

Zárójelentés

Azonosító: K-47241

A pályázat futamideje 2004-2006

Témavezető: Kovács Attila Lajos

A pályázat címe:

Az autofágia mechanizmusának, szabályozásának, sejt és fejlődésbiológiai szerepének komplex jellemzése sejtbiológiai és genetikai módszerekkel *Caenorhabditis elegans*ban

Az autofágia *Caenorhabditis elegans*ban való vizsgálatának nincsenek hosszú hagyományai. Az autofágia kutatásának az 1990-es évek elejét megelőző több mint három évtizedes klasszikus korszakában egyáltalán nem vizsgálták a folyamatot ebben az igen fontos genetikai modellorganizmusban. Az autofágia élesztő sejtekben történt felfedezése nyomán a 90-es évek közepétől a modern genetika és molekuláris biológia új módszereinek alkalmazásával új fejezet kezdődött az autofagocitózis vizsgálatában. Magunk a kilencvenes évek végén elsőként vállalkoztunk a *C. elegans* bevezetésére autofagocitózis kutatásába. Az OTKA 2000-2002 között három éven összesen 3150 eFt.-al támogatta munkánkat (nyilvántartási szám: T033047). Ennek a támogatásnak a révén indulhatott el az a munka amelynek eredményeként világossá vált, hogy az autofágia folyamata *C. elegans*ban is kimutatható és ez a kiemelkedően fontos soksejtű modellállat ezen a területen is kivételes lehetőségeket ígér.

2003-ban nem sikerült pályázati támogatást nyernünk. Ennek ellenére tovább folytattuk a munkát aminek eredményéről eddig még nem készült összefoglaló beszámoló ezért ezt itt tesszük meg. Az autofagocitózis szabályozásában központi szerepet játszó target of rapamycin (TOR) fehérje funkcióvesztéses mutánsairól elektronmikroszkópos vizsgálataink feltárták, hogy ezek az állatok bizonyos ultrastrukturálisan is kimutatható jellegzetességeikben (pl. glikogén és lipid felhalmozás) hasonlítanak a gyakorlatilag nem öregedő un. dauer lárvákhoz. Ennek alapján kezdtük vizsgálni a TOR mutáns állatok élethosszát. Mivel a *C. elegans*ban ismert volt, hogy az élettartam szabályozása többek között kapcsolatban van az autofágiát is szabályozó insulin/IGF szignalizációs úttal,

vizsgálatainkba bevontuk a *daf-2* inzulin receptor-mutáns törzset is. Eredményeink azt mutatták, hogy a TOR, alapvetően egyébként az autofágiát is szabályozó insulin/IGF szignalizációs rendszerbe illeszkedve fejt ki az élethossz regulálásában játszott szerepét. A felfedezésünket a Nature című folyóirat szerkesztői és bírálói közlésre érdemesnek tartották (Vellai T, Takacs-Vellai K, Zhang Y, Kovacs AL, Orosz L, Muller F. Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. **Nature**. 2003 Dec 11; 426(6967): 620. (IF: 32.2 ez a közlemény eddig 63 idézetet kapott).

2004-ben jelent meg az autofagocitózisról szóló első önálló kötet amelyben a szerkesztő felkérésére mi írtuk a *C. elegans*ról szóló fejezetet (Kovacs AL, Vellai T, Muller F. Autophagy in *Caenorhabditis elegans*. In: Klionsky DJ, editor. **Autophagy**. Austin, Georgetown, Texas, U.S.A.: Eurekah.com, Landes Bioscience; 2004. p. 217-23). Ebben a cikkben elektronmikroszkópos módszerrel azonosítjuk és leírjuk az autofág struktúrákat *C. elegans*ban és *in silico* azonosítjuk az autofág gének *C. elegans* ortológjait. Főként ezeknek az eredményeknek köszönhető, hogy a témavezető felkérést és megbízást kapott a 2005-ben indult Autophagy c. folyóirat szerkesztő bizottsági tagságára (<http://www.landesbioscience.com/journals/autophagy/editorialboard>).

A beszámolási időszakban végzett munkánk során az autofág gének közül különös figyelmet fordítottunk az *Atg6/Vps30/bec-1* gén vizsgálatára. Ez a gén azért különösen érdekes mert az autofágia mellett fontos szerepet játszik az apoptózisban és a daganatos átalakulásban is. A Current Biology c. folyóiratban megjelent cikkünkben (Takacs-Vellai K, Vellai T, Puoti A, Passannante M, Wicky C, Streit A, Kovacs AL, Muller F. Inactivation of the autophagy gene *bec-1* triggers apoptotic cell death in *C. elegans*. **Curr Biol**. 2005 Aug 23;15(16):1513-7)(IF: 11.9, a cikk eddig 14 idézetet kapott) részletesen jellemeztük ezt a gént amely a *C. elegans* genomban egyetlen homológként van jelen. Northern-blot analízissel kimutattuk, hogy a *bec-1* mRNS az összes fejlődési stádiumban kifejeződik, legerősebben az embriogenezis folyamán. Vizsgálataink szerint a *bec-1* funkcióvesztéses mutációja a fejlődés különböző fázisában történő pusztuláshoz vezet. A fenotípus erősen variabilis mivel a korai embrionális stádiumtól a felnőttkor eléréséig bármelyik szakaszban elpusztulhatnak az állatok. Azok azonban amelyek mégis elérik az

adult fázist már nem képesek életképes utódok létrehozására. *bec-1* RNAi-val kezelt állatokban a mutánséhoz hasonló, de gyengébb penetranciájú fenotípust kaptunk. Létrehoztunk egy menekítő BEC-1::GFP transzlációs fúziós konstrukciót. Ennek segítségével megállapítottuk, hogy a BEC-1::GFP minden sejtben expresszálódik, de a legerősebb fluoreszcens jelölést a fejlődő szövetekben, a presumptív ventrális idegköteg, bél valamint a fejlődő vulva és a szomatikus gonád sejtjeiben találtuk.

Az emlős Beclin 1-ről kimutatták, hogy kötődik a Bcl-2 antiapoptotikus fehérjéhez (Liang, X.H., Kleemann, L.K., Jiang, H.H., Gordon, G., Goldman, J.E., Berry, G., Herman, B., and Levine, B. (1998). Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J. Virol.* 72, 8586–8596). *In vitro* pull-down eljárás és koimmunoprecipitáció segítségével kimutattuk, hogy ez a kapcsolat evolúciósan konzervált mivel megvan a BEC-1 és a Bcl-2 *C. elegans* ortológja, a CED-9 között is. A *bec-1* apoptózisra vonatkozó hatását vizsgálva azt az eredményt kaptuk, hogy mind a *bec-1* mutáns mind a *bec-1(RNAi)* embriókban, és a felnőtt állatok gonád karjaiban is szignifikánsan megnőtt a pusztuló sejtek száma. Ezzel összhangban álltak a TUNEL pozitív sejtek számáról kapott adataink is. Az apoptotikus sejtek számának növekedése nem következett be *ced-3(lf)* vagy *ced-9(gf)* mutációkban. Ez arra mutat, hogy a *bec-1* inaktiválás révén fokozódó sejtpusztulás mechanizmusa a CED-3/caspase által közvetített kanonikus úton folyik.

A Bec-1 fenotípus szembetűnő hasonlóságot mutat a *let-512* mutáció fenotípusával. A LET-512/VPS34, az élesztő és az emlősök foszfatidil-inozitol 3-kinázának homológja *C. elegans*ban. Az ezen gén által kódolt fehérje emlősben és élesztőben komplexet képez a Atg6/Vps30/Beclin 1-el amely a transz-Golgi régió membrán transzport folyamataiban valamint az autofagocitózis iniciálásában szerepel (Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., and Ohsumi, Y. (2001). Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 152, 519–530; Kihara, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001). Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep.* 2, 330–335). Koimmunoprecipitációs kísérleteink kimutatták, hogy a két fehérje *C. elegans*ban is előfordul asszociált formában. GFP::FYVE domén expressziót vizsgálva kimutattuk, hogy a foszfatidil-inozitol 3-foszfát hiányzott mind a *let-512(lf)*

mind a bec-1(RNAi) állatok sejtjeinek membránjaiból.

A bec-1 és let-512 mutánsok elektronmikroszkópos vizsgálata mindkét törzsre jellemző jellegzetes membrán módosulási jelenségeket tárt fel. Ezek közé tartozik az apró vezikulák tömeges megjelenése a citoszolban, a multivezikuláris testek expansiója és a ciszternás endoplazmás retikulum tubularizációja. Az autofág vakuólák megjelenése ellentmondásos képet mutat. Egyes embriókban az apoptózis fokozódása mellett kiugróan magas autofágiát is találtunk, míg másokban nem. Az ellentmondások mellett is világosan látszik, hogy ennek a két fehérjének az együttműködése fontos szerepet játszik a sejtek endomembrán szerkezetének, a membrán átalakulási folyamatoknak a szervezésében.

Az autofágia szabályozásának vizsgálatához kapcsolódóan az insulin/IGF szignalizációs út komponenseiben mutáns állatok megfigyelése és irodalmi adatok nyomán olyan megfigyeléseket tettünk, hogy a nematodák bizonyos tanulási képességei ezen szignalizációs út változásaihoz kötöttek és egyben függenek az állat nemétől. A felmerült kérdésekre talált kísérleti válaszokat és következtetéseket a Genetics c. folyóiratban publikáltuk (Vellai T, McCulloch D, Gems D, Kovacs AL Effects of sex and insulin/insulin-like growth factor-1 signaling on performance in an associative learning paradigm in *Caenorhabditis elegans*. Genetics. 2006 Sep;174(1):309-16 (IF: 4.3 ez a cikk már kapott egy idézetet). Eredményeink kimutatták, hogy *C. elegans*ban az éhezéssel párosított kemotaktikus ingerekre adott válasz tanulási hatékonysága az inzulin/IGF-1 szignalizációs rendszer aktivitásával egyenes arányban változott. Ezzel összhangban a konstitutív módon csökkent inzulin/IGF-1 aktivitást mutató hím állatok tanulási képessége is gyengébbnek mutatkozott.

Már régóta jól ismert, hogy a sejtek pusztulásának vannak olyan módjai amelyben szerepet játszik az autofagocitózis (Bursch, W., Ellinger, A., Gerner, C. and Schulte-Hermann, R. (2004). Autophagocytosis and programmed cell death. In Autophagy (ed. D. J. Klionsky), pp. 287-303. Georgetown, TX: Landes Bioscience). Mindezideig elsősorban az apoptotikus sejtpusztulás és az autofág gének és géntermékek összefüggéseit vizsgálták ill. vizsgáltuk. A *C. elegans*ban kitűnő modell rendszer áll rendelkezésre a

toxikus neuronpusztulás vizsgálatára. Ennek felhasználásával kísérleteket végeztünk az autofág gének és a toxikus ioncsatorna-függő nekrotikus neurondegeneráció összefüggésének felderítésére. Az eredményeinket összefoglaló cikket a *Journal of Cell Science* folyóirat elfogadta és a kézirat nyomdában van (Tóth ML, Simon P, Kovacs AL and Vellai T Influence of autophagy genes on ion-channeldependent neuronal degeneration in *Caenorhabditis elegans* **Journal of Cell Science** 2007(120) in press IF: 7.25). Az ioncsatorna alegységeket kódoló *deg-1*, *mec-4* és az acetilkolin receptor alegységet kódoló *deg-3* gén funkció fokozó mutációi a *C. elegans*ban csak néhány meghatározott sejtben fejeződnek ki. Az ioncsatornák hiperaktivitása által okozott neuron pusztulás drámai membránátalakulási folyamatokkal, vakuóla képződéssel jár együtt. Kimutattuk, hogy három *C. elegans* autofág gén (*unc-51*, *bec-1* és *lgg-1* amelyek sorrendben az élesztő *Atg1*, *Atg6* and *Atg8* génjének megfelelői) inaktiválása gátolja a toxikus ioncsatorna-függő neuronpusztulást. A CeTOR által közvetített szignalizációs út, amely a táplálkozás-éhezés állapotváltozásaihoz kapcsolódik aktív, jól táplált állapotban gátolja, míg inaktív állapotban éhezés mellett fokozza a nekrotikus pusztulást.

Az eddigiekben már sokoldalúan vizsgált *unc-51/atg1* and *bec-1/atg6/beclin1* autofág gének inaktiválása kis testméret kialakulásához vezet. Emellett a fenti gének funkcióvesztéses mutációi szupresszálják az izulin/IGF és TGF $\beta$  szignalizációs utak mutációinak nagy testméretű fenotípusát. Mindez, mivel a sejtek száma nem változik, a fenti autofág géneknek a sejt méret szabályozásában való szerepét mutatja. Az erről szóló kéziratot benyújtottuk a *Genetics* folyóiratnak, jelenleg a bírálatok alapján az átdolgozása folyik.

2006 októberében került sor a 4. Nemzetközi Autofág Szimpoziium megtartására Japánban. Ezen a rendezvényen meghívott előadóként vett részt a témavezető. (Kovacs AL, Vellai T, Palfia Z, Rez G, Kovacs J. Mechanism of autophagy and the role of autophagy genes in various metazoan cell types. **4th International Symposium on Autophagy: Exploring the Frontiers of Autophagy Research**, October 1–5, 2006; Mishima, Shizuoka-ken, Japan; Oral Lecture Abstracts, **Autophagy** 2006; 2:4, 336) Az elhangzott előadás anyaga élénk érdeklődést váltott ki (Eskelinen EL, Deretic V,

Neufeld T, Levine B, Cuervo AM. 4(th) International Symposium on Autophagy: Exploiting the Frontiers of Autophagy Research. *Autophagy* 2007;3(2):166-73).

és cikk formájában is megfogalmazásra került. Ebben a kéziratban összefoglaljuk az autofág izoláló membrán szerkezetére és keletkezésére vonatkozó eddigi eredményeinket és az eredmények alapján bemutatunk egy több vonatkozásban új izoláló membrán keletkezési modellt (Kovacs AL, Vellai T, Palfia Z, Rez G, Cervenak L, Kovacs J. Characterization of the macroautophagic isolation membrane by traditional transmission electron microscopy in various cell types.) A kézirat az utolsó ábra kivételével elkészült és néhány napon belül közlésre benyújtjuk az *Autophagy* folyóirathoz.

A fenti összefoglalóban leírt nagyrészt már publikált eredményeinket ismertettük. Számos további vonalon gyűjtöttünk további értékes adatokat amelyek kisebb vagy nagyobb kiegészítésekkel több további publikáció alapját képez(het)ik. Ezek közül a legfontosabbak a következők. Részletesen vizsgáltuk és kitartóan tovább vizsgáljuk a *gfp::lgg-1* transzlációs konstrukciót tartalmazó törzsben jelentkező expressziós mintázatokat. Az *lgg-1* gén az élesztő *Atg8* gén *C. elegans* ortológja. Az *Atg8p* az egyetlen eddig ismert fehérje amely viszonylag tartósan, kovalens kötással kapcsolódik az autofág izoláló membránhoz. Ennek alapján többféle kísérleti rendszerben kimutatták, hogy *gfp*-vel jelzett fúziós protein formájában alkalmas lehet az autofagocitózis fénymikroszkópos detektálására (Mizushima N. Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36(12):2491-502). Jelenleg olyan *C. elegans* törzs áll rendelkezésünkre amely a *gfp::lgg-1* gén extrakromozómális vektorban lévő transzlációs konstrukcióját hordozza. Az autofágiával való kapcsolat igazolására jellegzetes, granuláris, reprodukálhatóan megjelenő mintázatok után kutatunk olyan helyzetekben amikor az autofágia fokozódása várható. A munka az adatok felhalmozásának stádiumában van. Eddigi eredményeink szerint az expresszió szintje igen változó lehet. Az erős kifejeződés gyakran, de nem minden esetben, letalitással is együtt járhat. Igen jelentős a diffúz jelölődés. A legerősebben jelölt állatok között reprodukálható módon felbukkannak dumpy fenotípusúak és a fark fejlődésében rendellenességet mutatók. Ezen a megfigyelések arra utalnak, hogy az autofágia a test felépítés és morfogenezis eddig ismeretlen területein is szerepet játszik. Ennek igazolása természetesen a következő

időszak feladataihoz tartozik.

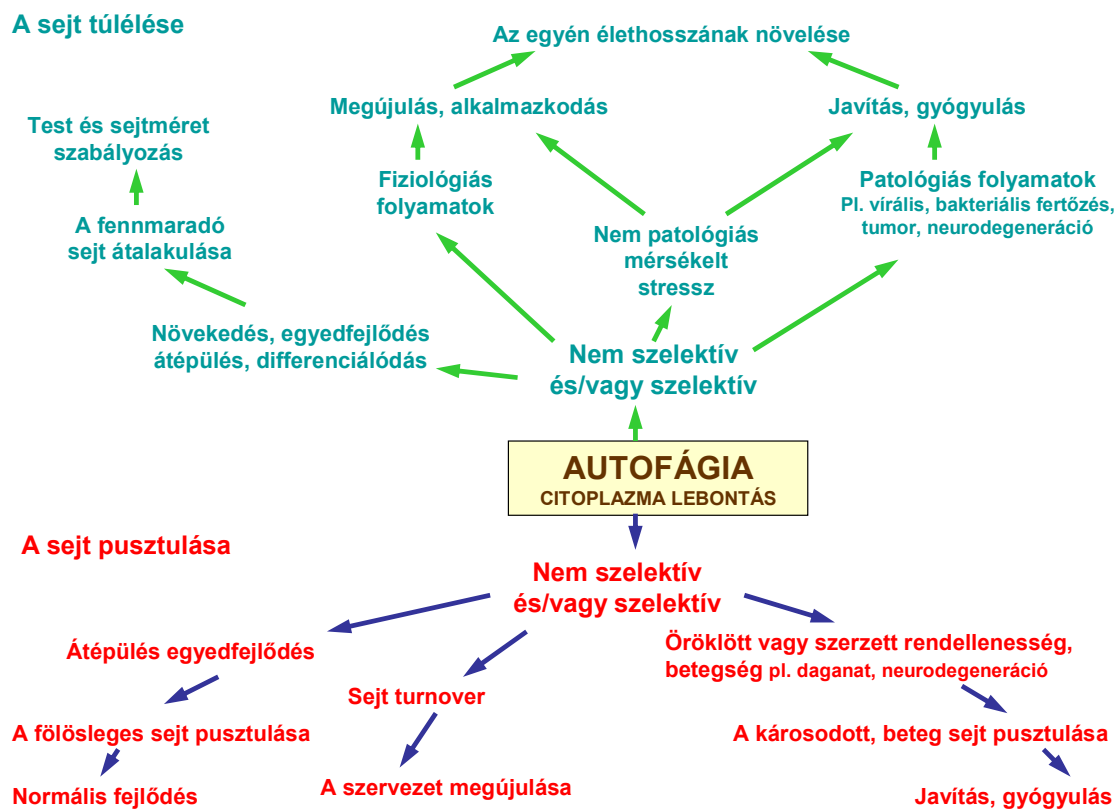
A gyorsabb haladást a gpf-lgg-1 expressziós mintázat analízisében nehezíti, hogy a törzs mozaikos expressziót mutat és igen nagy a fenotipikus variabilitása. Érdekes és óvatosságra intő az a megfigyelésünk, hogy az unc-51 mutációt hordozó (feltételezhetően csökkent autofág funkciójú) törzsbe keresztezve a gfp::lgg-1 konstrukció igen intenzív, ráadásul igen gyakran granuláris jelölődést mutathat. Konfokális mikroszkóppal nézve ezek a viszonylag nagy granulumok gyűrűszerű megjelenést (amit emlős rendszerekben az autofagoszómák jelölődéseként tartanak számon) nem mutatnak.

Folytatjuk az éheztetésnek az adult életszakaszra, az utódok számára és ezzel összefüggésben az autofágiára gyakorolt hatásának a szisztematikus vizsgálatát. Eddigi eredményeink szerint az L4 stádiumból kikelt állatok teljes éhezés mellett is képesek több mint tíz életképes utódot létrehozni. Elektronmikroszkópos vizsgálataink nem mutatnak kiugró autofágiát ezekben az állatokban. Ha lizoszómális lebontást leupeptinnel gátoljuk, akkor csökkeni látszik az utódok száma. Igen érdekes morfológiai megfigyelésnek tartjuk, hogy a leupeptinnek kezelt állatokban, elsősorban a hipodermisben, reziduális testhez hasonló struktúrák jelennek meg, ami degradáció gátlóra utal. Jelenleg ennek a felhalmozódó anyagnak az eredetét kutatjuk. Elkezdtük a gfp::lgg-1 konstrukciót hordozó állatoknak a fenti éheztetési tesztben történő vizsgálatát. Eddigi eredményeink szerint nem látszik feltűnő fénymikroszkóppal kimutatható granuláció. Két további fontos megfigyelés tartozik ezekhez az eredményekhez. Elektronmikroszkóppal kimutattuk, hogy az éheztetett állatokban a lizoszómális proteázok gátlása révén nagy, szabálytalan alakú granulumok halmozódnak fel, elsősorban a hipodermisz sejtekben. Mivel nem látszanak nyilvánvalóan makroautofág elemekből származónak, eredetüket ki kell derítenünk. Ennek kapcsán felmerül annak lehetősége, hogy a makro és mikroautofágiától egyaránt elrérő új, eddig ismeretlen autofág szegregációs forma áll a folyamat mögött.

Beszereztünk egy igen érdekes un. "granuleless" (glo) mutációt hordozó törzset. Ebben hiányzik egy lizoszomotrop ágensekkel (lysotracker, acridin orange) festhető granulum típus. Kimutattuk, hogy ezek a granulumok a vad típusban neutrálvörössel is festődnek, amiről korábban már megállapítottuk, hogy vitális festékként a *C. elegans*ban is alkalmazható. Ennek felhasználásával lehetségessé válhat a fokozott lizoszómális

aktivitás folyamatos nyomonkísérése, mivel a bél acidofil granulomái nem fedik el a fénymikroszkopos festődést.

A legújabb köztük saját kutatásaink nyomán is rendkívül izgalmas kép bontakozik ki az autofagocitózisról. Egyre világosabbá válik, hogy ez az eukarióta sejtekre jellemző ősi önemésztő folyamat, alapvető jelentőségű a sejtek normális és patológiás működésében, a növekedés és fejlődés szabályozásában a változó körülményekhez való alkalmazkodásban. Talán érdemes ide idézni a témavezetőnek egy egyetemi szakmai szemináriumon néhány hete elhangzott előadásában szerepelt összefoglaló ábrát.





Az ábra alapján látható, hogy az autofagocitózis egyaránt részese lehet a sejtek túlélésének és pusztulásának. Befolyást gyakorol a sejt és testméret alakulására és a testalak és testtájak morfogenezisére. Szerepel a növekedés és fejlődés folyamataiban, fiziológiás és patológiás változásokban egyaránt. A mérsékelt stresszhatások kivédésétől a sejtek és a szervezet állandó megújulásán át az élethossz befolyásolásáig szinte minden fontos sejtbiológiai folyamathoz kapcsolódik az autofág rendszernek valamilyen változása. Azt, hogy az valóban új korszakba léptünk jól mutatja, hogy Science és a Nature folyóiratokban a 90-es évek előtt kettő, míg azóta harminc cikk jelent meg az autofágiáról. Az évente megjelent 1989-ben 22, míg 2006-ban 463 volt. A fellendülés ennek ellenére még a kezdeténél tart. Az új eredmények alapján a modern autofágia kutatás jelenleg legizgalmasabb periódusát éli, mélységében és terjedelmében egyaránt gyorsan fejlődik. Szerencsésnek érezzük magunkat, hogy ebben a munkában részt vehetünk, úgy is mint az autofágiával világszerte a leghosszabb idő, 1964 óta folyamatosan foglalkozó kutatóhely egyik csoportja. Az OTKA eddig számunkra nyújtott támogatásával sikeresen bevezettük a *Caenorhabditis elegans* az autofágia kutatás területére. Jelenleg jó esélyünk van arra, hogy a *C. elegans* autofágia kutatásban meghatározó szerepet játsszunk. A kutatócsoportban ehhez megvannak a szubjektív feltételek és a további OTKA támogatásért beadott pályázatunk sikere biztosíthatja a munka és a fejlődés folyamatosságát.

Végül egy pályázatszervezési, adminisztratív kérdést szeretnék érinteni. Kitűnő dolognak tartom és nagy előrelépésnek a pályázatok beadásához kialakított elektronikus rendszert. Ennek továbbfejlesztésére, az OTKA Iroda képviselőjével, Vécsei Krisztiánnal történt konzultáció alapján javaslatot teszek arra, hogy a beszámolók elektronikus benyújtásának honlapján biztosítson az Iroda módot arra, hogy az eddig publikált közlemények pdf változatait is feltölthessük. Mivel erre jelenleg mód nincs, ezért külön email-ben csatolt file-ként küldöm el közleményeinket amelyekből a bírálók és érdeklődők további részletekkel ismerkedhetnek meg munkánkról.