

36. OTDK Biológia szekció

Az autofagoszóma szekréciós útvonal karakterizálása

Hargitai Dávid

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Biológia MSc II. évfolyam

ELTE TTK Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék

MTA-ELTE Vezikuláris Transzport Kutatócsoport

Témavezető:

Dr. Lőrincz Péter



TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítésjegyzék	3
Bevezető	4
Célkitűzés	5
A Syntaxin17 az autofagoszóma szekrécióban is szerepet játszhat	6
A Syntaxin17 hiányában halmozódó autofág vezikulák karakterizálása	8
A Syx17 hiányában megjelenő autofagoszómák Rab fehérje összetétele.....	10
A Rab30 az autofagoszómák egy alpopulációjára toborzódik	12
A Rab30 egyéb vezikuláris folyamatokban	14
A Rab30 az autofagoszóma szekrécióhoz szükséges	16
Az Exocyst komplex autofagoszóma szekrécióhoz is szükséges.....	17
Összefoglalás és kitekintés	19
Anyagok és módszerek.....	21
Drosophila melanogaster törzsek fenntartása	21
Felhasznált törzsek és genotípusok.....	21
Ex vivo minták fixálása és immunfestés	23
Mintaelőkészítés, fotózás.....	24
Elektronmikroszkópia.....	24
Hemolimfa izolálás és Western Blot eljárás	24
Nyálszekréciós teszt	25
Adatok kiértékelése és ábrázolása	25
Köszönetnyilvánítás	25
Támogatás	26
Irodalomjegyzék.....	26

Megjegyzés: A jelenlegi publikációs trendet figyelembe véve az *Anyagok és módszerek* című fejezet az eredmények megvitatása után kerül tárgyalásra.

Rövidítésjegyzék

- Act Actin promóter
- Arf ADP ribosylation factors
- Arl8 Arf-like GTPase 8
- Atg Autophagy associated gene (autofágiához kapcsolódó gén)
- Dcr Dicer enzim gén
- hsFlp Hősokk promóteres Flippáz rekombinááz gén
- FRT Flippáz kötőhely (DNS szekvencia)
- GFP Green Fluorescent Protein (zöld fluoreszcens fehérje)
- GTP Guanozin-trifoszfát
- L3 Larval stage 3 (3. lárvastádium)
- PBS Nátrium-foszfát oldat
- PBTX PBS 0,1% Triton-X 100-al
- Rab Ras associated binding protein
- RNSi RNS interferencia konstrukció
- RPM Percenkénti rotáció
- SNAP Synaptosomal-associated protein
- SNARE Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
- STX, Syx Syntaxin
- VAMP8 Vesicle-Associated Membrane Protein 8
- Vps Vacuolar protein sorting
- UAS Upstream activatory sequence
- HOPS HOMotypic fusion and Protein Sorting

Kiemelt mikroszkópos képeken:

- R30 Rab30-YFP
- L LAMP
- A8 Atg8
- V41-HA Vps41-3xHA

Bevezető

Az élő rendszerek fontos sajátása a dinamikus átalakulás képessége. A sejtek nagyfokú belső rendezettségének fenntartása folyamatos energiabefektetéssel jár. Így az előregedett, sérült vagy feleslegessé vált makromolekulák és sejtalkotók lebontása nélkülözhetetlen folyamat.

A sejtes önemésztés egyik típusa, a makroautofágia (továbbiakban: autofágia), révén az eukarióta sejtek képesek saját nagyméretű alkotóinak lebontására (*Lőrincz és Juhász, 2019*). Számos sejten belüli folyamat, így az autofágia is, membránnal határolt, a citoszóltól elkülönült belső térrel rendelkező vezikulák működésével valósul meg. Izolált belső terükben a vezikulák képesek a citoszóltól jelentősen eltérő, specifikus folyamatokhoz szükséges körülmények kialakítására.

Az autofágia folyamata a fagofór elnevezésű, változatos membránforrásból építkező vezikula kialakulásával kezdődik. A fagofór fokozatosan körbenövi a lebontandó sejtalkotókat és citoplazma részletet, majd záródásával (*Chang és mtsai., 2021*) kettős membránnal határolt vezikula, autofagoszóma képződik. Ez a folyamat lehet szelektív is, ekkor autofág receptorok (például a p62) jelölik ki a lebontásra szánt alkotókat (*Gatica és mtsai., 2018*). Mivel az autofág receptorok maguk is az autofágia szubsztrátjai, így az autofág receptorok sejten belüli szintje fordítottan arányos az autofág lebontás sikerességével (*Pircs és mtsai., 2012*). A kialakult autofagoszóma azonban önmagában nem képes beltartalmának lebontására. Ehhez a bontó enzimeket és azok működéséhez megfelelő körülményeket kialakítani képes vezikulák, a lizoszómák szükségesek. A lizoszómák és az autofagoszómák membránfúziós folyamat révén képesek egyesülni, így megvalósítva a szubsztrátok és enzimek találkozását, az autofág lebontás folyamatát.

Minden ismert vezikuláris membránfúziós folyamat hasonló funkciójú molekulák összehangolt működését igényli (*More és mtsai., 2020*). Az autofagoszóma-lizoszóma fúzió során a Rab7, Rab2 és Arl8 kis GTPáz kapcsolófehérjék a vezikulák identitásának meghatározásában játszanak központi szerepet (*Boda és mtsai., 2019; Lőrincz, Tóth és mtsai., 2017*). Effektoraik a sejten belül mozgatásért felelős motorfehérjék, illetve a megfelelő közelségbe került vezikulák közötti első fizikai kapcsolat kialakításáért felelős pányvázó fehérje komplexek. A Rab2 és Arl8 elsősorban a lizoszómákon, míg a Rab7 késői endoszómákon és érett autofagoszómákon található (*Hegedűs és mtsai., 2016*). Az autofagoszóma-lizoszóma fúzió folyamatában a pányvázásért a HOPS heterohexamér komplex felelős (*Takáts és mtsai., 2014*). A membránegyesülést ténylegesen katalizáló fehérje faktorok a SNARE-fehérjék. A tárgyalt fúziós folyamathoz eddigi ismereteink szerint többsejtű

metazoákban (*Bas és mtsai., 2018*) az autofagoszómákon található Syntaxin17 (Syx17) Qa-SNARE fehérje, a lizoszómákon elhelyezkedő VAMP7/8 R-SNARE fehérje és a citoszolból toborzódó SNAP29 (Qbc) SNARE fehérje szükséges (*Takáts és mtsai., 2012; Itakura és mtsai., 2013*). Ez a három fehérje névadó SNARE motívumaik révén szoros komplexet képez, amely képes olyan fizikai közelségbe kényszeríteni a fúzióban résztvevő vezikulák membránjait, hogy azok vélhetően spontán módon egyesüljenek (*Chernomordik és Kozlov, 2009*). Két másik SNARE-fehérje részvételét is javasolták a folyamatban, de ezek pontos szerepe és a fehérjék közötti viszony még nem teljesen tisztázott (*Takáts és mtsai., 2018; Matsui és mtsai., 2018*).

Az autofág lebontás régóta kutatott, orvosi biológiai szempontból rendkívül fontos folyamat (*Mizushima és Levine. 2020*). Az elmúlt pár évtizedben ismerték fel, hogy az autofágiának nem csak sejtorganelleket lebontó útvonalai, hanem a klasszikustól eltérő típusai is léteznek (*Scarlati és mtsai., 2008*). Ezek közé a folyamatok közé tartozik a kevésbé feltárt autofág szekréció is (*Duran és mtsai., 2010; New és Thomas, 2019*). Autofág szekréció esetén az autofág beltartalma a lebontás helyett a sejt környezetébe kerül, egyszeres membránnal határolt autofág testek képződnek. Ennek a mechanizmusnak igen fontos szerepe van a szabad riboszómákon szintetizálódó fehérjék sejten kívüli térbe való kijuttatásában (*Duran és mtsai., 2010; Kim és mtsai., 2018*), ezáltal többek között az immunválasz kialakításában (*Kimura és mtsai., 2017*), emellett a tumoros elváltozások fenntartásában (*Keulers és mtsai., 2016*) és a neurodegenerációs kórképek kialakulásában is (*Nilsson és Saido., 2014*). Jelentős relevanciája ellenére, a lebontási útvonallal ellentétben, többségében nem ismerjük sem a háttérben húzódó molekuláris folyamatokat, sem a pontos vezikuláris útvonalakat.

Célkitűzés

Kutatómunkám célja az autofág szekréció mögött húzódó molekuláris szintű folyamatok feltárásának megkezdése ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) modellszervezet segítségével. Az ecetmuslica az autofág kutatások fontos és régi modellje, a lebontási folyamat számos elemét itt írták le az elsők között (*Takáts és mtsai., 2013; Takáts és mtsai., 2014*). Korábbi kutatómunkám során pedig váratlanul sikerült egy olyan kísérleti elrendezést azonosítanunk, ahol az autofág szekréció molekuláris folyamata feltárhatóvá vált.

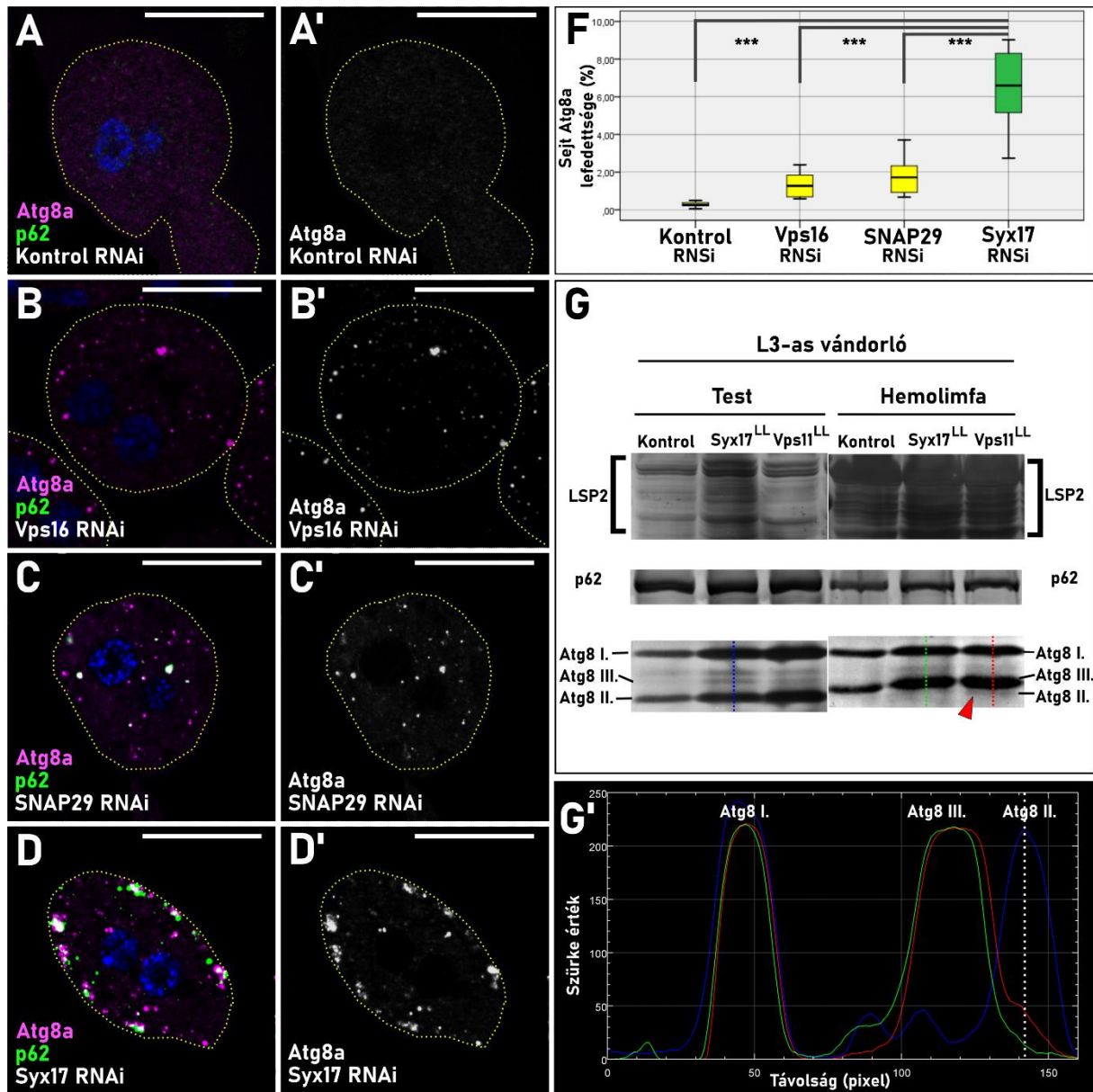
A Syntaxin17 az autofagoszóma szekrécióban is szerepet játszhat

Tavalyi TDK dolgozatomban a heterofágia útvonalaiban résztvevő SNARE-fehérjék azonosításával és karakterizálásával foglalkoztam. Kutatásunkhoz az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) lárvális Garland-nefrocitáit használtam modellként, mint intenzív heterofágiát folytató sejtípus. Ennek a kutatásnak a keretében megvizsgáltuk többek között a (Syx17) Qa-SNARE fehérje hiányában jelentkező fenotípust is. A heterofágia késői lépését érintő defektus mellett egy érdekes, más SNARE csendesítése esetén nem észlelhető Rab7 pozitív vezikula populációra is felfigyeltünk.

Elektronmikroszkópos vizsgálataink alapján pedig megállapítottuk, hogy Syx17 hiányában autofagoszómák halmozódnak a plazmamembrán alatti régióban. Mivel kutatócsoportunk fő profilja az endocitózis kutatása mellett az autofágia vizsgálata, így szerettük volna jobban is tanulmányozni a Garland-nefrociták autofág aktivitását.

Vándorló stádiumú, kontrol RNS interferenciát (RNSi) bináris (prospero-Gal4 – UAS) rendszerben expresszáló Garland-sejtekben csak ritkán detektáltunk α Atg8a pozitív autofág vezikulákat (1.A,A',F ábra), amely nem meglepő ezekben a sejtekben: az autofág aktivitás tapasztalataink szerint alacsony (Lőrincz és mtsai., 2019), bazális szinten jelentkezik. Az α Atg8a immunfestés mellett p62 autofág receptor ellen is végeztünk immunfestést, annak érdekében, hogy megállapítsuk, a vizsgált RNS interferenciák mellett lecsökken-e az autofág lebontás szintje (Pircs és mtsai., 2012).

Az autofagoszóma-lizoszóma fúzióban központi szerepet játszó HOPS komplex alegységeinek (például a Vps16-nak) csendesítése esetén az autofagoszómák száma kismértékben megnövekedik (1.B,B',F), kutatócsoportunk korábbi eredményeivel megegyezően (Lőrincz és mtsai., 2019). Hasonló fenotípust mutat az autofagoszóma-lizoszóma fúzióban résztvevő Qbc-SNARE, a SNAP29 csendesítése is (1.C,C',F). Meglepő módon azonban a Syx17 RNSi ennél jóval erősebb fenotípust okozott: a plazmamembrán alatt Atg8 pozitív autofág vezikulák halmozódtak. A Syx17 RNSi sejtekben szignifikánsan több volt az α Atg8a pozitív autofág vezikula, mint a többi vizsgált RNSi esetén (1.D,D',F). Éheztetett *Drosophila* zsírtestekben és humán sejtenyészetekben a klasszikus autofagoszóma-lizoszóma fúziós gépezet tagjainak hiányában ilyen különbség nem tapasztalható, mindegyik hiánya hasonló mértékben okozza az autofagoszómák halmozódását (Takáts és mtsai., 2014). Fontos különbség tapasztaltunk továbbá az autofág vezikulák elhelyezkedésében. Míg Vps16 vagy SNAP29 hiányában a plazmamembrán alatt nincs számottevő α Atg8a pozitív struktúra (1.B',C'), addig Syx17 hiányában számos Atg8 pozitív vezikula figyelhető meg ebben a régióban (1.D').



1. *Ábra: Syx17 az autofág szekrécióhoz is szükséges*

A kék csatorna a Hoechst DNS festék jele a mikroszkópos felvételeken. A-D: α Atg8a, α p62 fluoreszcens immunfestés Garland-sejteken. A'-D': A-D képek α Atg8a jele külön kiemelve szürkeárnyalatban. A-A': Kontrol RNSi sejtek. B-B': Vps16 RNSi sejtek. C-C': SNAP29 RNSi sejtek. D-D': Syx17 RNSi sejtek. F: Az A'-D' kísérletekhez tartozó kvantifikáció (n=15). G: Hemolimfa szeparációt követő Western Blot eredménye L3-as stádiumú vándorló állatokból (15 μ l minta). LSP2 a hemolimfa dúsulás mérésére alkalmas. Atg8a I: citoszolikus Atg8a. Atg8a II: lipidált Atg8a. Atg8a III: adenilált Atg8a (lipidált forma előalakja). Syx17 mutáns állatok hemolimfájában nem jelenik meg az Atg8a II. izoformája, míg Vps11 mutáns állatok hemolimfájában igen (piros nyíl). G': A G ábrán megjelölt Atg8a blot képek szürkeértékének összevetése. Láthatók az egyes izoformák csúcsai. Fehér szaggatott vonal: A III. izoforma kiemelve: a piros (Vps11 mutáns) nagyobb értéket vesz fel, mint a zöld (Syx17 mutáns). Skála: 20 μ m.

Ezek alapján azt feltételezzük, hogy Syx17 hiányában nem csak az autofagoszómalizozóma fúzió folyamata, hanem az autofagoszóma szekréció folyamata is elakadhat a Garland-sejtekben. A HOPS komplex, a SNAP29 és a VAMP7 SNARE-fehérjék ezzel szemben csak a lebontáshoz kellhetnek, hiányukban pedig az autofagoszómák a lebontási út helyett a szekréciós útra terelődnek, más sejtípusokhoz hasonlóan (Morelli és mtsai., 2014; Solvik és mtsai., 2022).

A hipotézis alátámasztásához ki szeretnénk mutatni, hogy a HOPS komplex alegység hiányával ellentétben a Syx17 hiányában nincsenek jelen a muslica hemolimfájában a szekréció eredményeként kikerülő autofág testek. Elkezdtem kidolgozni egy Western Blot alapú detektálási eljárást, ami lehetővé tenné a hemolimfában és az állat sejtjein belül elhelyezkedő autofág testek elkülönítését. Ehhez tiszta sejtmentes hemolimfa és hemolimfa-mentesített egész állat WB preparátumokat állítottam elő. Jelenleg is zajlik a protokoll beállítása, ugyanakkor az eddigi elrendezést használva detektálható mennyiségű lipidált Atg8a (II. izoforma) jelenik meg a Vps11 (HOPS komplex alegység) mutáns állatok hemolimfájában (1.G,G' ábra), ami az autofág szekréció HOPS komplex független létre utal. A lipidált Atg8a azonban hiányzik a Syx17 mutáns állatok hemolimfájából, ami az autofág testek hiányát, azaz a szekréció elmaradását igazolhatja. Mivel a hemolimfa számos egyéb szomatikus sejt szekréciójának lehet célállomása, így a 1.G ábrán bemutatott kísérlet alapján valószínűsíthető, hogy a Syx17 autofág szekrécióban betöltött szerepe a legtöbb sejtfeleségre igaz lehet.

Mivel a Syx17 az eddig leírt autofág szekréciós mechanizmusokban nem ismert (New és Thomas, 2019; Solvik és mtsai., 2022), ezért szeretnénk feltárni az egész molekuláris gépezetet, ami a Syx17-tel kölcsönhatva szerepet játszik az autofág szekrécióban. Amennyiben feltételezésünk igaz, Syx17 hiányában mind az autofág lebontás, mind az autofág szekréció folyamata gátolt, így a Syx17 csendesített sejtek alkalmasak lehetnek a szekretálódás előtt álló autofág vezikulák molekuláris jellemzésére.

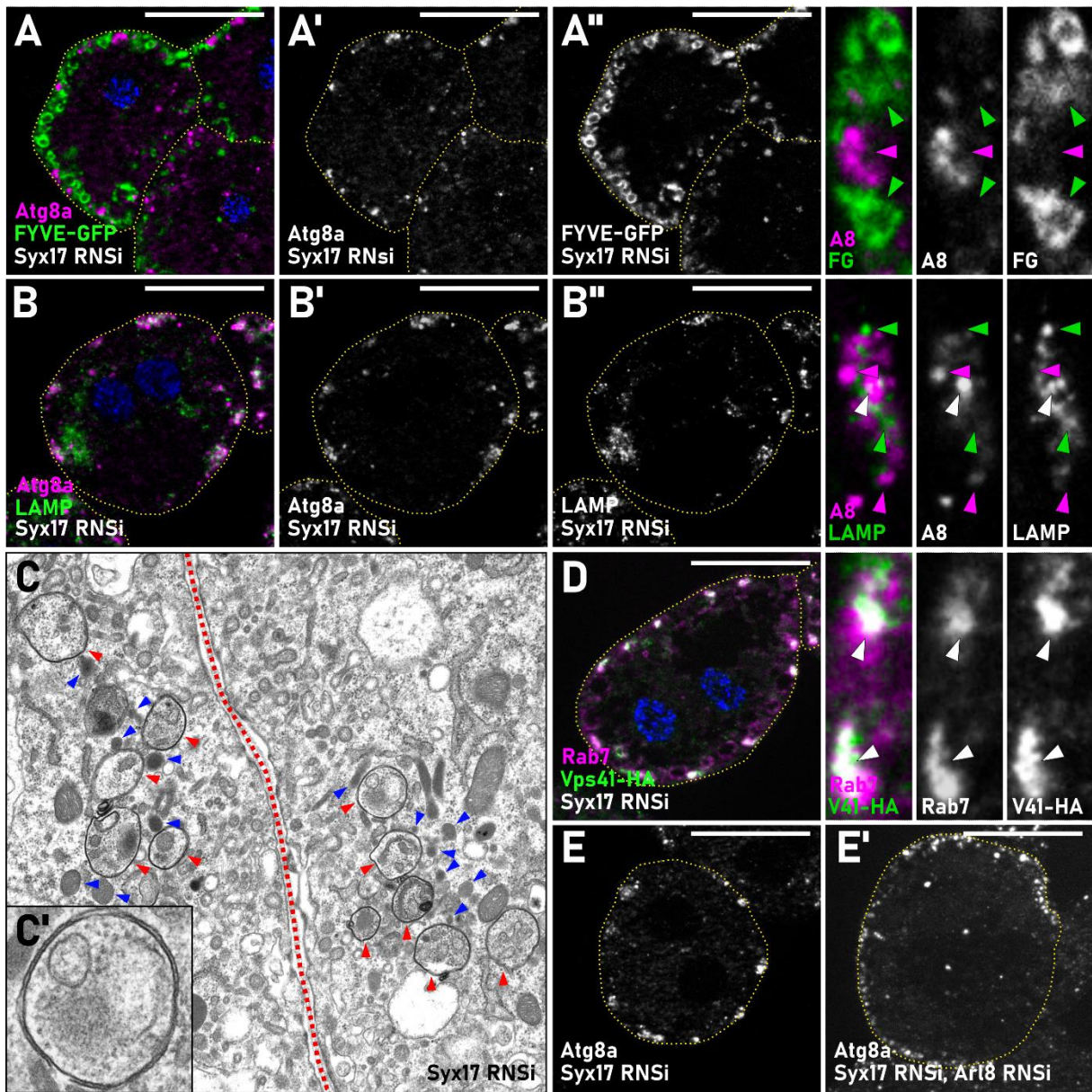
A Syntaxin17 hiányában halmozódó autofág vezikulák karakterizálása

Annak érdekében, hogy pontosabb képet kapjunk arról, hogy milyen típusú autofág vezikulák halmozódnak, megvizsgáltuk, hogy az Atg8a általános autofág marker mellett, milyen egyéb, kategorizálás szempontjából fontos molekulákra mutatnak pozitivitást a Syx17 csendesített Garland-sejtek plazmamembránja alatt halmozódó autofág vezikulák.

Az autofagoszóma képződés és érés fontos lipid komponense a foszfatidil-inozitol-3-foszfát (PI(3)P) (Cebollero és mtsai, 2012). FYVE-GFP PI(3)P kötő fehérjét expresszáltatva Syx17 csendesített Garland-sejtekben azt tapasztaltuk, hogy a detektált Atg8 pozitív vezikulák

nem kolokalizálnak a FYVE-GFP-vel, azaz vélhetően nem tartalmaznak PI(3)P-t (2. A-A''), így érett autofág vezikuláknak tekinthetők (Lőrincz és Juhász, 2019).

Autolizoszómák kimutatásának gyakori módszere az Atg8a – LAMP kolokalizáció vizsgálata. Syx17 csendesített Garland-sejteken végeztem kétlépcsős, fluorescens immunfestést autofág marker Atg8a (2.B,B') és lizoszómális marker LAMP ellen (2.B,B''). A kiemeléseken látható, hogy csak kismértékű átfedés tapasztalható. A két marker ugyanakkor egymáshoz nagyon közel figyelhető meg, de vélhetően elkülönült vezikula populációban (2. B kiemelések). Ezek szerint a Syx17 hiányában megfigyelt autofág vezikulák a szakirodalommal megegyezően (Takáts és mtsai., 2013) autofagoszómák.



2. **Ábra:** A Syx17 hiányában megjelenő autofág vezikulák és környezetük karakterizálása
A két csatorna a Hoechst DNS festék jele a mikroszkopos felvételeken. A-A'': FYVE-GFP PI(3)P kötő fehérje expressziója Syx17 RNSi sejtekben α Atg8a immunfestés mellett. A kiemelésen nyilak: magenta:

csak α Atg8a pozitív, zöld: csak FYVE-GFP pozitív. **B-B'**: α LAMP és α Atg8a kolokalizációjának vizsgálata Syx17 RNSi sejteken. A kiemelésen nyilak: magenta: csak α Atg8a pozitív, zöld: csak α LAMP pozitív, fehér: kettősen pozitív. Skála: 20 μ m **C**: Syx17 RNSi Garland-sejtek határa (transzmissziós elektronmikroszkópos felvétel). piros szaggatott: plazmamembránok összefekvése. Nyilak: piros: autofagoszómák, kék: lizoszóma eredetű vezikulák. **C'**: Kiemelt autofagoszóma. **D**: Vps41-3xHA expresszázó Syx17 RNSi sejt α Atg8a immunfestéssel. Kiemelésen nyilak: fehér: kettősen pozitív. **E**: Syx17 RNSi sejt α Atg8a immunfestés. **F**: Syx17 és Arl8 kettős RNSi sejt: α Atg8a immunfestés.

Eredményeink megerősítésére elektronmikroszkópos felvételeket készítettünk Syx17 csendesített Garland-nefrocitákról (2. C, C'). A felvételen két Syx17 csendesített Garland-sejt határa figyelhető meg.

A plazmamembránok alatt (piros szaggatott vonal) kétoldalon autofagoszómák láthatók (piros nyíl) amelyek közvetlen környezetében, sokszor az autofagoszómákkal kontaktban denz beltartalmú vezikulák, feltehetően lizoszóma eredetű vezikulák figyelhetők meg (kék nyíl), megerősítve az α Atg8a/ α LAMP immunfestéssel kapott eredményeinket.

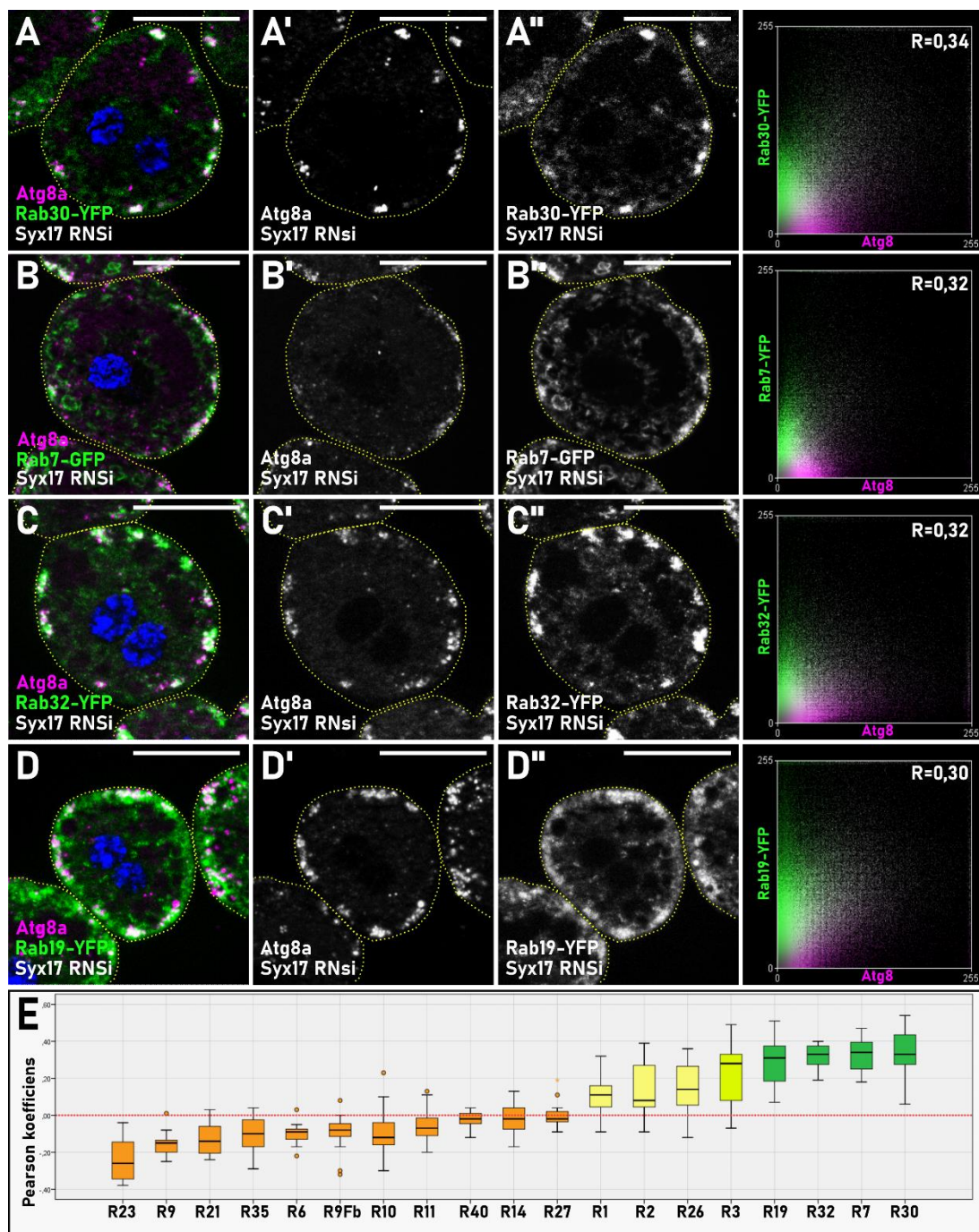
A HOPS komplex autofagoszóma-lizoszóma, endoszóma-endoszóma és endoszóma-lizoszóma fúziókban szerepet játszó pályvázó komplex. Syx17 RNSi-t kifejező Garland sejtekben koexpresszáztattuk a Vps41-3xHA fúziós fehérjét (2.D). A HOPS komplexbe beépülő Vps41-3xHA egy része Rab7 pozitív endoszómákon található (Lőrincz és mtsai., 2019), jelentős része azonban az autofagoszómákból és lizoszómákból álló Rab7 pozitív vezikulacsoportokkal kolokalizál (2.D kiemelés). Ez megmagyarázhatja, hogy az autofagoszómák és lizoszómák miért alkothatnak diszkrét csoportokat: lehetséges, hogy a HOPS komplex az, amely egyben tartja ezeket. Mivel az Arl8 kis GTP-áz szükséges a HOPS komplex lizoszómákhoz toborzásához (Boda és mtsai., 2019), ezért megvizsgáltuk, hogy Arl8 és Syx17 hiányában is kialakulnak-e ezek a csoportok. Feltételezésünket erősíti, hogy az Arl8 és Syx17 kettős csendesítése mellett az autofagoszómák nem rendeződnek csoportokba, hanem sokkal inkább a plazmamembrán alá sorakoznak (2. E, E').

A Syx17 hiányában megjelenő autofagoszómák Rab fehérje összetétele

Minden ismert vezikuláris membránfúzió alapuló útvonal hasonló funkciójú molekuláris elemeken alapul (More és mtsai., 2020), így feltételeztük, hogy ez az autofagoszóma szerkeció esetében sincs másképp. A vezikuláris útvonalak fontos elemei a kis GTPáz kapcsolófehérjék, amelyek specifikus útvonalak kiindulópontjaként meghatározzák a vezikula további sorsát.

Annak érdekében, hogy megtaláljuk az autofagoszómák szekréciójához potenciálisan szükséges Rab fehérjét, megvizsgáltuk az autofagoszómák membránjának Rab összetételét. Ehhez fluorofór fehérjével (GFP-vel vagy YFP-vel, továbbiakban: YFP) fuzionált Rab fehérjéket használtunk (UAS, prospero>Gal4 expressziós rendszerben) és az α Atg8a-val való kolokalizáció mértékét vizsgáltuk Syx17 csendesített háttéren (3. E).

A Rab-YFP fehérjéket sejten belüli mintázatuk és a kolokalizáció jelenlétét indikáló Pearson-koefficiensük alapján négy kategóriába soroltuk.



3. *Ábra:* A Syx17 hiányában megjelenő autofagoszómák Rab fehérje összetétele

A két csatorna a Hoechst DNS festék jele a mikroszkópos felvételeken. **A-A'':** UAS-Rab30-YFP, Syx17 csendesített sejtek, α Atg8a immunfestés. **B-B'':** UAS-Rab7-GFP, Syx17 csendesített sejtek, α Atg8a immunfestés. **C-C'':** UAS-Rab32-YFP, Syx17 csendesített sejtek, α Atg8a immunfestés. **D-D'':** UAS-Rab19-YFP, Syx17 csendesített sejtek, α Atg8a immunfestés. **E:** Pearson-koefficiensek kvantifikálása ($n=15$, piros szaggatott vonal: 0 érték). Jobb oldalon: Kísérletekhez tartozó Manders diagrammok R: Átlagos Pearson-koefficiens. Skála: 20 μ m. A vizsgálatból megfelelő szinten expresszálo konstrukció hiánya miatt egyelőre hiányzik: Rab4, Rab5, Rab8, Rab18, Rab39.

Egyes Rab-YFP fehérjék más membránokon dúsulnak fel (például endoszómák, plazmamembrán): ezek a Rab-YFP fehérjék nem mutattak kolokalizációt az α Atg8a-val. Más Rab-YFP fehérjék citoszólikusak voltak (első két kategória: 3.E narancssárga boxplotok). Egyéb Rab-YFP fehérjéket az autofagoszómákat körülvevő vezikulákon – feltehetően lizoszómákon - mutattunk ki: ezek egy része bizonyos mértékben pozitív volt α Atg8a-ra (3. E: citromsárga). A negyedik csoportba az α Atg8a-val nagymértékű átfedést mutató Rab-YFP fehérjék kerültek (3. E: zöld; 3. A-D). Utóbbiakról feltételezzük, hogy valóban az autofagoszómákon helyezkedhetnek el, ezek valamelyike lehet a szekrécióhoz szükséges Rab fehérje.

A Rab19 fehérjét (3.D-D'') egyéb tanulmányokban a Golgi-komplexen észlelték (*Sinka és mtsai., 2008*), de Atg fehérje kötő képessége is ismert (*Nagy és mtsai., 2017*). Szakirodalom alapján a Rab32 fehérjének (3.C-C'') a mitokondriumok szabályozásában, a lipid tárolásban és az autofagoszóma képződés folyamatában van szerepe (*Wang és mtsai., 2012*). A Rab7 fehérjéről (3.B-B'') ismert, hogy az autofagoszóma-lizoszóma és más lizoszómális lebontó fúziókhoz szükséges (*Hegedűs és mtsai., 2016*). A Rab30 is (3.A-A'') elsősorban a Golgi komplexhez kapcsolódó funkciókban ismert, ahol GARP kötő képessége miatt, feltehetően a Golgi ciszternák közötti transzportban játszik szerepet (*Sinka és mtsai., 2008*). A Rab7 és a Rab32, illetve a Rab19 és a Rab32 párok közelebbi rokonságban állnak egymással (*Brighthouse és mtsai., 2010; Klöpper és mtsai., 2010*).

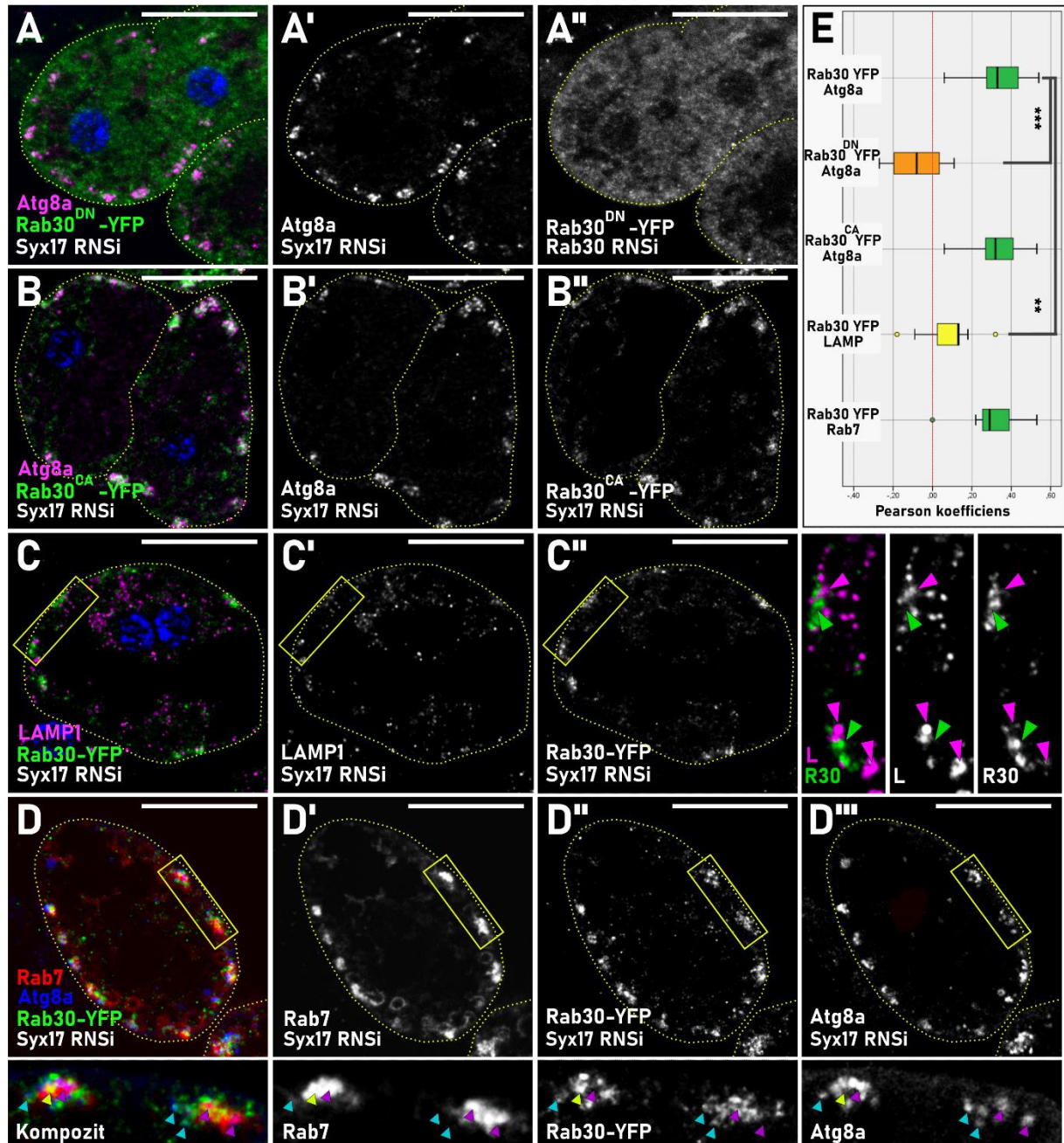
A Rab30 az autofagoszómák egy alpopulációjára toborzódik

Ezt követően figyelmünk első körben a Rab30 fehérjére irányult, mert ez mutatta a legnagyobb kolokalizációt az összes Rab-YFP fehérje közül, valamint ez a Rab fehérje rendelkezik olyan ismert kötőpartnerekkel (*Gillingham és mtsai., 2014*), amelyek felkeltették érdeklődésünket.

Amikor a Rab30-YFP domináns negatív (DN) formáját expresszáltattuk a Syx17 csendesített Garland-sejtekben (4.A-A''), a korábban Rab30-YFP-vel detektált α Atg8a kolokalizáció szignifikánsan lecsökkent (4.E). Ez arra utal, hogy a Rab30 funkciójával

összefüggésben kerül az autofagoszómákra és nem az autofágia szubsztrátjaként dúsul fel az autofagoszómák belsejében. Rab30-YFP konstitutív aktív (CA) formája a Rab30-YFP-hez hasonlóan kolokalizációt mutatott az α Atg8a-val (4.B-B'',E), ami arra utal, hogy feltételezhetőleg az autofagoszóma az aktivált Rab30 egyik „végállomása” lehet.

Szerettük volna megmutatni, hogy a Rab30-YFP nem a vezikula csoportban jelenlévő lizoszómális eredetű vezikulákon található, így megvizsgáltuk a Rab30-YFP és a LAMP fehérje immunfestés jelének az átfedését (4.C-C''). A kiemelt részleten és a kvantifikációban (4.E) látható, hogy a két fehérje döntően eltérő vezikulákon helyezkedik el.



4. *Ábra: A Rab30 az autofagoszómák egy alpopulációjára toborzódik.*

A kék csatorna a Hoechst DNS festék jele a mikroszkópos felvételeken (kivéve: D-D’’). A-A’’: UAS-Rab30^{DN}-YFP, Syx17 csendesített sejtek, α Atg8a immunfestés. B-B’’: UAS-Rab30^{CA}-YFP, Syx17 csendesített sejtek, α Atg8a immunfestés. C-C’’: UAS-Rab30-YFP, Syx17 csendesített sejtek, α LAMP immunfestés. Kiemelés nyilak: magenta: csak α LAMP pozitív, zöld: csak Rab30-YFP pozitív. D-D’’: UAS-Rab30-YFP, Syx17 csendesített sejtek, α Atg8a és α Rab7 immunfestés. Kiemelés nyilak: türkisz: Rab7(-), Atg8 (+), Rab30 (+); lila: Rab7(+), Atg8 (+), Rab30 (-); sárga: Rab7 (+), Rab30 (+) E: Pearson-koefficiensek kvantifikálása (n=15, piros szaggatott: 0 érték). Skála: 20 μ m.

Rab7 fehérje szerepe ismert az autofág lebontás folyamatában és saját vizsgálatunk is jelentős kolokalizációt mutatott ki az α Atg8a és a Rab7-GFP között (3.B-B’’).

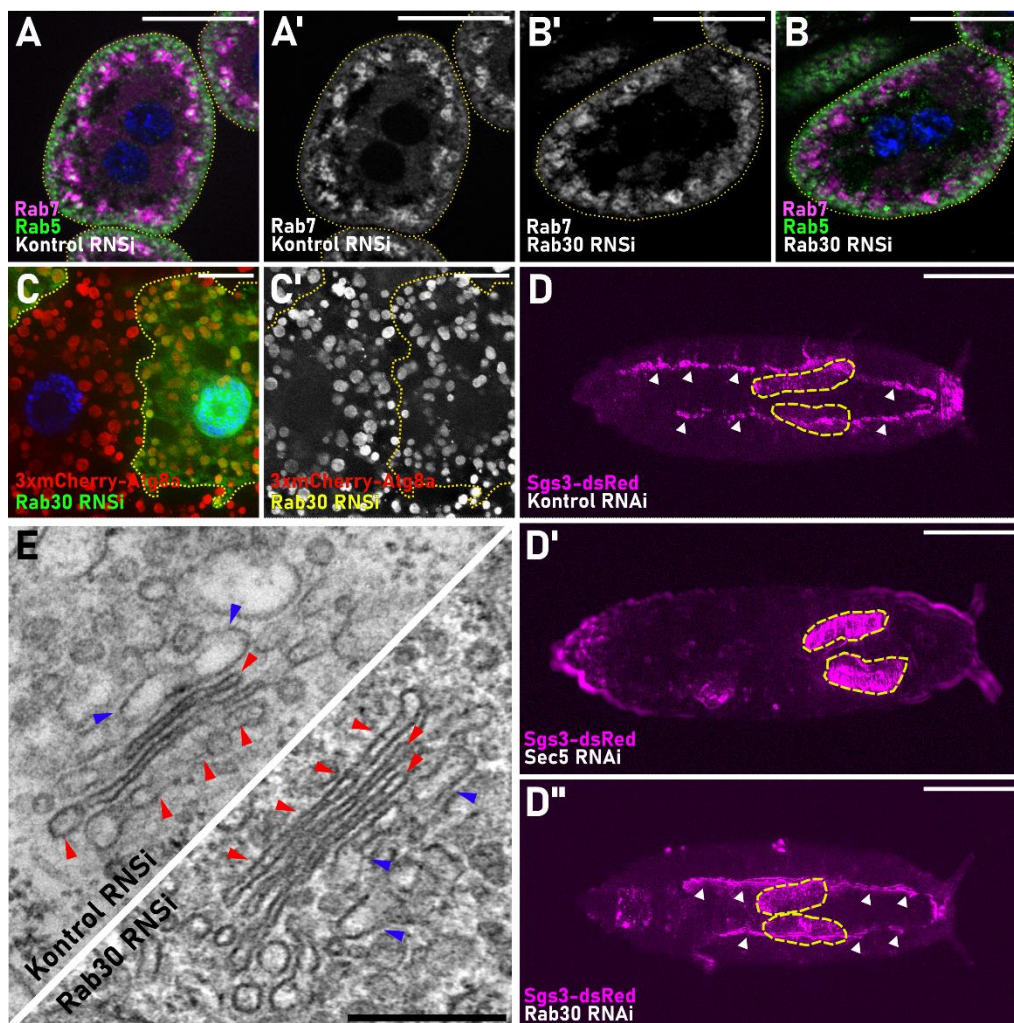
Éppen ezért szerettük volna megvizsgálni a Rab7 és a Rab30 egymáshoz való helyzetét. Kíváncsiak voltunk, hogy a Rab7 és a Rab30 azonos autofagoszómákon észlelhetők, vagy létezik-e két elkülönül autofagoszóma populáció. Ennek megállapítására Rab30-YFP-t expresszáltattunk Syx17 csendesítése mellett, továbbá fluoreszcens immunfestéssel jelöltük az Atg8-at és a Rab7-et (4.D-D’’). Vizsgálatunkból kiderült, hogy bár jelentős átfedést mutat a Rab30 és a Rab7, léteznek olyan autofagoszómák, amelyek csak a Rab7-re (lila nyíl) vagy csak a Rab30-ra (türkiz nyíl) pozitívak. A jövőben érdekes lesz a két fehérje lehetséges epiztatikus viszonyának a feltárása.

A Rab30 egyéb vezikuláris folyamatokban

Mivel a Rab30 érdekes lokalizációt és Rab7-hez való viszonyt mutatott, szerettük volna megállapítani, hogy pontosan milyen szerepe lehet az autofágiában. Az autofagoszómák lizoszómákat megelőzően endoszómákkal is fuzionálhatnak, így amfiszómákat képezve. A Rab30 potenciálisan résztvevő lehet ebben a fúziós folyamatban. Ennek megválaszolásához Rab5, Rab7 immunfestés segítségével megvizsgáltuk a Rab30 csendesítés endoszómális rendszerre gyakorolt hatását Garland-sejteken (5. A,A’,B,B’). Azonban nem tapasztaltuk sem a Rab5 pozitív korai, sem a Rab7 pozitív késői endoszómák jelentősebb elváltozását a szakirodalommal egybehangzóan (*Fu és mtsai., 2017*). Azaz a Rab30 kis GTPáz vélhetően nem az endocitózis folyamatán keresztül hat az autofágiára.

Az autofág lebontásban betöltött szerep megvizsgálása érdekében vándorló zsírtestekben mozaikosan csendesítettük a Rab30-at (5.B,B’). Választásunk azért esett a vándorló stádiumra, mert az itt képződő amfilizoszómák a teljes vezikuláris lebontási hálózat integritását igénylik megfelelő formálódásukhoz (*Jacomin és mtsai., 2016*). Rab30 hiányában (GFP-t expresszáló sejtek) azonban nem tapasztaltuk a vándorló stádiumú zsírtestekben az amfilizoszómák elváltozását: kontrol méretű és jelintenzitású Atg8a-mCherry vezikulákat

figyeltünk meg. Ez azt mutatja, hogy a Rab30 nem szükséges sem az autofagoszóma képződés, sem az autofág lebontás folyamatában. Ezek alapján még valószínűbbnek tűnt, hogy a Rab30 az autofág szekrécióban játszhat szerepet.



5. Ábra: A Rab30 egyéb vezikuláris folyamatokban

A kék csatorna a Hoechst DNS festék jele a mikroszkópos felvételeken. **A-A'**: Kontrol RNSi, Rab5, Rab7 immunfestés, Garland-sejt. **B-B'**: Rab30 RNSi, Rab5, Rab7 immunfestés, Garland-sejt. **C-C'**: Mozaikos vándorló zsirtetek. GFP: Rab30 RNSi sejtek. 3xmCherry-Atg8a. A,B,C: skála: 20 μ m. **D**: Sgs3-dsRed kontrol RNSi, **D'**: Sec5 RNSi, **D''**: Rab30 RNSi. Sárga keret: nyálmirigy, fehér nyilak: kiköpött glue. D-D'': skála: 200 μ m. **E**: Elektronmikroszkópos felvétel: Kontrol és Rab30 RNSi Golgi-komplex összehasonlítása. Piros nyíl: Golgi ciszternák, kék: Transz-Golgi Komplex. E: skála: 0,5 μ m.

Felmerült bennünk, hogy a Rab30 egy kanonikus szekrécióhoz szükséges kis GTPáz lehet. Ehhez szekréciós tesztet végeztünk fehér bábok segítségével (5.D-D''). A bábozódás kezdetén az átalakuló lárvák glue fehérje tartalmú granulumokat ürítenek a nyálmirigyükből. A glue megfelelő mennyiségben képes a báb letapasztására, azért hogy a motilitás nélküli életszakaszban helyhez rögzítettek legyenek. A glue szekréció detektálása érdekében Sgs3-

dsRed (Glue fehérje) fúziós fehérjét expresszáltattunk a muslicák nyálmirigyeiben. Kontrol esetben (5.D) fehér báb stádiumban a báb dorsalis felszínén megjelennek az Sgs3-dsRed tartalmú csíkok (fehér nyíl), tehát a szekréció megtörténik. Ha csendesítünk egy kanonikus szekrécióhoz szükséges gént, például az Exocyst pányvázó komplex egyik alegységét: a Sec5-öt (5.D'), akkor a szekréció elmarad, a hasoldali csíkok nem jelennek meg, a nyálmirigyben pedig intenzívebb Sgs3-dsRed jel észlelhető (sárga keret). Rab30 hiányában (5.D'') a kontrolhoz hasonlóan a glue szekréció megtörténik, így feltételezhető, hogy a szakirodalommal egybehangzóan (*Ma és Brill, 2021*) a Rab30 nem szükséges a kanonikus szekrécióhoz.

Ismert, hogy a Rab30-nak szerepe lehet a Golgi-komplexen belül (*Sinka és mtsai., 2008*), s bár hiánya nem okozza a Golgi-komplex funkciójának elvesztését, egy tanulmányban arra a következtetésre jutottak, hogy immortalizált HeLA-sejtekben a Rab30 hiánya a Golgi-cisztárnák széteséséhez vezet (*Kelly és mtsai., 2012*). Rab30 csendesített Garland-sejtek esetében elektron mikroszkópos felvételeken azonban azt tapasztaltuk, hogy a Golgi cisztárnák a kontrolhoz hasonlóan kialakulnak (5.E). Tehát a Golgi-készülék integritása megmarad, a Rab30 nem a Golgi-komplex fenntartásán keresztül hat az autofágiára.

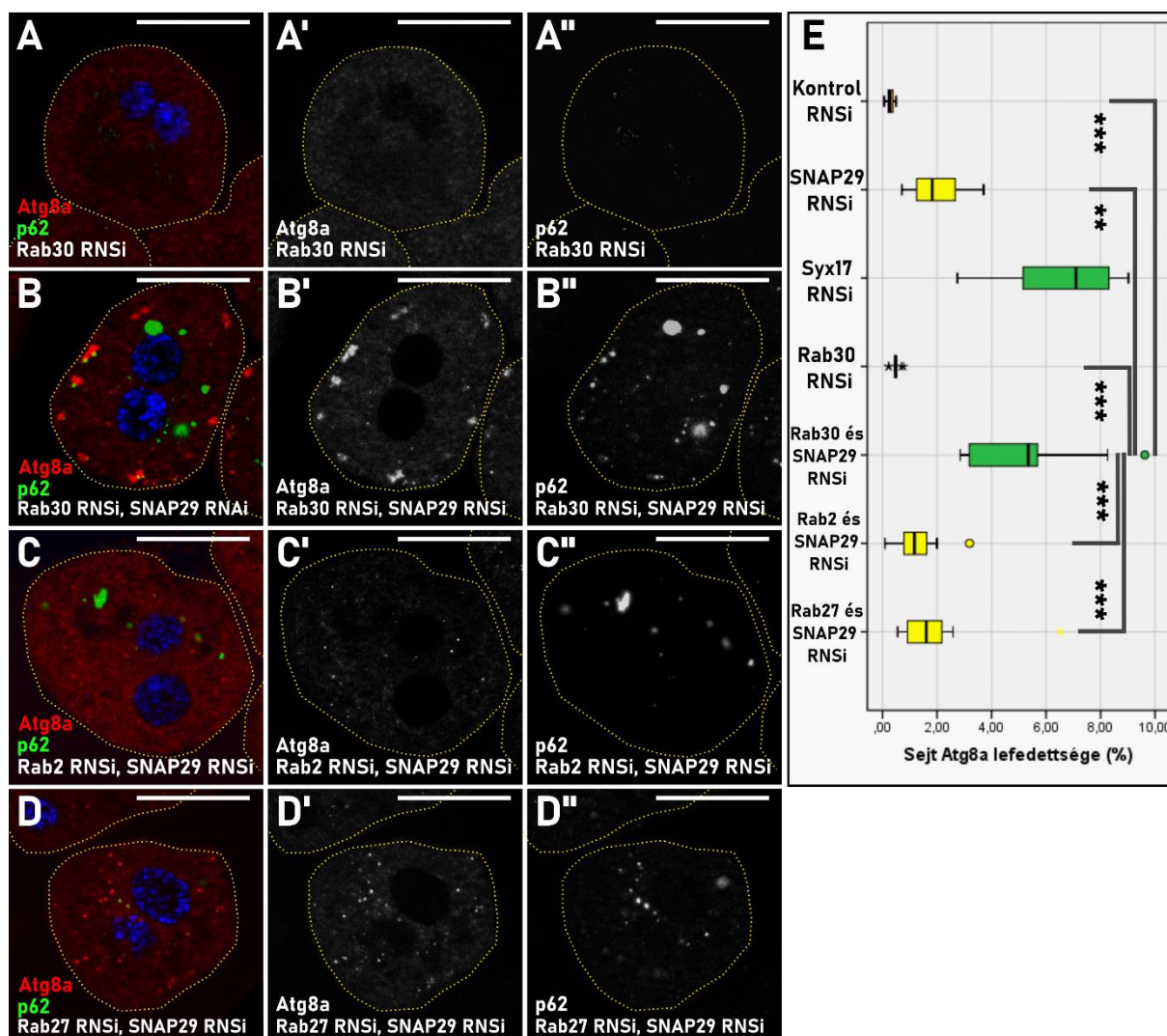
A Rab30 az autofagoszóma szekrécióhoz szükséges

Miután megbizonyosodtunk róla, hogy a Rab30 nem az autofagoszóma képződés -, autofagoszóma lebontás -, autofagoszóma-endoszóma fúzió -, Golgi-komplex felőli enzimszállítás -, sem a kanonikus szekréció folyamatán keresztül hat az autofágiára, direkt módon is megvizsgáltuk, hogy a Rab30 szükséges lehet-e az autofág szekrécióhoz.

Rab30 csendesített Garland-sejtekben a kontrolhoz hasonlóan elenyésző mennyiségű Atg8 pozitív struktúrát figyeltünk meg (6.A-A''). Ha a Rab30 mellett azonban az autofág lebontáshoz szükséges SNAP29-et is csendesítjük (6.B-B''), akkor a Syx17 csendesítéshez hasonló fenotípust (1.D), azaz a plazmamembrán alatt halmozódó autofág vezikulákat figyelhettünk meg. Ez a kísérlet arra enged következtetni, hogy a SNAP29 hiányában bekövetkező autofág szekréció gátlódik Rab30 hiányában, azaz a Rab30 vélhetően szerepet játszik az autofagoszóma szekrécióban.

Kontrol kísérletként megvizsgáltuk a Rab2 és Rab277 fehérjéket SNAP29-el együtt történő csendesítésének a hatását. Rab2 és SNAP29 csendesítése mellett (6.C-C'') SNAP29 hiányára emlékeztető fenotípust kaptunk, ami azt mutatja, hogy a Rab2 vélhetően nem szükséges az autofagoszóma szekréció folyamatához. Bár a Rab27 fehérje nem rendelkezett kimagaslóan magas Atg8 kolokalizációval Syx17 csendesített sejtekben (3.E), szakirodalmi adatok szerint a Rab27 szerepet játszik az autofág szekréció folyamatában (*Underwood és*

mtsai., 2020). Azonban Rab27 és SNAP29 együttes csendesítése (6.D-D'') SNAP29 csendesítésre emlékeztető fenotípust adott. Ezek alapján a Rab27 vélhetően nem szükséges faktor az autofagoszóma szekréció általunk vizsgált folyamatában.



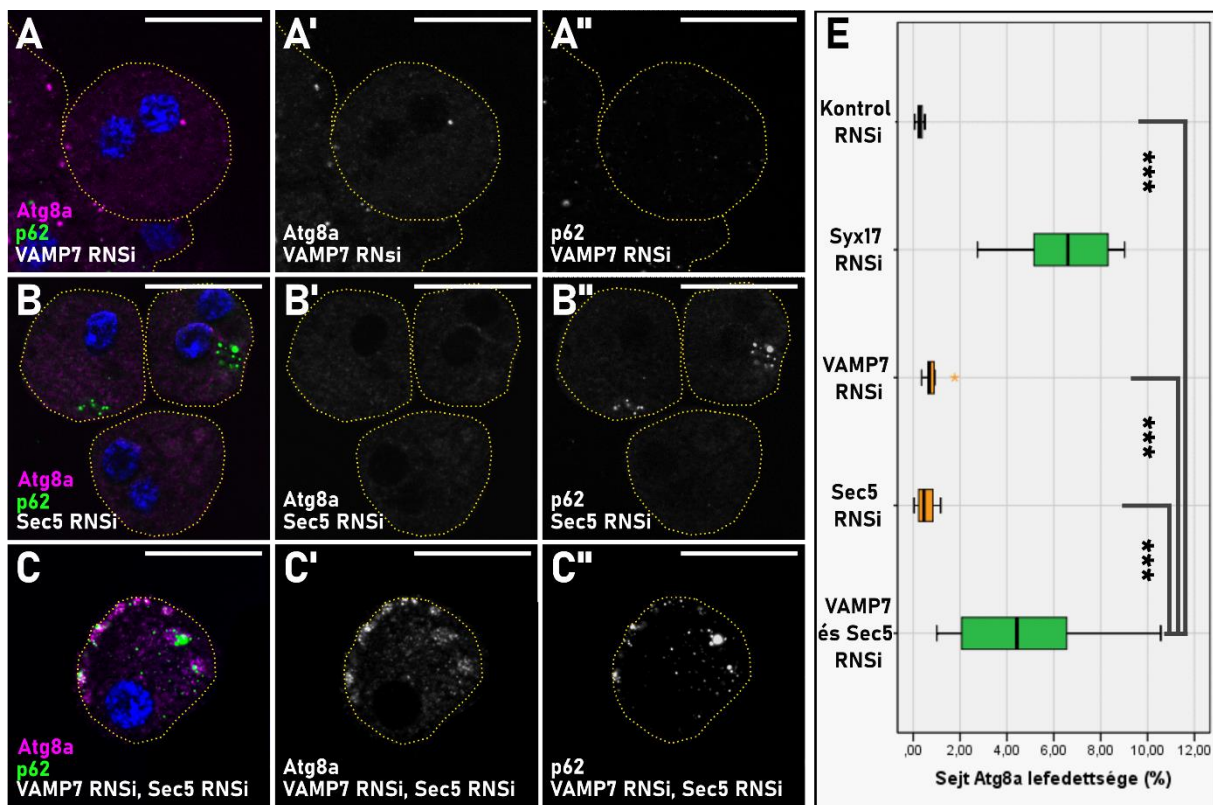
6. Ábra: A Rab30 az autofagoszóma szekrécióhoz szükséges

A két csatorna a Hoechst DNS festék jele a mikroszkópos felvételeken. **A-A'**: Rab30 RNSi, α Atg8, ap62 immunfestés, Garland-sejt. **B-B'**: Rab30 és SNAP29 RNSi, α Atg8, ap62 immunfestés, Garland-sejt. **C-C'**: Rab2 és SNAP29 RNSi, α Atg8, ap62 immunfestés, Garland-sejt. **D**: Rab27 és SNAP29 RNSi, α Atg8, ap62 immunfestés, Garland-sejt. **E**. Sejtek Atg8a lefedettségének kvantifikálása ($n=15$) Skála: 20 μ m.

Az Exocyst komplex autofagoszóma szekrécióhoz is szükséges

Mivel minden vezikuláris membránfúzióban szerepet játszanak pányvázó faktorok, így szerettük volna megtalálni az autofág szekrécióban szerepet játszó pányvázó komplexet. A Rab30 ismert kölcsönható partnerei (Gillingham és mtsai., 2014) közül több is felkeltette az érdeklődésünket. Ezek közül is kiemelkedtek az Exocyst pányvázó komplex alegységei. A Rab

fehérjék közül leginkább a Rab30 köti az Exocyst komplex összes alegységét, így nagyon valószínű kölcsönható partner lehet szekréciós folyamatokban. Kanonikus szekréciót vizsgáló kísérletünk (5.D-D'') kimutatta, hogy míg a Sec5 Exocyst alegység igen, addig a Rab30 kis GTPáz nem szükséges a kanonikus szekrécióhoz. Szerettük volna megállapítani, hogy az autofagoszóma szekréció folyamatában az Exocyst komplex lehet-e a Rab30 kölcsönható partnere. VAMP7 csendesített Garland-nefrocitákban csak elvétve találni Atg8 pozitív vezikulákat (7.A-A''). Sec5 csendesítés esetén (7.B-B'') a sejtméret lecsökken, de hasonlóan a VAMP7 csendesítéshez az autofág vezikulák száma alacsony (7.E). VAMP7 és Sec5 együttes csendesítése (7.C-C'') esetén azonban autofág vezikulák halmozódnak a plazmamembrán alatt. Mivel a VAMP7 az autofagoszóma-lizoszóma fúzióhoz szükséges SNARE fehérje, így ezekben a sejtekben az autofagoszómák lebontása nem lehetséges. Ezzel párhuzamos Sec5 csendesítés pedig úgy tűnik, hogy gátolja az autofagoszóma szekréció folyamatát. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a Rab30-al leírtan kölcsönható Exocyst komplex szerepet játszhat az autofagoszóma szekréció folyamatában.

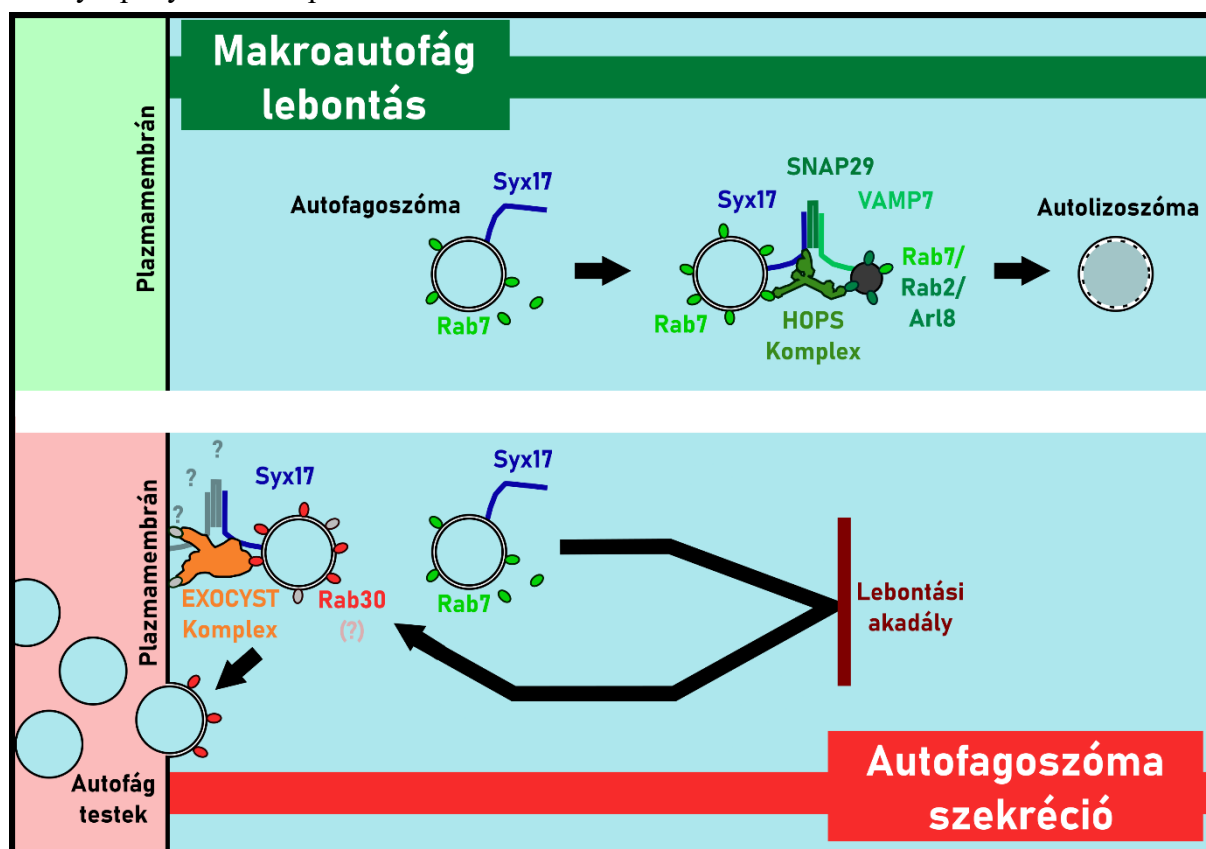


7. Ábra: Az Exocyst komplex az autofagoszóma szekrécióhoz is szükséges

A kék csatorna a Hoechst DNS festék jele a mikroszkópos felvételeken. **A-A'**: VAMP7 RNSi, α Atg8, ap62 immunfestés, Garland-sejt. **B-B'**: Sec5 RNSi, α Atg8, ap62 immunfestés, Garland-sejt. **C-C'**: VAMP7 és Sec5 RNSi, α Atg8, ap62 immunfestés, Garland-sejt. **D**: Sec15-GFP expresszió és Syx17 RNSi, α Atg8 immunfestés, Garland-sejt. **E**. Sejtek Atg8a lefedettségének kvantifikálása ($n=15$) Skála: 20 μ m.

Összefoglalás és kitekintés

Kísérleteink alapján a következő hipotetikus modellt állítottuk fel az autofagoszóma szekréció mechanizmusára (8.ábra). A lebontási útvonal és a szekréció közös pontja a Syx17 Qa-SNARE fehérje: ennek hiányában mind az autofág lebontás, mind az autofág szekréció elakad. Amennyiben a lebontási úton halad az autofagoszóma, akkor Rab7 kis GTPáz, HOPS pányvázó komplex, SNAP29 - és VAMP7 SNARE fehérje dependens módon megvalósul a lizoszómális fúzió: azaz az autofág lebontás. A lebontás valamilyen molekulájának hiánya esetén az autofagoszóma szekréció irányába terelődik. Ebben a folyamatban kísérleteink alapján jelentős szerepe van a Rab30 kis GTPáz fehérjének és kölcsönható partnerének az Exocyst pányvázó komplexnek.



8. Ábra: Az autofagoszóma szekréció hipotetikus modellje

Normál körülmények között a bazális szinten megjelenő autofagoszómák (véltetően nagyrésze) lizoszómával egyesülve lebontják beltartalmukat. A lizoszómális fúzió elmaradása esetében azonban az autofagoszóma Rab30 és Exocyst dependens módon a Syx17 segítségével szekrécióra kerül.

A jövőben szeretnénk az autofagoszóma szekréció folyamatában résztvevő további molekuláris elemeket is azonosítani. Különösen érdekes kérdés lesz annak a potenciális döntési mechanizmusnak a megvizsgálása, ami az autofagoszómát a lebontás irányából a szekréció irányába tereli. Lehetséges, hogy az autofagoszóma szekréció a lebontási útvonal működése

mellett is végbemegy kis mértékben, jelenlegi módszereink sajnos ennek megvizsgálására még nem alkalmasak. Hemolimfa izoláció segítségével sikerült lipidált Atg8a-t kimutatnunk Vps11 (HOPS komplex) mutáns állatokban, ahol hipotézisünk szerint indukálók az autofág szekréció, kontrol állatokban azonban ezt még nem sikerült detektálnunk.

Eddigi eredményeink alapján úgy tűnik, hogy az autofagoszóma szekréciós mechanizmus nem korlátozódik Garland-sejtekre. Az útvonalban azonosított molekulák jelentősen konzerváltak, funkcionális hasonlóságot is mutatnak, így valószínűsíthető, hogy az autofagoszóma szekréció útvonala is konzervált lehet.

Eredményeink több szempontból egyedinek és jelentősnek tekinthetők a szakterületen belül. Az autofagoszóma szekrécióval foglalkozó tanulmányok legtöbbször azok beltartalmának leírására és élettani hatásának megismerésére fókuszálnak (*Solvik és mtsai., 2022; Kimura és mtsai., 2017*). Így azonban a szekretálódó autofagoszóma külső membránjának molekuláris karakterizálása, a folyamatban résztvevő fehérjegyépezetek leírása háttérbe szorul. Feltételezésünk szerint a szekréciós autofágia inkább egy gyűjtőfogalom lehet, mintsem egyetlen molekuláris folyamat. Az interleukin szekrécióban szerepet játszó autofagoszómák szelektív módon különítik el az interleukinokat citoszolikus transzlációjukat követően és lebontás helyett, a lebontási gépezet jelenléte ellenére szekretálódnak (*Kimura és mtsai., 2017*). Ezekben az autofagoszómákban specifikus fehérjék találhatók és nem rendelkeznek például Syx17-tel sem, ami az általunk vizsgált folyamattól eltérő molekuláris útvonalra utal.

Jelenlegi eredményeink alapján úgy gondoljuk, létezik egy olyan autofág szekréciós útvonal, ahol az autofág vezikulák szekrécióra specifikus módon alakulnak ki (ezek mindig specifikus sejtfeleségekben jelennek meg (például egyes immunsejtek)). Illetve létezik egy olyan, általunk vizsgált útvonal, ami a lebontás irányába haladni képtelen autofagoszómák szekréciójáért felelős. Ez a folyamat szerepet játszhat a Parkinson-kórban résztvevő, felgyülemlett α -Synuclein szekréciójában (*Ejlerskov és mtsai., 2013*). Hasonlóan Alzheimer-kór vizsgálata során kimutatták, hogy az autofág mutáns neuronokban az amiloid-béta halmozódás megtörtént, de az extracelluláris plakk formálódás elmaradt (*Nilsson és mtsai., 2013*). Ez arra utal, hogy a plakk képződés legalább részben autofág szekréció-függő folyamat. Ezek fényében az általunk azonosított molekulák mind a további alapkutatás, mind későbbi transzlációs alkalmazások szempontjából kiemelt jelentőségűek lehetnek.

A jövőben érdekes kérdés lehet még többek között a lebontásra szánt autofagoszómák szekrécióra kész formába történő átalakulásának feltárása (Rab30 toborzás mechanizmusa), illetve a folyamat normál (nem lebontás gátolt körülmények között) való alaposabb vizsgálata.

Kiemelt célunk továbbá a szekretált autofagoszómák detektálására szolgáló módszertan további fejlesztése. A jövőben szeretnénk kísérleteinket egyéb módszerekkel megerősíteni és a 8. ábrán még kérdőjellel szereplő molekulák azonosításával az útvonalat részleteiben is leírni, így tovább mélyítve az autofagoszóma szekrécióról szerzett tudásunkat.

Anyagok és módszerek

Drosophila melanogaster törzsek fenntartása

Az ecetmuslicák 25°C fokon, kukoricaliszt-agar-élesztő alapú standard táptalajon voltak tartva, átlag 12 órás megvilágítás mellett.

Felhasznált törzsek és genotípusok

Expressziós rendszerek		
Törzs	Felhasználás	Ábra
+;DCR; Prospero>Gal4/TM6	Garland-sejtekben történő expresszió	1.,2.,3.,4.,5.,6.,7.
+;DCR; Prospero>Gal4; Syx17 JF/TM6	Garland-sejtekben történő expresszió, Syx17 csendesítés mellett	2.,3.,4.
+;DCR; Prospero>Gal4; SNAP29 JF/TM6	Garland-sejtekben történő expresszió, SNAP29 csendesítés mellett	6.,7.
+;Sgs3-dsRed; forkheadGal4	Nyálmirigyekben történő expresszió	5.
+, hs-Flp; UAS-2xeGFP, 3xmCherry-Atg8a; Act>CD2>Gal4, UAS-Dcr2	Zsírtestekben történő mozaikos expresszió	5.
RNS interferencia törzsek		
Törzs	Törzsszám	Ábra
Syx17 JF	01937	1.,2.,3.,4.
SNAP29 JF	01883	1.,6.
VAMP7 R-1	1599R-1	6.
Sec5 JF	27526	5., 7.

Rab30 JF	31120	5., 6.
Vps16 GD	v23769	1.
Rab2 GD	v34767	6.
Rab27 JF	31887	6.
Arl8 GD	v26085	2.
Riporter törzsek		
Vps41-3xHA	Lőrincz és mtsai., 2019	2.
Rab1-GFP	24104	3.
Rab2-GFP	9760	3.
Rab3-YFP	9762	3.
Rab6-YFP	23251	3.
Rab7-GFP	42705	3.
Rab9-YFP	9783	3.
Rab9Fb-YFP	9847	3.
Rab10-YFP	9789	3.
Rab11-GFP	8506	3.
Rab14-YFP	9793	3.
Rab19-YFP	24150	3.
Rab21-YFP	23242	3.
Rab23-YFP	9802	3.
Rab26-YFP	23245	3.
Rab27-YFP	9810	3.
Rab30-YFP	9812	3.,4.
Rab30DN-YFP	9813	4.
Rab30CA-YFp	9814	4.
Rab32-YFP	9815	3.
Rab35-YFP	9821	3.
Rab40-YFP	9830	3.
Mutánsok		
Syx17 LL	Kyoto:140948	1.
Vps11 LL	Kyoto:141824	1.

1. Táblázat: Felhasznált törzsek listája

Ex vivo minták fixálása és immunfestés

A kívánt szöveteket L3-as stádiumú vándorló lárvákból boncoltam ki. Mind a zsírtestek előkészítését, mind a Garland-sejtek festését már korábban alkalmazott protokoll szerint végeztem (Lőrincz és mtsai., 2019). Az *ex vivo* mintákat szobahőmérsékletű PBS-ben történő mikrocipesszel kiboncolását követően 4%-os Formaldehid-PBS fixáló oldatban fixáltam 30-40 percig. A fixálást követően 3X PBS öblítés, majd 10 perc mosás következett. A zsírtestek ezt követően már a fedési lépéshez értek. Az immunfestéshez a Garland-mintákat ezt követően PBTX-szel (0,1% Triton-X 100 tartalmú PBS) 15 percig permeabilizáltam. Húsz perc 5% kecske szérumot tartalmazó PBTX oldatban blokkoltam, majd 4°C-on 16 órán keresztül blokkolóban hígított, 1% Nátrium-azidot tartalmazó antitest keverékben inkubáltam. Másnap 3X PBTX öblítés után 5% NaCl-tartalmú PBTX oldattal kimosztam az aspecifikusan kötő antitesteket. Majd 3X PBTX öblítés és 15 perc mosást követően az elsődleges ellenanyaghoz hasonló módon blokkoltam. Ezután a jelölt másodlagos antitesteket tartalmazó blokkoló oldatban 3 óráig (sötétben, szobahőmérsékleten) inkubáltam a mintákat. Ezt követően 3X PBTX öblítés, 15 perc sózó oldatos inkubálás, 3X PBTX öblítés és 3X 10 perc PBS mosás következett. A használt antitestek a következők voltak:

NÉV	Forrás/Hivatkozás	Hígítás
Egér monoklonális anti-Rab7	DSHB	1:10
Patkány poliklonális anti-Atg8a	Takáts és mtsai., 2013	1:300
Nyúl poliklonális anti-p62	Pircs és mtsai., 2012	1:1000
Nyúl poliklonális anti-Rab5	Abcam	1:100
Nyúl poliklonális anti-LAMP	Chaudhry és mtsai., 2022	1:1000
Csirke poliklonális anti-GFP	Abcam	1:600
Nyúl poliklonális anti-HA	Invitrogen	1:300
Alexa Fluor 568 ló anti-egér	Invitrogen	1:1000
Alexa Fluor 568 kecske anti-nyúl	Invitrogen	1:1000
Alexa Fluor 488 kecske anti-nyúl	Invitrogen	1:1000
Alexa Fluor 568 kecske anti-patkány	Invitrogen	1:1000
Alexa Fluor 488 kecske anti-csirke	Invitrogen	1:600

2. Táblázat: A felhasznált antitestek listája

Mintaelőkészítés, fotózás

Az *ex vivo* Garland-sejt tartalmú immunfestett mintákat VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium-al fedtem, míg a fixált zsírtesteket Hoechst tartalmú glicerín-PBS (20:80) arányú keverékében fedtem. A képek elkészítéséhez AxioImager M2 epifluoreszcens mikroszkópot (Carl Zeiss) és AxioCam MRm kamerát használtam. A mikroszkópos rendszer szemikonfokális ApoTome1 készülékkel volt felszerelve. Objektív 63X, 1,4 NA (immerziós). Használt szoftver: Zeiss ZEN PRO.

Elektronmikroszkópia

Témavezetőm irányításával és Truszka Mónika közreműködésével a hivatkozott cikkben leírt protokoll alapján (*Lőrincz és mtsai., 2016*), a következő módosítások mellett: uranil-acetát helyett fél óra 1%-os csersavat használtunk a kontrasztozáshoz, a sejthatárok kijelölése érdekében. Elektronmikroszkóp: ELTE JEOL JEM 1011

Hemolimfa izolálás és Western Blot eljárás

A hemolimfa izoláláshoz megsebzett kutikulájú L3-as lárvák (10mg állat) fungáltattunk 1700 RPM-mel 7 percig 4°C-on asztali fuga segítségével, az állatok testét és szöveteit visszatartó egyszerű szűrőn keresztül 10 µl 1% PTU és Proteáz inhibitor koktélt tartalmazó M3-médiumba. A fugálást követően 10 µl felülúszót leszívtuk és 10 µl 1x Laemmli pufferrel kevertük. A mintaelőkészítés további lépései, a testekből származó minták elkészítését, illetve a Western Blot technikai paramétereit a következő cikk részletesen tartalmazza: (*Takáts és mtsai., 2013*). Felvitt minták mennyisége: 15 µl. A mintákat a felvitel előtt 5 percig forraltuk, a visszamaradt lipidek zavaró hatásának kizárása érdekében. A minták futtatását 13%-os akrilamid gélen végeztem BioRad Kit segítségével. A blot lépést BioRad TurboBlot segítségével végeztem standard beállítások mellett. A fehérjék előhívásához 3 lépcsős immunjelölést használtam a jel erősítése érdekében. Első lépcső: Antigénre specifikus antitest. Második lépcső: Elsődleges antitest nem variábilis régiójára specifikus, biotin konjugált antitest (1:2000). Harmadik lépcső: StreptAvidin konjugált alkalikus foszfatáz enzim (1:10 000-ben hígítva). Az alkalikus foszfatáz reakciót a telítési pontig folytattam, ezt követően a szubsztrát desztillált vízzel való kimosásával állítottam meg az enzimreakciót. A nitrocellulóz membránokat a lehetséges legnagyobb felbontáson szkenneltük, majd kiértékeltek. Az előhíváshoz a következő antitesteket használtam:

Antitest neve	Hivatkozás/Forrás	Hígítás
Nyúl poliklonális anti-p62	Pircs és mtsai., 2012	1:6 000
Nyúl poliklonális anti-Atg8a	Takáts és mtsai., 2013	1:3 000
Nyúl poliklonális anti-LSP2	Csikós és mtsai., 2009	1:10 000
StreptAvidin konjugált Alkalikus foszfatáz	Sigma-Aldrich	1: 10 000
Kecske Biotin konjugált anti-nyúl	Abcam	1:4 000

3. Táblázat: *A Western Blot kísérletek során használt ellenanyagok*

Nyálszekréciós teszt

A kanonikus szekréció vizsgálatához UAS-Sgs3-dsRed-t forkhead GAL4 meghajtott módon, nyálmirigyspecifikusan expresszáló törzseket használtam. A bábozódás korai fázisában, fehér báb stádiumban mikroczipesz segítségével a fenntartáshoz szolgáló csövek faláról gyűjtöttem élő ecetmuslicákat. Az állatokat ventrális oldalukkal felfelé tárgylemezre helyeztem és Plan-Neofluar 5x, 0,16 NA objektívvel a fent említett mikroszkópos rendszer segítségével készítettem felvételeket azonos expozíciós idővel a törzsszövegben említett 3 genotípusból (N=10).

Adatok kiértékelése és ábrázolása

Az készített mikroszkópos felvételeket ImageJ szoftver segítségével kvantifikáltuk, majd SSP szoftver segítségével analizáltuk. A mikroszkópos felvételekből a sejtek 3 µm vastagságú, magi síkjban felvett részleteit használtuk fel a kvantifikációhoz. A kolokalizáció vizsgálatához szükséges Manders-diagrammok kinyeréséhez, a Pearson-koefficiensek kiszámításához, a Western Blot és az alkalikus foszfatáz előhívást követő gélképek szürkeárnyalat-profiljának a felvételéhez szintén az ImageJ szoftvert használtuk. Minden statisztikai mutatókat is feltüntető ábra statisztikája legalább 7 kontrol és 7 kezelt/transzgén állatból származó mindösszesen 15-15 sejt felhasználásával készült (n=15). Az adatok ábrázolása szintén SPSS szoftver segítségével készült. A bemutatott képek és saját ábrák InkScape szoftver segítségével készültek. A kiértékeléshez Tukey post-hoc tesztel kiegészített ANOVA - vagy Kruskal-Wallis tesztet végeztünk (a normalitás függvényében). A dolgozat során: *** : $p < 0,000$, **: $p < 0,05$.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani elsősorban témavezetőmnek, Dr. Lőrincz Péternek a fáradhatatlan munkájáért és rengeteg segítségéért, ami nélkül jelen dolgozatban tárgyalt

kutatómunka elképzelhetetlen lett volna. Különösen hálás vagyok a dolgozat írása során nyújtott szakmai tanácsaiért.

Szeretném megköszönni továbbá Nagy Anikónak a keresztezések kivitelezésében és a kísérletek elvégzésében nyújtott segítséget, illetve Truszka Mónikának az elektronmikroszkópos minták előkészítését.

Szeretném megköszönni Dr. Lőw Péter tanszékvezetőnek a kísérletek kivitelezéséhez szükséges infrastruktúrális háttér biztosítását és Dr. Juhász Gábornak a szükséges törzsek, illetve számos reagens biztosítását.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni az ELTE Anatómia-, Sejt-, és Fejlődésbiológiai Tanszék, illetve az MTA-ELTE Vezikuláris Transzport kutatócsoport összes munkatársának a munkám során felmerülő mindenfajta problémában való segítséget.

Támogatás

A dolgozat a Kulturális és Innovációs Minisztérium ÚNKP-22-2-III-ELTE-702 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.



Irodalomjegyzék

Bas, L., Papinski, D., Licheva, M., Torggler, R., Rohringer, S., Schuschnig, M., & Kraft, C. (2018). Reconstitution reveals Ykt6 as the autophagosomal SNARE in autophagosome-vacuole fusion. *The Journal of cell biology*, 217(10), 3656–3669.

<https://doi.org/10.1083/jcb.201804028>

Brighouse, A., Dacks, J. B., & Field, M. C. (2010). Rab protein evolution and the history of the eukaryotic endomembrane system. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 67(20), 3449–3465. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0436-1>

Boda A, Lőrincz P, Takáts S, et al. Drosophila Arl8 is a general positive regulator of lysosomal fusion events. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2019;1866(4):533-544. <https://doi:10.1016/j.bbamcr.2018.12.011>

Cebollero E, van der Vaart A, Zhao M, et al. Phosphatidylinositol-3-phosphate clearance plays a key role in autophagosome completion. *Curr Biol.* 2012;22(17):1545-1553. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.06.029>

Chang, C., Jensen, L.E. & Hurley, J.H. Autophagosome biogenesis comes out of the black box. *Nat Cell Biol* **23**, 450–456 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41556-021-00669-y>

Chaudhry, N., Sica, M., Surabhi, S., Hernandez, D. S., Mesquita, A., Selimovic, A., Riaz, A., Lescat, L., Bai, H., MacIntosh, G. C., & Jenny, A. (2022). Lamp1 mediates lipid transport, but is dispensable for autophagy in *Drosophila*. *Autophagy*, 18(10), 2443–2458. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2038999>

Chernomordik, L. V., & **Kozlov, M. M.** (2008). Mechanics of membrane fusion. *Nature structural & molecular biology*, 15(7), 675–683. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1455>

Duran, J. M., Anjard, C., Stefan, C., Loomis, W. F., & Malhotra, V. (2010). Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes. *The Journal of cell biology*, 188(4), 527–536. <https://doi.org/10.1083/jcb.200911154>

Ejlervskov, P., Rasmussen, I., Nielsen, T. T., Bergström, A. L., Tohyama, Y., Jensen, P. H., & Vilhardt, F. (2013). Tubulin polymerization-promoting protein (TPPP/p25 α) promotes unconventional secretion of α -synuclein through exophagy by impairing autophagosome-lysosome fusion. *The Journal of biological chemistry*, 288(24), 17313–17335. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.401174>

Fu Y, Zhu JY, Zhang F, Richman A, Zhao Z, Han Z. Comprehensive functional analysis of Rab GTPases in *Drosophila* nephrocytes. *Cell Tissue Res.* 2017;368(3):615-627. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2575-2>

Gatica, D., Lahiri, V. & Klionsky, D.J. Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nat Cell Biol* **20**, 233–242 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0037-z>

Gillingham AK, Sinka R, Torres IL, Lilley KS, Munro S. Toward a comprehensive map of the effectors of rab GTPases. *Dev Cell.* 2014;31(3):358-373. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.10.007>

Hegedűs K, Takáts S, Boda A, et al. The Ccz1-Mon1-Rab7 module and Rab5 control distinct steps of autophagy. *Mol Biol Cell.* 2016;27(20):3132-3142. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-03-0205>

Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell.* 2012;151(6):1256-1269. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.001>

Jacomin AC, Fauvarque MO, Taillebourg E. A functional endosomal pathway is necessary for lysosome biogenesis in *Drosophila*. *BMC Cell Biol.* 2016;17(1):36. Published 2016 Nov 16. <https://doi:10.1186/s12860-016-0115-7>

Kelly EE, Giordano F, Horgan CP, Jollivet F, Raposo G, McCaffrey MW. Rab30 is required for the morphological integrity of the Golgi apparatus. *Biol Cell.* 2012;104(2):84-101. <https://doi:10.1111/boc.201100080>

Keulers TG, Schaaf MB, Rouschop KM. Autophagy-Dependent Secretion: Contribution to Tumor Progression. *Front Oncol.* 2016;6:251. Published 2016 Nov 25. <https://doi:10.3389/fonc.2016.00251>

Kim J, Gee HY, Lee MG. Unconventional protein secretion - new insights into the pathogenesis and therapeutic targets of human diseases. *J Cell Sci.* 2018;131(12):jcs213686. Published 2018 Jun 25. <https://doi:10.1242/jcs.213686>

Kimura T, Jia J, Kumar S, et al. Dedicated SNAREs and specialized TRIM cargo receptors mediate secretory autophagy. *EMBO J.* 2017;36(1):42-60. <https://doi:10.15252/embj.201695081>

Klöpfer, T.H., Kienle, N., Fasshauer, D. *et al.* Untangling the evolution of Rab G proteins: implications of a comprehensive genomic analysis. *BMC Biol* **10**, 71 (2012). <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-71>

Lőrincz P, Lakatos Z, Varga Á, Maruzs T, Simon-Vecsei Z, Darula Z, Benkő P, Csordás G, Lippai M, Andó I, Hegedűs K, Medzihradszky KF, Takáts S, Juhász G. MiniCORVET is a Vps8-containing early endosomal tether in *Drosophila*. *eLife.* 2016a;5:e14226. <https://doi:10.7554/eLife.14226>

Lőrincz P, Tóth S, Benkő P, et al. Rab2 promotes autophagic and endocytic lysosomal degradation. *J Cell Biol.* 2017;216(7):1937-1947. <https://doi:10.1083/jcb.201611027>

Lőrincz P, Kenéz LA, Tóth S, et al. Vps8 overexpression inhibits HOPS-dependent trafficking routes by outcompeting Vps41/Lt. *Elife.* 2019;8:e45631. Published 2019 Jun 13. <https://doi:10.7554/eLife.45631>

Lőrincz P, Juhász G. Autophagosome-Lysosome Fusion. *J Mol Biol.* 2020;432(8):2462-2482. <https://doi:10.1016/j.jmb.2019.10.028>

Ma CJ, Brill JA. Endosomal Rab GTPases regulate secretory granule maturation in *Drosophila* larval salivary glands. *Commun Integr Biol.* 2021;14(1):15-20. Published 2021 Feb 9. <https://doi:10.1080/19420889.2021.1874663>

Matsui, T., Jiang, P., Nakano, S., Sakamaki, Y., Yamamoto, H., & Mizushima, N. (2018). Autophagosomal YKT6 is required for fusion with lysosomes independently of syntaxin 17. *The Journal of cell biology*, 217(8), 2633–2645. <https://doi.org/10.1083/jcb.201712058>

Mizushima N, Levine B. Autophagy in Human Diseases. *N Engl J Med*. 2020;383(16):1564-1576. <https://doi:10.1056/NEJMra2022774>

More, K., Klinger, C. M., Barlow, L. D., & Dacks, J. B. (2020). Evolution and Natural History of Membrane Trafficking in Eukaryotes. *Current biology : CB*, 30(10), R553–R564. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.03.068>

Morelli E, Ginefra P, Mastrodonato V, et al. Multiple functions of the SNARE protein Snap29 in autophagy, endocytic, and exocytic trafficking during epithelial formation in *Drosophila*. *Autophagy*. 2014;10(12):2251-2268. <https://doi:10.4161/15548627.2014.981913>

Nagy P, Szatmári Z, Sándor GO, Lippai M, Hegedűs K, Juhász G. *Drosophila* Atg16 promotes enteroendocrine cell differentiation via regulation of intestinal Slit/Robo signaling. *Development*. 2017;144(21):3990-4001. <https://doi:10.1242/dev.147033>

New J, Thomas SM. Autophagy-dependent secretion: mechanism, factors secreted, and disease implications. *Autophagy*. 2019;15(10):1682-1693. <http://doi:10.1080/15548627.2019.1596479>

Nilsson, P., Loganathan, K., Sekiguchi, M., Matsuba, Y., Hui, K., Tsubuki, S., Tanaka, M., Iwata, N., Saito, T., & Saido, T. C. (2013). A β secretion and plaque formation depend on autophagy. *Cell reports*, 5(1), 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.042>

Nilsson P, Saido TC. Dual roles for autophagy: degradation and secretion of Alzheimer's disease A β peptide. *Bioessays*. 2014;36(6):570-578. <https://doi:10.1002/bies.201400002>

Pircs K, Nagy P, Varga A, et al. Advantages and limitations of different p62-based assays for estimating autophagic activity in *Drosophila*. *PLoS One*. 2012;7(8):e44214. <https://doi:10.1371/journal.pone.0044214>

Scarlatti F, Maffei R, Beau I, Ghidoni R, Codogno P. Non-canonical autophagy: an exception or an underestimated form of autophagy?. *Autophagy*. 2008;4(8):1083-1085. <https://doi:10.4161/auto.7068>

Sinka R, Gillingham AK, Kondylis V, Munro S. Golgi coiled-coil proteins contain multiple binding sites for Rab family G proteins. *J Cell Biol*. 2008;183(4):607-615. <https://doi:10.1083/jcb.200808018>

Solvik, T. A., Nguyen, T. A., Tony Lin, Y. H., Marsh, T., Huang, E. J., Wiita, A. P., Debnath, J., & Leidal, A. M. (2022). Secretory autophagy maintains proteostasis upon lysosome inhibition. *The Journal of cell biology*, 221(6), e202110151. <https://doi.org/10.1083/jcb.202110151>

- Takáts** S, Pircs K, Nagy P, et al. Interaction of the HOPS complex with Syntaxin 17 mediates autophagosome clearance in *Drosophila*. *Mol Biol Cell*. 2014;25(8):1338-1354 <https://doi:10.1091/mbc.E13-08-0449>
- Takáts** S, Nagy P, Varga Á, et al. Autophagosomal Syntaxin17-dependent lysosomal degradation maintains neuronal function in *Drosophila*. *J Cell Biol*. 2013;201(4):531-539. <https://doi:10.1083/jcb.201211160>
- Takáts**, S., Glatz, G., Szenci, G., Boda, A., Horváth, G. V., Hegedűs, K., Kovács, A. L., & Juhász, G. (2018). Non-canonical role of the SNARE protein Ykt6 in autophagosome-lysosome fusion. *PLoS genetics*, 14(4), e1007359. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007359>
- Underwood** R, Wang B, Carico C, Whitaker RH, Placzek WJ, Yacoubian TA. The GTPase Rab27b regulates the release, autophagic clearance, and toxicity of α -synuclein. *J Biol Chem*. 2020;295(23):8005-8016. <https://doi:10.1074/jbc.RA120.013337>
- Wang** C, Liu Z, Huang X. Rab32 is important for autophagy and lipid storage in *Drosophila*. *PLoS One*. 2012;7(2):e32086. <https://doi:10.1371/journal.pone.0032086>