3 órát éhezett korai L3-as ecetmuslica zsírtesteket 80% glicerint, 20% PBS-t (Phosphate Buffered Saline) és Hoechst sejtmag-festéket (5 µg/ml) tartalmazó lefedőoldatban boncoltam ki.

### 3.3 Immunhisztokémia

Első nap a lárvákat 4%-os formaldehid (PBS-ben hígítva) oldatban boncoltam és ugyanebben 40 percig fixáltam. A mintákat fixálást követően 3-4-szer átöblítettem PBS-ben, majd kétszer 15 percig PBS-ben mostam. A következő lépésben 20 percen keresztül 0,1%-os PBTX (PBS + 0,1% Triton X-100) oldatban permeabilizáltam. Ezt követően történik a minták blokkolása 5% FCS (= Fetal Calf Serum; magzati szarvasmarha szérum, 0,1% PBTX-ben oldva) oldatban 30 percig. Az elsődleges antitesteket szintén FCS-PBTX-ben oldottam, majd a mintákon hagytam éjszakára 4 °C-on.

Második nap az elsődleges antitesteket PBTX-szel kiöblítettem, majd 15 percig 4%-os NaCl-oldatban (0,1% PBTX-ben oldva) inkubáltam. Ezt követően 2-3-szor kiöblítettem PBTX-szel, illetve 2-szer 15 percig PBTX-ben mostam a mintákat. Ezután 30 percen át FCS-PBTX-ben blokkoltam, majd az ebben oldott másodlagos antitestekkel 3 órán keresztül inkubáltam azokat. Az inkubációs idő lejárta után 3-szor PBTX-szel átöblítettem a mintákat, majd ezután 15 percen keresztül Hoechst-só oldatban (4% NaCl + 5 µg/ml Hoechst PBTX-ben) hagytam azokat. Ezt követően először 2-szer 15 percig PBTX-ben, majd 3 PBS-es öblítést követően 2-szer 15 percig PBS-ben mostam. A mikroszkópos vizsgálatához a mintákat a 3.2. alfejezetben ismertetett lefedőoldatban boncoltam ki, illetve fedtem le.

Az általam használt elsődleges antitestek: patkány anti-Atg8a (1:800 (Takáts és mtsai., 2013)), nyúl anti-CathepsinL (1:100, Abcam). Másodlagos antitestek: kecske anti-patkány Alexa Fluor 568 (1:1000), szamár anti-nyúl Alexa Fluor 568 (1:1000) (mindkettő Invitrogen).

### 3.4 Western Blot

Az RNSi-transzgéneket egy univerzális promóterrel (daughterless-Gal4) fejeztettem ki, és ezekből a lárvákból fehérjemintát készítettem. A lárvákra mg-onként 10 µl Laemmli-puffert és 10 µl PBS-t mértem, majd 5 perc 100°C-os forralás után homogenizáltam őket. Ezt követően

újra 5 percig forraltam 100°C-on és 13300 RPM-en (round per minute) 5 percig centrifugáltam a mintákat. A szétvált 3 fázis közül a középső, fehérjetartalmú réteget lepipettáztam.

A fehérjemintákat 8%-os (p62, tubulin) poliakrilamid-gélben elektroforézissel méret szerint szeparáltam. A futtatás után a gél fehérjetartalmát átblottoltam polivinilidén-fluorid membránra Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad) segítségével. A membránokat ezután TBST-vel (Tris Buffered Saline, pH 7,4 + 0,1% Tween20) öblítettem, majd 0,5%-os kazeinnel egy éjszakán át blokkoltam 4 °C-on.

Az elsődleges antitesteket kazein-TBST 1:1 arányú keverékében oldottam és 1 óráig inkubáltam a membránokat velük. Az elsődleges ellenanyagok: nyúl anti-p62 (1:3000, (Pircs és mtsai., 2012)), egér anti-tubulin (1:2000, Developmental Studies Hybridoma Bank).

Ezután 3-szor 10 percig mostam a membránokat TBST-ben, majd a kazein-TBST 1:1 arányú oldatában hígítottam alkalikus foszfátáz (AP) -konjugált másodlagos antitesteket, majd ezekkel inkubáltam azokat 1 órán át. A másodlagos antitestek: anti-nyúl-AP és anti-egér-AP (mindkettő 1:5000, Sigma-Aldrich). 3-szor 10 perc TBST-mosást követően alkalikus foszfátáz-pufferrel mostam 10 percig, végül az ebben oldott alkalikus foszfátáz-szubsztrátok (Nitro Blue Tetrazolium; 0,33 mg/ml és 5-bromo-4-kloro-3-indolilfoszfát; 0,165 mg/ml) hozzáadásával előhívtam a membránokat.

### 3.5 Élethossz vizsgálat

Az élethossz-vizsgálathoz az egyes ncMTOC-elemeket csendesítő konstrukciókat szintén da-Gal4-forással expresszáltattam. A felnőtt állatokat üvegcsövekben, a fentebb említett tápon tartottam, és naponta ráztam át őket új csőbe, illetve figyelemmel követtem, van-e halott egyed. Amennyiben volt, azt eltávolítottam a csőből.

### 3.6 Adatok kvantifikálása és statisztikai kiértékelése

Az ábrákon látható struktúrák számszerűsítésére ImageJ programot használtam. Minden esetben csak azokat a sejteket választottam ki, amelyeknek magja a fókusz síkban van.

Az autofág struktúrák eloszlásának számszerűsítéséhez a zsírsejteket egy perinukleáris és egy perifériás doménre osztottuk, és kiszámítottuk a fluoreszcens jel területét mindkét tér részben. Ezt követően a perinukleáris és perifériás jel területeinek különbségét vettük. Ezután ezt a különbséget elosztottuk a teljes sejt jel területével, így kaptunk egy olyan arányt, amely reprezentálja a struktúrák eloszlását (1 – tökéletesen perinukleáris, 0 – egyenletesen eloszlott, -1 – tökéletesen perifériás) (Boda és mtsai., 2024). Az adatokat statisztikailag a Prism 9.4.1

(GraphPad) segítségével értékeltem ki. Az adatsorok eloszlását D'Agostino & Pearson normalitás-teszt segítségével határoztam meg. Egyirányú ANOVA-t (Dunnett többszörös összehasonlítás tesztel) használtunk több minta összehasonlítására, ha azok mindegyike normális eloszlást mutatott. Több olyan minta összehasonlításakor, amelyek között legalább egy normáltól eltérő eloszlást mutató adatsor volt, Kruskal-Wallis tesztet (Dunn-féle többszörös összehasonlítási tesztel) használtunk.

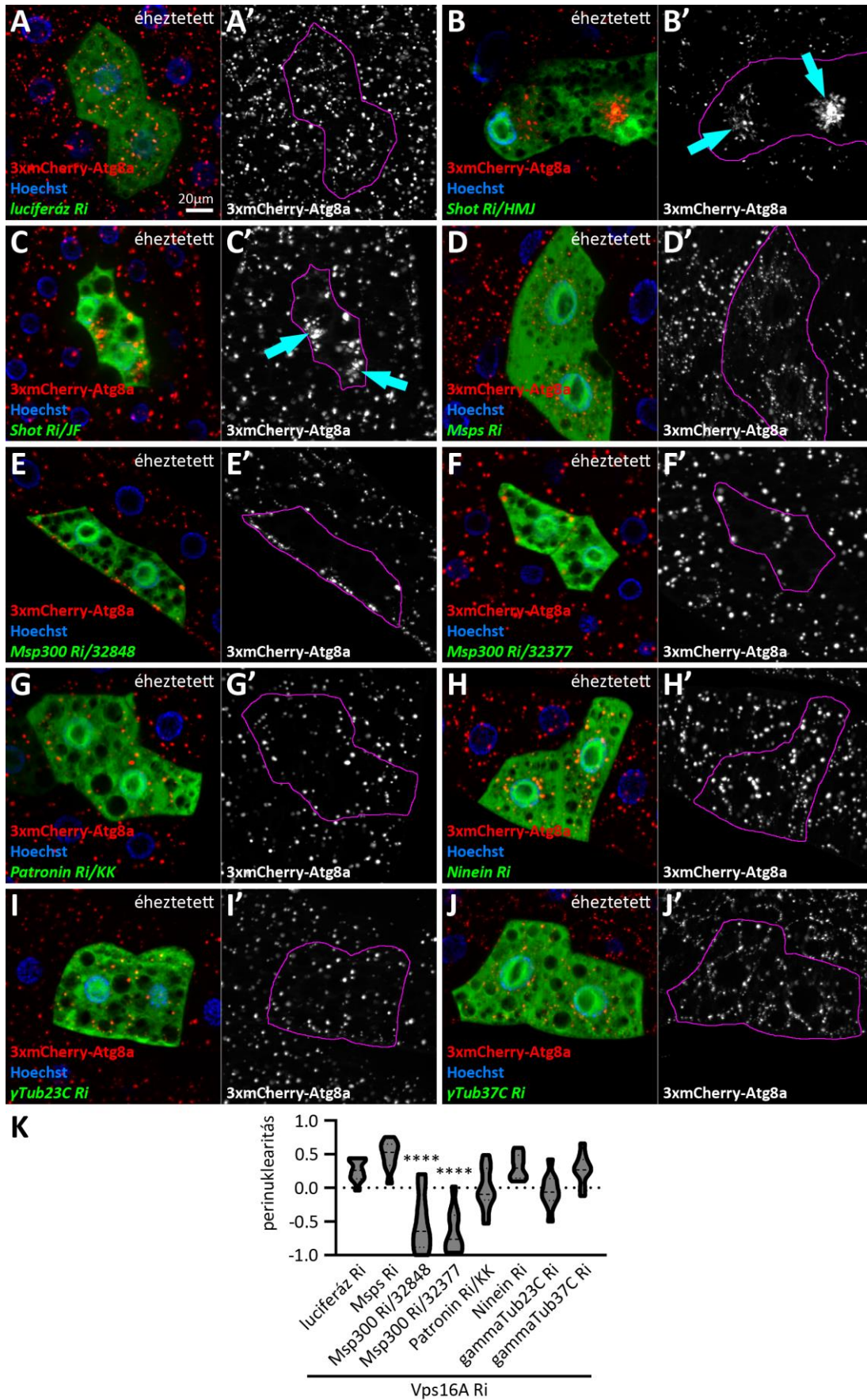
## 4. Eredmények és megvitatásuk

### 4.1 A nem-centroszomális MTOC fehérjekomponenseinek szerepe az autofág struktúrák eloszlásában

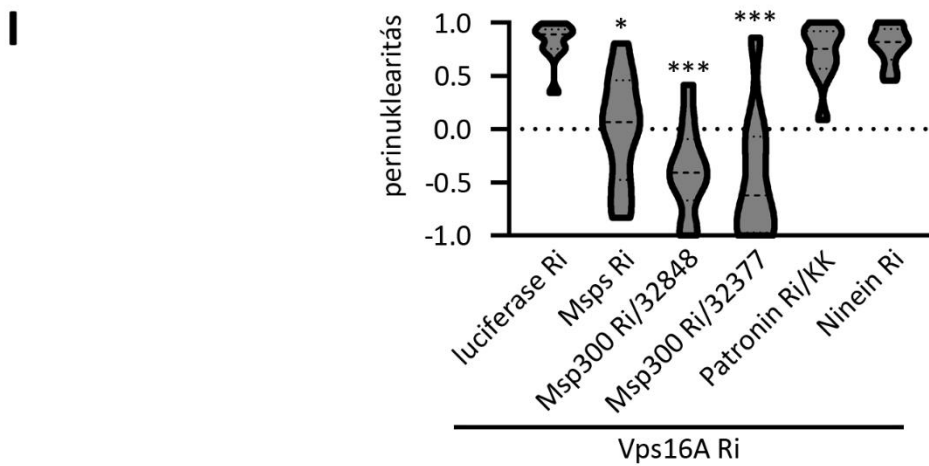
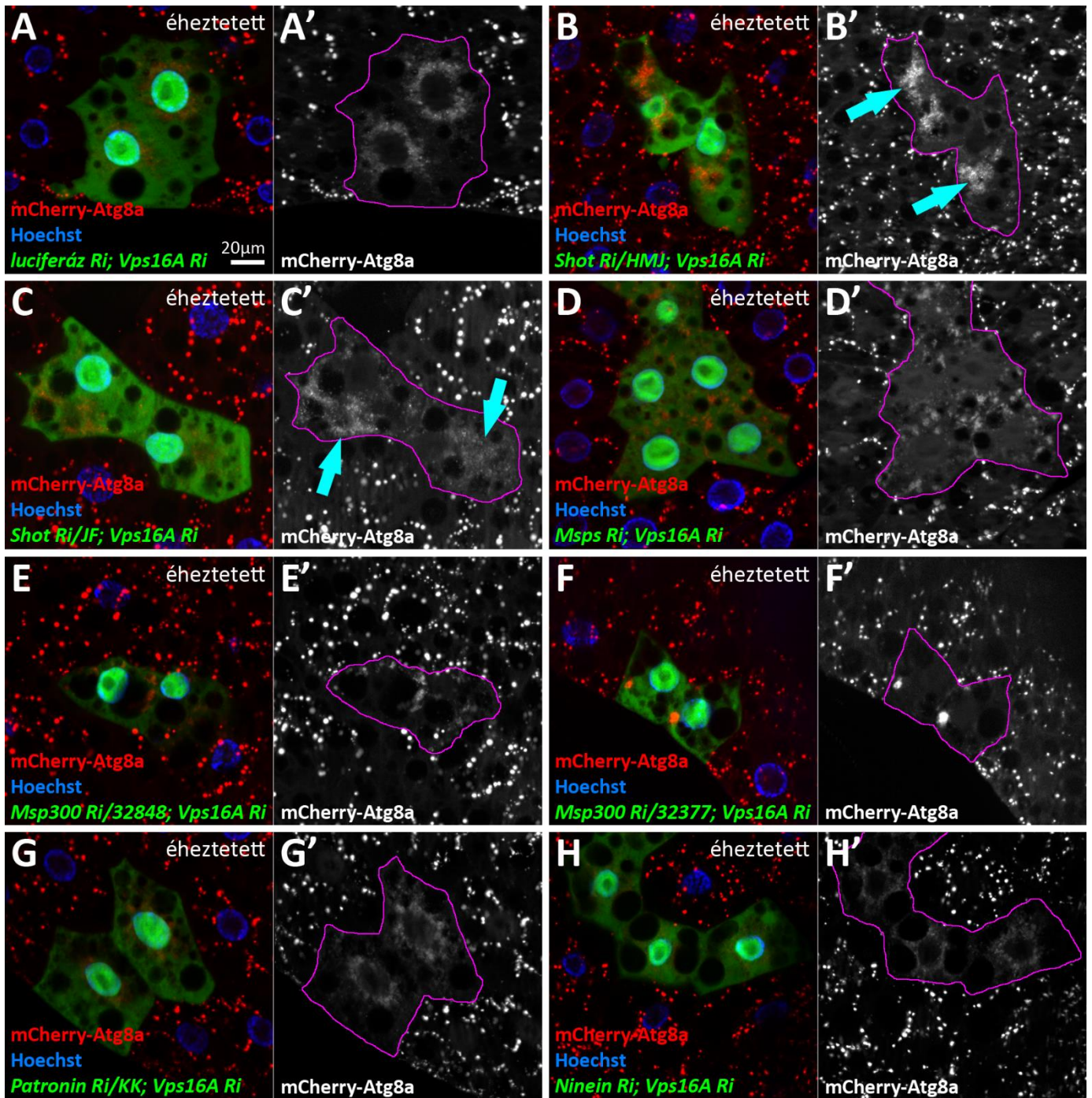
Munkám során a lárvális zsírtest-sejtek ncMTOC-ában előforduló fehérjék autofágiában betöltött szerepével foglalkoztam, melyhez az egyes fehérjék génjeit RNS-interferencia segítségével csendesítettem. Elsőként az autolizoszómákra gyakorolt hatásukat vizsgáltam, melyhez a 3.1 alfejezetben bemutatott, 3xmCherry-Atg8a-t mozaikosan expresszáló zsírtesteket használtam. Ez a riporter általánosságban az autofág struktúrákat jelöli ki: az autofagoszómákon megtalálható, ahonnan fúzió révén az autolizoszómákba jut (Hegedűs és mtsai., 2016).

Kontrollként luciferáz RNSi-val rendelkező törzset használtam. Ebben az esetben a 3xmCherry-Atg8a nagy méretű autolizoszómákat jelöl a sejtekben szétszórva (**4A. ábra**). A Shot funkcióvesztéséről ismert, hogy egy ektopikus MTOC-ot hoz létre a citoplazma egy pontján (Sun és mtsai., 2019). Ennek megfelelően az autolizoszómák is ekörül gyűltek össze a Shot csendesítése esetén (**4B-C. ábra**). Az Msps hiányában az autolizoszómák eloszlása perinukleáris tendenciát mutatott (**4D. ábra**). Ugyanakkor az Msp300 csendesítése esetén, az Msps-el ellentétesen, inkább a periférián helyezkednek el (**4E-F. ábra**). A Patronin, a Ninein és a  $\gamma$ -tubulin-izoformák funkcióvesztése viszont nem okozott eltérést a kontroll (luciferáz RNSi) sejtekben tapasztalt szétszórt autolizoszóma-mintázathoz képest (**4G-J. ábra**). Mindezek arra utalnak, hogy az egyes ncMTOC-komponensek funkcióvesztése különféleképpen hat az autolizoszómák elrendeződésére. Az egyes elrendeződés-mintázatok szépen összhangba hozhatók a funkcióvesztések esetén korábban leírt, mikrotubulus-hálózatot érintő változásokkal (**2. ábra**; (Zheng és mtsai., 2020)).

Ezután az egyes ncMTOC-komponensek autofagoszómákra kifejtett hatását is megvizsgáltam. Ehhez a 3.1-es alfejeztben leírt, Vps16A-at mozaikosan csendesítő, mCherry-Atg8a-val rendelkező törzset használtam. A Vps16A a lizoszomális fúziókhoz szükséges HOPS-komplex egyik alegysége (Takáts és mtsai., 2014), így hiányában az mCherry-Atg8a riporterrel a prefúziós autofagoszómák vizsgálhatók. Kontrollként a luciferáz szolgált, mely esetében az autofagoszómák perinukleáris eloszlást mutattak (**5A, I. ábra**). A Shot hiánya az autofagoszómákat az autolizoszómákhoz hasonlóan az ektopikus MTOC köré fókuszálja (**5B-C. ábra**). Az Msps inkább szétszórt eloszlást mutat, mint perinukleárisat vagy perifériásat (**5D, I. ábra**). Az Msp300 csendesítése esetén az autofagoszómák kikerülnek a sejtp perifériára (**5E-F, I. ábra**). Ezzel ellentétben a kontrollhoz hasonló fenotípus látható a Patronin (**5G, I. ábra**), illetve Ninein (**5H, I. ábra**) hiányának esetében, azaz perinukleáris eloszlás figyelhető meg.



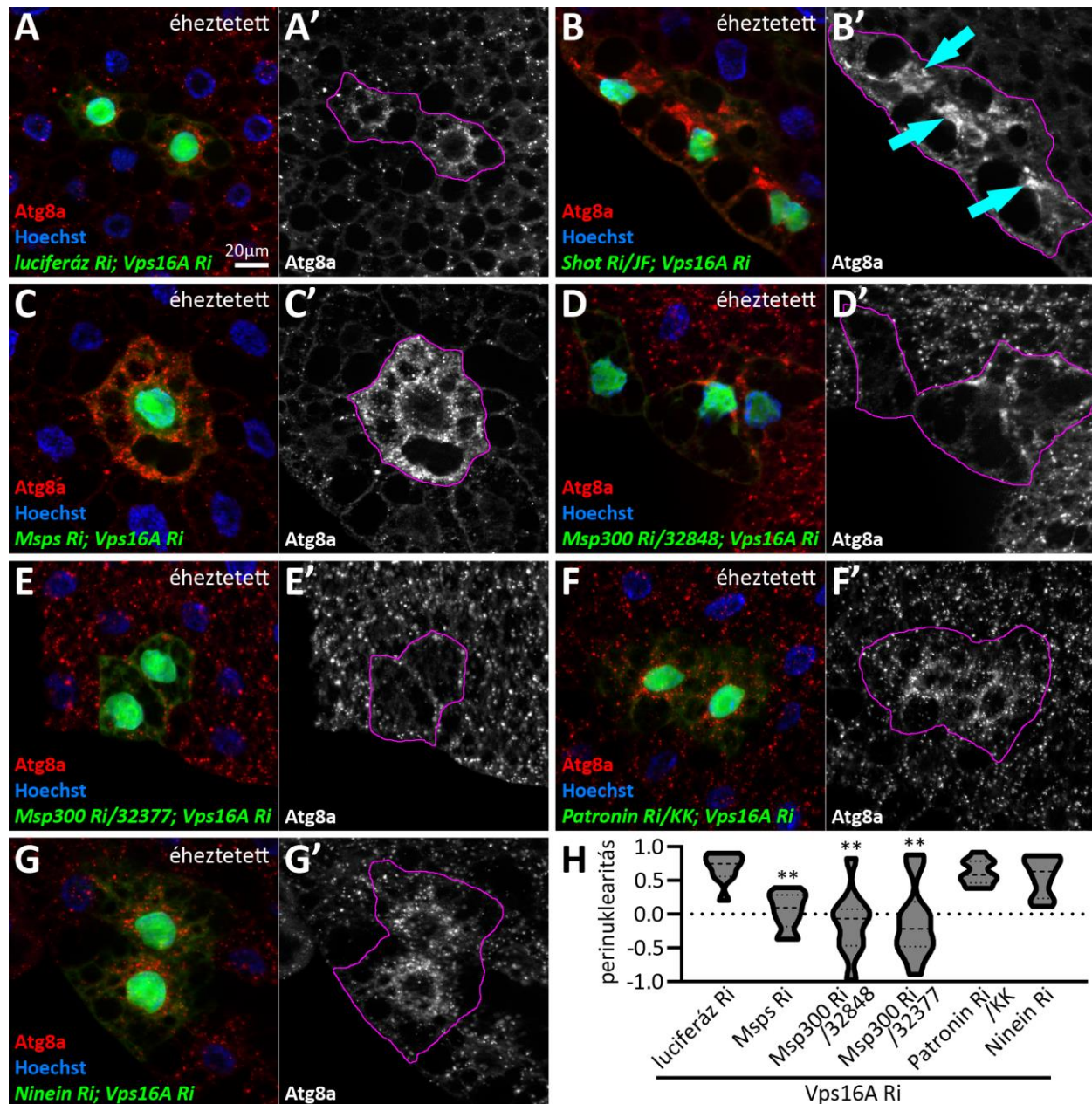
4. ábra: az ncMTOC-komponensek hiányának hatása az autofág struktúrák eloszlására. Magenta- a csendesített sejtek sejthatárai, kék nyilak- egy csoportba fókuszált autofagoszómák. A méretvonal az A panelen az összes fluoreszcens panelre érvényes.



◀ 5. ábra: az ncMTOC-komponensek hiányának hatása az autofagoszómák eloszlására. Magenta- a csendesített sejtek sejthátarai, kék nyilak- egy csoportba fókuszált autofagoszómák. A méretvonal az A panelen az összes fluoreszcens panelre érvényes.

Ezeket az eredményeket Atg8a-immunfestés által is megerősítettük, melyhez a 3.1 alfejezetben ismertetett, Vps16A-t mozaikosan csendesítő, ripotert nem tartalmazó törzset használtuk (6. ábra). Az így kapott fenotípusok alapvetően összhangban vannak a 5. ábrán látható eredményekkel.

Ezen kísérletek eredményei alapján elmondható, hogy a kontrollhoz (luciferáz RNSi) képest a legnagyobb eltérést az Msp300, illetve Shot fehérjék hiánya okozza. Az Msps elvételével az autofagoszómák eloszlása szétszórttá válik, ezzel ellenben a Patronin és Ninein csendesítése során a kontrollhoz hasonló eloszlást tapasztalhatunk.



◀ 6. ábra: az autofagoszómák eloszlásának vizsgálata immunhisztokémiával az ncMTOC-komponensek csendesítése esetén. Magenta- a csendesített sejtek sejthatárai, kék nyilak- egy csoportba fókuszált autofagoszómák. A méretvonal az A panelen az összes fluoreszcens panelre érvényes.

| RNSi                     | luciferáz                                                                         | Shot                                                                              | Msp                                                                               | Msp300                                                                            | Patronin                                                                            | Ninein                                                                              | $\gamma$ -tubulin                                                                   |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Autolizoszómák eloszlása |  |  |  |  |  |  |  |
| Autofagoszómák eloszlása |  |  |  |  |  |  |  |

7. ábra: a különböző RNS-interferenciák hatása az autolizoszómák, illetve az autofagoszómák eloszlására

Összefoglalva elmondható, hogy a kísérleteim során használt géncsökkentéseket megvizsgáltam mind lizoszomális fúziót megengedő, mind fúziógátolt genetikai háttéren is. A fúzió megengedésével az autolizoszómákat, míg a fúziót nem megengedő (Vps16A-csökkentett) háttéren az autofagoszómák eloszlását vizsgáltam az autofág (3x)mCherry-Atg8a riporterekkel.

A 7. ábra vizualizálja grafikusán az ezen kísérletek során kapott fenotípusokat. Kontrollként a luciferáz RNSi-t használtam, ezen esetben azt tapasztaljuk, hogy az autolizoszómák szétszórva, míg az autofagoszómák perinukleárisan helyezkednek el. Shot csökkentés esetén egy ektopikus MTOC köré csoportosulnak a struktúrák, melynek léte a szakirodalomban ismert (Sun és mtsai., 2019). Msp hiányában az autolizoszómák perinukleáris, míg az autofagoszómák inkább szétszórt eloszlást mutatnak. Msp300 RNSi alkalmazása esetén azt tapasztaljuk, hogy az autofág struktúrák a sejtp periférián helyezkednek el. A Patronin, a Ninein, illetve a  $\gamma$ -tubulin izoformáinak (Boda és mtsai., 2024) csökkentése esetén a kontrollhoz hasonló eloszlást kaptunk, azaz autolizoszómák esetében szétszórt, az autofagoszómák pozicionálásánál pedig perinukleáris eloszlást tapasztalunk.

Az egyes ncMTOC-komponensek tehát különféleképpen befolyásolják az autofág organelumok pozicionálását.

## 4.2 Az ncMTOC szerepe az autofág lebontásban

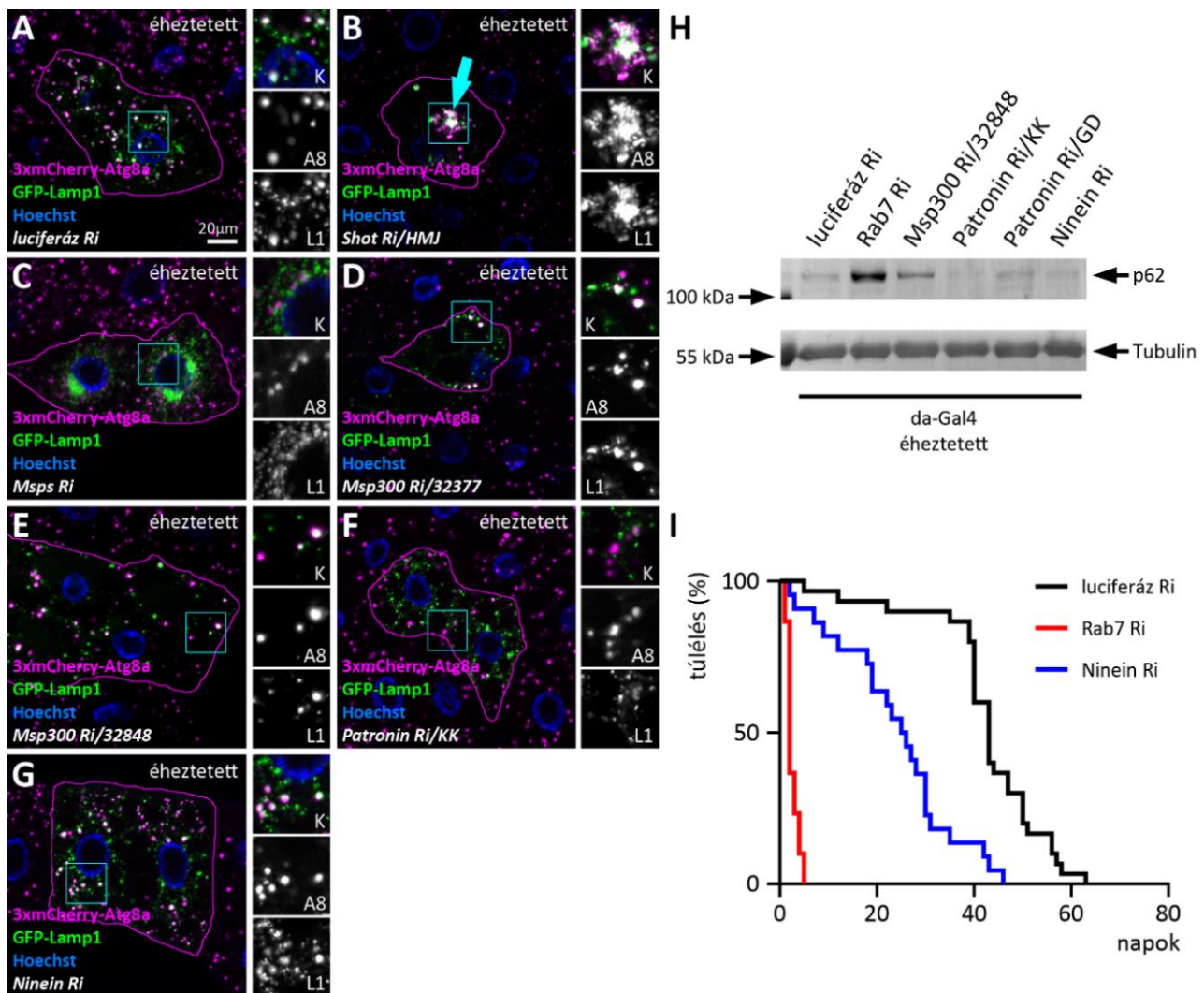
A megfigyelt eloszlás-fenotípusok alapján adódott a kérdés, hogy az egyes ncMTOC-komponensek csendesítése befolyásolja-e az autofág lebontást is. Elsőként ehhez a 3.1-es alfejezetben ismertett, 3xmCherry-Atg8a és GFP-Lamp1 (lysosomal associated membrane protein 1) génkonstrukciókkal rendelkező törzset használtam. Ez alkalmas az autofagoszóma-lizoszóma fúzió vizsgálatára, hiszen a 3xmCherry-Atg8a-val minden autofág struktúrát (Hegedűs és mtsai., 2016), míg a Lamp1-el a lizoszómákat jelölhetjük ki (Takáts és mtsai., 2018). Arra voltunk kíváncsiak, hogy az általunk vizsgált ncMTOC komponensek hiányában ez a két jel átfed-e egymással, illetve amennyiben igen milyen arányban. Ehhez luciferáz-csendesítést alkalmaztam, mint kontrollt. Kísérleteim eredményét a **8. ábra** mutatja be. Általánosságban elmondható ez alapján, hogy az Msp300-t és a Patronin (8C, F. ábra) leszámítva inkább az autofagoszómák és lizoszómák sikeres fúziója a jellemző, a két jel ugyanis a többi csendesítés esetében átfed. Ezen eredmények alapján az egyes ncMTOC-komponensek eltérő módon hatnak a fúzió hatékonyságára, illetve a struktúra-eloszlás változása a sejtekben nem feltétlenül okoz fúziós hibát.

Ahhoz, hogy megállapítsuk ezeknek a csendesítéseknek a hatását az autofág lebontásra, Western blotot alkalmaztam. Ehhez a géncsengesítéseket olyan Gal4-forrással fejeztettem ki, amely az egész lárvában expresszál (daughterless-Gal4), majd a korai L3-as stádiumú lárvákból fehérjemintákat készítettem és a p62 szintjét vizsgáltam. Ez egy autofágiával lebomló fehérje, így mennyisége információt ad a lebontás hatékonyságáról (Lőrincz és mtsai., 2017). Feltöltési kontrollként a tubulin szolgált. A Western blot során kapott eredmények alapján elmondható, hogy az egyes komponensek közül az Msp300 hiánya okozott bizonyos fokú p62-felhalmozódást (**8H. ábra**). Ez alapján az autofág lebontást leginkább az Msp300 fehérje funkcióvesztése gátolja, míg a többi ncMTOC-komponens elvétele kevésbé érinti azt.

Élethossz vizsgálattal megnéztem, hogy az ncMTOC fehérjekomponenseinek hiánya befolyásolja-e az állatok fiziológiás állapotát. Ehhez szintén a daughterless-Gal4 segítségével expresszáltam a RNS-interferenciákat. A kapott eredményeket a **8I. ábra** tartalmazza. Várakozásainknak megfelelően a legtöbb csendesítés letálisnak bizonyult, így nem volt mérhető az élettartam. Az egyetlen kivétel a Ninein volt, amelynek hiányában a felnőtt állatok kicsit rövidebb ideig éltek, mint a kontrollként szolgáló luciferáz-csendesített állatok.

Ezek alapján elmondható, hogy az egyes ncMTOC-komponensek eltérő módon hatnak a fúzió hatékonyságra, illetve a struktúrák eloszlásának a megváltozása a sejtekben nem feltétlenül okoz fúziós hibát. A Western blot kísérlet alapján megállapíthatjuk, hogy az Msp300 hi-

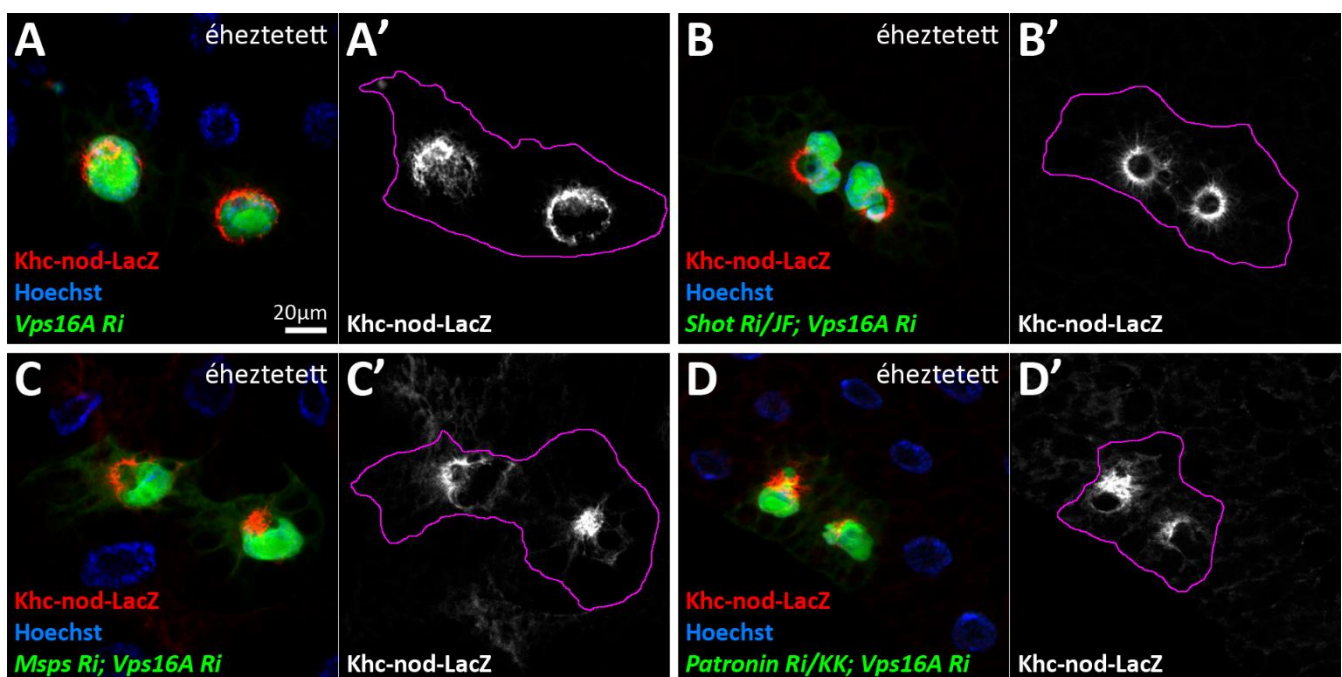
ánya eredményez bizonyos fokú lebontási defektust. Az élethossz vizsgálat során kapott eredmények azt mutatják, hogy szinte az összes csendesítés letális volt, kivéve a Ninein hiánya esetén. Ezek a felnőtt állatok kevesebb ideig maradtak életben, mint amit a kontroll állatoknál tapasztaltunk. Ez arra utal, hogy az ncMTOC-komponensek elvétele súlyosan érinti az állatok fiziológiás állapotát, ami valószínűleg komplex hatások eredményének a megnyilvánulása, melyben az autofágia defektusai is részt vehetnek.



8. ábra: A-G: az ncMTOC szerepe az autofág fúziókban és lebontásban. A panelek jobb oldalán egy-egy reprezentatív részlet látható, a kék keretben lévő terület 2x nagyításával. K- kompozit, A8-3xmCherry-Atg8a csatorna, L1- GFP-Lamp1 csatorna. Magenta- a csendesített sejtek sejthatárai, kék nyíl- egy csoportba fókuszált autofagoszómák. A méretvonal az A paneleken az összes fluoreszcens panelre érvényes. H: az egyes ncMTOC-komponensek hiányának hatása a p62 fehérje szintjére (Western blot). kDa- kilodalton. A tubulin feltöltési kontrollként szolgált. I: a Ninein-csendesített állatok élethosszáinak vizsgálata. A H és I paneleken a Rab7 RNSi pozitív kontrollként szolgált.

### 4.3 Az egyes ncMTOC-komponensek hiányának hatása az ncMTOC helyzetére

A továbbiakban kíváncsiak voltunk arra, hogy az egyes ncMTOC-alkotók hiányában megváltozik-e az ncMTOC pozíciója. Ehhez egy mesterséges, mínuszvég felé mozgó kinezint, a Khc-nod-LacZ rekombináns fehérjét (Clark és mtsai., 1997) használtam ncMTOC markerként. Feltételezésünk az volt, hogy anti-LacZ-antitesttel vizualizálhatóvá válik az egyes csendesítések esetén az ncMTOC megléte, pozícionálása. Ezt a 3.1-es alfejezetben ismertetett fúziót gátló, 3xmCherry-Atg8a-t nem tartalmazó törzsön vizsgáltam. A kontroll esetben a Khc-nod-LacZ jele perinukleárisan van jelen, ami igazolja a feltételezést, hogy ncMTOC-markerként használható (9A. ábra). A Shot csendesítése esetén a Khc-nod-LacZ a létrejövő ektopikus ncMTOC körül akkumulálódott gyűrű formájában (9B. ábra), ami tovább erősíti ennek a riporternek az alkalmasságát az ncMTOC jelölésére. Msps hiány esetén a Khc-nod-LacZ túltermelése meglepő módon képes az ncMTOC helyzetét menekíteni, a LacZ-jel ugyanis perinukleárisan van jelen (9C. ábra). A Patronin csendesítésekor a várakozásunknak megfelelően az ncMTOC a kontrollhoz hasonlóan perinukleáris helyzetű volt (9D. ábra).

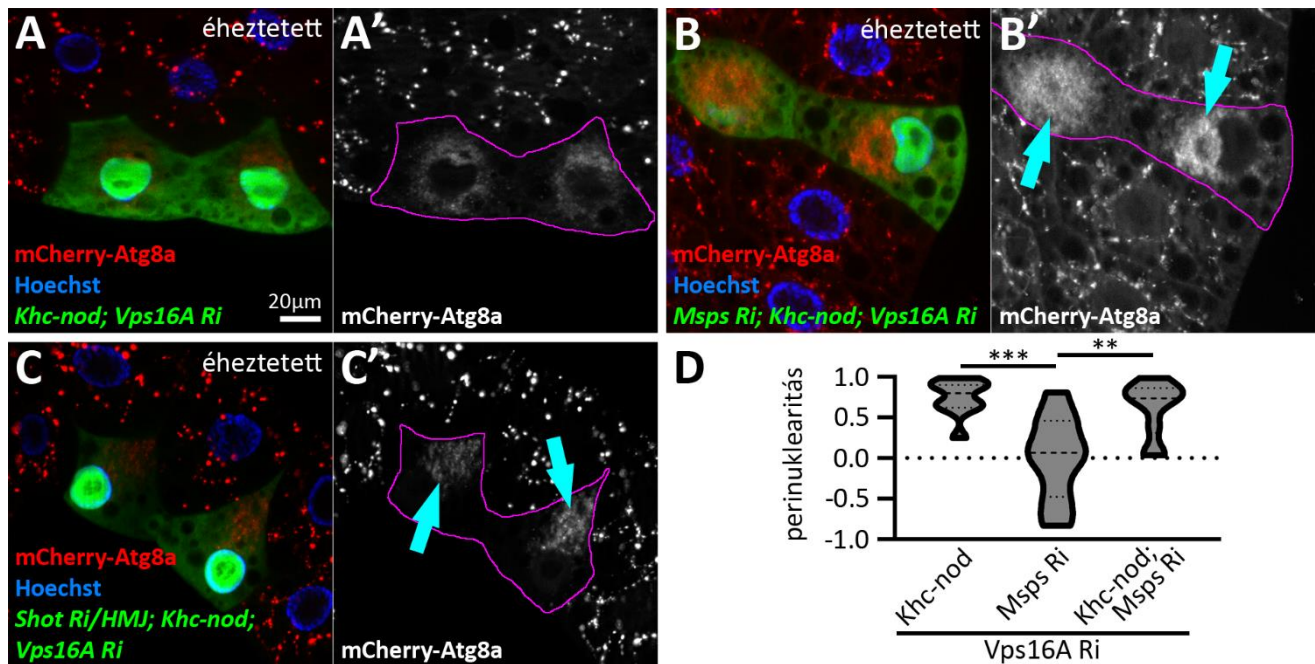


9. ábra: az egyes ncMTOC-komponensek hiányának hatása az ncMTOC helyzetére. Magenta- a csendesített sejtek sejthatárai. A méretvonal az A panelen az összes fluoreszcens panelre érvényes.

Felkeltette az érdeklődésünket az, hogy a Khc-nod-LacZ túltermelése befolyásolja-e az autofagoszómák eloszlását egyes ncMTOC-komponensek hiányában. Ezen kísérletekhez az Msps RNSi-t és a Shot RNSi-t választottuk ki, melyek jelentősen megváltoztatták az autofagoszómák eloszlását. Ebben az esetben kontrollként a Khc-nod-lacZ-túltermelést használtam önmagában. A Khc-nod-LacZ túltermelése nem változtatja meg az autofagoszómák perinukleáris eloszlását

(10A, D. ábra). Meglepő módon a Khc-nod-LacZ túltermelése megmenekítette az Mspcs-csenedesítés fenotípusát, ugyanis az autofagoszómák perinukleárisan helyezkedtek el (10B, D. ábra), szemben az önálló Mspcs-csenedesítés esetén tapasztalt szétszórt mintázathoz képest (5D. ábra). A Shot hiányának hatását a Khc-nod-LacZ-túltermelés részlegesen erősítette, az autofagoszómák ugyanis méginkább egyetlen fókuszpontban akkumulálódtak (10C. és 5B-C. ábra).

Összegzőképpen megállapíthatjuk, hogy az általunk vizsgált csenedesítések a Khc-nod-LacZ túltermelése esetén különböző módon viselkedtek. Amíg ez képes volt a csenedesített Mspcs-nél az autofagoszómák, illetve az ncMTOC pozícióját menekíteni, addig a Shot hiányánál erre már nem volt képes. Ezeknél a sejteknél viszont egy más helyzetben megjelenő LacZ gyűrű volt látható, amelyről feleltételezzük, hogy az ektopikus ncMTOC körül van jelen, ahol az autofagoszómák eloszlása is fókuszálódott.



10. ábra: a Khc-nod-LacZ túltermelésének hatása az autofagoszómák mozgására egyes ncMTOC-komponensek hiányában. Magenta- a csenedesített sejtek sejthatárai, kék nyilak- egy csoportba fókuszált autofagoszómák. A méretvonal az A panelen az összes fluoreszcens panelre érvényes. A D panelen az összehasonlíthatóság érdekében az Mspcs RNSi is fel van tüntetve.

## **5. Köszönetnyilvánítás**

Szeretném megköszönni témavezetőmnek Dr. Boda Attilának a segítségét, tanácsait. Emellett köszönöm Dr. Lőrincz Péternek, hogy az általa alapított MTA-ELTE Lendület Vezikuláris Transzport Kutatócsoportban dolgozhatok.

## 6. Hivatkozások

- Clark, I.E., L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 1997. Reciprocal localization of Nod and kinesin fusion proteins indicates microtubule polarity in the *Drosophila* oocyte, epithelium, neuron and muscle. *Development*. 124:461-470.
- Goodson, H.V., and E.M. Jonasson. 2018. Microtubules and Microtubule-Associated Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 10.
- Hannaford, M.R., and N.M. Rusan. 2024. Positioning centrioles and centrosomes. *J Cell Biol*. 223.
- Hegedűs, K., S. Takáts, A. Boda, A. Jipa, P. Nagy, K. Varga, A.L. Kovács, and G. Juhász. 2016. The Ccz1-Mon1-Rab7 module and Rab5 control distinct steps of autophagy. *Mol Biol Cell*. 27:3132-3142.
- Lőrincz, P., and G. Juhász. 2020. Autophagosome-Lysosome Fusion. *J Mol Biol*. 432:2462-2482.
- Lőrincz, P., C. Mauvezin, and G. Juhász. 2017. Exploring Autophagy in *Drosophila*. *Cells*. 6.
- Mizushima, N., B. Levine, A.M. Cuervo, and D.J. Klionsky. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 451:1069-1075.
- Piracs, K., P. Nagy, A. Varga, Z. Venkei, B. Erdi, K. Hegedus, and G. Juhasz. 2012. Advantages and limitations of different p62-based assays for estimating autophagic activity in *Drosophila*. *PLoS One*. 7:e44214.
- Sanchez, A.D., and J.L. Feldman. 2017. Microtubule-organizing centers: from the centrosome to non-centrosomal sites. *Curr Opin Cell Biol*. 44:93-101.
- Scott, R.C., O. Schuldiner, and T.P. Neufeld. 2004. Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev Cell*. 7:167-178.
- Sui, H., and K.H. Downing. 2010. Structural basis of interprotofilament interaction and lateral deformation of microtubules. *Structure*. 18:1022-1031.
- Sun, T., Y. Song, J. Dai, D. Mao, M. Ma, J.Q. Ni, X. Liang, and J.C. Pastor-Pareja. 2019. Spectraplakins Maintain Perinuclear Microtubule Organization in *Drosophila* Polyploid Cells. *Dev Cell*. 49:731-747.e737.
- Takáts, S., G. Glatz, G. Szenci, A. Boda, G.V. Horváth, K. Hegedűs, A.L. Kovács, and G. Juhász. 2018. Non-canonical role of the SNARE protein Ykt6 in autophagosome-lysosome fusion. *PLoS Genet*. 14:e1007359.
- Takáts, S., K. Piracs, P. Nagy, Á. Varga, M. Kárpáti, K. Hegedűs, H. Kramer, A.L. Kovács, M. Sass, and G. Juhász. 2014. Interaction of the HOPS complex with Syntaxin 17 mediates autophagosome clearance in *Drosophila*. *Mol Biol Cell*. 25:1338-1354.
- Boda A., Balázs V., Nagy A., Hargitai D., Lippai M., Simon-Vecsei Zs., Molnár M., Fürstenhoffer F., Juhász G., Lőrincz P. 2024. The Rab7-Epg5 and Rab39-ema modules cooperately position autophagosomes for efficient lysosomal fusions. *eLife*. e102663.
- Wu, J., and A. Akhmanova. 2017. Microtubule-Organizing Centers. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 33:51-75.
- Zheng, Y., R.A. Buchwalter, C. Zheng, E.M. Wight, J.V. Chen, and T.L. Megraw. 2020. A perinuclear microtubule-organizing centre controls nuclear positioning and basement membrane secretion. *Nat Cell Biol*. 22:297-309.