

Doktori tézisek

Új molekuláris szabályozási útvonalak és poszttranszkripcionális modifikációk az autofágiában

Bánréti Ágnes Regina

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Természettudományi Kar

Biológia Doktori Iskola

Molekuláris Sejt- és Neurobiológia program

2014



Doktori iskola vezetője: Prof. Erdei Anna

Témavezető: Prof. Sass Miklós

DSc. Habil., egyetemi tanár

Konzulens: Dr. Yacine Graba

Ph.D., tudományos főmunkatárs, CNRS, Franciaország

("Research Director at CNRS, France")

Bevezetés

A sejtek homeosztázisának fenntartása, a sejtek számának valamint méretének szabályozása a felépítő (anabolikus) és a lebontó (katabolikus) folyamatok precíz összehangolását igénylik. Autofágia (sejtes önemésztés) alatt az eukarióták körében előforduló, olyan katabolikus folyamatokat értjük, melyek során a sejt saját anyagait, beleértve a citoszólt, makromolekuláris komplexeket és organelumokat a lizoszómális rendszer segítségével bontja le. Az autofágia nélkülözhetetlen a sejt környezeti stresszhatásokhoz történő adaptációjához, elengedhetetlen szerepet játszik a sejt saját anyagainak reciklizációján keresztül annak makromolekulákkal és ATP-vel történő ellátásában, valamint az egyedfejlődés során a sejtek és szövetek átépülésében. Az autofágia három fő formáját különböztetjük meg morfológiai lefolyásuk alapján, a chaperone-mediált autofágiát, a mikroautofágiát, valamint a makroautofágiát. A makroautofágia során, a sejt citoplazmarészei kettős membránnal határolt vezikulákba, ún. autofagoszómákba különülnek. Az autofagoszómák a lizoszómákkal egyesülve, majd beltartalmuk a lizoszómális enzimek segítségével lebomlik. Doktori munkám során a makroautofágia folyamatának tanulmányozására fókuszáltam. Az autofágiát szabályozó jelátviteli útvonalakat először élesztőben írták le, később igazolták, hogy ezen szabályozási rendszerek igen nagymértékű evolúciós konzerváltságot mutatnak mind *C. elegans*-ban, *Drosophilában* és emlős sejtekben. Mivel az autofágia meghibásodása számos patológiai elváltozással összefüggésbe hozható (daganatos megbetegedések, obezitás, diabétesz, neurodegeneratív betegségek), az autofágiát szabályozó molekuláris mechanizmusok tanulmányozása rendkívüli jelentőségű.

Számos sejtbiológiai folyamat és jelátviteli útvonal fehérjék reverzibilis foszforilációja által szabályozott. Számos kináz autofágiában betöltött szerepét leírták, ám az autofágia kontrolljában szerepet játszó fehérjék defoszforilációját végző foszfatázok pontos hatásmechanizma eddig még tisztázatlan. A protein foszfatáz 2A (PP2A) egy szerin-treonin specifikus foszfatáz, mely számos sejtbiológiai folyamatban betöltött szerepéről ismert, mint például DNS replikáció, intermedier anyagszere, transzkripció, sejtosztódás, apoptózis vagy autofágia. A PP2A heterotrimer holoenzim komplex egy A, B és egy C alegységből épül fel. A katalitikus C alegység az A vázfehérje karboxil végéhez köt, így formálva az ún. dimer core komplexet. A dimerhez kötő B regulációs alegység határozza meg a holoenzim szubcelluláris lokalizációját és szubsztrátspecifitását. Korábbi tanulmányokban leírták, hogy a PP2A-C szelektív inhibitora, az okadánsav gátolja az autofágiát májsejtekben, továbbá, hogy élesztőben a PP2A a TOR által szabályozott autofágiában játszik szerepet.

Doktori munkám eredményei szerint *Drosophilában* az mts (katalitikus alegység), a PP2A-29B vázfehérje valamint két regulációs alegység (wdb és B') által alkotott trimer komplexek szabályozzák az éhezéssel indukált autofágia folyamatát, két eltérő útvonalon.

A hox gének által kódolt transzkripciós faktorok számos olyan, egyedfejlődésben szerepet játszó folyamatot szabályoznak, mint például az organogenezis, a sejt differenciáció és az apoptózis. A programozott sejthalál az állatok körében a normál egyedfejlődés szerves része. Míg a Hox gének és az apoptózis kapcsolatát már korábban leírták (I. típusú programozott sejthalál, PCDI), az autofágia (II. típusú programozott sejthalál, PCDII) kapcsolatát eddig még nem vizsgálták.

Munkám eredményeként levonható következtetés, hogy a Hox fehérjéknek -Ultrabithorax (Ubx), Abdominal A (AbdA), Abdominal B (AbdB), Deformed (Dfd), Sex Comb Reduced (Scr)- elengedhetetlen szerepük van az egyedfejlődés során a programozott autofágia precízen szabályozott időzítéséhez. Eredményeim szerint a tesztelt Hox fehérjék mindegyike gátolja az autofágiát, azaz ezen funkciójuk inkább tekinthető generálisnak és redundánsnak, mintsem paralóg-specifikusnak. A megszokott, pozicionális információt kódoló szerepükkel ellentétben a Hox fehérjék a fejlődési autofágia időzítésében játszanak szerepet, azaz temporális információval szolgálnak az egyedfejlődés során. Munkám eredményei igazolják továbbá, hogy a Hox gének kifejeződésének időbeli mintázatát a Brahma kromatin regulációs komplex szabályozza, melynek aktivitása a fakultatív Pontin komponensének jelenlététől függ. Eredményeim szerint a Hox fehérjék számos Atg és autofágia specifikus gén átírásának gátlásán keresztül szabályozzák az autofágia folyamatát.

A doktori munka fő célkitűzései

A) A PP2A és az autofágia kapcsolatának vizsgálata:

- 1) Szerepet játszik-e a *Drosophila* PP2A foszfatázhoz az autofágia szabályozásában, az emlős PP2A-hoz hasonlóan?
- 2) Mely *Drosophila* PP2A alegységek szabályozzák az autofágiát?
- 3) Hogyan illeszthető be a PP2A az autofágiát szabályozó molekuláris hálózatba?
- 4) Mik a PP2A potenciális célfehérjéi, melyeken keresztül szabályozza az autofágiát?

B) A Hox fehérjék és az autofágia kapcsolatának vizsgálata:

- 1) Mi a Hox gének időbeli kifejeződési mintázata *Drosophila* lárvális zsírtestben a fejlődési autofágia indukciója előtt és azt követően?
- 2) Mi áll a Hox gének kifejeződési mintázatának hátterében?
- 3) Szerepet játszanak-e a Hox géneknek a fejlődési autofágia szabályozásában?
- 4) Befolyásolható-e a Hox gének kifejeződésének mintázata környezeti hatásokkal?
- 5) Van-e szerepe a Hox géneknek az éhezéssel indukált autofágia szabályozásában?
- 6) Hogyan illeszthetőek be a Hox fehérjék az autofágiát szabályozó molekuláris hálózatba?
- 7) Melyek a Hox fehérjék potenciális célgénjei, melyeken keresztül szabályozza az autofágiát?
- 8) A Hox fehérjék autofágiára gyakorolt hatása evolúciósan konzervált-e?

Anyagok és Módszerek

Módszerek: *Drosophila* genetika, Szemi-kvantitatív és kvantitatív Reverz Transzkriptáz PCR molekuláris klónozás, immunohisztokémia és immunocitokémia, fluorescens és konfokális mikroszkópia, transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM), grinces sejtvonal transzfekció

Modell rendszerek: *Drosophila* L3 stádiumú lárvák, gerinces COS-7 sejtvonal

Eredmények

A) A PP2A katalitikus alegységének gátlása okadánsavval, RNSi-vel illetve az mts génbe történő P-elem inszercióval az éhezéssel indukált autofágia teljes mértékű gátlását eredményezte. Ezen eredmények szerint, hasonlóan az emlős sejtekben megfigyeltékhez, a PP2A-nak *Drosophilában* is szerepe van az autofágia szabályozásában. Igazoltam, hogy további PP2A alegységeknek úgymint a PP2A-29B, wdb illetve a PP2A-B' fehérjéknek szintén elengedhetetlen szerepe van az autofágia indukációjában. *GFP::PP2A-B'* fúziós gént hordozó törzset állítottam elő, melyben a GFP-jelölt fúziós fehérjét túltermeltettem. Éhezetés hatására az autofág struktúrák igen jelentős feldúsulása volt megfigyelhető. A GFP-jelölt PP2A-B' fehérje a LysoTracker-Red pozitív granulumokat jelölt fluoreszcens mikroszkóppal, és konfokális mikroszkóppal. Eredményeimet transzmissziós elektronmikroszkóp segítségével is igazoltam. Kimutattam továbbá, hogy rapamycin kezelés hatására megváltozik a PP2A-B' alegység szubcelluláris lokalizációja és a B' alegység szerepet játszik a rapamycin-idukált

autofágiában. Ezzel ellentétben, a *wdb* alegység csendesítése nem volt hatással a rapamycin-indukált autofágiára. Mindezek alapján arra következtettek, hogy míg a *wdb* a dTOR-on keresztül hathat, addig a B'-t valószínű a dTOR szabályozza.

A PP2A potenciális célgénjeként azonosítottam az *srp* (*serpent*)-et mint az élesztő *gln3* *Drosophila* ortológját. Kimutattam, hogy az Srp szabályozza az autofagoszómák és lizoszómák fúzióját. Azonosítottam továbbá három új Atg gént (Atg14, Atg17 és Atg101), melyek potenciálisan a PP2A és az Srp kontrollja alatt állnak.

B) A Hox fehérjék térbeli expresszióját egész boncolt zsírtesteken, immunfestéssel tanulmányoztam. Az Ubx és AbdB kifejeződése szokatlanul széles sávra terjed ki, és átfedést mutatott az anterior Dfd-t expresszáló zónával. Mindezen eredmények arra utalnak, hogy a Hox géneknek nem a sejtek térbeli helyzetét kódoló funkciójuk van a zsírtestben. Következésképp megvizsgáltam a Hox gének expresszióját a fejlődési autofágiát indukáló megelőző periódusban (táplálkozó lárvastádium) illetve azt követően (vándorló lárvastádium). Eredményeim a Hox gének kifejeződésének L3F/L3W átmenetet követő csökkenésére utalnak, mely a transzkripció szintjén is megfigyelhető volt. A Hox gének L3W stádiumban fenntartott kifejezetése klónsejtekben gátolta a fejlődési autofágiát. Ezen eredményeket elektronmikroszkópos vizsgálatokkal is alátámasztottam. A funkcionyeréses kísérletek eredményei illetve a Hox gének széles sávban átfedő kifejeződési mintázata mind a Hox fehérjék zsírtestben betöltött általános temporális információt kódoló szerepére utalnak. Eszerint pusztán egy individuális Hox gén gátlása nem változtat a Hox fehérjék fejlődési autofágiára gyakorolt gátló hatásán. A Tritorax csoportba tartozó Brahma (Brm) komplex felelős mind a *Drosophila* a Hox gének expresszionális szabályozásáért embrióban és más szövetekben. Hogy ez igaz-e a lárvális zsírtestre is, a Brm komplex tagjainak RNSi-vel történő inaktivációjának hatását teszteltem a Hox géntermékeire. Eredményeim alapján a Brm komplex konstitutív (Brm, Osa, Moi) illetve járulékos (Pont) tagjainak együttes jelenléte szükséges a Hox gének kifejeződésének fenntartásához és az autofágia gátlásához L3F stádiumban. Korábbi közlemények szerint a fejlődési autofágia időzítése az ecdizon hormonhoz kötött. Eredményim szerint az ecdizon szabályozza a Pont aktivitásának dinamikáját és a Hox gének időbeli kifejeződési mintázatát zsírtest sejtekben. Éheztetés hatására az eukarióta sejtekben, így a *Drosophila* lárvális zsírtestjének sejtjeiben fiziológias válaszreakcióként indukálódik az autofágia. Megfigyeltem, hogy a Hox fehérjék dinamikája és az autofágia lefolyása egymással negatív korrelációban állnak éheztetést követően. Eredményeim szerint a Hox fehérjék szintén gátló hatással vannak az éheztetéssel indukált autofágiára. Igazoltam, hogy a Hox fehérjék az éheztetéssel indukált autofágia szabályozásáért

felelős, evolúciósan konzervált Akt1/dTOR útvonal kontrollja alatt állnak. Következő lépésként potenciális Hox célgéneket kerestem. Számos Atg gén (AuTophagy-related gén) melyek az autofágiát szabályozó molekuláris rendszer kulcsenzimeit kódolják, illetve egyéb, az autofágia szabályozásában leírt gén kifejeződésének mértékét qRT-PCR-al vizsgáltam L3F és L3W stádiumokban. Eredményeim szerint, a Hox gének termeltetése L3W stádiumban számos autofágiában elengedhetetlen szereppel bíró gén kifejeződését gátolta. A Hox fehérjék által szabályozott autofágia evolúciós konzerváltságát igazolja, az egér Hox ortológok *Drosophila* lárvális zsírtestjében illetve COS-7 sejtekben megfigyelt autofágiára gyakorolt gátló hatása.

Diszkusszió

Az autofágia valamennyi eukariótában előforduló, élettani folyamat, mely rendkívüli mértékű evolúciós konzerváltságot mutat. Az autofágiának nélkülözhetetlen szerepe van a sejtek környezeti stresszhatásokra adott válaszreakciójában, az öregedésben, a feleslegessé vált vagy károsodott sejtstruktúrák eliminációjában illetve a sejtek és szövetek átépülésében az egyedfejlődés során. Az autofágia indukciójának és gátlásának szabályozása rendkívül összetett, a környezeti szignálok integrálása mellett fejlődési jelek – hormonok - közvetítését is magába foglalja. Erre példa az egyedfejlődés során tömeges autofágiához vezető ecdizon szteroid hormon és annak szignalizációs kaszkádja. A hormonális és környezeti jeleket közvetítő jelátviteli útvonalak egymással szoros összefüggésben állnak, mint azt egy korábban leközölt tanulmányok eredményei is alátámasztják. Például *Drosophilában* az ecdizon által indukált jelátviteli útvonal az Pi3K/Akt1 kaszkád gátlásán keresztül hat.

A legtöbb sejt folyamat és jelátviteli útvonal szabályozása részben a fehérjék reverzibilis foszforilációján keresztül valósul meg. Habár számos kináz elengedhetetlen szerepét írták le az autofágia szabályozásában, az általuk szabályozott fehérjék defoszforilációjának pontos mechanizmusa többnyire ismeretlen. *Drosophilában* a PP2A heterotrimer enzimkomplex egy katalitikus PP2A-C (microtubule star/mts), egy vázfehérje A (PP2A-29B) illetve egy variábilis regulációs B (twins (tws), widerborst (wdb) vagy B') alegységből épül fel. A PP2A dimer (core) komplexet az mts és PP2A-29B alegységek alkotják, a variábilis alegységek pedig (wdb, tws illetve PP2A-B') a holoenzim komplex szubcelluláris lokalizációját és szubsztrátspecifitását határozzák meg.

Korábbi tanulmányok eredményei igazolják, hogy a PP2A-nak szerepe van a TOR által szabályozott autofágiában mind élesztőben mind emlős sejtekben. Továbbá *Drosophilában*

Wdb genetikailag együtt hat a Pi3K/Akt1 jelátviteli útvonallal, valamint feltehetőleg az Akt1 direkt foszforilációján keresztül szelektív úton befolyásolja annak aktivitásának szintjét. Eredményeimet összefoglalva, az autofágia indukciójához két különböző PP2A (B'-vel illetve wdb-vel alkotott) komplex aktivitása szükséges, melyek különböző úton fejtik ki hatásukat: míg a B'-t magába foglaló komplex a dTOR targetje, a wdb-vel alkotott PP2A holoenzim annak regulátora. A PP2A-A/B'/C komplex potenciális célgénjeként három új Atg gént azonosítottam, az élesztő *atg14*, *atg17* és *atg101* ortológjait illetve a *serpent*-et (*srp*) mely élesztő Gln3 transzkripciós faktort kódoló gén ortológja. Összefoglalva, eredményeim igazolják a *Drosophila* PP2A éhezéssel indukált autofágia szabályozásában betöltött kettős szerepét. Azonosítottam továbbá számos potenciális célfehérjét melyeken keresztül a PP2A az autofágiára hathat.

Az autofágia időzítésének precíz szabályozása kulcsfontosságú. Genetikai tanulmányok igazolják, hogy a fejlődési autofágia elengedhetetlen a *Drosophila* egyedfejlődéshez. A fejlődési autofágia igen jelentős mértékben megnő a posztembrionális fejlődés során újraszerveződő lárvális sejtekben, sejtcsoportokban úgy mint a trachea, zsírtest, nyálmirigy és középbél sejtjeiben.

Doktori munkám eredményei a *Drosophila* Hox fehérjék (beleértve a Dfd, Scr, Ubx, AbdA illetve AbdB fehérjéket) egy új, az autofágia gátlásában betöltött szerepét igazolják. Munkám eredményi igazolják, hogy a Hox gének megszokott, pozicionális információt kódoló szerepükkel ellentétben az ekdizon jelátviteli útvonal aktivitásának hatására a fejlődési autofágia időzítésében játszanak szerepet, azaz temporális információval szolgálnak az egyedfejlődés során. Igazoltam, hogy az összes Hox gén egyidejű gátlása - mely a Brm komplex inaktivitásának eredményeként valósul meg - előfeltétele az autofágia indukciójának. A fejlődési autofágia kontrollja mellett a Hox fehérjék szintén szerepet játszanak az éhezéssel indukált autofágiában, a konzervált InR/Akt1/dTOR jelátviteli útvonal tagjaiként a külső környezet jeleit közvetítve a sejt számára. Eredményeim szerint az autofágia Hox gének általi gátlása számos Atg és egyéb autofág gén kifejeződésének gátlásán keresztül valósul meg. Az Ubx és AbdB aktivitása a legtöbb ismert Atg gén kifejeződését gátolta, és a két Hox fehérje célgénjei nagymértékben átfedtek, mely funkcionális redundanciájukra utal. Összefoglalásul, munkám eredményei rávilágítanak arra, hogy a Hox gének működése elengedhetetlen a fejlődési autofágia időzítéséhez, és ezen új funkciójuk nem csupán genetikailag meghatározott fejlődési szignálok, de a külső környezet jelei által is befolyásoltak, valamint a Hox gének ezen külső és belső jelek által aktivált jelátviteli kaszkádok integrátoraként hatnak az autofágiára.

Tekintve az autofágia nagyfokú evolúciósan konzervatív jellegét, ezen molekuláris szabályozási útvonalak ismerete, illetve farmakológiai szintű manipulációjuk által az autofágia kimenetelének befolyásolása új lehetőségekkel szolgálhat a gyógyszerkutatásban a célfehérjék keresése során.

Publikációk a doktori tézis témakörében

Agnes Banreti, Bruno Hudry, Andrew Saurin, Miklos Sass and Yacine Graba

Hox proteins mediate environmental control of autophagy, under review in *Developmental Cell*, 2013 Dec 31. pii: S1534-5807(13)00705-3. doi: 10.1016/j.devcel.2013.11.024. [Epub ahead of print]

Agnes Banreti, Tamas Lukacsovich, Gyorgy Csikos, Miklos Erdelyi, and Miklos Sass

PP2A regulates autophagy in two alternative ways in *Drosophila*, *Autophagy*. 2012 Apr;8(4):623-36.

Egyéb publikációk

Agnes Banreti, Miklos Sass and Yacine Graba

The emerging role of acetylation in the regulation of autophagy, *Autophagy*. *Autophagy*. 2013 Jun 1;9(6):819-29.

Konferencia prezentációk a doktori értekezés témakörében

Előadások:

Banreti A, Hudry B, Saurin A, Sass M, Graba Y

Hox Proteins Regulate Programmed Autophagic Cell Death in *Drosophila*

Symposium on HOX and TALE Transcription Factors on Development and Disease, Madrid, Spanyolország, 2012

Banreti A, Sass M, Graba Y

Hox Protein-Regulated Autophagy

Intézeti szemináriumi előadás, IBDML, Marseille, Franciaország, 2011

Poszter prezentációk:

Banreti A, Hudry B, Sass M, Graba Y.

Hox proteins mediate autophagic programmed cell death in *Drosophila*

Autophagy in health and disease-EMBO meeting, Ma'ale Hachamisha, Izrael, 2011

Banreti A, Hudry B, Sass M, Graba Y.

Hox proteins mediate autophagic programmed cell death in *Drosophila*

Carry le Rouet, Franciaország, 2011

Banreti A, Csikos G, Lukacsovich T, Sass M.

The *Drosophila* Target of Rapamycin (dTOR) and Protein Phosphatase 2A (PP2A) in autophagy regulation.

Hungarian Biochemical Association Assembly, Budapest, Hungary, 2009

Banreti A, Csikos G, Sass M

A PP2A szerepe az autofágia regulációjában

8. Magyar Genetikai Kongresszus és 15. Sejt- és Fejlődésbiológiai napok, 2009, Nyiregyháza

Banreti A, Csikos G, Sass M

The role of PP2A (Protein Phosphatase 2A) in the regulation of autophagy.

2nd International Conference on Molecular Perspectives on Protein-Protein Interactions, 2008, Dubrovnik, Horvátország

Banreti A, Csikos G, Sass M

A PP2A szerepe az autofágia regulációjában- A Janus-arcú foszfatáz

38. Membrán Transzport Konferencia, 2008, Sümeg

Tudományos kitüntetések, díjak, támogatások

2012 STSM COST ösztöndíj fiatal kutatóknak, konferencia részvétel támogatás

2011 Az EMBO konferencia legjobb tudományos posztere díj, EMBO Conference on Autophagy in Health and Disease, Izrael

2011 A Richter Gedeon Nyrt. predoktori ösztöndíja

2011 STSM COST Európai Unió támogatás

2011 Bourse de l'Espace Campus France Hongrie, EGIDE-A Francia kormány tudományos ösztöndíja

2010 ELTE Egyszeri tudományos támogatás

2010 STSM COST Európai Unió támogatás

2010 1. Helyezés, Erasmus szakmai gyakorlat ösztöndíj, ELTE TTK

2008 ELTE Egyszeri tudományos támogatás