

Az autofagoszóma-mozgatás molekuláris faktorainak azonosítása ecetmuslicában

Balázs Villő

biológia Bsc 3. évfolyam

Eötvös Loránd Tudományegyetem

36. OTDK Biológia Szekció

Témavezetők:

dr. Boda Attila, tudományos munkatárs

dr. Lőrincz Péter, egyetemi adjunktus



Tartalomjegyzék

Összefoglaló.....	3
1. Bevezetés	4
1.1. Autofágia	4
1.2. A mikrotubuláris mozgatus.....	5
1.3. A <i>Drosophila</i> használata az autofágia-kutatásokban.....	6
2. Célkitűzések.....	7
3. Anyagok és módszerek	7
3.1. <i>Drosophila melanogaster</i> genetika.....	7
3.2. Fluoreszcens mikroszkópia.....	8
3.3. Immunhisztokémia	8
3.4. Western Blot	9
4. Eredmények és megvitatásuk.....	10
4.1. Az autofagoszóma-mozgathoz potenciálisan szükséges gének azonosítása genetikai szűréssel	10
4.2. Az autofagoszóma-mozgatus molekuláris faktorainak karakterizálása.....	12
4.3. Az autofagoszóma motilitásának kapcsolata az autofág lebontással.....	16
Köszönetnyilvánítás	21
Tételes szerzői hozzájárulás	22
Irodalomjegyzék	23
Függelék	25

Összefoglaló

A makroautofágia az eukarióta sejtek lebontó folyamata, mely során a sejt megemésztí a számára már nem hasznos organelumokat, anyagokat. Az autofagoszóma egy kettős membránnal határolt, citoplazma-részletet tartalmazó vezikula, mely lizoszómákkal egyesül, ahol a lebontás megtörténik.

Az autofág lebontás megfelelő működéséhez szükséges a résztvevő organelumok megfelelő pozicionálása. Munkám során az autofagoszómák mozgásával foglalkoztam. Elsőként egy genetikai szűrést végeztünk, melynek során a lizoszomális fúziókat megakadályozó genetikai háttéren vizsgáltam olyan gének csendesítését, melyek potenciálisan az autofagoszóma-mozgáshoz köthetők. Így a vizsgált sejtekben autolizoszómák nem, csak autofagoszómák tudtak képződni. Eredményeim szerint az autofagoszómák a mikrotubulusok mentén, mínusz irányban, dineinek segítségével mozognak. Ennek hiányában a kinezin-motorok átveszik a mozgítás szerepét és az irány megfordul. Valószínűsíthető, hogy a motorfehérjék aránya határozza meg a mozgítás irányát, amely mindkét esetben a Rab7 kis GTPáz és az Epg5 adaptor által szabályozott. Ezen felül sikerült kimutatni, hogy az autofagoszóma-mozgítás hibája lizoszomális fúziós és lebontási defektushoz vezet.

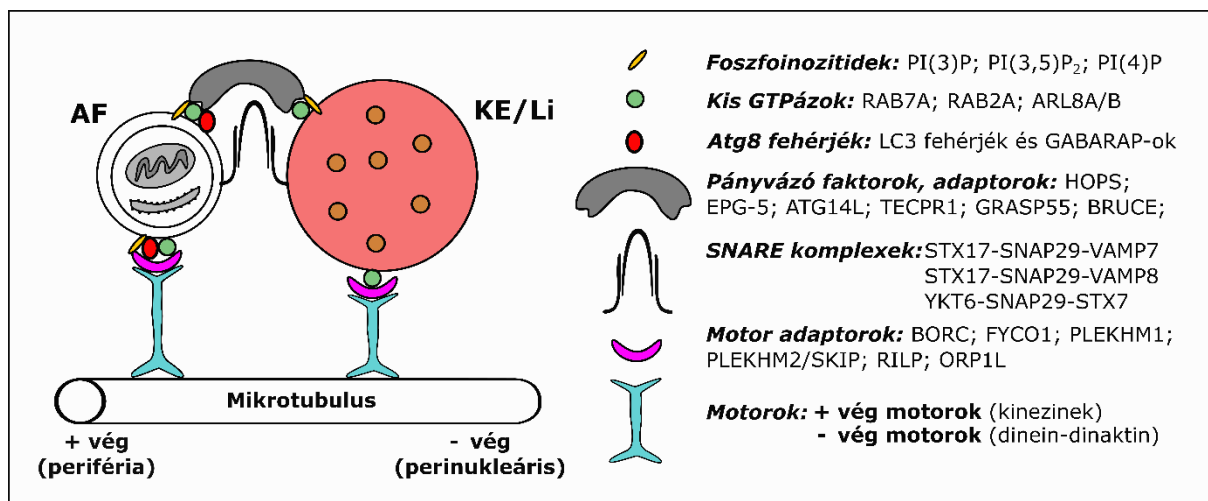
Mivel az autofágia sérülése súlyos következményekkel jár a sejtekre és a szervezet egészére nézve, eredményeink segíthetnek annak megértésében, hogy ezen kórképek kialakulásának hátterében milyen molekuláris mechanizmusok állhatnak.

1. Bevezetés

1.1. Autofágia

A sejtek homeosztázisának fenntartásához elengedhetetlen a makroautofágia (a későbbiekben egyszerűen autofágiaként említve). Ez egy eukarióta sejtekben lejátszódó, lebontó folyamat, mely során „önemésztés” történik. Bazális autofágiának nevezzük azt az autofág aktivitást, amit a sejt alapállapotban folyamatosan végez. Ez stressz hatásra növelhető (stresszindukált autofágia) [1], vagy az egyedfejlődés bizonyos fázisaiban is növekedhet az aktivitás (fejlődési autofágia) [2].

Az autofágia első lépéseként létrejön egy izoláló membrán (fagofór), mely körülhatárolja a lebontandó anyagot és záródik. Ezt a kettős membránnal határolt struktúrát nevezzük autofagoszómának, amely lizoszómákkal fuzionál. Az így kialakult autolizoszóma savas közegében hidrolázok végzik a lebontást [3]. Az autofagoszómák kialakulásában az élesztőben azonosított *Atg* (Autophagy-related genes) géneknek fontos szerepük van [4]. Az autofagoszóma-lizoszóma fúzióhoz szükség van egy kis GTPáz fehérjére a struktúrák membránján (például a Rab7) [5-7], a HOPS pányvázó komplexre (Homotypic Fusion and Vacuole Protein Sorting), illetve egyes SNARE- (SNAP Receptor) fehérjékre (Syntaxin17, VAMP7/8 (Vesicle Associated Membrane Protein), ubisnap) [8, 9] (**1. ábra**). Ez a fúziós gépezet alapvetően konzervált az eukarióták között.



1. ábra: Az autofagoszóma-lizoszóma fúzió fő résztvevői. AF: autofagoszóma; KE: késői endoszóma; Li: lizoszóma ([8] alapján, módosítva).

A lebontásnak nagyon fontos szerepe van a sejt működése szempontjából. A túl alacsony, illetve túl magas aktivitás is káros a sejt számára; ha a folyamat szabályozása sérül, az súlyos következményeket okoz. Az autofágia diszfunkcióját már összefüggésbe hozták a rák-

kal, neurodegeneratív betegségekkel és az öregedéssel is [10]. Az utóbbi évtizedekben megnőtt az autofágia-kutatás iránti érdeklődés, hiszen nincs kellőképpen felderítve a működésének a molekuláris háttere [8].

1.2. A mikrotubuláris mozgatás

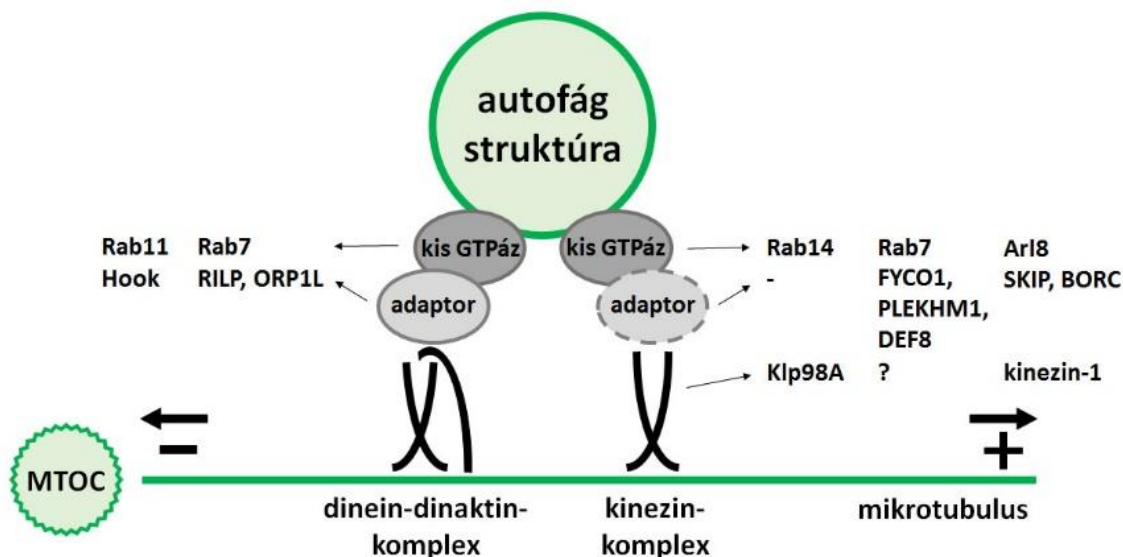
A vezikulumok mozgatása alapvetően a mikrotubulusokon zajlik, melyek felépítéséhez szükséges a mikrotubulus organizáló centrum (MTOC). Az acetabulumok zsírszövetjeiben nem a centroszóma alkotja az MTOC-ot, hanem a sejtmag körül elhelyezkedő egyes fehérjék, ezért azt non-centroszomálisnak nevezzük [11].

A vezikulumok az MTOC irányába (- vég), vagy attól távolodva (+ vég) mozoghatnak a mikrotubuluson. A mozgatáshoz szükség van egy motor-komplexre (gyakran könnyű és nehéz láncok együttese). Ezek lehetnek kinezinok (+ vég felé), vagy dineinek (- vég felé). A citoplazmatikus dineinek a dinaktin-kompleksszel együttműködve látják el a funkciójukat. A motorfehérje-komplexez nehéz láncai ATPáz aktivitással rendelkeznek. A motorokhoz kapcsolódhatnak adaptorok, amiken keresztül a vezikulumok membránfelszíni molekuláihoz kötődnek. Ez utóbbiak főként kis GTPázok, például az Arl8 [5, 12], a Rab14 [13], vagy a Rab7 [14-16]. Sok olyan adaptor ismert, amely a vezikulummozgatáshoz köthető, de pontosan nem tudjuk, hogy a motor-komplex mely eleméhez kapcsolódnak. Emlősökben például a SKIP-et írták le, ami kölcsönhat az Arl8-cal és a kinezin-1-gyel is [12], de számos emlős Rab7-adaptor is ismert, például a RILP és az ORP1L [14, 15], a FYCO1 [16], valamint a PLEKHM1 és a Def8 [17]. A PLEKHM1 szerepe az autofagoszóma-lizoszóma fúzióban is ismert [18].

A kinezinok esetén a motor aktivitású fehérjék száma nagy és a könnyű láncot alkotó önálló polipeptidekből kevés van. A dineineknél ennek az ellentéte igaz. A kinezinoknak nincs feltétlen szükségük adaptorokra, a motor és a kis GTPáz közvetlen kölcsönhatására is van szakirodalmi adat [13]. A kinezinokat családokba soroljuk, míg a dineineket többféle módon csoportosíthatjuk, például a polipeptid-lánc típusa alapján (a Függelék **F1a-b. táblázata**).

Az autofagoszóma mozgatásáról kevés szakirodalmi adat áll rendelkezésre. Elképzelhető, hogy a Rab7 egy fontos szabályozó fehérje, mivel rajta van az autofagoszómaon [6, 19]. Egy közlemény szerint a Rab14 kis GTPáz szerepet játszik az autofág struktúrák mozgásában, a Klp98A kinezin segítségével. A Klp98A hiánya fúziós hibát és a vizsgált struktúrák perinukleáris elrendeződését okozta [13]. Egy másik publikáció a dinein-mediált mozgatás hipotézisét erősíti. Éheztetés hatására a Rab11 az endoszómaokról az autofagoszómaokra relokál és odatoborozza a Hook dinein-aktivátort is [20]. Asztrocitákban azt figyelték meg, hogy az autofagoszóma a sejtp periféria felé mozognak [21]. Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy

az előbbi közleményekben nem voltak egyértelműen elválasztva az autofagoszómák más autofág struktúráktól, így az eredmények nem vonatkoztathatóak a még nem fuzionált autofagoszómákra (2. ábra).



2. ábra: Az autofág struktúrák mozgásában résztvevő faktorok. MTOC, mikrotubulus organizáló centrum (saját ábra, [5, 12-17, 20, 22] alapján).

1.3. A *Drosophila* használata az autofágia-kutatásokban

A *Drosophila melanogaster* (ecetmuslica) kedvelt eszköze a molekuláris biológiai és genetikai kutatásoknak. Egyszerű és olcsó a fenntartásuk, a rövid generációs idő miatt gördülékenyen lehet velük dolgozni. Az egyszerű genomfelépítésük is előny a kutatásokban, valamint ismert a genomszekvenciájuk is. Számos mutáns és transzgenikus vonal könnyen beszerezhető törzsgyűjteményekből. Így a kutatásainkhoz megfelelő modellállatnak bizonyult az ecetmuslica [23].

Az ecetmuslicák egyedfejlődése körülbelül 10 napos. Kikelve a petéből (~1 nap), három lárvastádiumon mennek keresztül: L1, L2 (1-1 nap) és L3 (~2 nap). A bábstádium után az imágó napokon belül kikel. A muslicák lárvális zsírtestjén jól lehet vizsgálni az autofágiát fénymikroszkópiával az egy rétegben elhelyezkedő, nagy méretű poliploid sejtjei miatt. A korai L3-as lárván - ekkor még a táptalajba fúródva, intenzíven táplálkozik – éheztetéssel stresszindukált autofágiát vizsgálhatunk [24, 25]. A késői L3-as, vándorló stádiumban a lárv már nem táplálkozik, kimászik a tápból és a bebábozódás helyére megy. Ebben a stádiumban a fejlődési autofágia vizsgálható [2]. A vizsgált folyamatok konzerváltak, így az ecetmuslicában leírt eredmények alapján érvényes következtetéseket vonhatunk le más állatokra, vagy akár az emberre is.

2. Célkitűzések

- Az autofagoszómák mozgási irányának meghatározása *ecetmuslica* zsírsejtjeiben
- Az autofagoszóma-mozgáshoz szükséges fehérjefaktorok feltárása
- Az autofagoszóma-mozgás és az autofág lebontás összefüggésének vizsgálata

3. Anyagok és módszerek

3.1. *Drosophila melanogaster* genetika

A muslicákat üvegcsővekben, cukrot, agart és élesztőt tartalmazó, kukoricaliszból készült táptalajon tartottam fenn. A keresztezéseket 25 °C-on, 60%-os páratartalom mellett tartottam. A vizsgálatokhoz korai L3-as, 20%-os szacharóz-oldatban 3 órán át éheztetett lárvákat használtam, ami biztosította a magas autofág aktivitást.

Vizsgálataimhoz elsősorban klonális rendszereket használtam, melyek működésének alapja, hogy az embriókban egy hősokk-promóter véletlenszerűen aktiválódik bizonyos sejtekben és kifejez egy Flp-rekombinázt (*hs-Flp*), ami képes kivágni egy nem kódoló *CD2* spacer régiót, az azt határoló *FRT* (flippase recognition target) helyek révén, egy konstitutív *aktin5C*-promoter (*Act*) és egy *Gal4*-transzgén közül. Így az aktin-promóter megindíthatja a *Gal4* transzkripcióját. Ez egy transzkripciós aktivátor, mely az *UAS*-enhanszerhez (Upstream Activating Sequence) köt. Az *UAS*-mediált kifejeződés csak bizonyos sejtekben indul be, ahol a hősokk-promóter aktiválódott, így mozaikos szövetek jönnek létre. Az ezt a rendszert tartalmazó törzseink mindegyike hordozott valamilyen *UAS-GFP* zöld fluoreszcens riportert a klónsejtek beazonosíthatósága céljából és egy Dicer-transzgént is (*UAS-DCR2*), ami fokozza az RNS-interferencia (RNSi) hatását [26, 27].

Az autofagoszómák más autofág struktúráktól való elkülönítéséhez két olyan törzs állt rendelkezésünkre, ahol a fenti klonális rendszer mellett a HOPS-komplex egyik alegysége, a *Vps16A* is csendesítve volt, ezáltal gátolva a lizoszomális fúziót. A két törzs közötti különbség az egyikben jelenlévő, az *r4* zsírtest-specifikus promóter által kifejeződő *mCherry-Atg8a*-transzgén volt. Ez a piros fluoreszcens riportert minden autofág struktúrát jelöl. A genotípusaik:

- *hs-Flp; UAS-Vps16A RNSi, UAS-DCR2; Act>CD2>Gal4, UAS-GFPnls*
(*nls*: nukleáris lokalizációs szignál),

• *hs-Flp; UAS-Vps16A RNSi, UAS-DCR2; Act>CD2>Gal4, UAS-GFPnls, r4-mCherry-Atg8a*.

A *Vps16A* RNSi transzgént nem tartalmazó törzsekkel is dolgoztam:

• *hs-Flp; UAS-DCR2; Act>CD2>Gal4, UAS-GFPnls* [5],

• *hs-Flp; UAS-DCR2; Act>CD2>Gal4, UAS-GFPnls, r4-mCherry-Atg8a* [9].

Az autofagoszóma-lizoszóma fúzió vizsgálatához olyan törzset használtam, melyben a lizoszómákat (és egyúttal a klónsejteket) *UAS-GFP-Lamp1* jelölte, míg az autofág struktúrákat egy saját promóterről működő *3xmCherry-Atg8a* riporter:

• *hs-Flp; 3xmCherry-Atg8a, UAS-GFP-Lamp1; Act>CD2>Gal4, UAS-DCR2* [5].

A vizsgálatokhoz többségében *UAS-RNS-interferencia* transzgént hordozó vonalakat használtam. A genetikai szűréshez felhasznált törzsek forrásai és törzsszámai az **F2. táblázat**-ban találhatók. A dolgozatban szereplő kísérletekhez felhasznált törzsek: Bloomington *Drosophila* Stock Center: *luciferáz RNSi* (31603), *Rab7 RNSi* (27051), *Epg5 RNSi* (35624), *Dhc64C RNSi* (36698), *DCTN1-p150 RNSi* (24760), *DCTN2-p50 RNSi* (63693), *Khc RNSi* (25898), *Klc RNSi* (33934), *Shot RNSi* (28336) és *epg5[Gal4]* (24807); Vienna *Drosophila* Resource Center: *Vps16A RNSi* (23769); Fly Stocks of National Institute of Genetics, Japán: *Dlic RNSi* (1938 R-3) és *Def8 RNSi* (11534 R-3); FlyORF, University of Zurich: *UAS-Klp98A-3xHA* (F001727); Kyoto *Drosophila* Stock Center: *epg5[P-RS5]* (126064). A *DCTN2-p50; Khc* kettős RNSi törzs létrehozásához a *DCTN2-p50 RNSi* (63693) és a *Khc RNSi* (25898) vonalakat használtuk.

3.2. Fluoreszcens mikroszkópia

A fluoreszcens vizsgálatokhoz Plan-Apochromat 40x (NA=0,95) objektívvel (Zeiss), Orca Flash 4.0 LT sCMOS kamerával (Hamamatsu Phototonics), Apotome2-egységgel és ZEN 2.3 szoftverrel (Zeiss) ellátott Zeiss AxioImager M2 fluoreszcens mikroszkópot használtam. A lárvák zsírtestét 80% glicerint, 20% PBS-t (Phosphate Buffered Saline) és Hoechst sejtmag-festéket (1:5000) tartalmazó lefedőben boncoltam. Az immunfestett mintáknál lefedőként Vectashield-et használtam.

3.3. Immunhisztokémia

A lárvákat PBS-ben boncoltam, majd a mintákat 4%-os formalinban 40 percig fixáltam. Néhány PBS-öblítést és 2x15 perc PBS-mosást követően a preparátumokat PBTX-ben (0,1% Triton-X PBS-ben oldva) permeabilizáltam 20 percig. Ezután 5% magzati szarvasmarha szérumot (FCS, fetal calf serum) tartalmazó PBTX oldattal 30 percig blokkoltam, majd az elsőd-

leges antitestekkel egy éjszakán át inkubáltam 4 °C-on. Egy PBTX-es öblítés, egy 4%-ban NaCl-ot tartalmazó PBTX-el történő mosás, majd 2x15 perc PBTX-mosás után újból 30 perces blokkolás következett 5% FCS-PBTX-oldattal. A másodlagos ellenanyagokkal 3 óráig inkubáltam és innentől kezdve letakartam a mintákat az antitestek fényérzékenysége miatt. Három PBTX-öblítés után 4% NaCl-t és Hoechst-öt (1:5000) is tartalmazó PBTX-oldattal mostam 15 percig. Ezután egy PBTX-öblítés és 2x15 perc PBTX-mosás, majd PBS- öblítések és 2x15 perc PBS-mosási lépések követték egymást. Az antitesteket a blokkolóoldatban (5% FCS-PBTX) oldva, az alábbi hígításokban használtam.

Elsődleges antitestek: patkány anti-Atg8a - 1:800 (saját antitest [9]), egér anti-Rab7 - 1:10 (Developmental Studies Hybridoma Bank, DSHB), nyúl anti-Arl8 - 1:300 (DSHB).

Másodlagos antitestek: anti-patkány-, anti-egér- és anti-nyúl-Alexa568 (mind 1:1500; Life Technologies).

3.4. Western Blot

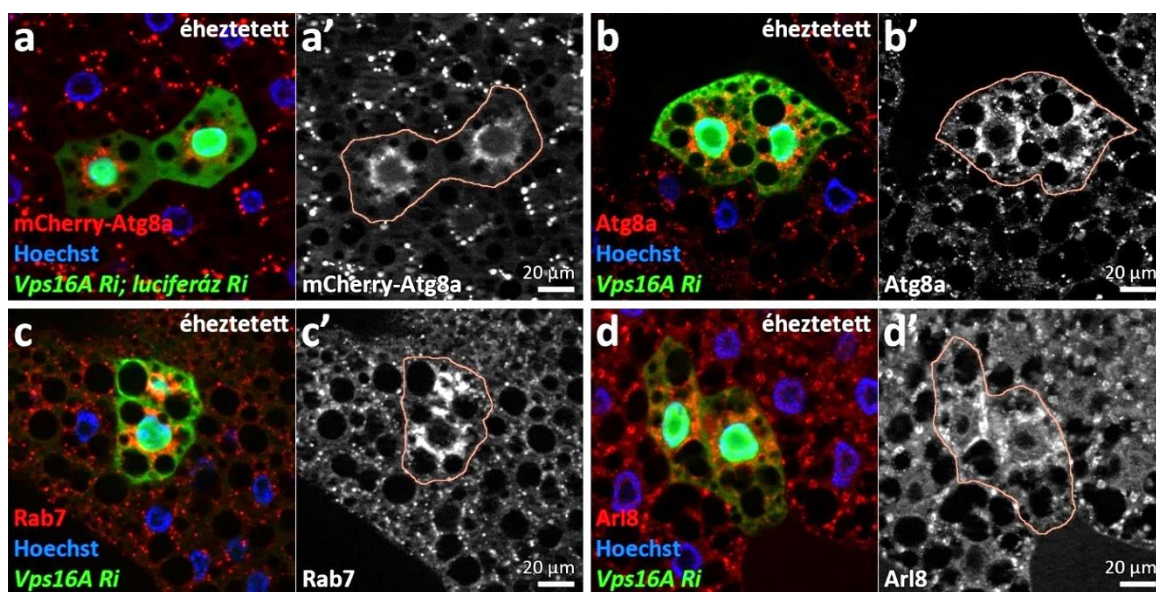
Az RNSi-transzgéneket egy zsírtest-specifikus promóterrel (*cg-Gal4*) fejeztettem ki, majd fehérjemintát készítettem a lárvákból: mg-onként 10 µl Laemmli-puffert és 10 µl PBS-t mértem rájuk és rövid centrifugálást követően 5 percig forraltam a mintákat 100 °C-on. Homogenizálás után újból 5 percig forraltam és 13300 RPM-en (round per minute) 5 percig centrifugáltam a mintákat. A 3 fázis közül a középső fehérjeréteget lepipettáztam.

A minták fehérjetartalmát 12%-os poliakrilamid-gélben elektroforézissel méret szerint szétválasztottam. 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-Atg8a - 1:5000 (saját antitest [9]); egér anti-Tubulin - 1:2000 (DSHB). Ezután 3x10 percig mostam a membránokat TBST-ben, majd a kazein-TBST 1:1 arányú elegyében oldott, alkalikus foszfatáz-konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltam azokat 1 órán át. A másodlagos antitestek: anti-nyúl-AP és anti-egér-AP - mindkettő 1:5000 (Sigma-Aldrich). 3x10 perc TBST-mosást követően alkalikus foszfatáz-pufferrel mostam 10 percig, végül az ebben oldott alkalikus foszfatáz-szubsztrátok (Nitro Blue Tetrazolium; 0,33 mg/ml és 5-bromo-4-kloro-3-indolilfoszfát; 0,165 mg/ml) hozzáadásával előhívtam a membránokat.

4. Eredmények és megvitatásuk

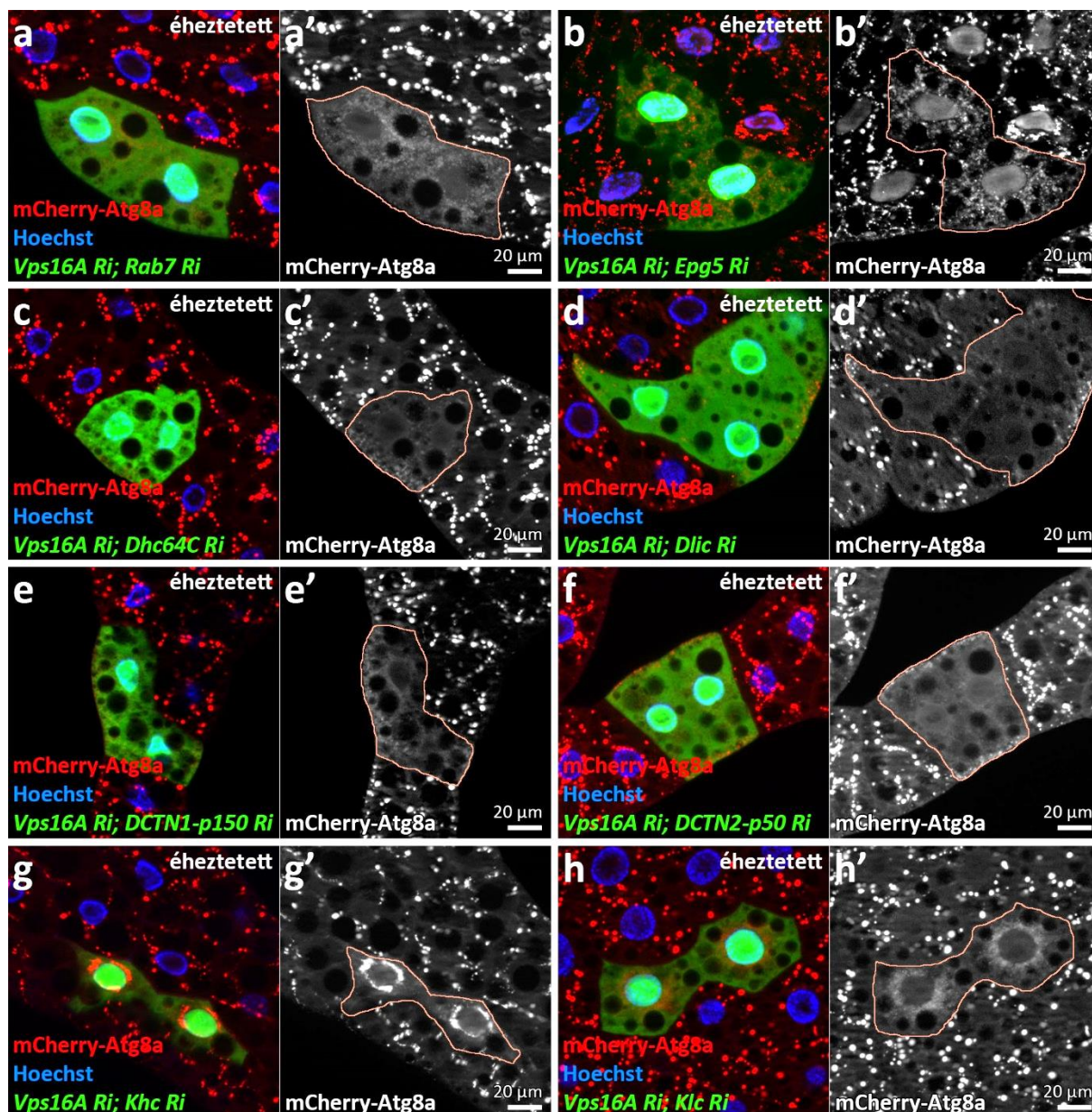
4.1. Az autofagoszóma-mozgathoz potenciálisan szükséges gének azonosítása genetikai szűréssel

Az autofagoszóma-mozgathoz molekuláris résztvevőinek azonosításához genetikai szűrést végeztünk éhezettett lárvák zsírtestén, melyhez a 3.1. alfejezetben bemutatott, mozaikosan *Vps16A*-t csendesítő, mCherry-Atg8a-t hordozó törzset használtuk. A *Vps16A* RNSi gátlja a lizoszomális fúziókat, ezáltal lehetővé téve a nem fuzionált autofagoszómák vizsgálatát. Elsőként megvizsgáltam, hogy ez a törzs megfelelően működik-e. Ehhez elsőként egy luciferáz RNSi vonallal kereszteztem be, ami - mivel olyan gént csendesít, ami nem található meg ecetmuslicában - megfelelő kontrollnak tekinthető a genetikai szűréshez. A HOPS-funkcióvesztésről ismert, hogy a zsírsejtekben az autofág struktúrák perinukleáris elrendeződését okozza [5, 28]. A *Vps16A*-csendesített (GFP-pozitív) sejtekben az mCherry-Atg8a riporter valóban perinukleáris autofagoszómákat jelölt **(3a. ábra)**. Ugyanez Atg8a-immunhisztokémiával is kimutatható volt **(3b. ábra)**. Az autofagoszómák pozitívak a Rab7 kis GTPázra [6, 19], így a Rab7 eloszlását is megvizsgáltam, amely szintén többségében perinukleáris volt **(3c. ábra)**. Ezen eredmények és a szakirodalmi előzmények [5, 28] arra utalnak, hogy az autofagoszómák alapvetően dineinek segítségével mozognak *Drosophila* zsírsejtekben. A *Vps16A* hiányában megjelenő, nem fuzionált lizoszómák szintén perinukleáris elrendeződést mutattak a lizoszómákat jelölő Arl8-ra specifikus immunjelöléssel **(3d. ábra)**.



3. ábra: A *Vps16A* csendesítése az autofagoszómák perinukleáris elrendeződését okozza. (a-d) mCherry-Atg8a riporter (a); Atg8a (b), Rab7 (c) és Arl8-immunjelölés (d). Barackszínnel a csendesített sejtek vannak körberajzolva.

Ezután megkezdtek a genetikai szűrést, melynek során a *Drosophila*-ban ismert, mikrotubuláris mozgathoz köthető fehérjéket vizsgáltuk: a motor-komplexek alegységeit, adaptorokat és regulátorokat, kis GTPázokat, továbbá a mikrotubulusok és az MTOC alkotóelemeit. A szűrés eredményeit a Függelék **F2. táblázata** foglalja össze. A szűrés során a Vps16A és luciferáz RNSi esetén tapasztalt perinukleáris elrendeződést (**3a. ábra**) tekintettük kontrollnak és azt vizsgáltuk, hogy milyen fehérjék hiánya és hogyan változtatja meg ezt a mintázatot.



4. ábra: A genetikai szűrés néhány kiemelt eredménye. (a-h) A Rab7 (a), az Epg5 (b), a dineinek és dinaktinok (c-f) és egyes kinezinek (g-h) csendesítése Vps16A RNSi genetikai háttérén. Barackszínnel a csendesített sejtek vannak körberajzolva.

Több fenotípus-kategóriát is elkülöníthettem: perinukleáris, perifériás, szétszórt és ezektől eltérő, kevésbé jól kategorizálható mintázatokat is. A kis GTPázok közül a Rab7 (**4a. áb-**

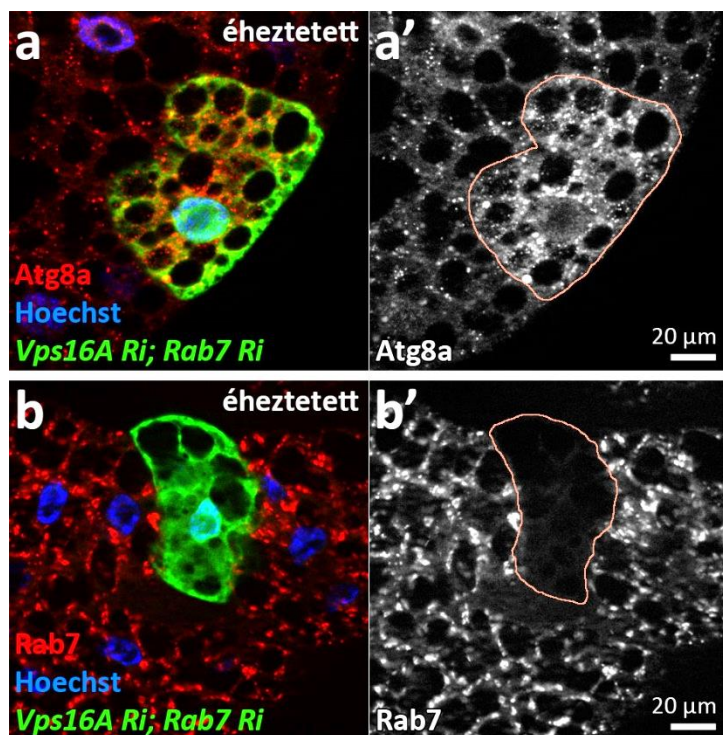
ra), a Rab11, a Rab39 és a Rab40 csendesítése mutatott eltérést a perinukleáris eloszlástól; mindegyik esetén szétszórva helyezkedtek el az autofagoszómák a citoszólban. Az adaptor fehérjék közül találatként az Epg5 **(4b. ábra)** és a Def8, a különféle dinein-regulátorok közül a Girdin és a Lis-1 jött ki, ezek hiánya szintén szétszórta az autofagoszómákat. A Rab7 aktív komplexének két eleme, a Mon1 és a Ccz1 [6] is találatként jött ki, melyek csendesítése a Rab7-hez hasonló fenotípust adott. A citoplazmatikus dinein-dinaktin komplex elemei közül találatként a következők jöttek ki: a dineinek közül a Dhc64C (motor-doménes fehérje) **(4c. ábra)**, a Dlic (könnyű-köztes lánc) **(4d. ábra)**, az sw (köztes lánc), a Dlc90F (könnyű lánc) és a Cdlc2 (könnyű lánc), míg a dinaktin-komplex elemei közül a DCTN1, a DCTN2 **(4e-f. ábra)** és a DCTN4. Megfigyeltem, hogy ezen fehérjék hiányában az autofagoszómák a sejt periferiájára kerülnek ki. Ha feltételezzük, hogy ebben az esetben a kinezinek átvehetik a mozgató funkciót, akkor ez fordítva is igaz lehet, esetleg a kinezinek hiányában „perinukleárisabb” lesz a fenotípus a kontrollnál. Ezt azonban nem figyeltem meg; a szűrés során a kinezinek mindegyike a kontroll esethez hasonló perinukleáris fenotípust mutatott **(4g-h. ábra)**. A három alapvető fenotípus-kategóriától eltérő elrendeződést alapvetően az MTOC építőelemeinek csendesítésekor tapasztaltam, míg a tubulinok hiánya szétszórta az autofagoszómákat **(F2. táblázat)**. Mindezek alapján arra következtettem, hogy az autofagoszómákra valóban a dinein-mediált mozgás jellemző, de ennek hiányában ezt a szerepet valószínűleg kinezinek veszik át. Továbbá, a megfelelő kis GTPázok, adaptorok és regulátorok hiányában az autofagoszómák egyik irányba sem tudnak mozogni.

A fenti találatok közül a legfontosabbakat választottam ki további vizsgálatra. A kis GTPázok közül a Rab7-tel foglalkoztam tovább, melyről ismert, hogy megtalálható az autofagoszómákon és szabályozza azok lizoszomális fúzióit [6, 19]. Az adaptorok közül az autofág funkciókkal bíró, Rab7-et kötő Epg5-öt vizsgáltam tovább [29-31]. A dinein-dinaktin-komplex elemei közül a Dhc64C-t, a Dlic-et, valamint a dinaktin-komplex két tagját (DCTN1/2) választottam. A dolgozat további részében ezen eredményeket mutatom be.

4.2. Az autofagoszóma-mozgás molekuláris faktorainak karakterizálása

A továbbiakban az eredményeimet immunhisztokémiai kísérletekkel erősítettem meg, amelyhez a 3.1. alfejezetben bemutatott, Vps16A-t csendesítő, de mCherry-Atg8a-t nem tartalmazó törzset alkalmaztam. Elsőként a Rab7 csendesítését vizsgáltam Atg8a-jelöléssel és azt tapasztaltam, hogy az Atg8a-pozitív autofagoszómák egyenletesen szétszóródtak a citoplazmában **(5a. ábra)**, ami feltételezi, hogy a Rab7 mindkét irányú mozgásban szerepet játszhat. Az RNS-interferencia hatékony működését Rab7-jelöléssel validáltam **(5b. ábra)**. Ezután az

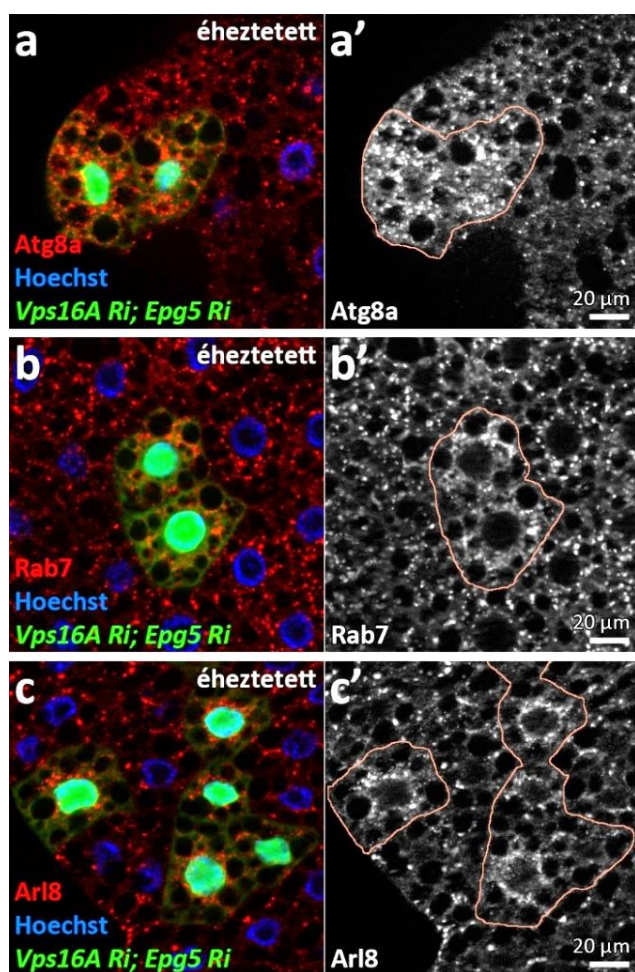
Epg5 adaptort vizsgáltam, melynek csendesítése szintén szétszórt autofagoszóma-mintázatot mutatott Atg8a- és Rab7-immunjelöléssel (**6a-b. ábra**), tehát az Epg5 a Rab7-hez hasonlóan mindkét irányú mozgathoz szükséges lehet. Ezen eredmények összhangban vannak azzal, hogy az Epg5 ismert kölcsönható partnere a Rab7 [30]. Továbbá eredményeim alapján az Epg5 jelenléte nélkül is rákerül az autofagoszómákra az Atg8a és a Rab7. A nem fuzionált lizoszómák helyzetét is megnéztem az Epg5 hiányában Arl8-immunfestéssel; nem változott a lizoszómák perinukleáris elrendeződése (**6c. ábra**), tehát nem kell a mozgásukhoz.



5. ábra: A Rab7 csendesítése az Atg8a-pozitív autofagoszómák szétszóródását okozza. (a-b) A Rab7 csendesítése *Vps16A RNSi* genetikai háttéren Atg8a (a) és Rab7 (b) - immunjelöléssel. Barackszínnel a csendesített sejtek vannak körberajzolva.

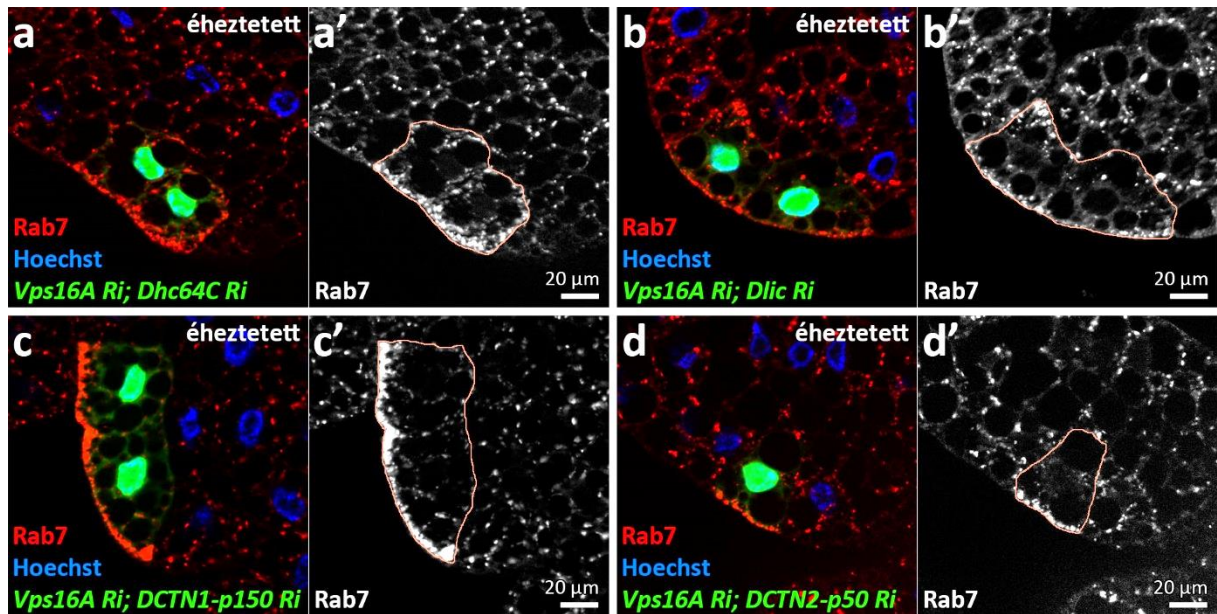
A kiválasztott dinein- és dinaktin-alegységek csendesítése esetén Rab7-immunjelöléssel kimutattam, hogy az autofagoszómák a sejt periferiájára mozognak (**7. ábra**), amiből az következik, hogy ha a dinein irányította mozgathoz nem tud létrejönni, egyes kinezinok átveszik a helyüket. Ebből kiindulva megvizsgáltam a dinein- és kinezin-mediált mozgathoz viszonyát is. Ehhez elsőként a genetikai szűréshez használt törzset bekeresztettem egy, a Klp98A kinezint túltermelő vonallal. Szakirodalmi adatok alapján ez a kinezin szükséges az autofág struktúrák mozgathoz [13]. A megnőtt Klp98A-szint szétszórt autofagoszóma-mintázathoz vezetett, sőt, néhol kis mértékű perifériás átrendeződés is megfigyelhető volt (**8a. ábra**). Ezek alapján a citoplazmatikus motorfehérjék aránya fontos a mozgathoz irányának meghatározásához, tehát kompetitív viszony állhat fenn a dineinek és kinezinek között. Megvizsgáltam azt is, hogy mi történik, ha mindkét irányú mozgathoz gátolva van, egy dinaktin (DCTN2-p50) és kinezin (Khc) kettős csendesítéssel *Vps16A RNSi* háttéren. Meglepő módon egyértelmű perinukleáris

és perifériás halmozódás is megfigyelhető volt egyazon sejten belül (**8b. ábra**). Ezen eredmények alapján az alapvető dinein-dinaktin-komplex általi mozgatás mellett a kinezinnek is részt vehetnek az autofagoszómák pozicionálásában. Annak tisztázására, hogy pontosan mely motor-komplexek között áll fenn kompetitív viszony, illetve miként jelent előnyt ez a sejteknek, további kutatások szükségesek. Felvetődhet a kérdés, hogy más sejtípusokban is a dineinek általi mozgatás a preferált-e, hiszen van olyan szakirodalmi adat, amely kinezin-mediált mozgást valószínűsít [21]. Elképzelhető, hogy a különféle sejtípusokban másképpen szabályozódik ez a folyamat.

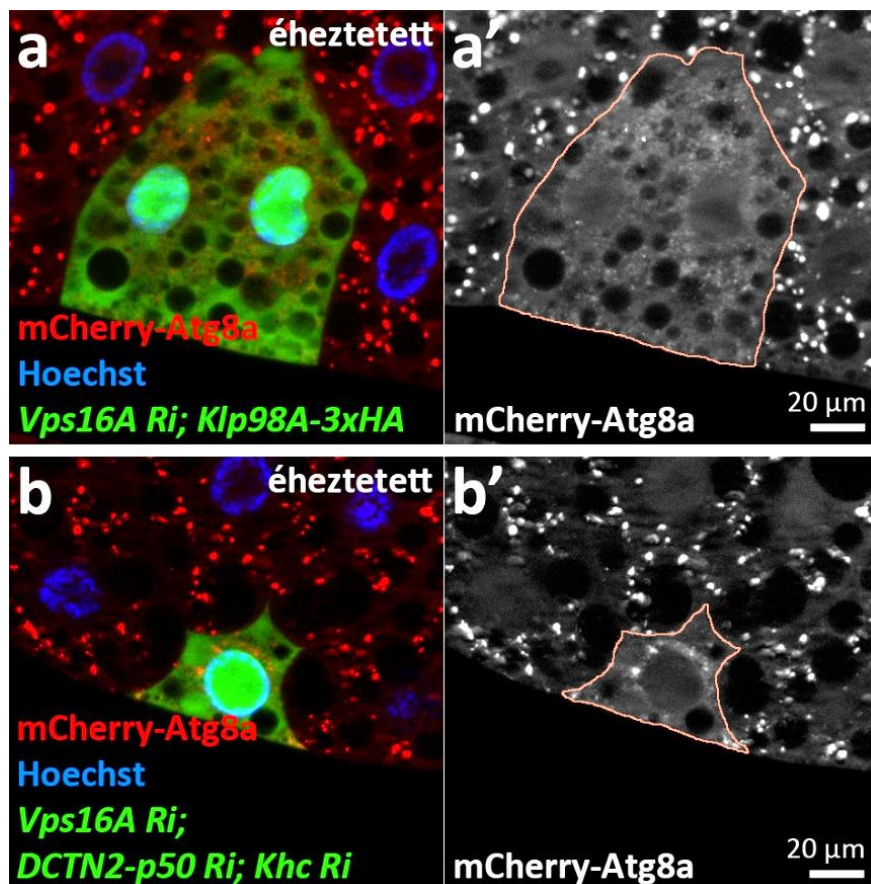


6. ábra: Az Epg5 szükséges az autofagoszóma-mozgathoz, míg a lizoszómákéhoz nem. (a-c) Atg8a (a), Rab7 (b) és Arl8 (c) - immunfestés az Epg5 csendesítése esetén, Vps16A RNSi háttéren. Barackszínnel a csendesített sejtek vannak körberajzolva.

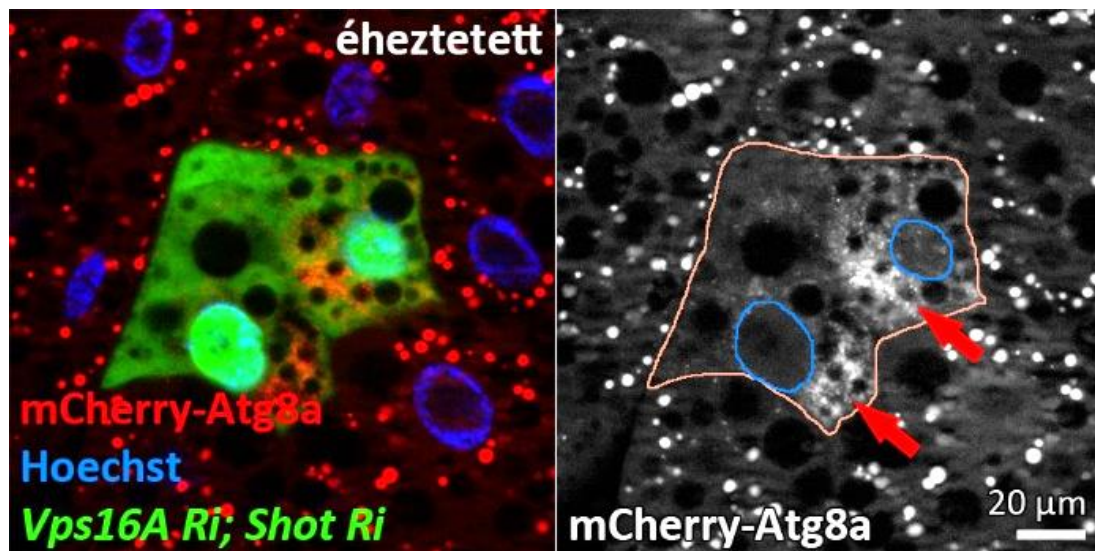
Ismert, hogy a zsírsejtek egyik non-centroszomális MTOC-komponense, a Shot fehérje hiányában ugyan képződnek mikrotubulusok, de az MTOC áthelyeződik máshová a citoszolban [11] és egyes kompartmentek is eköré rendeződnek [32]. Kíváncsi voltam, hogy a fúzióképtelen autofagoszómák perinukleáris mozgása valóban az MTOC felé irányul-e? Ehhez egy *Shot* RNSi vonalat kereszteztem a szűréshez használt törzzsel. Várakozásaimnak megfelelően, az autofagoszómák nem a sejtmag köré, hanem egy határozottan elkülönülő fókuszpontba gyűltek össze (**9. ábra**). Ez alapján valóban az MTOC körül halmozódnak a dineinek által mozgatott autofagoszómák.



7. ábra: A dinein-dinaktin komplex csendesítése az autofagoszómák perifériás elrendeződését okozza. (a-d) A dinein- és dinaktin-alegységek csendesítése Vps16A RNSi háttéren Rab7-immunjelöléssel. Barackszínnel a csendesített sejtek vannak körberajzolva.



8. ábra: A kinezinek és dineinek viszonya az autofagoszómák mozgásában. (a-b) A Klp98A kinezin túlermelése (a) és egy dinaktin-kinezin dupla csendesítés (b) Vps16A RNSi háttéren. Barackszínnel a csendesített és túlermelő sejtek vannak körberajzolva.

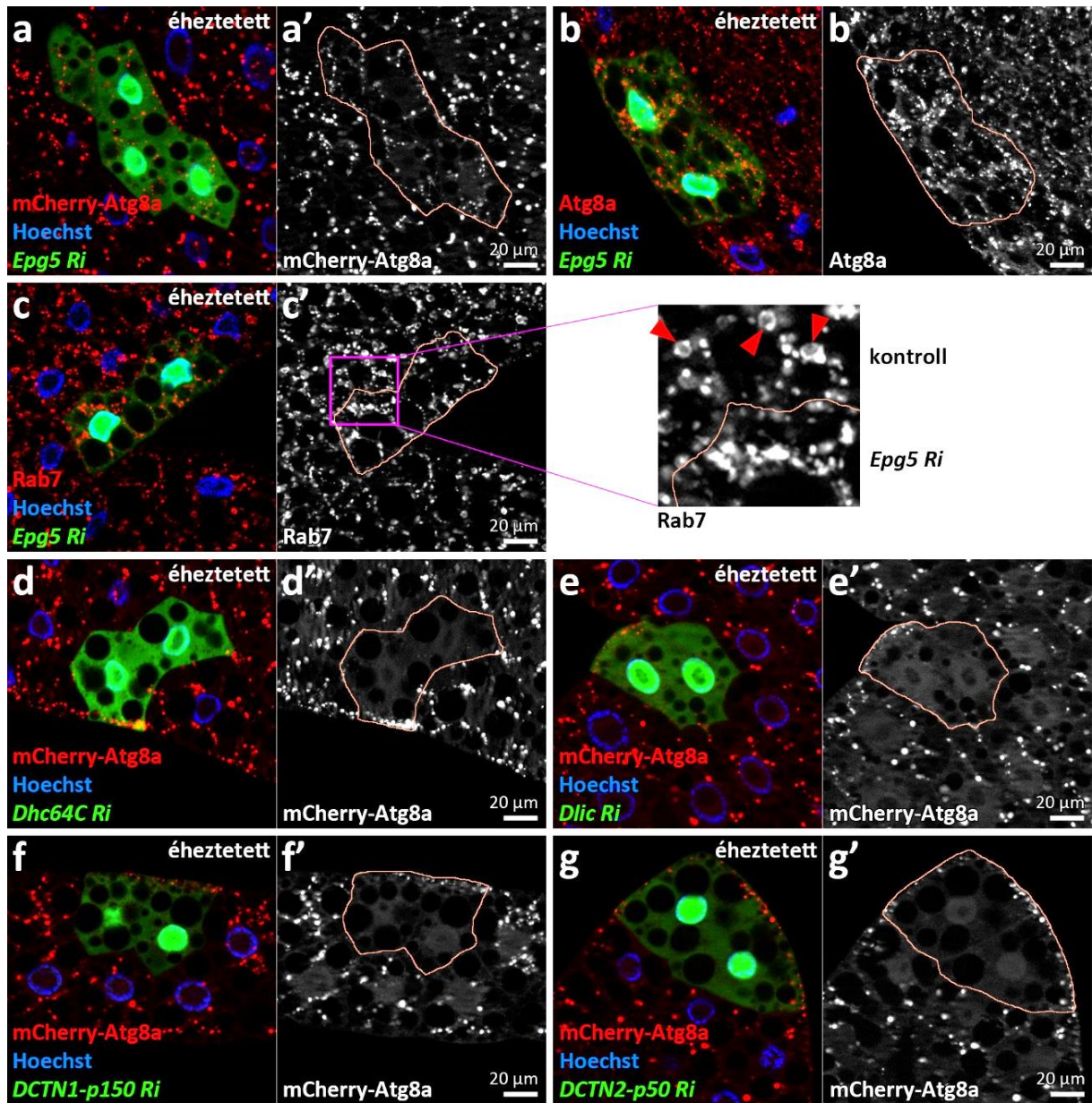


9. ábra: A Shot csendesítése esetén az autofagoszómák az áthelyeződött MTOC felé mozognak. A Shot csendesítése *Vps16A RNSi* sejtekben. Barackszínnel a csendesített sejtek, kékkel a sejtmagok vannak körberajzolva. A piros nyilak az áthelyeződött MTOC köré gyűlő autofagoszómákat mutatják.

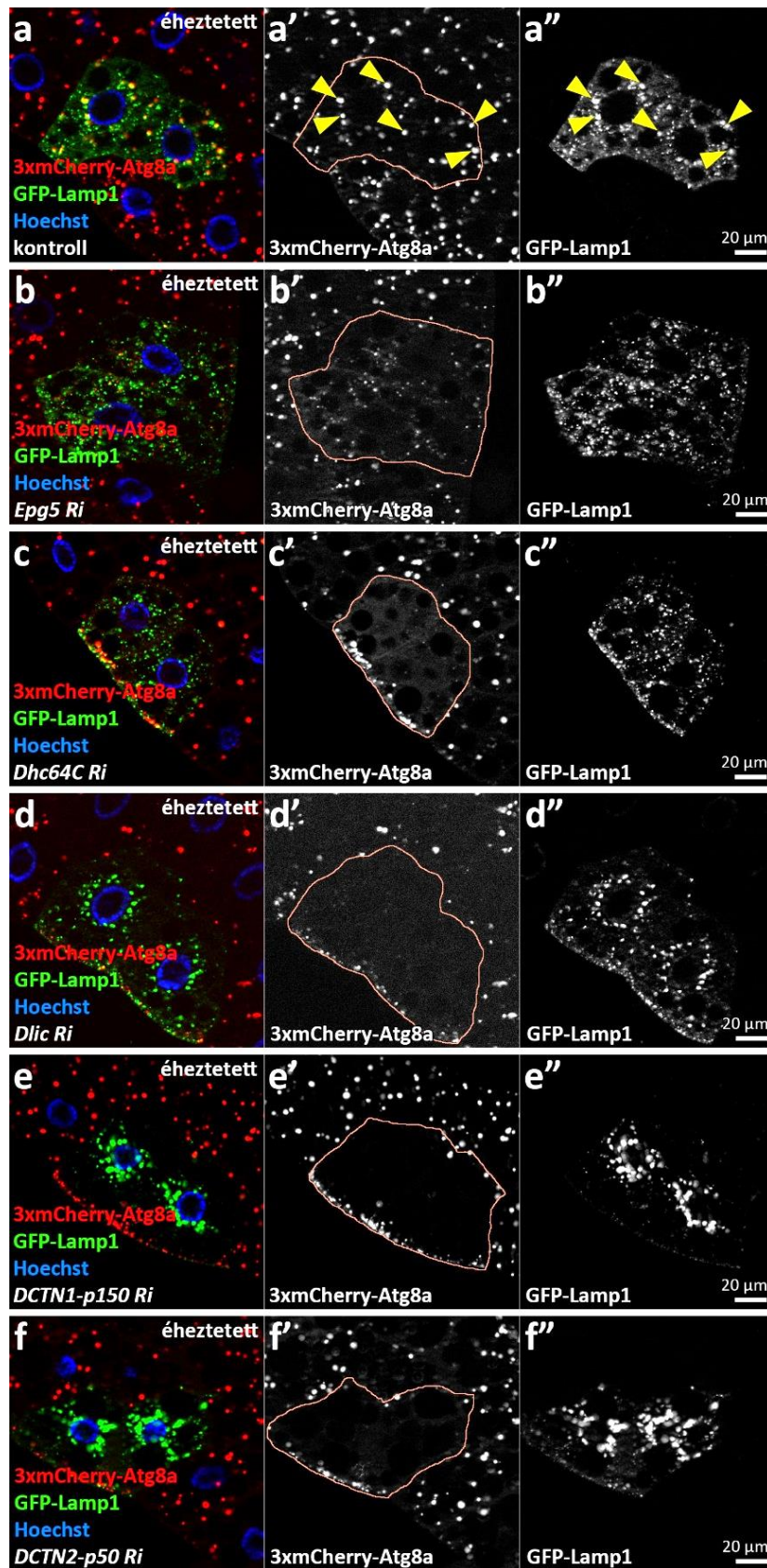
4.3. Az autofagoszómák motilitásának kapcsolata az autofág lebontással

A következőkben azt vizsgáltam, hogy a megfelelő autofagoszóma-motilitás szükséges-e a makroautofág lebontáshoz. Ehhez viszont szükség volt a fúzió lehetőségére a sejtekben, ezért a fentiekhez hasonlóan működő, de a *Vps16A RNSi* konstrukciót nem tartalmazó törzset használtam (genotípusaik a 3.1. alfejezetben megtalálhatók). Az összes vizsgált csendesítés esetén szembevető volt a klónsejtekben a kisebb mCherry-Atg8a-pozitív struktúraméret a kontroll sejtekhez képest, ami legalább részleges fúziós hibára utal (**10a, d-g. ábra**). Az Epg5 funkcióvesztését Atg8a- és Rab7-immunfestéssel is vizsgáltam. Az Atg8a szintje megemelkedett a csendesített sejtekben, amely szintén az autofág lebontás zavarára utal (**10b. ábra**). A Rab7 jele kontroll sejtekben nagy autolizoszómákat reprezentáló gyűrűkként jelent meg, míg a csendesített sejtekben ezek nem voltak jelen (**10c. ábra**).

Annak igazolására, hogy ezek a fenotípusok valóban a fúzió hibájára vezethetők vissza, olyan törzset használtam, amiben 3xmCherry-Atg8a-val az autofág struktúrák, míg GFP-Lamp1-gyel a lizoszómák, egyben a csendesítő klónsejtek voltak jelölve (genotípusa szerepel a 3.1. alfejezetben). Kontroll sejtekben a két riporter nagy autolizoszómákon kolokalizál (**11a. ábra**). Ezzel szemben a kolokalizáció csökkenése megfigyelhető volt mind az Epg5, mind a dinein- és dinaktin-alegységek csendesítése esetén (**11b-f. ábra**).

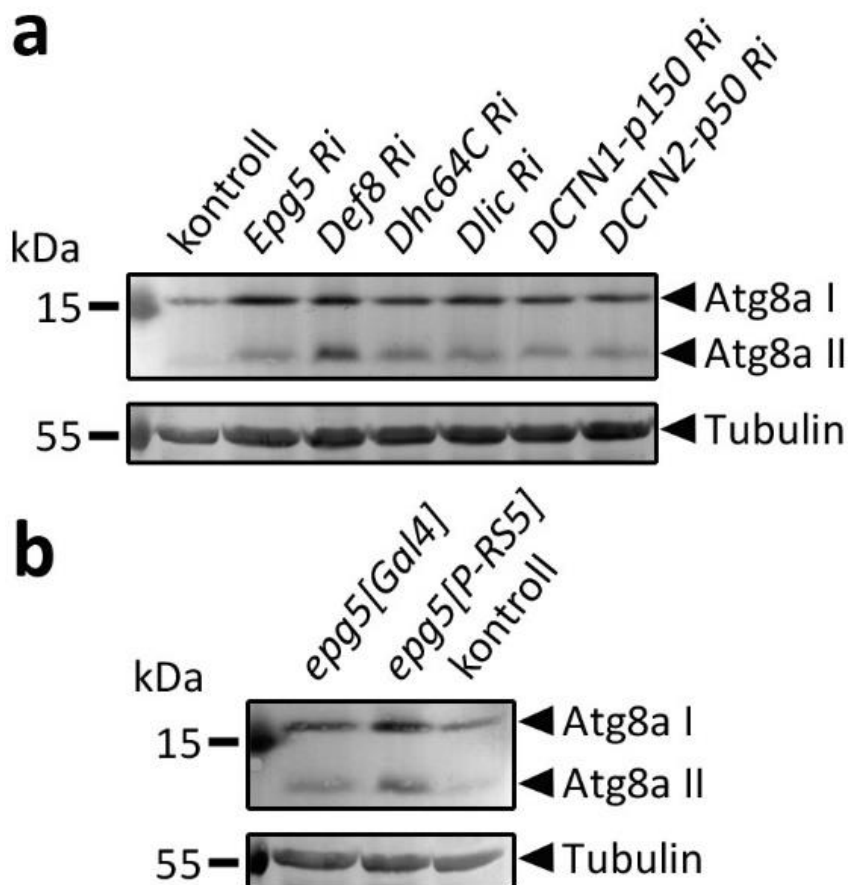


10. ábra: Az abnormalis autofagoszóma-mozgatás autolizoszóma-érési hibát okoz. **(a-c)** Epg5-csenedesítés mCherry-Atg8a riporterrel (a), Atg8a (b) és Rab7 (c) -immunfestéssel. A 3x nagyítású panelen a kontroll sejtben piros nyílfejek mutatják a gyűrűket. **(d-g)** A dinein- és dinaktin-alegységek csenedesítése mCherry-Atg8a riporterrel. Barackszínrel a csenedesített sejtek vannak körberajzolva.



11. ábra: Az abnormalis autofagoszóma-mozgatás fúziós hibát okoz. (a-f) A 3xmCherry-Atg8a és a GFP-Lamp1 riporterek kolokalizációja kontroll (a sárga nyílfejek átfedő struktúrákat mutatnak) (a), Epg5 (b), illetve a dinein- és dinaktin-alegységek (c-f) esetén. Barackszínnel a csendesített (GFP-Lamp1+) sejtek vannak körberajzolva.

A lebontási hiba kimutatására Western blot kísérleteket is végeztem, melynek során az autofágiával lebomló Atg8a szintjét vizsgáltam. Ennek két formája detektálható Western blot segítségével: a citoszólikus Atg8a I és az autofág membránokon lévő, lipidált Atg8a II [24]. Eredményeim alapján az Atg8a mindkét formáját kis mértékben halmozzák a vizsgált csendesítések (**12a. ábra**), ami az autofág lebontás részleges hibájára utal. Erősebb halmozódást a Def8 adaptor csendesítése mutatott, amely az Epg5-höz hasonlóan a szűrés során szétszórta autofagoszómákat okozott. A Def8-funkcióvesztés erősebb fenotípusa valószínűleg annak köszönhető, hogy a Def8 lizoszomális adaptorként ismert [17]. Két, potenciálisan mutáns *epg5*-allélt is vizsgáltam Western blot-tal: az egyik egy Gal4 kódoló szekvenciát (*epg5[Gal4]*), míg a másik egy transzpozábilis elemet hordozott (*epg5[P-RS5]*) az *Epg5* génben. Mindkét esetben az Atg8a két formájának a megemelkedett szintjét mutattam ki (**12b. ábra**).



12. ábra: Az autofagoszóma-mozgatásban szereplő faktorok csendesítése részleges autofág lebontási hibához vezet. (a-b) Western blot zsírtest-specifikusan csendesített (a) és különböző *epg5*-allélokat hordozó (b) lárvákból készült fehérjemintákból. A Tubulin feltöltési kontrollként szolgált. kDa, kilodalton.

Mindezen eredményekből arra következtethetünk, hogy bár nem szűnik meg teljesen a lebontás, de egyértelműen csökken a hatékonysága megfelelő autofagoszóma-mozgatás nélkül. Az autofagoszómák mozgatásának nem megfelelő működése nagy károkat okozhat a sejt homeosztázisában. Erre példa az Epg5 hiányában kialakuló súlyos neurodegeneratív betegség, a Vici-szindróma [29]. Az autofagoszóma-mozgatás molekuláris szabályozásának feltárása tehát nagy jelentőséggel bír. Reményeim szerint eredményeim hasznos alapot biztosítanak majd további kutatásokhoz és hozzájárulhatnak majd új terápiák fejlesztéséhez.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik segítettek munkámat. Külön köszönöm támogatásukat és tanácsaikat: Dr. Boda Attilának, Dr. Lőrincz Péternek, Dr. Lippai Mónikának, Nagy Anikónak és Pálfia Zsoltnénak.

Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott **Balázs Villő** nyilatkozom, hogy a 36. OTDK-ra benyújtott **Az autofagoszóma-mozgatás molekuláris faktorainak azonosítása ecetmuslicában** című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Részfeladat	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán jellemezve)
<i>A dolgozatban bemutatott genetikai szűrés során tesztelt vonalak mikroszkópos feldolgozása</i>	4
<i>Ecetmuslica-törzsek fenntartása, keresztezése</i>	5
<i>A vizsgálandó fénymikroszkópos preparátumok előkészítése, feldolgozása</i>	5
<i>Immunhisztokémiai kísérletek elvégzése</i>	5
<i>Fehérjeminták készítése</i>	5
<i>Western blot kísérletek elvégzése</i>	5

Kelt: Budapest, 2023. január 18.



Balázs Villő

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítjük:



Dr. Boda Attila

ELTE-TTK, Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai
Tanszék



Dr. Lőrincz Péter

ELTE-TTK, Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai
Tanszék

Irodalomjegyzék

1. Moreau, K., S. Luo, and D.C. Rubinsztein, *Cytoprotective roles for autophagy*. Curr Opin Cell Biol, 2010. 22(2): p. 206-11.
2. Rusten, T.E., et al., *Programmed autophagy in the Drosophila fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway*. Dev Cell, 2004. 7(2): p. 179-92.
3. Feng, Y., et al., *The machinery of macroautophagy*. Cell Res, 2014. 24(1): p. 24-41.
4. Nishimura, T. and S.A. Tooze, *Emerging roles of ATG proteins and membrane lipids in autophagosome formation*. Cell Discov, 2020. 6(1): p. 32.
5. Boda, A., et al., *Drosophila Arl8 is a general positive regulator of lysosomal fusion events*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2019. 1866(4): p. 533-544.
6. Hegedus, K., et al., *The Ccz1-Mon1-Rab7 module and Rab5 control distinct steps of autophagy*. Mol Biol Cell, 2016. 27(20): p. 3132-3142.
7. Lorincz, P., et al., *Rab2 promotes autophagic and endocytic lysosomal degradation*. J Cell Biol, 2017. 216(7): p. 1937-1947.
8. Lorincz, P. and G. Juhasz, *Autophagosome-Lysosome Fusion*. J Mol Biol, 2020. 432(8): p. 2462-2482.
9. Takats, S., et al., *Autophagosomal Syntaxin17-dependent lysosomal degradation maintains neuronal function in Drosophila*. J Cell Biol, 2013. 201(4): p. 531-9.
10. Mizushima, N., et al., *Autophagy fights disease through cellular self-digestion*. Nature, 2008. 451(7182): p. 1069-75.
11. Zheng, Y., et al., *A perinuclear microtubule-organizing centre controls nuclear positioning and basement membrane secretion*. Nat Cell Biol, 2020. 22(3): p. 297-309.
12. Rosa-Ferreira, C. and S. Munro, *Arl8 and SKIP act together to link lysosomes to kinesin-1*. Dev Cell, 2011. 21(6): p. 1171-8.
13. Mauvezin, C., et al., *Coordination of autophagosome-lysosome fusion and transport by a Klp98A-Rab14 complex in Drosophila*. J Cell Sci, 2016. 129(5): p. 971-82.
14. Johansson, M., et al., *Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor betaIII spectrin*. J Cell Biol, 2007. 176(4): p. 459-71.
15. Jordens, I., et al., *The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors*. Curr Biol, 2001. 11(21): p. 1680-5.
16. Pankiv, S., et al., *FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport*. J Cell Biol, 2010. 188(2): p. 253-69.
17. Fujiwara, T., et al., *PLEKHM1/DEF8/RAB7 complex regulates lysosome positioning and bone homeostasis*. JCI Insight, 2016. 1(17): p. e86330.
18. McEwan, D.G., et al., *PLEKHM1 regulates autophagosome-lysosome fusion through HOPS complex and LC3/GABARAP proteins*. Mol Cell, 2015. 57(1): p. 39-54.
19. Gao, J., et al., *Molecular mechanism to target the endosomal Mon1-Ccz1 GEF complex to the pre-autophagosomal structure*. Elife, 2018. 7.
20. Szatmari, Z., et al., *Rab11 facilitates cross-talk between autophagy and endosomal pathway through regulation of Hook localization*. Mol Biol Cell, 2014. 25(4): p. 522-31.
21. Hilverling, A., et al., *Maturing Autophagosomes are Transported Towards the Cell Periphery*. Cell Mol Neurobiol, 2022. 42(1): p. 155-171.
22. Pu, J., et al., *BORC, a multisubunit complex that regulates lysosome positioning*. Dev Cell, 2015. 33(2): p. 176-88.

23. Beckingham, K.M., et al., *Drosophila melanogaster--the model organism of choice for the complex biology of multi-cellular organisms*. Gravit Space Biol Bull, 2005. 18(2): p. 17-29.
24. Lorincz, P., C. Mauvezin, and G. Juhasz, *Exploring Autophagy in Drosophila*. Cells, 2017. 6(3).
25. Nagy, P., et al., *How and why to study autophagy in Drosophila: it's more than just a garbage chute*. Methods, 2015. 75: p. 151-61.
26. Phelps, C.B. and A.H. Brand, *Ectopic gene expression in Drosophila using GAL4 system*. Methods, 1998. 14(4): p. 367-79.
27. Theodosiou, N.A. and T. Xu, *Use of FLP/FRT system to study Drosophila development*. Methods, 1998. 14(4): p. 355-65.
28. Takats, S., et al., *Interaction of the HOPS complex with Syntaxin 17 mediates autophagosome clearance in Drosophila*. Mol Biol Cell, 2014. 25(8): p. 1338-54.
29. Byrne, S., et al., *EPG5-related Vici syndrome: a paradigm of neurodevelopmental disorders with defective autophagy*. Brain, 2016. 139(Pt 3): p. 765-81.
30. Gillingham, A.K., et al., *Toward a comprehensive map of the effectors of rab GTPases*. Dev Cell, 2014. 31(3): p. 358-373.
31. Wang, Z., et al., *The Vici Syndrome Protein EPG5 Is a Rab7 Effector that Determines the Fusion Specificity of Autophagosomes with Late Endosomes/Lysosomes*. Mol Cell, 2016. 63(5): p. 781-95.
32. Sun, T., et al., *Spectraplakins Shot Maintains Perinuclear Microtubule Organization in Drosophila Polyploid Cells*. Dev Cell, 2019. 49(5): p. 731-747 e7.

Függelék

F1a. táblázat: a *Drosophila* kinezinok legközelebbi emlős homológjai.

KINEZIN-CSALÁD	DROSOPHILA	EMLŐS
kinezin-1	Khc	KIF5B
kinezin-2	Kif3C	KIF17
	Klp64D	KIF3A
	Klp68D	KIF3B
kinezin-3	Khc-73	KIF13A
	Klp98A	KIF16B
	unc-104	KIF1A
	neb	KIF14
kinezin-4	Klp3A	KIF4A
	Klp31E	KIF21A, KIF21B
	cos	KIF7, KIF27
kinezin-5	Klp61F	KIF11
kinezin-6	pav	KIF23
	sub	KIF20A
kinezin-7	cana, cmet	CENPE
kinezin-8	Kif19A	KIF19
	Klp67A	KIF18A
kinezin-10	nod	KIF22
kinezin-11	CG14535	KIF26A, KIF26B
kinezin-12	Klp54D	KIF12
kinezin-13	Klp10A	KIF2A, KIF2C
	Klp59C	KIF2A, KIF2B, KIF2C
	Klp59D	KIF2C
kinezin-14	ncd	KIFC1
-	CG10845	-
könnyű lánc	Klc	KLC1-4

F1b. táblázat: a *Drosophila* citoplazmatikus dineinek és dinaktinok legközelebbi emlős homológjai.

TÍPUS	DROSOPHILA	EMLŐS
nehéz lánc (DHC)	Dhc64C	DYNC1H1
	btv	DYNC2H1
köztes lánc (DIC)	sw	DYNC1I1, DYNC1I2
könnyű-köztes lánc (DLIC)	Dlic	DYNC1LI1
	CG3769	DYNC2LI1
könnyű lánc (DLC)	Cdlc2, ctp	DYNLL2
	Dlc90F	DYNLT1
	Dnali1	DNALI1
	CG8800	DNAL1
	robl, robl22E, robl37BC, robl62A	DYNLRB2
	CG5359, CG7276	DYNLT2B
dinaktin-komplex	DCTN1-p150, CG9279	DCTN1
	DCTN2-p50	DCTN2
	DCTN3-p24	DCTN3
	DCTN4-p62	DCTN4
	DCTN5-p25	DCTN5
	DCTN6-p27	DCTN6
	cpa	CAPZA1, CAPZA2
	cpb	CAPZB
	Arp1	ACTR1A
	Arp10	ACTR10

F2. táblázat: a genetikai szűréshez használt RNS-interferencia vonalak.

GÉN	TÖRZSSZÁM	FORRÁS	FENOTÍPUS
Kis GTPázok			
Rab1	27299 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Rab1	34670 HMS	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Rab2	28701 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Rab2	34767 GD	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
Rab3	100787 KK	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
Rab3	31691 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Rab4	24672 GD	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
Rab4	33757 HMS	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Rab5	30518 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Rab5	67877 GL	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Rab6	27490 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Rab6	100774 KK	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
Rab7	40337 GD	Vienna Drosophila Resource Center	szórt
Rab7	27051 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	szórt
Rab8	27519 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Rab8	28092 GD	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
Rab9	107192 KK	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
Rab9	31688 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Rab9D	49738 GD	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
Rab9Db	109089 KK	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
Rab9Db	38269 HMS	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Rab9Fb	34374 HMS	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Rab10	26289 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Rab10	101454 KK	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
Rab11	27730 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	szórt
Rab11	108382 KK	Vienna Drosophila Resource Center	enyhén szórt
Rab14	28708 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Rab14	104392 KK	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
Rab18	27665 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Rab18	40228 GD	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
Rab19	34607 HMS	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Rab19	103653 KK	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
Rab21	29403 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Rab23	13147 GD	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
Rab26	31177 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Rab26	101330 KK	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
Rab27	50537 GL	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Rab27	31887 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	enyhén szórt
Rab30	31120 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris

Rab32	104348 KK	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
Rab35	28342 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Rab39	25953 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	szórt
Rab40	29579 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	szórt, Atg8a- klaszterek
RabX1	330763 shRNA	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
RabX2	103311 KK	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
RabX4	28704 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
RabX5	28045 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
RabX6	26281 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Arl8	7891 R-2	Fly Stocks of National Institute of Gene- tics	perinukleáris
Regulátorok, adaptorok			
Mon1	11926 R-1	Fly Stocks of National Institute of Gene- tics	szórt
Ccz1	18479 GD	Vienna Drosophila Resource Center	szórt
Epg5	35624 GL	Bloomington Drosophila Stock Center	szórt
Epg5	17469 GD	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
Epg5	110420 KK	Vienna Drosophila Resource Center	enyhén szórt
RilpL	11448 R-3	Fly Stocks of National Institute of Gene- tics	perinukleáris
PLEKHM1	HMJ23550	Fly Stocks of National Institute of Gene- tics	perinukleáris
PLEKHM1	108079 KK	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
PLEKHM1	42065 GD	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
prd1	108557 KK	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
Def8	11534 R-1	Fly Stocks of National Institute of Gene- tics	szórt
Def8	11534 R-3	Fly Stocks of National Institute of Gene- tics	szórt
Def8	28312 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	enyhén szórt
Hook	35483 GD	Vienna Drosophila Resource Center	enyhén szórt
Hook	64663 HMC	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
BicD	108084 KK	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
BicD	27683 GD	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
BicD	28571 HM	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
BicD	35405 GL	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
BicD	42929 HMS	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
nuf	31493 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Milt	44477 HMC	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Milt	28385 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Spindly	34933 HMS	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Htt	31264 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Lis-1	28663 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	szórt

Girdin	67960 HMS	Bloomington Drosophila Stock Center	szórt
Dineinek, dinaktinok			
Dhc64C	28053 GD	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
Dhc64C	36698 HMS	Bloomington Drosophila Stock Center	perifériás
Dhc64C	36583 GL	Bloomington Drosophila Stock Center	enyhén szórt
Dhc64C	28749 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	perifériás
btv	105152 KK	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
btv	19323 GD	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
btv	28373 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
sw	30505 HM	Bloomington Drosophila Stock Center	perifériás
Dlic	1938 R-3	Fly Stocks of National Institute of Gene- tics	perifériás
Dlic	66981 HMS	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Dlc90F	31749 GD	Vienna Drosophila Resource Center	enyhén szórt
Dlc90F	31750 GD	Vienna Drosophila Resource Center	szórt
Dlc90F	65189 HMC	Bloomington Drosophila Stock Center	szórt
Cdlc2 + ctp	42862 HMS	Bloomington Drosophila Stock Center	szórt, Atg8a- klaszterek
DCTN1-p150	3785 GD	Vienna Drosophila Resource Center	perifériás
DCTN1-p150	24760 AP	Bloomington Drosophila Stock Center	perifériás
DCTN1-p150	24761 AP	Bloomington Drosophila Stock Center	perifériás
DCTN1-p150	27721 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	perifériás
DCTN2-p50	63693 HMJ	Bloomington Drosophila Stock Center	perifériás
DCTN2-p50	28596 HM	Bloomington Drosophila Stock Center	perifériás
DCTN4-p62	60499 HMJ	Bloomington Drosophila Stock Center	perifériás
DCTN5-p25	30491 HM	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
DCTN6-p27	64679 HMC	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Arp1	100752 KK	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
Arp1	26007 GD	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
Kinezinek			
Khc	44337 GD	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
Khc	35770 HMS	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Khc	35409 GL	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Khc	25898 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Klc	33934 HMS	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Klc	36795 GL	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Klc	42597 HMS	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Khc-73	105984 KK	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
Khc-73	38191 GL	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Khc-73	36733 HMS	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
unc-104	47171 GD	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
unc-104	23465 GD	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
unc-104	58191 HMJ	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris

unc-104	58083 HMJ	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
unc-104	43264 GL	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
unc-104	28951 HM	Bloomington Drosophila Stock Center	enyhén szórt
unc-104	53296 HMC	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
CG14535	108308 KK	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
ncd	22570 GD	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
Kif19A	106569 KK	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
Kif19A	36459 GD	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
Klp10A	41534 GD	Vienna Drosophila Resource Center	enyhén szórt
Klp98A	40603 GD	Vienna Drosophila Resource Center	perinukleáris
Klp98A	50542 GL	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Klp98A	39037 HMS	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Mikrotubulus- és MTOC-komponensek			
Ninein	62414 HMJ	Bloomington Drosophila Stock Center	szórt
Shot	28336 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	MTOC- áthelyeződés
Shot	41858 GL	Bloomington Drosophila Stock Center	MTOC- áthelyeződés
Shot	64041 HMJ	Bloomington Drosophila Stock Center	MTOC- áthelyeződés
Msp	38990 HMS	Bloomington Drosophila Stock Center	MTOC- áthelyeződés
Msp	31138 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	perinukleáris
Msp300	32848 HMS	Bloomington Drosophila Stock Center	MTOC- áthelyeződés
Msp300	32377 HMS	Bloomington Drosophila Stock Center	MTOC- áthelyeződés
alpha-Tub84B	31389 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	szórt, Atg8a- klaszterek
beta-Tub56D	65028 HMC	Bloomington Drosophila Stock Center	szórt, Atg8a- klaszterek
gamma-Tub23C	42799 GL	Bloomington Drosophila Stock Center	enyhén szórt
gamma-Tub23C	31204 JF	Bloomington Drosophila Stock Center	szórt