

Bevezetés

Az autofágia (önemésztés) a sejtek egyik alapműködése, amelynek során a saját, felesleges, hibás, sérült, működésképtelen, vagy káros makromolekuláit és organelleumait elkülönítik a működő citoplazmától és lebontják, eliminálják. Makroautofágia során az ún. PAS-ból (Pre-Autophagosomal Structure) kettősfalú izoláló membrán alakul ki, mely körülzárja a citoplazma lebontandó komponenseit és kialakul az autofagoszóma. Az autofagoszóma lizoszómákkal fuzionál, amelyek egyrészt tartalmazzák az izolált makromolekulák lebontásához szükséges enzimeket, másrészt a lizoszómák membránjában levő v-ATPázok biztosítják azt a savas közeget, amely szükséges az enzimek működéséhez. Az így keletkezett organelleum az autolizoszóma, amelyben lezajlik a bekebelezett citoplazmakomponensek emésztése. Az emésztés során keletkező nukleotidok, aminosavak, szabad zsírsavak, egyszerű cukrok, stb. az autolizoszóma membránján keresztül visszajutnak a citoplazmába és a szintetikus folyamatokban újrahasznosulnak. Az esetlegesen visszamaradó, emészthetetlen anyagokat tartalmazó, ún. reziduális testek felhalmozódhatnak vagy exocitózissal kiürülnek a sejtől. Az utóbbi években felmerült az a lehetőség, hogy az autofagoszóma úgy válnak képessé a lizoszómákkal való fúzióra, hogy előbb endoszómákkal egyesülnek és ún. amfiszómákat képeznek.

Az autofágiát eredetileg a sejtek védekező mechanizmusaként írták le, mivel a sejtet érő, nagyon különböző fizikai és kémiai behatásokkal lehet indukálni (pl. hőmérsékletváltozás, tápanyaghiány, besugárzás, szabadgyökök felhalmozódása, általában fogalmazva: stressz-hatásokkal). Például éhezéskor a csökkenő tápanyagmennyiség autofágiát vált ki. Ennek során a sejt a saját makromolekuláinak lebontásával jut pl. aminosavakhoz, zsírsavakhoz, ATP-hez, általában anyagokhoz és energiához, ami biztosítja a túlélését külső tápanyagforrás hiányában is.

Ma már tudjuk, hogy az autofágia minden sejtben folyamatosan zajló, állandóan aktív, lebontó folyamat, amely nélkülözhetetlen a normális életműködéshez és a homeosztázis fenntartásához. Ezt az alapszinten, folyamatosan zajló autofágiát „housekeeping” (háztartási) autofágiának nevezzük. Az autofágia mellett a sejtek másik katabolikus rendszere, a proteaszóma rendszer vesz még részt a felesleges, vagy hibás makromolekulák eliminálásában. E két lebontó folyamat kapcsolatának részletei ma még erősen kérdésesek. Az autofágia egyes fiziológiai helyzetekben, elsősorban az ontogenezis egyes lépései során extrém módon felerősödik és akár a sejtek pusztulásához is vezethet. Ez az ún. „fejlődési autofágia” nagyon szigorúan szabályozott folyamat, térben és időben pontosan meghatározott sejtek, szövetek, szervek lebontásához vezet. Jó és sokat tanulmányozott példa a fejlődési

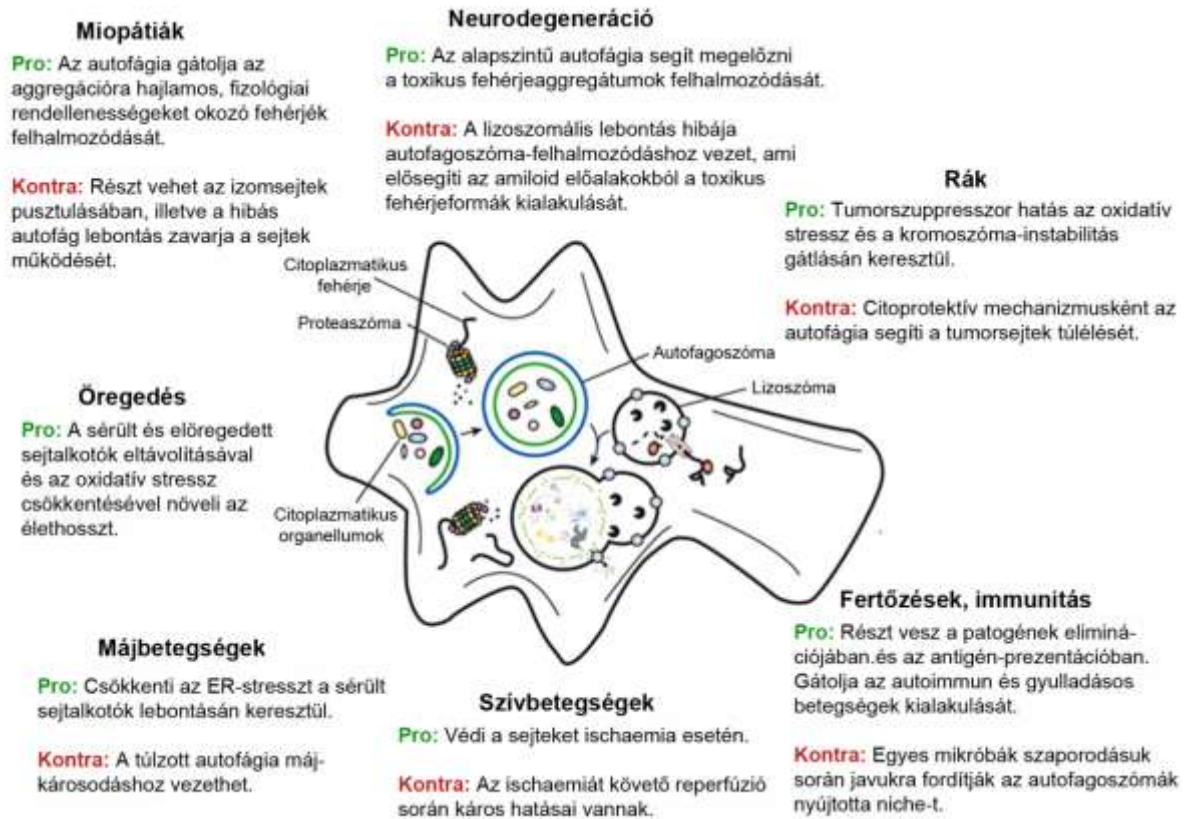
autofágiára a teljes átalakulással fejlődő rovarok lárvális szerveiben zajló autofágia. A metamorfózis (a bábozódás) során a lárvális sejtek és szervek lebomlanak, és helyüket a kifejlett állatokra jellemző szervek veszik át. A sejtek lebomlása alatt felhalmozódott extrém mennyiségű autofág struktúra halmozódik fel a lárvális szervekben. Ha az autofágiára való képesség valamilyen módon sérül, akkor a rovar elpusztul a metamorfózis alatt, mert az autofágia hiányában a lárvális szervek nem bomlanak le (és az imaginális szervek nem tudnak kialakulni), így a lárva, vagy a báb nem tud továbblépni a következő fejlődési stádiumba.

Az autofágia kutatásában jelentős áttörést jelentett az ATG (Autophagy-related genes) géneket felfedezése. Mintegy 20 olyan mutánst izoláltak és azonosítottak, amelyek az autofágia folyamatában, molekuláris mechanizmusában hibásak. Meghatározták a mutációk által érintett géneket és a géntermék funkcióját az autofág folyamatokban. Rövidesen fény derült arra, hogy az ATG gének növényekben, férgekben, rovarokban, halakban és emlősökben is jelen vannak, és funkcióik az élesztőben megfigyeltékhez nagyon hasonlóak. Az ATG gének tehát evolúciósan konzerváltak, működésüket megőrizték a törzsfajlás folyamán.

Az ATG gének tanulmányozása során az is nyilvánvalóvá vált, hogy az autofágia a multicelluláris szervezetekben milyen sokféle és nagyon fontos élettani folyamatban vesz részt. Például szabályozza a sejtek növekedését, átépülését (reprogramming), az egyedfejlődés számos lépését, a sejtek és a szervezet öregedését (ageing), és szerepet játszik a kórokozók elleni védekezésben is. Mivel az autofágiát mechanizmusában és szabályozásában szerepet játszó gének erősen konzerváltak, jó esély van arra, hogy az alsóbb rendű modellállatokban kapott eredmények az emlős/humán rendszerekre is kiterjeszthetők. Ez indokolja azt, hogy laboratóriumainkban kihasználjuk mindazon kísérletes, molekuláris biológiai, genetikai eljárások előnyeit, amelyek a *Drosophila* és a *Caenorhabditis elegans* esetében rendelkezésünkre állnak.

Az autofágia kutatások további jelentős felismerései arra vonatkoznak, hogy az autofágia hibája, hiánya, vagy éppen extrém felerősödése nagyon sok patológiás folyamat okozója, vagy velejárója. Ilyenek a sejtvesztéssel járó betegségek (a cerebrovasculáris és a myocardialis stroke, a különböző myopatiák), a rosszindulatú daganatok kialakulása, a cukorbetegség és számos lizoszómális eredetű betegség, hogy a legfontosabbakat említsük. A legnagyobb probléma ezen alap kutatási eredmények értelmezésében és főként hasznosításában, hogy jelenleg nem áll rendelkezésre elegendő adat arra vonatkozóan, hogy az egyes betegségekben az autofágiát erősíteni kell-e, azért, hogy a citoprotektív hatásának előnyeit használjuk ki, vagy éppen gátolni kell, hogy megakadályozzuk, hogy a felerősödő

autofágia ne vezessen ahhoz, hogy a sejtek megemésszék önmagukat és ebbe belepusztuljanak. Az azonban már a rendelkezésre álló adatok fényében is nyilvánvaló, hogy a terápiás eljárások kidolgozása az egyes betegségekre, sőt az egyes páciensekre is specifikus eljárásokat követel majd.



Az autofágia kettős szerepe különböző emberi betegségeken.
 (Szatmári Zsuzsa ábrája Mizushima és munkatársai (2008) alapján)

Laboratóriumainkban mintegy 40 éve foglalkozunk az autofágia vizsgálatával. A fentiek, és az előzetes eredményeink ismeretében megfogalmazott **célkitűzéseink** a következőkben foglalhatók össze:

Eddig ismeretlen, az autofágia szabályozásában szerepet játszó gének azonosítása *Drosophilában* 1) P-elem indukált mutánsgyűjtményekből, DEP (Double Enhancer and Promoter element) indukált mutánsgyűjtményekből és microarray módszer segítségével. 2) Az autofágia molekuláris mechanizmusában és szabályozásában fontos új gének keresése *C. elegans*-ban. 3) Az autofágia funkcióinak vizsgálata hiper- és hypothermia alatt és után. 4) Az esetleges fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálata az autofágia szabályozásában co-immunprecipitáció segítségével. 5) Az autofágia szabályozásában részt vevő jelátviteli

útvonalak leírása Drosophilában és *C. elegans*ban. 6) Az ATG gének szerepe a neuronpusztulásban, *Drosophila* modellben. 7) Az ATG gének és termékeik funkciója az emlős szervezet neuronpusztulással járó kórképeiben. 8) Az eredmények hasznosítása az oktatási munkánk során.

Az elért eredmények

A záróbeszámolóban nem érintjük az összes korábban elért és publikált eredményünket, mivel azok szerepeltek az időközi beszámolóokban és az irodalomjegyzék alapján nyomon követhetők. Itt elsősorban azokra a dolgainkra koncentrálnunk, amelyeket a 2013-14 években sikerült megvalósítanunk.

A *Drosophila melanogaster*en végzett vizsgálatok

Genetikai, molekuláris biológiai, sejtbiológiai, morfológiai módszerek kombinációjával igazoltuk a **protein phosphatase 2A (PP2A)** szerepét az autofágia mechanizmusában és szabályozásában. *Drosophilában* a PP2A triimer „B” alegységének három ismert formája van, a *widerborst/wdb*, a *twins/tws* és a PP2A-B'. A holoenzim lokalizációja attól függ, hogy a komplex melyik B alegységet tartalmazza. Eredményeink szerint, ha a *wdb* alegység van a komplexben, akkor a PP2A a dTOR-tól upstream hat a PtdIns3K/PTEN/Akt szabályozási útvonalon keresztül. Ha azonban a B' alegység kapcsolódik a komplexhez, akkor az a dTOR-hoz képest downstream hat és elsősorban az autofagoszóma izoláló membránjának elongációját, ill. az autofagoszóma-lizoszóma fúziót befolyásolja. Igazoltuk, hogy ebben a folyamatban a PP2A-A/B'/C komplex potenciális célmolekulái az Atg14, Atg17 és Atg101 fehérjék lehetnek. (Bánréti és mtsai, 2012)

Egy következő munkánkban az irányított vesicularis transzportban és a membránfúzióban szerepet játszó **HOPS fehérjék** funkcióját vizsgáltuk az autofágia során. *Drosophilában* hat HOPS alegység (*Vps11/CG32350*, *Vps18/dor*, *Vps16A*, *Vps33A/car*, *Vps39/CG7146* and *Vps41/lt*) ismert és eredményeink szerint mindegyik szükséges az autofagoszóma-lizoszóma fúzióhoz. Ha ezen alegységeket kódoló bármelyik gén hibás, funkcióját veszti, a sejtekben igen nagymennyiségben halmozódnak fel autolizoszómák, de bennük nem indul meg a lebontás, mert nem képesek a lizoszómákkal összeolvadni. Ez a jelenség mind a bazális, mind az indukált, mind a fejlődési autofágia során megfigyelhető. A Syntaxin 17 (*Syx17*) az autofagoszómák membránjában mint egy SNARE működik. Kimutattuk, hogy e molekulához a *Vps33A/car* specifikusan kötődik, majd e kötés hatására a *Vps16A* az autofagoszómák membránján lokalizálható Atg8-hoz kapcsolódik. Azt is

igazoltuk, hogy a Vps38/UVRAG null-mutánsokban az autofagoszóma-lizoszóma fúzió nem károsodik, de az endocitotikus folyamatok és a lizoszómák biogenezise gátolt, ami a két útvonal eltérő molekuláris mechanizmusaira utal. **(Takács és mtsai, 2013)**

A saját eredményeink és az irodalmi adatok összefoglalásaként írtunk egy cikket az **acetiláció szerepéről** az autofágia szabályozásában. Kimutattuk, hogy az autofágia, amellett, hogy számos foszforilációs és ubiquitinációs lépés szigorú szabályozása alatt áll, jelentősen befolyásolják – gátolják, vagy serkentik – a hiszton acetilázok és deacetilázok is. E cikkben bemutattuk mindazon eredményeket, amelyek az acetiláció és az autofágia kapcsolatára utalnak különböző fiziológiai és patológiai folyamatokban. **(Bánréti és mtsai, 2013)**

Munkánk során foglalkoztunk a **Rab11 fehérje** autofágiában betöltött szerepének vizsgálatával is. Kimutattuk, hogy a Rab11 RNS interferencián alapuló csendesítése kisméretű autofág struktúrák felhalmozódásához vezet a *Drosophila* lárvális zsírtest sejtjeiben. Hasonló fenotípust tapasztaltunk a működő Rab11 fehérjét nem tartalmazó homozigóta mutáns sejtekben, illetve a fehérje állandóan inaktív, domináns negatív formájának túltermelését követően is. Ezek a megfigyelések arra utaltak, hogy a Rab11 szükséges az autofágia zavartalan működéséhez, hiánya az autofágia hibáját okozza. Különböző módszerekkel – immunhisztokémia, Western blot analízis, autofág flux követésére alkalmas transzgének vizsgálata, elektronmikroszkópia – sikerült megerősítenünk, hogy a Rab11 hiánya éretlen autofagoszóma felhalmozódásához vezet. A működőképes Rab11 fehérjét nem tartalmazó sejtekben megfigyeltük a késői endoszóma számának jelentős növekedését. Ko-lokalizációs vizsgálatok segítségével kimutattuk azt is, hogy a Rab11 az érési folyamat korai lépéseivel, azaz az autofagoszóma késői endoszómákkal történő fúziójához, az amfiszóma kialakulásához szükséges. Kimutattuk azt is, hogy az éhezéssel történő autofágia indukció hatására a Rab11, a reciklizáló endoszóma (RE) ismert markere, autofagoszómaakra helyeződik át. A Rab11 mind sejttenyészetben, mint pedig élő állatban fizikai kölcsönhatást létesít a **Hook fehérjével**, mely az endoszóma érésének egyik ismert regulátora. Ko-immunprecipitációs vizsgálatok segítségével feltérképeztük a Hook fehérjén a Rab11 kötőhelyét. A kölcsönhatás erőssége megnőtt autofágia indukció során. Ezzel összhangban a két fehérje ko-lokalizációjának gyakorisága is növekedett. Kimutattuk, hogy éhezéssel történő autofágia hatására a Hook késői endoszómákról autofág struktúrára helyeződik át, és ehhez a folyamathoz szükséges a Rab11 jelenléte a sejtekben. **(Szatmári és mtsai, 2014)**

A **Rab fehérjék** autofágiában betöltött szerepéről írtunk egy eddig hiánypótló, összefoglaló cikket is. **(Z. Szatmári, M. Sass. (2014) “Autophagy wants you!” – recruitment**

for clean-up purposes conducted by RABs and their upstream regulators. **Autophagy**, submitted, under second revision)

A **Hox gének** olyan, a fejlődést szabályozó transzkripciós faktorokat kódolnak, amelyek meghatározzák a testszelvények tulajdonságait a test antero-posterior tengelye mentén. Elsőként figyeltük meg, hogy emellett a Hox gének többsége erősen gátolja a posztembrionális fejlődés során jelentkező autofág folyamatokat *Drosophilában*. Az autofágia gátlása nem mutat térbeli specifitást, vagy testszelvényekhez köthető, pozicionális fenotípust. Időben azonban nagyon pontosan behatárolt a Hox gének autofágia gátlása. A fejlődési autofágia csak akkor indul meg, ha a Hox gének gátlása alól felszabadul. Aktív Hox gének mellett éhezéssel sem lehet autofágiát serkenteni a *Drosophila* sejtekben. Igazoltuk, hogy a Hox gének a Brahma „kromatin remodelling komplex” egyik tagján, a Pontin-on keresztül fejtik ki gátló hatásukat az autofágia központi mechanizmusában szerepet játszó gének kifejeződésére. Bizonyítottuk azt is, hogy a Hox gének ezen gátló hatása emlős sejttényeszetekben is érvényesül. (**Bánréti és mtsai, 2014**)

A **vps13a** gén humán megfelelőjének mutációja a chorea-acanthocytosis nevű, neurodegenerációs tünetekkel és abnormális vörösvértest-morfológiával jellemezhető betegség kialakulásához vezet, melynek patomechanizmusáról, valamint a gén termékének funkciójáról nincsenek pontos ismereteink. Ugyanakkor a gén által kódolt fehérjéről feltételezhető, hogy autofág és/vagy endocitotikus szerepet tölthet be.

A *vps13a* funkciójának vizsgálatához célzott, *in vivo* mutagenézissel létrehoztuk a gén funkcióvesztéses allélját. A továbbiakban a mutációra homozigóta egyedek fenotípusos sajátosságait vizsgáltuk meg. Q-PCR vizsgálattal bizonyítottuk, hogy a génnek a deléción által nem érintett szakaszáról csak nagyon kismértékű transzkripció zajlik, továbbá a mutáns alléllel homozigóta egyedek 80%-a elpusztul a metamorfózis során. A fentiek alapján a létrehozott mutáció a *vps13a* szemileltális, hipomorf alléljének tekinthető. A túlélő, kifejlett állatok esetén részleges nőstény-, illetve teljes hímsterilitás mutatható ki. A hím egyedek ondóhólyagja (a vad típussal ellentétben) sosem tartalmaz egyedi, önálló mozgásra képes spermiumokat. A spermatogenezis egyes fázisainak vizsgálatából kiderült, hogy az ősvarsejtek mitotikus, illetve meiotikus osztódásai zavartalanul lezajlanak, a hiba a későbbi, differenciálódási fázisban következik be: a megnyúlt, egymással citoplazma-hidakkal összeköttetésben lévő hímivarsejt előalakok a mutáció következtében nem tudnak szétválni egymástól. Kimutatható továbbá a spermiumok mitokondriumainak morfológiai eltérése is a vadtypustól. A *vps13a* gén terméke tehát szükséges a normális spermatogenezishez, hiányában hímsterilitás alakul

ki, melynek háttérében a spermiumok individualizációs zavara, illetve mitokondriumainak abnormális morfológiája áll. (**Maruzs és mtsai., kézirat elkészítés alatt**)

Az autofágia további szerepét igazoltuk az ivarsejtdifferenciáció során *Drosophila*-ban. A hímek testiszében a keletkező csírasejtek tömeges pusztulása egy regenerációs folyamatot indukál, mely során differenciált sejtek dedifferenciálódnak csírasejteket képző őssejtekké. E folyamat során az autofágia jelentősen aktiválódott a regenerációban részt vevő sejtekben (mCherry::Atg8 riporter konstrukciót tartalmazó törzsekben), és autofág gének klonális mutációs inaktivitása jelentős mértékben blokkolta a regenerációs folyamatot. Igazoltuk továbbá, hogy az autofág folyamat ezen hatása a Hedgehog és a BMP jelátviteli útvonalak hatását igényli: számos autofágia gén ezen útvonalak hatására expresszálódik a regenerálódó sejtekben (**Kovács és mtsai., kézirat elkészítés alatt**).

A pályázat időtartama alatt részletesen vizsgáltuk az **autofág gének funkcióját a *Drosophila* szárny fejlődése során**. Az Atg6 (az emlős Beclin1 *ecetmuslica* megfelelője) az irodalmi adatok alapján a Vps34 és Vps15 fehérjékkel együtt alkotja a PI3K (III) komplex központi részét. Attól függően, hogy Atg14 vagy UVRAG fehérje kötődik negyedik komponensként a komplexhez, beszélünk PI3K (III) komplex I-ről, illetve PI3K (III) komplex II-ről. Az ismert, hogy a Vps34 és Vps15 szükséges számos sejtleletani működés szabályozásához, úgy mint például az endocitózis és autofágia. Munkánk során az Atg6, UVRAG és Atg14 szerepét vizsgáltuk az *ecetmuslica* szárny fejlődése során. Fluoreszcens és elektronmikroszkópos módszerek segítségével kimutattuk, hogy az Atg6 és UVRAG szükséges az endolizozómák éréséhez valamint működéséhez, amely miatt receptorok és ligandjaik lebontása révén az Atg6 és UVRAG szükséges jelátviteli folyamatok szabályozásához. Ez utóbbi feltételezésünket a Notch és Wingless - két szárnyfejlődésben kritikus fontosságú – jelátviteli útvonal vizsgálatával is sikeresen igazoltuk. Kimutattuk, hogy ezen folyamatok eredőjeként az Atg6 és UVRAG szükséges a hámsejtek normális polaritási mintázatának kialakításához. Továbbá azt is sikeresen kimutattuk, hogy ezekhez a sejtleletani folyamatokhoz az Atg14 egyáltalán nem szükséges. Viszont ezzel szemben igazoltuk, hogy míg az UVRAG nem, az Atg14 és az Atg6 elengedhetetlenül szükséges a normális autofág működésekhez. Eredményeink tehát azt a feltételezést igazolták, hogy az Atg14 tartalmú az autofágia-specifikus komplex, míg az UVRAG tartalmú az endocitózis szabályozásáért felelős komplex. (**Lőrincz P., Lakatos Zs., Maruzs, T., Szatmári, Zs., Kis, V. and Sass, M.:** (2014) Atg6- and UVRAG-containing PI3K (III) complex is required for endosome

maturation, lysosome function, receptor downregulation and cell polarity in *Drosophila* **Bio.Med. Research International**, accepted for publication)

Drosophilában igazoltuk, hogy az autofágia szükséges az **érett összetett szem** kifejlődéséhez. Autofág gének klonális (szemtelepben történő) kikapcsolása vagy csendesítése csökevényes vagy szemnélküli fenotípust eredményezett. Az autofágia hiperaktiválása szemtelepben pedig megnőtt szemhez vezetett felnőtt állatokban. Ezzel összhangban az autofágia jelentős és differenciált aktivitást mutat a szem diszkusz fejlődése során. Igazoltuk, hogy ezen folyamat során bizonyos autofág gének az egyedfejlődés mesterszabályozó elemeinek tekinthető HOX fehérjék transzkripciókat kontrollja alatt állnak; pl. a Labial HOX faktor transzkripciósan aktiválja az *ATG8* autofágia gént a szem diszkuszban (**Billes és mtsai., kézirat elkészítés alatt**).

Egy további munkánkban igazoltuk, hogy a **proteaszomális lebontás** hibája a hipoxia jelátviteli útvonalon serkenti az autofágiát ecetmuslicában. A szabályozott fehérjebontás nagyobb részéért két útvonal felelős az eukaryota sejtekben: az ubiquitin-proteaszóma rendszer és az autofágia. Az utóbbi években kiderült, hogy mindkét rendszer képes az ubiquitinilált fehérjék szelektív lebontására és hogy az autofágia részlegesen kompenzálni tudja a proteaszomális lebontás hiányát. Eredményeink bizonyítják, hogy a *Drosophila* lárvális zsírtestjében az autofágia felerősödik, ha a különböző proteaszóma alegység (α , β vagy szabályozó) géneket csendesítjük. Ha RNS interferenciával csendesítettük a sejtekben az *Atg* géneket, akkor a p62 és a ubiquitinilált fehérje tartalmú aggregátumok nagymértékű felhalmozódását tapasztaltuk. A p62 hiánya nem gátolja az autofágia proteaszóma hiba általi serkentését és ez mutatja, hogy a kiegészítő autofágia nem egyszerűen a felesleges fehérjék felszaporodása miatt indul be. Az ubiquitin-proteaszóma rendszer egyik legrészletesebben jellemzett szubsztrátja a hypoxia-indukálható transzkripció faktor 1 α alegysége (HIF-1 α), melyet normál oxigén ellátás mellett a proteaszóma folyamatosan lebont. A hipoxia emlős sejtekben ismertén serkenti az autofágiát. Munkánk során egy új genetikai kapcsolatot azonosítottunk az ubiquitin-proteaszóma rendszer és az autofágia között és kimutattuk, hogy a hipoxia jelátviteli útvonalat genetikailag indukálva *Drosophila* sejtekben is kiváltható az autofágia. Emellett az is kiderült, hogy a proteaszóma inaktiválással indukált autofágiához szükség van a HIF-1 α *Drosophila* ortológjára. (**Lów és mtsai, 2013**)

Eredendően a *Drosophila* lárvális nyálmirigyben az autofágia szabályozását terveztük tanulmányozni a szerv lebomlása/pusztulása során. Végül arra az eredményre jutottunk, hogy a nyálmirigy sejtjei a fehérjéik nagy részét nem autofágia útján, hanem apokrin szekrécióval távolítják el a sejtek lebontása során. (**Farkas és mtsai, 2014**)

A pályázat időtartama alatt részt vettünk két **összefoglaló módszertani cikk** megírásában és megszerkesztésében (**Eskeleinen és mtsai, 2011, Klionsky és mtsai, 2012**)

A *Caenorhabditis elegans*on végzett vizsgálatok

A DNS metabolizmus felborulása sejtpusztulást indukál. Az 5-fluorouracil (5FU) az egyik legpotensebb genotoxikus stressz az emlős sejtekben, hatékony kemoterápiás ágens. Eredményeink szerint az 5FU kezelés autofág sejthalált indukál humán sejtvonalakban és fonálféreg (*Caenorhabditis elegans*) modellrendszerben. Igazoltuk, hogy az 5FU kezelés során a *mismatch repair* (MMR) és *base excision repair* (BER) DNS javító útvonalak konvergálódnak, és közös elemeken keresztül aktiválják az autofág folyamatot (**Sengupta és mtsi., *Nat Commun.* 2013; 4:2674**). Az autofágia tehát esszenciális eleme a genotoxikus stressz kivédésére szöveti szinten (eltávolítja az érintett sejteket a működő szövetből).

Irodalmi adatok és korábbi eredményeink igazolták, hogy az insulin/IGF-1 (insulin-like growth factor-1) és TGF- β (transforming growth factor-beta) jelátviteli útvonalak szabályozzák az autofág folyamatot a sejtnövekedés, az öregedési és a sejtes differenciáció során. Kimutattuk, hogy *C. elegans*-ban a két folyamatot a HSF-1 (heat shock factor-1) transzkripció faktor kapcsolja össze molekulárisan. A HSF-1 aktivitását az insulin/IGF-1 receptor DAF-2 gátolja, míg a HSF-1 a TGF-beta ligandum DAF-7 expresszióját blokkolja. A HSF-1 tehát központi szerepet játszik a különböző stressz folyamatokra adott sejtes válaszok összehangolásában, így az autofágia indukációjában is (**Barna és mtsi., *BMC Dev Biol.* 2012, 12:32.**). Jelenleg a HSF-1 célgénnek szisztematikus (genom szintű) jellemzésével foglalkozunk *C. elegans*-ban. A direkt találatok között számos autofág gén található, amely magyarázatot adhat arra, miként aktiválódik az autofágia hő- és oxidatív stresszre is (**Barna és mtsi., kézirat elkészítés alatt**).

Ma már sok adat igazolja, hogy az **autofágia az élethossz, az öregedési folyamat** meghatározásában központi szerepet játszik az élesztőtől kezdve, a fonálférgen és a légyen át az emlősökig. Ennek a jelenségnek a molekuláris részletei azonban még távolról sem ismertek. A pályázat ideje alatt publikáltunk egy cikket, amelyben összefoglaltuk mindazon ismereteket, amelyek arra utalnak, hogy az öregedésben valamilyen funcióval rendelkező, valamennyi folyamat, szabályozási útvonal végső fokon az autofágia szabályozására hat. (**Vellai és mtsai 2009**)

Kimutattuk, hogy **az autofágia és az apoptózis** (programozott sejthalál) együtt szükségesek a *C. elegans* normális egyedfejlődéséhez. Autofágia vagy apoptózis defektív egyszeres mutáns állatok életképesek, és normálisan kifejlődnek, míg az autofágia-apoptózis

defektív kettős mutáns állatok elpusztulnak az embrionális fejlődés során. Igazoltuk, hogy autofág gének transzkripciós aktivitása az apoptózisban szerepet játszó ATF-szerű transzkripciós faktorok kontrollja alatt áll (**Erdélyi és mtsi., *J Cell Sci.* 2011, 124: 1510-8; Borsos és mtsi., *Autophagy.* 2011, 7: 557-9).**

A tervezet egyik célkitűzése volt **az autofágia funkcióinak vizsgálata hiper- és hypothermia alatt és után.** Az ezirányú munkát elkezdtük, de egyértelmű, publikálható eredményekre egyelőre nem jutottunk.

A munkatervi pont helyett egy igen érdekes és a szakirodalomban teljesen új kutatási irányban kezdtünk dolgozni. Nevezetesen az **autofágia funkcióját** néztük a **regenerációs folyamatokban.** A zebrahal (*Danio rerio*) farokúszója kitűnő szöveti regenerációs modell. A szerv amputálása után kb. 2 hét alatt a farki struktúrák visszaönek, és ez regenerációs folyamat többször is megismételhető. A farokúszó regenerációja dedifferenciációval történik, amelyet a sebzés helyén található blasztéma sejtek iniciálnak. A dedifferenciáció során a sejtek anyagainak intenzív átrendeződése zajlik, számos komponens lebomlik, miközben újak szintetizálódnak. Kezdeti feltételezésünk szerint a lebontás alapvetően autofágiával (sejtes önmérsztés) megy végbe. Elektronmikroszkópos és fluoreszcens mikroszkópos (Gfp-Atg8/Lc3 riporter konstrukciót tartalmazó transzgenikus halakat vizsgálva) technikákkal kimutattuk, hogy a regenerációs régióban található sejtekben jelentős mértékben megnőtt az autofág aktivitás. Az autofág folyamat blokkolása RNS interferenciával (MO-Atg5 morfolino injektálása a regenerálódó szövetbe) és farmakológiai eszközökkel (bafilomycin kezelés) jelentős mértékben gátolta meg az amputált farok úszószövet regenerációját. Az ilyen kezeléssel átesett halak sebszövetében az apoptotikus sejtpusztulás jelentős mértékben megnőtt. Hasonló jelenséget figyeltünk meg a hal szívizomjának regenerációja során (a kamra izomszövet 1/3-ának eltávolítása regenerációval normálisan helyreáll). Kimutattuk, hogy ez az autofágia-függő regenerációs folyamat az Fgf/ERK jelátviteli folyamat aktivitását igényli (**Varga és mtsi., *Cell Death Differ.* 2014, 21: 547-56**). Megjegyzendő, hogy (ahogy fentebb már láttuk), az autofágia szerepe a here szövetében zajló dedifferenciálódásban, regenerációban is esszenciális.

Az esetleges **fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálata** az autofágia szabályozásában co-immunprecipitáció segítségével.

Ez a munkatervi pont lényegében egy metodikai fejlesztésre vonatkozott. A co-immunprecipitáció módszerét bevezettük a kutatásainkba és minden olyan munkánkban

alkalmaztuk, ahol annak értelme, jelentősége volt. A Genetikai Tanszéken Vellainé Takács Krisztina, az Anatómiai Tanszéken Hegedűs Krisztina vezeti azokat a laborokat, amelyekben e vizsgálatokat ma már rutinszerűen el lehet végezni.

Az autofágia szabályozásában részt vevő **jelátviteli útvonalak leírása** *Drosophilában* és *C. elegansban*.

Az elmúlt években rendkívül sok leírás, eredmény látott napvilágot a nemzetközi irodalomban arról, hogy a rovarok (főként a *Drosophila*) szervezetében az autofágiának milyen élettani működésekben van fontos szerepe. Napjainkban az is nyilvánvaló, hogy az ilyen leírások nem nélkülözhetik a molekuláris és genetikai megközelítéseket, szabályozási útvonalak, mechanizmusok feltárását. Ezen eredményekről írtunk egy összefoglaló cikket, amelyben az autofágia szabályozásában részt vevő jelátviteli útvonalak is részletes ismertetésre kerültek – igaz, még nem bioinformatikai vizsgálatok alapján. (**Malagoli és mtsai, 2010**) A *C. elegans* esetében az autofágia masinéria új potenciális elemeit bioinformatikai eszközökkel is prediktáltuk, és közülük némelyiket kísérletesen validáltuk (**Kubisch és mtsi., 2013**).

Az ATG gének szerepe a neuronpusztulásban, *Drosophila* modellben

A CG6783 jelű gént eredetileg egy, autofágiában szerepet játszó gének azonosítására alkalmazott szűrés eredményeként azonosítottuk. Ez egy citoplazmatikus, zsírsavkötő fehérje, amely az omega-3 és omega-6 esszenciális zsírsavak felvételéért felelős. A fehérje hiányában a lárvális fejlődés 50%-al megnyúlik, a bából való kikelés után a legyek mozgása rendellenes és 48 óra után elpusztulnak. Az ilyen állatok az állatok központi idegrendszerében tömeges neuronpusztulást figyeltünk meg. Riportergén technikával kimutattuk, hogy a CG6783 fehérje jelen van az állat valamennyi szövetében, ahol nagymennyiségű lipidfelhalmozódás figyelhető meg (zsírtest, középbél, vérsejtek, agydúc).

A továbbiakban feltérképeztük a lipidcseppek tér és időbeli eloszlását a *muslica* agyban. A lipidcseppek az agy minden részén jelen vannak, de kifejezetten nagy számban találhatóak a központi test dorzomediális részén. A lipidcseppek csoportokba rendeződnek, s mindig a neurális őssejtek közvetlen környezetében lelhetők fel. Kizárólag a gliasejtekben találtunk lipidcseppeket, az idegsejtekben soha. Az első lipidcseppek a második lárvastádiumban jelennek meg, s számuk fokozatosan nő a bábállapot első harmadáig. Ezután a lipidcseppek száma fogyatkozni kezd és a kifejlett állatban már nem figyelhetőek meg. Genetikailag létrehozott gliasejt-klónok vizsgálatával kimutattuk, hogy létezik egy speciális

gliasejt (az ún. gyöngy sejt), amely igen nagy számban halmoz fel lipidcseppeket. E sejteket fény- és elektronmikroszkópos módszerekkel jellemeztük. Igazoltuk azt is, hogy ezek a sejtek nagy mennyiségben expresszálják a *Drosophila* fatty acid binding protein-t (*dfabp*, *CG6783*), mely fehérje ellen termeltetett ellenanyaggal meg tudtuk jelölni ezeket a sejteket. A következő lépés a lipidcseppek élettani funkciójának felderítése volt. A gliasejtekben lecsendesítettük a *dfabp* gént, aminek következtében a lipidcseppek száma drasztikusan lecsökkent a lárvális agyban. A csendesítés hatására nagymértékű sejtpusztulást figyeltünk meg. A felnőtt géncsökkentett állatok súlyos fejlődési rendellenességeket mutattak. Noha minden szervük kifejlődött a bábállapot során, a bábbőről nem tudtak kikelni, s azon belül elpusztultak. Igen kis százalékuk kelt csak ki, ám ezek súlyos idegrendszeri zavarokat mutattak. Normális mozgásra, párosodásra, repülésre képtelenek voltak, s egy-két napon belül elpusztultak. A mutáns állatok agyában a gliasejtek számának drasztikus csökkenését figyeltük meg, az agy központi részében. Eredményeink elsőként világítanak rá a lipidcseppek agyfejlődésben betöltött szerepére és fontosságára. Vizsgálatainkból az is következik, hogy a hibás zsírsavanyagcseréből eredeztethető idegrendszeri rendellenességek kiválóan modellezhetőek muslica modellben. **(Kis és mtsai, 2013, Kis és mtsai, kézirat elkészítés alatt)**

Az ATG gének és termékeik funkciója az emlős szervezet neuronpusztulással járó kórképeiben

A munkatervben vállaltaknak megfelelően vizsgálatainkat kiterjesztettük a legismertebb és leggyakoribb konformációs neurodegeneratív betegségekből elhunyt páciensek *post-mortem* agymintáinak vizsgálatára.

A kutatásaink sikere érdekében számos módszertani újítást vezettünk be, amelyek segítségével jelentősen mélyebb betekintést nyerhettünk a neurodegenerációs folyamatok molekuláris sejtbiológiai mechanizmusába, mint az eddig alkalmazott „hagyományos” morfológiai vizsgálati eszköztár révén.

Kidolgoztunk és rendszeresítettünk egy olyan új alacsony hőmérsékletű elektronmikroszkópos minta-előkészítő módszert, amely alkalmazásával nem csak a perfúziósan fixált egér agyakban, hanem a *post-mortem* humán agymintákban is jelentős mértékben megőriztük az egyébként kioldódásra hajlamos makromolekulákat, különös tekintettel a fehérjékre. Az így beágyazott mintákon végzett pre- és postembedding immuncitokémiai jelölések összehasonlítható morfológiai és morfometriai elemzései

egyértelműen azt mutatták, hogy szignifikánsabb több epitopot tudunk lokalizálni és specifikusabban, mint a korábban alkalmazott eljárások révén.

Egy nemzetközi kollaboráció keretében részt vettünk egy új, a szinukleinopátiákban központi szerepet játszó α -synuclein patogén fehérjét betegség-specifikusan felismerő ellenanyag, az 5G4 előállításában és kísérleti modellekből illetve humán agyból származó mintákon történő tesztelésében.

Legfontosabb eredményeink az alábbiakban összegezhetők:

PRION BETEGSÉGEK

A kóros konformációjú prion fehérjét (PrP^{Sc}) koncentráltan tartalmazó inokulum amyloid-képző hatása rendkívüli a GPI-horgonnyal nem rendelkező prion fehérjét expresszáló állatokban.

Az állatok nem mutatják a prion betegségekre jellemző kliniko-patológiai tüneteket.

Az elektronmikroszkópos szinten történő megfigyelések alapján megállapítható, hogy a PrP^{Sc} fibrillumokból felépülő plakkok folyamatos képződése ellenére, azok szomszédságában a neuronok a fiziológiásnak megfelelő képet mutatnak.

Az extracelluláris fehérje aggregátumok nagy tömegét az idegszövet glia hálózata igyekszik eliminálni és elszigetelni a környezetétől.

A PrP^{GPI-} transzgenikus állatok esetén a PrP^{Sc} által kiváltott gyenge patológiás folyamatok a prion fehérje GPI-horgonyának hiányával magyarázható.

A PrP^{Sc} nem képes az idegsejtek membránjával kapcsolatot kialakítani, ezáltal pedig internalizációjának, valamint az endoszómális-lizoszómális rendszerbe kerülésének, és az intracelluláris patológiás mechanizmusok kialakulásának a lehetősége meglehetősen csekély.

Az endoszómális-lizoszómális rendszernek tehát alapvető szerepe van a PrP^{Sc} sejten belüli terjedésében, valamint a patológiás folyamatok kiváltásában.

(László és mtsai, 2013, Puska és mtsai, 2013, Tóth és mtsai, 2013, Tóth és mtsai 2013)

SZINUKLEINOPÁTIÁK

Az 5G4 ellenanyag rendkívül ígéretesnek bizonyult a korábban már feldolgozott anyagok vizsgálatában, valamint a már megvitatásra került eredmények újraértékelésében.

A patológiás folyamatokban szerepet játszó α -szinuklein felhalmozódások neuronokban, vékony és vastag neuritekben, elszórtan neuronokban/neuropilben, továbbá az asztrogliá sejtekben, az ependyma sejtekben és kapillárisokhoz kapcsolódva egyaránt jelen vannak.

Az ependyma sejtek és a kapillárisok immunoreaktivitása azt a koncepciót támogatja, hogy a betegség patológiás folyamataiban meghatározó szerepet betöltő α -szinuklein jelen lehet a CSF-ben vagy a vérben is.

Az α -szinuklein endoszómális jellegű strukturákban figyelhető meg az idegsejtekben, ami a fehérje sejtről-sejtre történő terjedésével kapcsolatos felvetést támasztja alá.

A striatum területén asztrocita sejtekben, valamint az entorhinális és a temporális kéreg minden rétegében, valamint az amygdala területén fibrilláris sturkturák figyelhetők meg. Ebből arra következtethetünk, hogy az asztrocita sejtek önmaguk képesek fibrilláris aggregátumok képzésére a fehérje fagocitózisa nélkül.

(Molnár és mtsai, 2013, Kovács és mtsai 2014), (Gabor G. Kovacs, Leonid Breydo, Ryan Green, **Viktor Kis, Gina Puska, Péter Lőrincz**, Laura Perju-Dumbrava, Regina Giera, Walter Pirker, Mirjam Lutz, Ingolf Lachmann, Herbert Budka, Vladimir N. Uversky, **Kinga Molnár, Lajos László** (2014) Prion-like cell-to-cell spreading of disease-associated α -synuclein in the human brain. **Acta Neuropathologica (submitted, under second revision)**)

Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a neurodegeneratív betegségek esetében a sérült mitokondriumok lebontása nem mitofágia révén valósul meg, hanem a degenerálódó mitokondriumok saját külső membránja válik képessé a lizoszómákkal való fúzióra. Ez a folyamat követhető nyomon a kopási (öregedési) pigment (lipofuszcín) képződésekor.

(Kis és mtsai 2014)

2013-ban **egy év hosszabbításért** folyamodtunk az OTKA kuratóriumához azért, hogy a folyamatban levő munkáinkat még a pályázat lezárása előtt befejezhessük és publikálhassuk. 2013-14 között 11 tudományos cikket publikáltunk, egy már el van fogadva, de még nem jelent meg és kettő van az elbírálás utolsó fázisában – ahogy azt a fenti szövegben is jeleztük. További öt kéziratunk gyakorlatilag készen van, heteken belül beadásra fognak kerülni ezek is.

Az eredmények hasznosítása az oktatási munkánk során.

A pályázatban részt vevő két tanszék együttesen gondozza a biológus M.Sc. képzés „Genetika és molekuláris sejtbiológia” szakirányban zajló képzést. Ebben a pályázat keretében elért eredményeinket is ismertetjük a különböző kurzusok keretében, tekintettel arra, hogy a szakirányt választó hallgatók nagy része egyben a szakdolgozatosaink közé tartozik. A pályázati időszakban nagyon sok hallgatót sikerült bevonni a kutató munkánkba. Összesen 33 B.Sc. és 59 M.Sc. szintű szakdolgozat született a két tanszéken a pályázat ideje alatt. A hallgatóink egy része a publikációinkban szerzőtársként szerepel. A nagyon sok M.Sc. hallgatónk közül összesen 17 kolléga tudott Ph.D. ösztöndíjasként tovább dolgozni a két tanszéken. Közülük négyen szerezték meg az abszolutóriumot, akiknek a védeése ebben az évben várható.

A tudományos eredmények hasznosítása

Munkánk tipikus alapkutatás, nem volt és nem is lehetett célja a gyakorlatban közvetlenül hasznosítható eredmények elérése. Ugyanakkor, mint minden alapkutatással foglalkozó, rendületlenül hiszünk abban, hogy az általunk felismert és azonosított molekulák idővel hasznosíthatók lesznek a gyógyításban. E fehérjék ugyanis olyan irányított gyógyszertervezésnek lehetnek a célpontjai, amelyek az autofág folyamatok befolyásolását teszik majd lehetővé. Ennek különös jelentősége lehet, hiszen az autofágia olyan népbetegségek patomechanizmusában is szerepet játszik, mint a myocardialis, vagy a cerebrovascularis stroke, vagy a neuronvesztéssel járó Alzheimer-, Parkinson-, vagy Huntington-kór, a kettes típusú diabétesz, a rák, stb. Mindezek mellett az is egyre világosabb, hogy az autofágiának jelentős funkciója van az öregedési folyamatokban és az élethossz meghatározásában.

Ezen távlati célok mellett egyre közelebbinek látjuk azt, hogy az általunk kifejlesztett módszerek, ellenanyagok, próba cDNS-ek és számos más, a kutatásban alkalmazott eszközünk alkalmazható lesz a diagnosztikus eljárásokban. Ennek egyre nagyobb a jelentősége, ahogy erősödik az orvostudomány egyik legnagyobb kihívása, az egyéni terápiás eljárások alkalmazása.