

Pályázati végjelentés (eredmények), Vellai Tibor:

1. *C. elegans* autofág gének meghatározása

Bioinformatikai eszközökkel (BLAST szekvencia-hasonlósági kereséssel) autofág géneket azonosítottunk a *C. elegans* genomban (Sigmond és mtsi., 2008a; Tóth és mtsi., 2008). Ismert élesztő és humán ATG (autofágia-kapcsolt) gének fereg ortológjait határoztuk meg (elsőként). Néhány élesztő ATG gén esetében nem találtunk fereg ortológot, míg egy ATG gén esetében (Atg8) egynél több nematoda ortológot is meghatároztunk. Az ATG gének többsége azonban evolúciósan konzervált formában, vagyis egy-egy jól definiált ortológ által reprezentálva található meg a fereg genomban. Ez azt sugallja, hogy az autofágia mechanizmusa *C. elegans*-ban konzerváltan, az élesztőben megismert molekuláris masinériához hasonlóan mehet végbe (Kovács és mtsai., 2007).

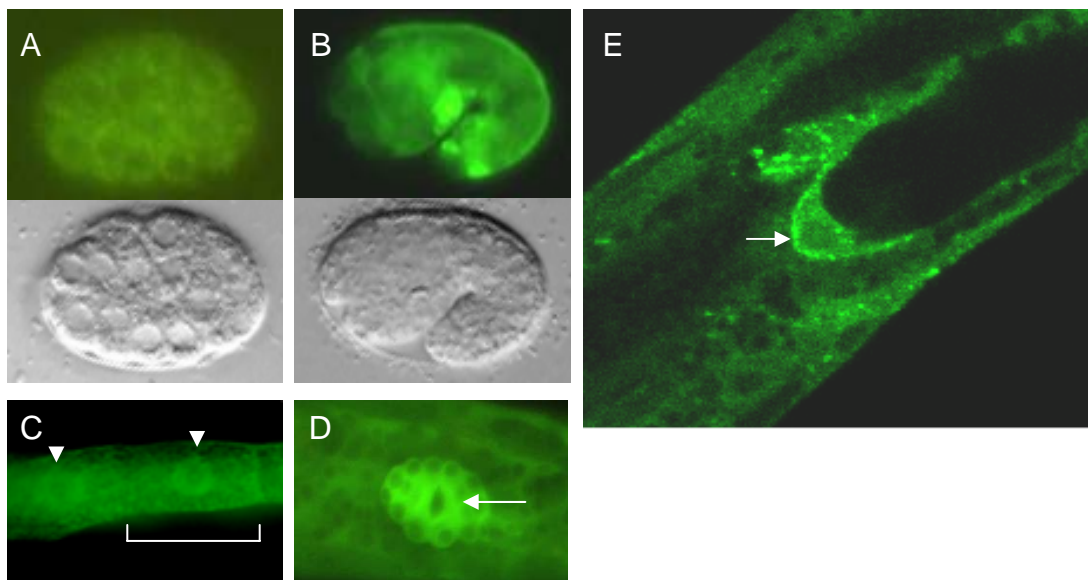
2. *C. elegans* autofág gének funkcionális (genetikai) jellemzése: mutáns allélek és géncsendesítés

Számos *C. elegans* autofág gén esetében izoláltunk vagy szereztünk be funkcióvesztéses mutáns alléleket: *unc-51/ATG1*, *bec-1/ATG6*, *atg-7*, *lgg-1/ATG8* és *atg-18* gének mutáns alléljeit jellemeztük molekulárisan és ultrastruktúráisan (elektronmikroszkópos vizsgálatokkal) (Sigmond és mtsai., 2008a; Sigmond és mtsai., 2008b; Tóth és mtsai., 2008). Az *unc-51* kivételével mindegyik autofág gén mutációja teljes vagy részleges penetranciájú életképtelen fenotípust eredményezett. A mutáns állatok az embrionális vagy a korai lárvális fejlődés során pusztultak el. Az autofágia tehát esszenciális a *C. elegans* egyedfejlődéséhez. Alternatív magyarázatként az autofág gének autofágia-független funkciója szükséges az életképességhez. A *bec-1*, *atg-7* és *lgg-1* gének esetében RNSi konstrukciókat is létrehoztunk. Mindhárom konstrukció funkcionálisnak bizonyult (megszüntette a megfelelő autofág gén *gfp*-vel jelölt fluoreszcens világítását). Ezen autofág gének csendesítése alacsony penetranciájú életképtelen fenotípust eredményezett. A vizsgált autofágia deficiens embriókban az apoptózissal elpusztuló sejtek száma jelentősen megemelkedett a kontroll (vad vagy üres RNSi plazmidot hordozó) állatokhoz képest. Érdekes módon az összes vizsgált autofágia defektív törzsben az endocitózis folyamata befolyásolt volt. Ezekben az állatokban nem formálódtak tipikus autofág struktúrák (autofagoszómák), hanem karakterisztikus multivezikuláris képletek jöttek létre, amelyek felhalmozódtak a citoplazmában (Sigmond és mtsai., 2008b). Végül az

autofágia gátlása jelentősen szuppresszálta a nekrozist bizonyos ioncsatorna hiperaktív neurodegeneratív modellekben (Vellai és mtsai., 2007).

3. *C. elegans* autofág gének expressziós jellemzése

Három autofág gén (*bec-1*, *lgg-1* és *atg-18*) esetében hoztunk létre transzlációs fúziós *gfp*-jelölt riporter konstrukciókat. A *bec-1* és *atg-18* gének esetében a C-terminálison, az *lgg-1* esetében az N-terminálison fuzionáltuk a *gfp* kódoló régiót (az *lgg-1* C-terminálisán található utolsó aminosav – glicin – funkcionális, szükséges a fehérje aktiválásához) (Klionsky és mtsai., 2008; Tóth és mtsai., 2008). Ezek a transzsgének menekítették az adott gének mutáns alléljai által okozott letális fenotípusokat. Instabil – extrakromoszómális – genomi szerkezetben kiváló genetikai mozaik rendszerként működtek. Például a [*bec-1*(-); *pbec-1*::BEC-1::GFP] genotípusú állatok egy jelentős része képes volt fertilis felnőtt stádiumba fejlődni, miközben számos szövettípusban megnyilvánult (fenotípusosan) a BEC-1 fehérje hiánya (pl. vulva fejlődési defektusok). A *bec-1*, *lgg-1* és *atg-18* gének expressziója azt mutatta, hogy ezek a faktorok az egyedfejlődés során minden sejtben aktívak (Sigmond és mtsai., 2008a). A legintenzívebb expressziót az embrionális fejlődési stádiumokban detektáltuk. Lárvákban és felnőtt állatokban kitüntetően az intenzíven osztódó sejtekben láttunk erős GFP jelet (**1. ábra**). Intracellulárisan ezek az autofág fehérjék a citoplazmában és a magban egyaránt megtalálhatóak voltak. A citoplazmában pontszerű struktúrákhoz lokalizáltak. A korábbi feltételezések szerint ezek a struktúrák autofagoszómális képletek (autofagoszómák). Az LGG-1 esetében igazoltuk, hogy a korai lárvák laterális varrat- (*seam*) sejtjeiben a fehérje a Golgi rendszerhez is lokalizál (**2. ábra**). Ezért a pontszerű autofág fehérje-pozitív struktúrák nem tekinthetőek egyértelműen autofág eredetű komponenseknek.



1. Ábra. A BEC-1 fehérje akkumulációja. A fehérje (fluoreszcens képek) minden sejtben a korai embrionális állapotoktól jelen van. **A**, 16 sejtes embrió (alul a Nomarski kép). **B**, *comma* állapotú embrió. **C**, belsejtek (a vonal egy belsejtet jelöl). **D**, Fejlődő vulvaszövet (nyíl). **E**, Konfokális kép, a nyíl a gonád disztális csúcssejtjét jelöli.

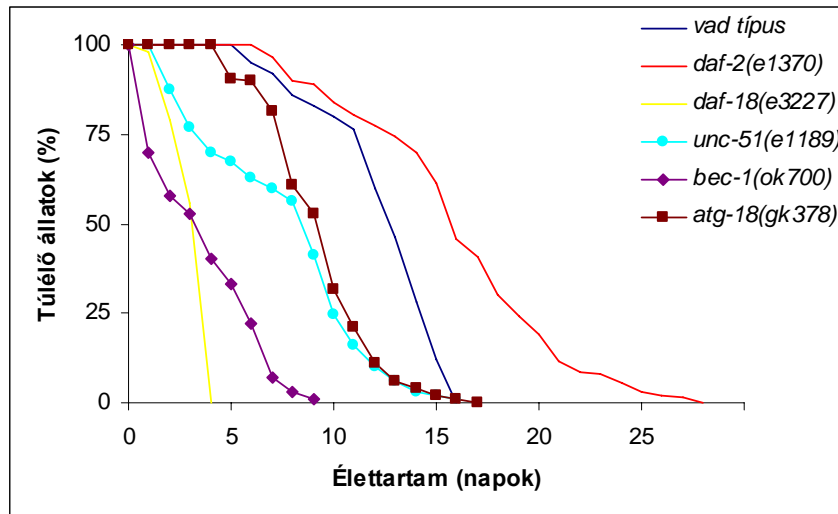


2. Ábra. LGG-1/Atg8 lokalizációja a Golgi apparátusban. **A**, Citoplazmában diffúz és pontszerű LGG-1 akkumuláció embriókban. **B**, „ikerfolt”-szerű LGG-1 akkumuláció egy L2 lárva varratsejtjeiben. Egy egyedi varratsejt bekeretezve, az „ikerfoltok” nyilakkal jelöltek. **C**, Az előző panelen bekeretezett varratsejt nagyított képe. A vastag nyíl a sejtmagot, a kicsi nyilak az „ikerfoltokat” jelölik. **D**, Egy varratsejt EM képe. A vastag nyíl a sejtmagot, a vékony nyilak a Golgi apparátusokat jelölik. A **C** és **D** képek egybevetése alapján az „ikerfoltok” Golgit azonosítanak.

4. Az autofág gének szabályozzák az öregedési folyamatot *C. elegans*-ban

Az autofág gének mutációs inaktiválása és géncsökkentése megrövidült élethosszt eredményezett. A kísérletekben életképes *unc-51(-)* és *atg-18(-)* mutánsokat, *bec-1* genetikai mozaikokat [*bec-1(-); pbec-1::BEC-1::GFP*], valamint *atg-7(RNSi)* és *lgg-1(RNSi)* állatokat vizsgáltunk. Ezek az autofágia defektív felnőtt állapotba fejlődő állatok jelentősen rövidebb ideig éltek a vad típusnál (Tóth és mtsai., 2008; Sigmond s mtsai., 2008a) (**3. ábra**). Mivel az élethossz megrövidülése nem szolgál evidenciaként a vizsgált gén öregedési funkciójára vonatkozóan (a rövidebb élethosszt teoretikusan okozhatják az autofágia hiányában fellépő degeneratív elváltozások, „betegségek” is), ezekben az állatokban meghatároztuk az öregedési pigment (lipofuscin) és a mozgási képesség életkor függvényében történő változását. Ismert ugyanis, hogy az öregedő fonalféreg progresszíven halmoznak fel lipofuscint (a lizoszómális aktivitás végtermékei) sejtjeikben, és mozgásuk az idő előrehaladásával fokozatosan paralizálttá válik. Eredményeink szerint az autofágia gén deficiens állatok gyorsabban halmoznak fel lipofuscint és gyorsabban bénulnak meg, mint a vad típusú kontroll állatok. Autofág génfunkciók hiánya tehát az

öregedési folyamat befolyásolásán (gyorsításán) keresztül okozott rövidebb élettartamot. Az autofágia deficiens állatok progérikusak (gyorsan öregednek).

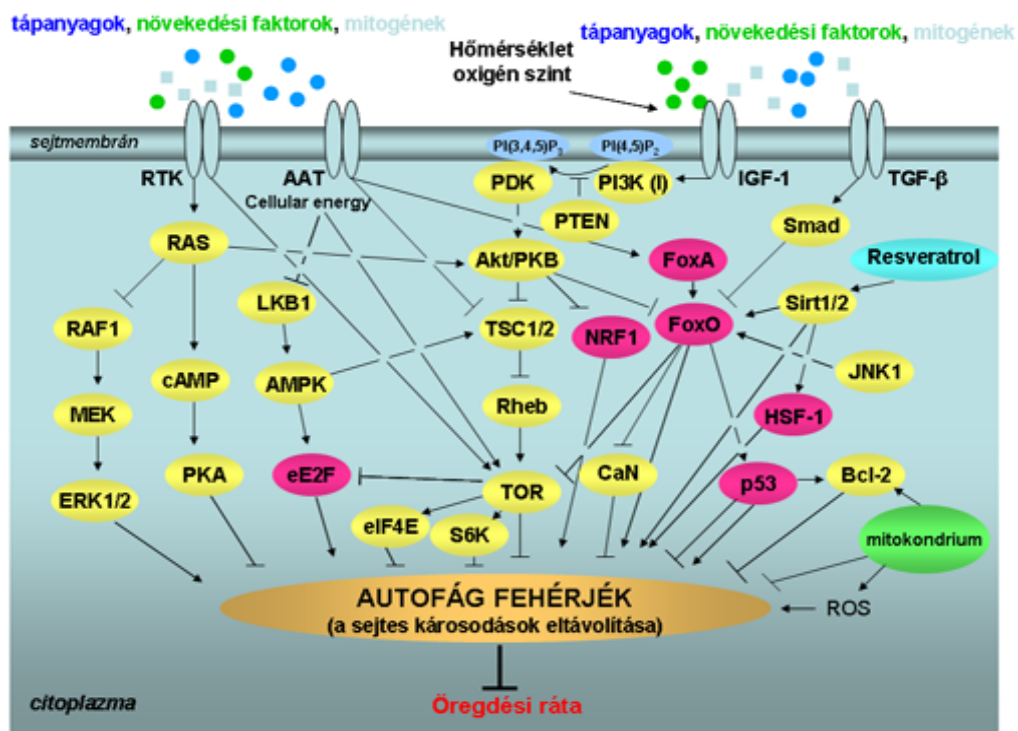


3. Ábra. Autofág gén deficiens L1 lárvák csökkent túlélése éhezés során. Az embriók tápanyagot nem tartalmazó M9 oldatban keltek ki és növekedtek. Az éhező L1 lárvák megrekednek ebben a fejlődési stádiumban. A túlélő állatok arányát két naponta határoztuk meg. *daf-2(-)*: inzulin/IGF-1 jelátvitel deficiens mutáns, *daf-18(-)*: inzulin/IGF-1 jelátvitel hiperaktív mutáns (a *daf-18* a PTEN – az inzulin/IGF-1 jelátvitel negatív szabályozója – fereg ortológját kódolja).

5. Az öregedési folyamatot szabályozó genetikai útvonalak hatása az autofág géneken konvergálódik *C. elegans*-ban

Az utóbbi évtizedekben számos öregedési folyamatot szabályozó (gyorsító) jelátviteli rendszert határoztak meg (ezen gének funkcióvesztéses mutációja hosszú élettartamot eredményez). Ilyen rendszer az inzulin/IGF-1 és a TOR jelátviteli útvonal (az utóbbi funkcióját magunk tártuk fel; Vellai és mtsai., 2003), a csökkent tápanyagfelvételt („kalorikus restriktiót”) közvetítő útvonal és a mitokondriális légzési lánc. E rendszerek valamelyikének működésében gátolt egyszeres mutáns állatok hosszú életidejűek. Autofág génfunkcióban deficiens egyszeres mutánsok – ahogy azt fentebb láttuk - rövidebb ideig élnek, mint a vad típus. Autofág géneket inaktiváltunk hosszú életidejű mutánsokban, és néztük a beavatkozás élettartamra kifejtett hatását. Minden kettős mutáns kombinációban az autofág mutánsok rövidebb élettartama volt epiztatikus. Kivételt a *daf-2(-)* mutánsok jelentettek, amelyekben az autofág gének blokkolása csak részlegesen szuppresszálta a megnyúlt élettartamot; *daf-2(-); autofág gén(-)* kettős mutánsok tehát hosszabb ideig éltek a vad típusnál, de rövidebb ideig éltek a *daf-2(-)* egyszeres mutánsoknál. Figyelemre méltó módon az autofág gének blokkolása nagyobb mértékben csökkentette az élettartamot *daf-2(-)* mutáns háttérben, mint vad típusú (egyszeres autofágia deficiens

mutáns) háttérben. Ez újabb indikációt jelentett az autofág gének élettartam szabályozó szerepére vonatkozóan. Autofág gének inaktiválása rövid élettartamot eredményezett TOR, kalorikusan „restriktált” és mitokondriális légzésben csökkent mutáns állatokban. Az autofág gének tehát egy útvonalban hatnak a TOR kinázzal, a tápanyag jelátviteli komponensekkel és a mitokondriális respirációs lánc komponensekkel: epiztatikusan hatnak e komponensek felett, közvetítik azok hatását (pl. az autofág gének funkciója kell a TOR mutáns állatok megnyúlt élettartamának kifejeződéséhez). Ezen eredmények alapján a különböző élethossz szabályozó útvonalak hatása az autofág génekaszádon konvergálódik (Tóth és mtsai., 2008; Vellai, 2009; Vellai és mtsai., 2009; Vellai és Klionsky, 2010; Vellai és Takács-Vellai, 2010). Az autofágia tehát az öregedési folyamat központi szabályozó mechanizmusa (4. ábra). Eme megállapítás egybevágh azokkal az utóbbi években tett megfigyelésekkel, miszerint az autofágia abnormalis működése számos idős kori degeneratív elváltozásban kimutatható. Nem véletlen, hogy az egyik leggyakoribb öregkori idegrendszeri patológiát, az Alzheimer betegséget pl. ma tipikus autofágia-kapcsolt degeneratív elváltozásnak tekintik.



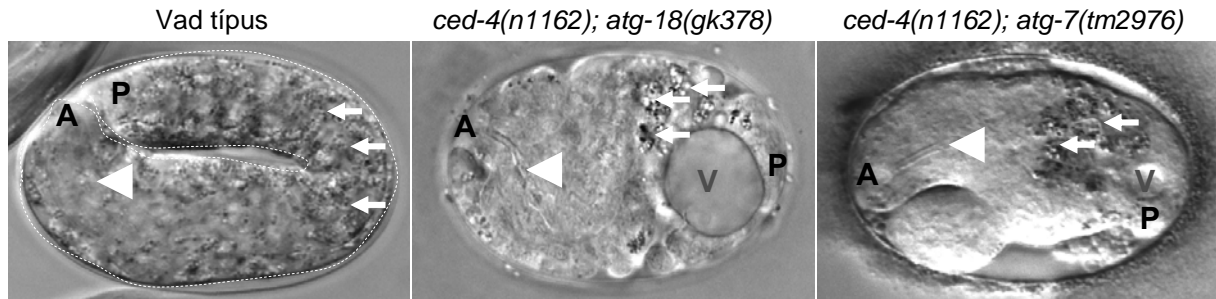
4. Ábra. Az öregedési folyamat szignalizációs hálózata. Az öregedési folyamatot szabályozó fehérjék/útvonalak hatásai az autofág génekre konvergálnak. A sárga gömbök jelátviteli komponenseket, a piros gömbök szabályozó fehérjéket, a kék ovális alakzatok receptorokat jelölnek. A fehérjéket az emlős ortológok nevével jelöltem. Nyilak aktiváló, talpas nyilak gátló kölcsönhatásokat jelölnek.

6. Az *unc-51/Atg1* és *bec-1 /Atg6* *C. elegans* autofág gének szerepet játszanak a sejtnövekedés szabályozásában

A TOR–inzulin/IGF-1 jelátvitel tengely tápanyag- és hormonfüggő módon szabályozza a sejtnövekedést és proliferációt. Amint azt az előző pontban láttuk, e tengely öregedési folyamatra gyakorolt hatását autofág gének közvetítik. Ezért két életképes autofág mutáns törzsben (*unc-51(-)* és *bec-1* mozaikok) megvizsgáltuk az állatok testméretét (a *C. elegans* szomatikus sejtek száma invariáns, tehát az állat testmérete a sejtek méretének függvénye). A mutáns állatok testmérete a normálisnál rövidebb (kisebb) volt. Szövet-specifikus markerek alkalmazásával megállapítottuk, hogy a sejttség nem változott meg a mutáns állatokban. Néhány egyedei sejt térfogatát is megmértük, és megint kisebb értékeket kaptunk, mint a vad típusban. *C. elegans*-ban a normális sejttség kialakításához tehát autofág gének funkciójára van szükség. Episztázis (kettős mutáns) elemzéssel kimutattuk, hogy az autofág gének *downstream* hatnak a sejtnövekedést és proliferációt szabályozó két legfontosabb útvonaltól, az insulin/IGF-1 és TGF- β (transforming growth factor-beta) jelátviteli rendszerektől (Vellai és mtsai., 2008).

7. Az autofág gének és az apoptotikus génkaszkád redundánsan szabályozzák az embrionális fejlődést

A *C. elegans* egyedfejlődése során 131 szomatikus sejt hal meg programozott módon apoptózissal. Érdekes módon az apoptózis deficiens nematodák (pl. *ced-4* funkcióvesztéses mutánsok; a *ced-4* egy konzervált Apaf1 ortológot kódol) életképes, fertilis felnőtt állatokká fejlődnek. *C. elegans*-ban számos autofág gén inaktiválása szintén nem vagy csak csökkent mértékben befolyásolja az életképességet. Az apoptózis és autofágia defektív egyszeres mutáns állatok embrionális fejlődése tehát normális. Az egyszeres mutációk kombinálásával (keresztezés) *apoptózis(-)*; *autofágia(-)* deficiens kettős mutáns állatokat állítottunk elő. Genetikai null allélek használata esetén ezek a kettős mutáns állatok embrionális korban elpusztulnak. Ez a letális fenotípus teljes penetranciájú volt. Az elpusztult embriók jellegzetes morfogenetikai abnormalitásokat mutattak (5. ábra). Kimutattuk továbbá, hogy három „központi” autofág gén (*bec-1*, *lgg-1* és *atg-18*) transzkripcióját a bZip-szerű ATF-2 transzkripciós faktor szabályozza. Az ATF-2-ről ismert, hogy a központi (*core*) apoptotikus génkaszkádot is transzkripciós szinten szabályozza. Az apoptózis és az autofágia tehát közös transzkripciós kontroll alatt áll ebben az organizmusban (Erdélyi és mtsai., 2010).



5. Ábra. Apoptózis-autofágia deficiens kettős mutáns embriók súlyos morfológiai rendellenességeket mutatnak. A: anterior (feji) vég, P: poszterior (farki) vég. V: vakuóla. A fehér nyílhegyek a garatot, a kicsi nyilak a bél autofluoreszcens granuláumait jelölik. A kettős mutáns embriók életképtelenek.

8. Bizonyos myotubularin-szerű (MTM) protein foszfatázok potensen gátolják az autofágiát *Drosophilában* és *C. elegansban*

Az autofág membrán képződésének egyik első biokémiai lépése a PIP2 (phosphatidylinositol-bisphosphate) - PIP3 foszforiláláció, amelyet egy PI3 (phosphatidylinositol 3-phosphate) kináz (VPS34; *vacuolar protein sorting-34*) katalizál. A folyamat egyensúlyi, a VPS34 antagonistái bizonyos MTM foszfatázok. Mutáns elemzéssel és RNSi kísérletekkel meghatároztuk azokat az MTM foszfatázokat a *C. elegans* genomban (a *C. elegans* genom 5 darab MTM foszfatázt kódol: *mtm-1*, *-3*, *-5*, *-6* és *-9*), amelyek autofágiát gátolnak. Az ortológ foszfatázok vizsgálatát *Drosophilában* is elvégeztük. E foszfatázok inaktiválása autofágia indukciót, míg hiperaktiválása autofágia blokkolást eredményezett. Ennek hatására a vizsgált törzsek élettartama jelentősen növekedett. Az autofágia stimulációja jelentős neuroprotektív hatásúnak bizonyult neurodegeneratív (humán α -synucleint és β -amyloidot expresszáló) modellekben. *Drosophilában* feltártunk néhány szervfejlődésben betöltött autofágia funkciót is (Billes és mtsai., kézirat elkészítés alatt).

Közlemények

1. **Vellai T**, Tóth ML, Kovács AL (2007). Janus-faced autophagy. A dual role of cellular self-eating in neurodegeneration? *Autophagy* 3 (5): 461-463.
2. Kovács AL, Pálfia Z, Réz G, **Vellai T**, Kovács J (2007). Sequestration revisited. Integrating traditional electron microscopy, de novo assembly and new results. *Autophagy* 3 (6): 655-662.

3. Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, ... **Vellai T**, ... Deter RL (2008). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 4 (2): 151-175.
4. Tóth ML, Sigmond T, Borsos É, Barna J, Erdélyi P, Takács-Vellai K, Orosz L, Kovács AL, Csikós G, Sass M, **Vellai T** (2008). Longevity pathways converge on autophagy genes to regulate life span in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy* 4 (3): 330-338.
5. **Vellai T**, Bicsák B, Tóth ML, Takács-Vellai K, Kovács AL (2008). Regulation of cell growth by autophagy. *Autophagy* 4 (4): 507-509.
6. Sigmond T, Barna J, Tóth ML, Takács-Vellai K, Pásti G, Kovács AL, **Vellai T** (2008a). Autophagy in *Caenorhabditis elegans*. *Method. Enzymol.* 451: 521-540.
7. Sigmond T, Fehér J, Baksa A, Pásti G, Pálfia Z, Takács-Vellai K, Kovács J, **Vellai T**, Kovács AL (2008b). Qualitative and quantitative characterization of autophagy in *Caenorhabditis elegans* by electron microscopy. *Method. Enzymol.* 451: 467-491.
8. **Vellai T** (2009). Autophagy genes and ageing. *Cell Death Differ.* 16 (1): 94-102.
9. **Vellai T**, Takács-Vellai K, Sass M, Klionsky DJ (2009). The regulation of aging: does autophagy underlie longevity? *Trends Cell Biol.* 19 (10): 487-494.
10. **Vellai T**, Klionsky DJ (2010). A second report from the EMBO conference on autophagy: mechanism, regulation and selectivity of autophagy. *Autophagy* 6 (1): 197-198.
11. **Vellai T**, Takács-Vellai K (2009). Regulation of protein turnover by longevity pathways. In: *Protein synthesis and aging*, ed. Nektarios Tavernarakis, Landes Bioscience-Springer, Georgetown, Texas, USA, pp69-80.
12. Erdélyi P, Borsos É, Takács-Vellai K, Kovács T, Kovács AL, Sigmond T, Hargitai B, Pásztor L, SenGupta T, Dengg M, Pécsi I, Tóth J, Nilsen H, Vértessy BG, **Vellai T**

(2010). Shared developmental roles and transcriptional control of autophagy and apoptosis in *C elegans*. *J. Cell Sci.* Under revision.

13. Billes V, és mtasi. Kézirat elkészítés alatt (2010).