

Zárójelentés

OTKA K (109349) 2013-2017: **Uncovering novel developmental/cellular functions and transcriptional regulators of autophagy genes**/Autofágia (sejtes önmérsztés) gének új egyedfejlődési és sejtes funkcióinak, valamint transzkripciós szabályozó faktorainak feltárása.

Témavezető: Vellai Tibor, ELTE Genetikai Tanszék

Kutatási programunk célja kettős volt. Egyrészt az autofágia (sejtes önmérsztés) új egyedfejlődési és sejttani funkcióit kívántuk feltárni. Másrészt a folyamat új *upstream* szabályozó faktorait (*Atg* gének expresszióját befolyásoló transzkripciós faktorok és ezen keresztül jelátviteli rendszerek) szerettük volna azonosítani. Elsőként a *Drosophila melanogaster* összetett szemének fejlődését vizsgáltuk autofágia deficiens genetikai hátterekben. A muslica szemtelepe az egyik legintenzívebben vizsgált és legjobban megértett szervfejlődési modell a fejlődésgenetika területén. Kimutattuk, hogy *Atg* mutáns vagy géncsendesített (RNS interferencia, RNSi) állatokban nem (*eyeless*) vagy csak csökevényesen (*small eye*) fejlődik ki az összetett szem (Billes és mtsi., 2018). A csökkent méretű szemtelep egy fokozott apoptotikus sejtpusztulási folyamat eredménye. Az autofágia hiánya tehát apoptózishoz vezet. Érdekes módon ez a morfológiai fenotípus erősebben nyilvánult meg az *Atg-RNSi* állatokban, mint az *Atg* genetikai null mutáns állatokban. A jelenség mögött genetikai kompenzációs mechanizmusok húzódnak meg, amelyek csökkentik a gének funkcióvesztéses mutációinak fenotípusos megnyilvánulását. Eredményeink szerint az ilyen kompenzációs mechanizmusok közé tartoznak a paralóg génfunkciók felerősödése, a *splice* variánsok fokozott expressziója, illetve az anyai hatású faktorok fokozott működése. Kimutattuk, hogy a fejlődő szemtelepben az *Atg8a* autofágia kulcsgén expresszióját két HOX transzkripciós faktor, a Labial és a Deformed közvetlenül szabályozza. A kötőhely elrontása irányított mutagenézissel megszüntette a Lab *Atg8a*-ra kifejtett szabályozó hatását. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az autofágia sokkal szigorúbb egyedfejlődési kontroll alatt áll, mint ahogy azt korábban gondolták (az eddigi felfogás szerint a folyamat elsősorban környezeti stresszre aktiválódik) (Billes és mtsi., 2018). Ezen a projekten keresztül szereltünk fel egy új „*Drosophila* fejlődésgenetika” kutatócsoportot az ELTE Genetikai Tanszékén, és a projektben résztvevő Kovács Tibor azóta adjunktusi alkalmazásba került, míg Billes Viktor pályázaton alkalmazott tudományos munkatárs lett.

Az autofágia szemfejlődésben betöltött funkciójának vizsgálata során részletesen jellemeztünk egy autofágiát szabályozó fehérjét, az EDTP-t. Az EDTP a humán myotubularin-típusú foszfataz MTMR14/hJumpy muslica ortológja. Az MTMR foszfatazok az autofág membránképződés negatív szabályozó faktorai (az izoláló membrán szintézisében szerepet játszó III. típusú foszfatidilinozitol 3-kináz Vps34/PtdIns-3K antagonistái), gátolják a folyamat hiperaktiválódását indukzív (stressz) körülmények között (az autofágia túlzott működése ugyanis sejtpusztuláshoz vezet). Az *Edtp* genetikai analízise során számos mutáns allélt jellemeztünk, és kimutattuk a gén autofágiában és endocitózisban betöltött szerepét normális és stressz-indukált körülmények között (Manzéger és mtsi., kézirat elkészítés alatt, 2018). Ugyancsak elvégeztünk egy másik MTMR-típusú gén, a CG3530 genetikai jellemzését. Kimutattuk, hogy ezek a myotubularin foszfatazok differenciáltan szabályozzák az autofág folyamatot stresszhatások során (Manzéger és mtsi., kézirat elkészítés alatt, 2018).

Az MTMR14/hJumpy kiváló gyógyszer-célpontnak ígérkezett (a gátló gátlása): az autofágia farmakológiai aktiválása számos öregkori degeneratív patológia kialakulását előzheti meg vagy késleltetheti. Több MTMR14-et blokkoló ún. AUTEN (*autophagy enhancer*) kismolekulát izoláltunk kismolekula könyvtárak szűrésével, amelyek potens öregedés gátló (*antiaging*) és neuroprotektív hatásokkal rendelkeztek *in vivo* neurodegeneratív betegségmodellekben (Papp és mtsi., 2016; Billes és mtsi., 2016; Klionsky, és mtsi., 2016; Kovács és mtsi., 2017). Humán mutáns Huntingtin vagy Parkin fehérjét expresszáló transzgénikus *Drosophila* törzsekben az AUTEN gyógyszerjelöltek potensen fokozták az autofág folyamat fluxusát, gátolták a toxikus fehérjék akkumulációját, gátolták/késleltették az érintett neuronok pusztulását, javították az állatok mozgási képességét, és növelték az élettartamot. Emlős primer és stabil sejtenyészetekben az AUTEN kezelések fokozták a neuronok és egyéb sejtípusok túlélését, Alzheimer's modell egerekben pedig javították a nőstények fészekrakó viselkedését. Kimutattuk az MTMR14 expresszióját humán neuronokban is (Billes és mtsi., 2016). Az AUTEN-99-ről igazoltuk, hogy hatékonyan jut át *in vitro* vér-agy gát modellben a membrán egyik oldaláról a másikra. Az AUTEN molekulák preklinikai tesztelése gyógyszerfejlesztési célból jelenleg zajlik.

Egyik nagyon izgalmas megfigyelésünk az EDTP/MTMR14 myotubularin foszfatáz életkorfüggő akkumulációja volt neuronokban. Ez azt sugallja, hogy a neuronális öregedés részben szabályozott folyamat. Az MTMR14/EDTP foszfatázok egyre intenzívebben expresszálódnak a felnőtt élettartam során, és így egyre erőteljesebben csökkentik az autofág folyamat kapacitását neuronokban (Szinyákovics és mtsi., kézirat elkészítés alatt, 2018). Mivel az autofágia alapvető fontosságú a sejt károsodások eltávolításában és a sejt anyagának megújításában (makromolekula turnover), ezért a folyamat fokozatosan csökkenő aktivitása megmagyarázza, miért pusztulnak el neuronok tömegesen az életkor előrehaladtával. Eredményeink szerint az autofágia kapacitása öregedéssel fokozatosan hanyatlott *Drosophila* agytörzsben és humán neuronokban egyaránt (Szinyákovics és mtsi., kézirat elkészítés alatt, 2018). Ezek az eredmények egy új öregedés-serkentő (*proaging*) fehérjét tártak fel (elsőként az öregedés biológia területén), illetve rámutatnak arra, hogy az MTMR14 egy kiváló gyógyszer-célpont neurodegeneratív betegségek kezeléséhez (fokozatosan növekvő káros – öregítő – aktivitását célszerű blokkolni).

Az autofágia az egyik legjelentősebb sejt fenntartó (sejtprotektív) mechanizmus, kiemelt szerepe van a sejt homeosztázis fenntartásában, és így az öregedési folyamat lassításában. Az autofágia sztochasztikusan elromolhat *Atg* géneket érintő (random) mutációk következtében is, amelyek közül a legjelentősebb hatásúnak az *Atg* génekbe inszertálódó transzpozábilis genetikai elemek (TE-k, másnéven „ugráló gének”) bizonyultak. Ez elvezetett minket egy új öregedési modell megalkotásához (Sturm és mtsi., 2015; 2017). E modell lényege, hogy a szomatikus sejtekben az életkorral fokozatosan aktiválódó TE-k jelentős mértékű genomi instabilitást okoznak. A TE mutagenézis az érintett sejtek funkciójának leromlásához, majd pusztulásához vezet. A tömeges sejtpusztulás aztán az érintett szerv diszfunkcióját (egy öregkori degeneratív betegség) eredményezi, ami végül az egyén halálát okozza. A nem öregedő, korlátlan osztódási potenciállal rendelkező sejtekben (pl. csíravonal és rákos őssejtek) a Piwi-piRNS útvonal hatékonyan gátolja a TE-k mozgását. Az elmélet kísérletes igazolásához aktív TE családokat blokkoltunk *Caenorhabditis elegans* fonalféregben egy új, hatékony RNSi technológia kifejlesztésének segítségével (Sturm és mtsi., 2018). A TE-csendesített állatok élettartama hosszabb volt, mint a kontroll (üres RNSi vektort expresszáló) állatoké (Sturm és mtsi., kézirat *peer review* alatt, 2018). Hasonló élettartam növelő hatást tapasztaltunk Piwi

fehérjék (ektopikus) szomatikus expressziója során *C. elegans*-ban és *Drosophilában* egyaránt. A Piwi fehérjék magas szintű szomatikus expressziója tumorfejlődést indukált a transzgénikus állatokban. Kimutattuk továbbá, hogy az adenin metiláció szintje életkor-függő módon növekszik a TE szekvenciák mentén, és ez a kromatin módosulás hozzájárul a TE-k transzkripció aktiválódásához, majd mobilizációjukhoz, és ezen keresztül az öregedési folyamat fokozásához (Sturm és mtsi., kézirat [peer review alatt](#), 2018). Az elemzések egyik eredménye (mellékterméke) az öregedésben szerepet játszó új fehérjék bioinformatikai (géptanulás) azonosítása volt humánban (Kerepesi és mtsi., 2018). Másrészt feltártuk az öregedési folyamat szex-specifikus szabályozásának molekuláris alapját *C. elegans*-ban (a hermafroditák 20%-kal hosszabb ideig élnek, mint a hímek) (Hotzi és mtsi., 2018).

Zebrahalban (*Danio rerio*) vizsgáltuk az autofágia szöveti regenerációban betöltött szerepét. A zebrahal farokúszója kiváló regenerációs modell, mivel a szerv amputációt követően kb. 2 hét alatt képes az eredeti formájában visszanojni, és ezt korlátlan számban képes megismételni. *Atg* génfunkciók morfolinóval történő blokkolása jelentős mértékben meggátolta a farokúszó regenerációját (Varga és mtsi., 2014, Varga és mtsi., 2015; Fodor és mtsi., 2017). *Atg8/Lc3-Gfp* transzgénikus állatok előállításával és vizsgálatával igazoltuk az autofágia indukcióját a regenerálódó szövetben (blasztéma). Ugyancsak vizsgáltuk az autofágia szerepét az őssejtek regenerációjában *Drosophila* testiszben. Kimutattuk, hogy a csíravonal őssejtek regenerációja során az autofágia indukálódik, és ez egy specifikus – amfiszóma közvetített – mitofágiában nyilvánul meg. Az indukcióhoz szükséges Jak-STAT jelet a regenerálódó területhez vándorló hemociták (immunsejtek) szolgáltatják. Számos *Atg* gén promóterében azonosítottunk Jak-STAT-specifikus kötőhelyet, amelyek elrontása megszüntette az autofágia indukcióját (Kovács és mtsi., kézirat [elkészítés alatt](#), 2018).

Ugyancsak megvizsgáltuk az autofágia szerepét az oxidatív stressz-válaszban. Kimutattuk, hogy az oxidatív stressz során kulcsfontosságú szerepet betöltő Nrf2 transzkripció faktor közvetlenül szabályozza az AMP-függő kinázt (AMPK/AAK-t), és ezen keresztül gátolja az autofágia folyamatát *C. elegans*-ban és humán sejtekben egyaránt (Kosztelnik és mtsi., kézirat [elkészítés alatt](#); 2018). Itt megint egy olyan visszacsatoló (*feedback*) mechanizmust tártunk fel, amely meggátolja az autofágia hiperaktiválódását – és ezáltal a sejtes „öntúlevést” – induktív körülmények között (Kapuy és mtsi., 2018).

Bioinformatikai elemzésekkel meghatároztuk az autofágiát szabályozó jelátviteli útvonalak és transzkripció faktorok hálózatát (Türei és mtsi., 2015), valamint azokat a kritikus paralóg csoportokat, amelyek esszenciálisak eme jelátviteli üzenetek szabályozásában (Módos és mtsi., 2016). Ugyancsak rámutattunk arra, hogy primitív protozoa taxonokban nincs meg az ATG1 komplex, tehát bennük az autofágia indukciója másképpen mehet végbe, mint a magasabb rendűek esetében (Földvári-Nagy és mtsi., 2014).

Végül a projekt keretében számos autofágia specifikus genetikai/sejtbiológiai analízist végeztünk el *Drosophila* modellen. Ennek keretében kimutattuk, hogy a Retromer komplex szükséges a lizoszóma funkciók fenntartásához (Maruzs és mtsi., 2015), valamint hogy a Rab11 fehérje elősegíti az autofágia és az endoszómális útvonal kommunikációját (Sztamári és mtsi., 2014).

Referenciák

(szöveggközi említés sorrendjében)

Billes V, Kovács T, Manzéger A, Lőrincz P, Szincsák S, Regős Á, Kulcsár P, Korcsmáros T, Lukácsovich T, Hoffmann G, Erdélyi M, Mihály J, Takács-Vellai K, Sass S, **Vellai T**. Developmentally regulated autophagy is required for eye formation in *Drosophila*. *Autophagy* In press (2018).

Manzéger A, Kovács T, Billes V, Tagscherer K, Szinyákovics J, **Vellai T**. Differentiated roles of myotubularin phosphatases in controlling autophagy and endocytosis in *Drosophila*. kézirat elkészítés alatt (2018).

Papp D, Kovács T, Billes V, Varga M, Tarnóci A, Hackler L Jr, Puskás LG, Liliom H, Tárnok K, Schlett K, Borsy A, Pádár Z, Kovács AL, Hegedűs K, Juhász G, Komlós M, Erdős A, Gulyás B, **Vellai T**. AUTEN-67, an autophagy-enhancing drug candidate with potent antiaging and neuroprotective effects. *Autophagy* 12(2):273-86 (2016).

Billes V, Kovács T, Hotzi B, Manzéger A, Tagscherer K, Komlós M, Tarnóci A, Pádár Z, Erdős A, Bjelik A, Legradi A, Gulya K, Gulyás B, **Vellai T**. AUTEN-67 (Autophagy Enhancer-67) Hampers the Progression of Neurodegenerative Symptoms in a *Drosophila* model of Huntington's Disease. *J Huntingtons Dis.* 5(2):133-47 (2016).

Klionsky DJ, ..., **Vellai T**, ..., Zughaier SM. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12(1):1-222 (2016).

Kovács T, Billes V, Komlós M, Hotzi B, Manzéger A, Tarnóci A, Papp D, Szikszai F, Szinyákovics J, Rácz Á, Noszál B, Veszélka S, Walter FR, Deli MA, Hackler L Jr, Alfoldi R, Huzian O, Puskas LG, Liliom H, Tárnok K, Schlett K, Borsy A, Welker E, Kovács AL, Pádár Z, Erdős A, Legradi A, Bjelik A, Gulya K, Gulyás B, **Vellai T**. The small molecule AUTEN-99 (autophagy enhancer-99) prevents the progression of neurodegenerative symptoms. *Sci Rep.* 7:42014 (2017).

Szinyákovics J, Kovács T, Gulya K, és mtsi., **Vellai T**. EDTP/MTMR14 phosphatases regulate neuronal aging in *Drosophila* and human. kézirat elkészítés alatt (2018).

Sturm Á, Ivics Z, **Vellai T**. The mechanism of ageing: primary role of transposable elements in genome disintegration. *Cell Mol Life Sci.* 72(10):1839-47 (2015).

Sturm Á, Perczel A, Ivics Z, **Vellai T**. The Piwi-piRNA pathway: road to immortality. *Aging Cell* 16(5):906-911 (2017).

Sturm Á, Saskői É, Kovács T, Weinhardt N, **Vellai T**. Highly efficient RNAi and Cas9-based auto-cloning systems for *C. elegans* research. *Nucleic Acids Res.* In press. (2018).

Sturm Á, Saskői É, Hotzi B, Tarnóci A, Barna J, Bodnár F, Perczel A, Ivics Z, **Vellai T**. Downregulation of transposable elements extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* Peer review alatt (2018).

Kerepesi C, Daróczy B, Sturm Á, **Vellai T**, Benczúr A. Prediction and characterization of human ageing-related proteins by using machine learning. *Sci Rep.* 8(1):4094 (2018).

- Hotzi B, Kosztelnik M, Hargitai B, Takács-Vellai K, Barna J, Bördén K, Málnási-Csizmadia A, Lippai M, Ortutay C, Bacquet C, Pasparaki A, Arányi T, Tavernarakis N, **Vellai T**. Sex-specific regulation of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 17(3):e12724 (2018).
- Varga M, Sass M, Papp D, Takács-Vellai K, Kobolak J, Dinnyés A, Klionsky DJ, **Vellai T**. Autophagy is required for zebrafish caudal fin regeneration. *Cell Death Differ.* 21(4):547-56 (2014).
- Varga M, Fodor E, **Vellai T**. Autophagy in zebrafish. *Methods* 75:172-80 (2015)..
- Fodor E, Sigmond T, Ari E, Lengyel K, Takács-Vellai K, Varga M, **Vellai T**. Methods to Study Autophagy in Zebrafish. *Methods Enzymol.* 588:467-496 (2017).
- Kovács T, és mtsi., **Vellai T**. Germline stem cell dedifferentiation requires amphisome-mediated autophagic elimination of mitochondria in the *Drosophila* testis. Kézirat elkészítés alatt (2018).
- Kosztelnik M, Kurucz A, Papp D, Jones E, Sigmond T, Barna J, Traka MH, Banhegyi G, **Vellai T**, Korcsmáros T, Kapuy O. Suppression of AMPK/aak-2 by NRF2/SKN-1 downregulates autophagy during prolonged oxidative stress. *FASEB J.* Revízió alatt. 2018
- Kapuy O, Papp D, **Vellai T**, Bánhegyi G, Korcsmáros T. Systems-Level Feedbacks of NRF2 Controlling Autophagy upon Oxidative Stress Response. *Antioxidants* (Basel). 7(3) (2018).
- Türei D, Földvári-Nagy L, Fazekas D, Módos D, Kubisch J, Kadlecsek T, Demeter A, Lenti K, Csermely P, **Vellai T**, Korcsmáros T. Autophagy Regulatory Network - a systems-level bioinformatics resource for studying the mechanism and regulation of autophagy. *Autophagy* 11(1):155-65 (2015).
- Módos D, Brooks J, Fazekas D, Ari E, **Vellai T**, Csermely P, Korcsmáros T, Lenti K. Identification of critical paralog groups with indispensable roles in the regulation of signaling flow. *Sci Rep.* 6:38588 (2016).
- Földvári-Nagy L, Ari E, Csermely P, Korcsmáros T, **Vellai T**. Starvation-response may not involve Atg1-dependent autophagy induction in non-unikont parasites. *Sci Rep.* 4:5829 (2014).
- Maruzs T, Lőrincz P, Szatmári Z, Széplaki S, Sándor Z, Lakatos Z, Puska G, Juhász G, Sass M. Retromer Ensures the Degradation of Autophagic Cargo by Maintaining Lysosome Function in *Drosophila*. *Traffic* 16(10):1088-107 (2015).
- Szatmári Z, Kis V, Lippai M, Hegedus K, Faragó T, Lőrincz P, Tanaka T, Juhász G, Sass M. Rab11 facilitates cross-talk between autophagy and endosomal pathway through regulation of Hook localization. *Mol Biol Cell.* 25(4):522-31 (2014).