

**Két autofágia aktiváló kismolekula, az AUTEN-67 és az
AUTEN-99 hatásának vizsgálata *Drosophila melanogaster*
Huntington-kór modellben**

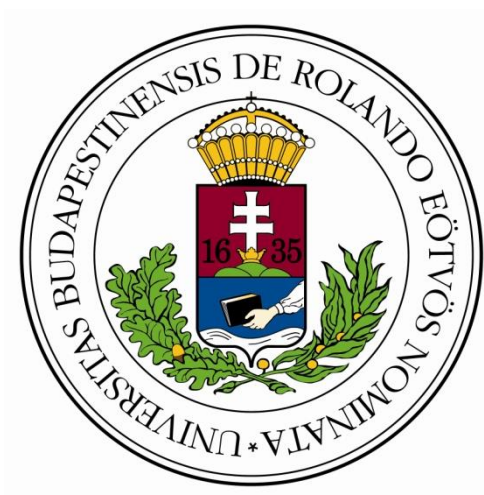
Doktori értekezés

Billes Viktor András

Biológia Doktori Iskola, iskolavezető: Prof. Erdei Anna

Klasszikus és Molekuláris Genetika Doktori Program, Programvezető: Prof. Vellai Tibor

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar



Témavezető: Prof. Vellai Tibor

Készült:

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Genetikai Tanszék

Budapest, 2017

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	1
Rövidítések jegyzéke.....	3
Bevezetés.....	6
Irodalmi áttekintés.....	7
Az autofágia	7
Az autofágia funkciói	8
A makroautofágia szakaszai.....	10
Az autofagoszóma-képződés molekuláris mechanizmusa	12
A PI3P, mint szabályozási pont.....	21
Autofágia az idegsejtekben	22
A Huntington-kór és a Huntingtin fehérje - terápiás megközelítések és kapcsolat az autofágiával	25
A Huntington-kór tünetei, lefolyása és genetikai háttere	25
A vad típusú Huntingtin (HTT) fehérje.....	29
Mutáns HTT patológiához vezető funkciói.....	31
Autofágia a HD-ban és a HTT az autofágiában	33
A HD terápiás lehetőségei.....	36
Az autofágia, mint terápiás célpont a HD-ban	39
Az autofágia fokozása az Atg14-tartalmú, autofágiára specifikus Vps34 komplex működésén keresztül	42
Az ecetmuslica (<i>Drosophila melanogaster</i>) mint HD modell	44
Célkitűzések	49
Anyagok és módszerek.....	50
A használt ecetmuslica törzsek és tartásuk	50
Hatóanyag-kezelések.....	50
Mászóképesség vizsgálata és átlagsebesség meghatározása	51
Repülésvizsgálat.....	52
Élethossz-mérés.....	53
Mikroszkópia.....	53
A mintaelőkészítés az autofágia felnőtt agyban való mikroszkópos vizsgálatához.....	54
Immunhisztokémia	54

Fehérjeizolálás és western blot analízis	55
A felvételek mennyiségi kiértékelése.....	56
Statisztika	57
Eredmények és értékelésük	58
Az AUTEN-67 és -99 kismolekulák növelik az autofág struktúrák mennyiségét <i>Drosophila</i> felnőtt agyban.....	58
Az AUTEN-67 és AUTEN-99 kismolekulák javítják a mászóképeséget <i>Drosophila</i> HD modellben	61
Az AUTEN-67 és AUTEN-99 kismolekulák csökkentik a p62 autofág szubsztrát mennyiségét <i>Drosophila</i> agyban	67
Az AUTEN-67 és AUTEN-99 kismolekulák csökkentik a toxikus mutáns HTT fehérje mennyiségét <i>Drosophila</i> HD modellben.....	74
Az AUTEN-67 megnöveli a 128Q-HTT <i>Drosophila</i> HD modell élettartamát.....	77
Az AUTEN-67 javítja a <i>Drosophila</i> HD modell repülési képességét.....	79
Eredmények megvitatása.....	80
Összefoglalás.....	91
Summary	92
Irodalomjegyzék.....	93
Köszönetnyilvánítás	117

Rövidítések jegyzéke

ADUK	Another Drosophila Unc-51-like kinase
Alfy	autophagy-linked FYVE protein
AMBRA1	Activating molecule in Beclin1-regulated autophagy
AMPK	(5') AMP-aktivált protein kináz
ASO	antiszensz oligonukleotid
ATG	autphagy-related
AUTEN	Autophagy enhancer
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor / agyi eredetű növekedési faktor
Cas9	CRISPR associated protein 9
CMA	chaperone-mediated autophagy / chaperon-közvetített autofágia
CRSPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
DFCP1	Double FYVE-containing protein 1
EDTP	Egg-derived tyrosine phosphatase
EEA1	Early endosomal antigen 1
EGCG	epigallocatechin gallate / epigallokatekin-gallát
EPG-6	Ectopic P granules-6
ER	endoplazmatikus retikulum
FDA	Food and Drug Administration / Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerbiztonsági Felügyelet
FIP200	Focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD
FKBP12	12-kDa FK506-binding protein
GABA	Gamma-aminobutyric acid / γ -amino-vajsav
GABARAP	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenas / gliceraldehyd 3-foszfát dehidrogenáz
GAL4	galactose-responsive transcription factor 4
GAPR-1	Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1
HAP1	Huntingtin-associated protein 1 / Huntingtin-asszociált protein 1
HAP40	Huntingtin-associated protein 40 / Huntingtin-asszociált protein 40
HD	Huntington's Disease / Huntington-kór
HDAC	hisztondeacetiláz
HOPS	Homotypic fusion and protein sorting

HTT	Huntingtin
LAMP2A	Lysosome-associated membrane protein 2A
LC3	light chain 3, teljes néven MAP1LC3 - microtubule associated protein 1 light chain 3
L-NAME	L-N ^G -Nitroarginin metil észter
MIP	Muscle-specific inositide phosphatase
MTM	Myotubularin
MTMR	Myotubularin related
miRNS	mikroRNS
mTOR	mammalian (vagy mechanistic) Target of Rapamycin
mTORC1	mammalian (vagy mechanistic) Target of Rapamycin Complex 1
NBR1	Neighbor of Brca1 gene 1
NMDA	N-metil-D-aszpartát
NOS	nitrogén-monoxid szintáz
PCM1	Pericentriolar material 1
PE	phosphatidylethanolamine / foszfatidil-etanolamin
PI	foszfatidilinozitol
PI3,5P ₂	foszfatidilinozitol-3,5-biszfoszfát
PI3K	foszfatidilinozitol 3-kináz
PI3KC3	phosphatidilinositol 3-kinase class 3 / III-as osztályba tartozó foszfatidilinozitol 3-kináz
PI3P	foszfatidilinozitol-3-foszfát
PROPPIN	β-propellers that bind phosphoinositides
Rab7	Ras-related protein in brain 7
Ref(2)P	refractory to sigma P
RNSi	RNS interferencia
SAHA	suberoylanilide hydroxamic acid / szuberoilanilid-hidroxámsav
SER	smooth / simafelszínű endoplazmatikus retikulum
siRNS	small interfering / kis interferáló RNS
SMER	small-molecule enhancer
SNARE	Soluble NSF attachment protein receptor
SNc	substantia nigra pars compacta
SQSTM1	Sequestosome-1
STX17/Syx17	Syntaxin 17

TBZ	Tetrabenazine
Tollip	Toll interacting protein
TOR	Target of Rapamycin
UAS	upstream activating sequence
Ubi	Ubiquitin / ubikvitin
ULK	UNC-51 like kinase
UVRAG	UV radiation resistance-associated gene
VMAT2	vezikuláris monoamin transzporter 2
Vps34	Vacuole protein sorting factor 34
WIPI	WD-repeat protein interacting with phosphoinositides
ZFP	zink finger protein / cink-ujj fehérje

Bevezetés

Az autofágia az eukarióta sejtekre jellemző konzervált, lizoszóma-közvetített sejtes önmész-tő folyamat. Kiemelkedően fontos szerepe van a sejt éhezésre adott fiziológiai válaszában, a tápanyaghiányos állapot túlélésében, valamint a felesleges és károsodott sejtalkotók (köztük az abnormális szerkezetű fehérjék) lebontásában. Az autofágia tehát elengedhetetlen a sejt homeosztázisának fenntartásához. A sejt anyagainak autofágiával történő megújítása különösen fontos a nem osztódó, terminálisan differenciálódott sejtek esetében, mint amilyenek a neuronok. Emberben a folyamat hibás működése számos betegség kialakulásához vezethet. Az autofágia működésének zavara az idegrendszerben különböző idegsejtpusztulással járó betegség kialakulásához járulhat hozzá, mint amilyen az Alzheimer-, a Parkinson- vagy a Huntington-kór. Ezzel összhangban az autofágia kitüntetett terápiás célponttá vált a neurodegeneratív betegségekben is. A Huntington-kór (HD) egy domináns, komplex motoros, kognitív és pszichiátriai tünetekkel járó, halálos kimenetelű, jelenleg gyógyíthatatlan betegség. Doktori munkám során két autofág aktivitást fokozó kismolekula hatását vizsgáltam egy *Drosophila melanogaster* (HD) modellben.

Irodalmi áttekintés

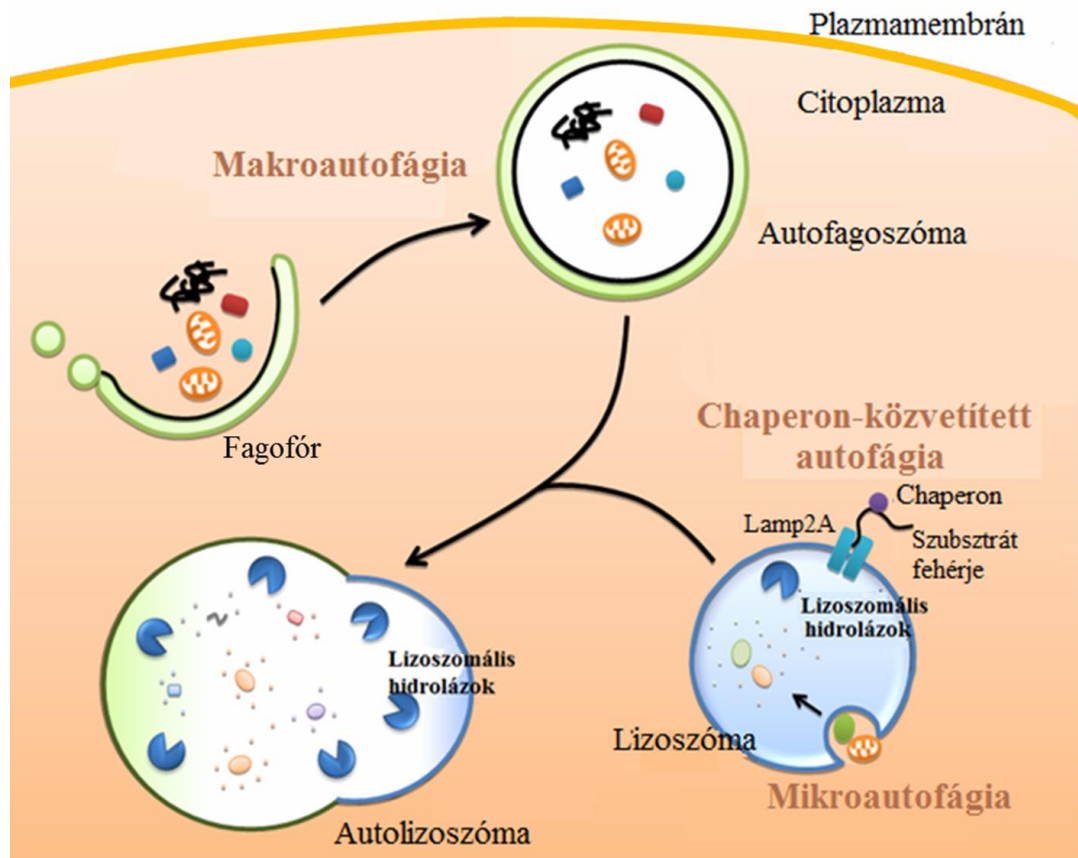
Az autofágia

Az autofágia az eukarióta sejtek szabályozott, erősen konzervált lebontó mechanizmusa, amely során a citoplazma egy része a lizoszómákba kerül, ahol a beltartalom savas hidrolázok által lebontódik. Az így keletkezett komponensek újrahasznosulhatnak a felépítő folyamatokban építőkövekként, valamint energiát szolgáltathatnak a sejt folyamatai számára (Mizushima és Komatsu, 2011).

Az autofágia három fő formáját különböztetjük meg a lizoszómába jutás módja szerint: a mikroautofágiát, a chaperon-közvetített autofágiát (*chaperone-mediated autophagy* - CMA) és a makroautofágiát (1. ábra) (Mizushima és Komatsu, 2011).

A mikroautofágia során a lizoszómák membránja betüremkedik és az így körülölelt citoplazma részlet invaginációval jut a lizoszóma belsejébe (Li és mtsai., 2012). A chaperon-közvetített autofágia során a KFERQ pentapeptid motívumot tartalmazó fehérjék specifikus degradációja történik. E fehérjéket egy chaperon-komplex ismeri fel, és a lizoszóma-asszociált membránprotein 2A (LAMP2A) receptorokon keresztül jutnak a lizoszómákba (Kaushik és Cuervo, 2012).

Az autofágia legjelentősebb és legjobban ismert formája a makroautofágia. Makroautofágia során egy riboszómamentes, kettős, ún. izoláló membrán (más néven fagofór) képződik, mely elkülöníti, majd magába zárja a citoplazma egy részét, ezzel kialakítva a kettős membránnal rendelkező autofagoszómát. Az autofagoszóma később lizoszómával, illetve lizoszómákkal (vagy még egy ezt megelőző lépésben még endoszómával is) fuzionál autolizoszómát eredményezve, amelyben a lizoszomális enzimek lebontják a beltartalmat és az autofagoszóma belső membránját egyaránt (1. és 2. ábra). (Növényekben és gombákban lizoszómák helyett a vakuolával történik a fúzió, és abban történik az enzimatis degradáció.) Az autofág lebontás termékei visszakerülnek a citoszolba, és a sejt újrahasznosítja őket igényeinek megfelelően. Bár az autofágia szó a görög „auto” és „phagos”, azaz „ön” és „evés” kifejezésekből származik - utalva arra a katabolikus folyamatra, amely során a sejt lebontja a saját komponenseit -, mégis pontosabb az autofágiát lebontó helyett reciklizáló útvonalnak nevezni, így jobban lehet érzékeltetni a sejt működéséhez való hozzájárulását.



1. ábra. Az autofágia típusai a lizoszómába jutás módja szerint. A mikroautofágia során a lizoszómák membránjának betüremkedése, majd lefűződése révén közvetlenül jut be a lebontandó citoplazma részlet a lizoszóma belsejébe. A chaperon-közvetített autofágia során a KFERQ pentapeptid motívumot tartalmazó fehérjéket specifikusan egy chaperon-komplex ismeri fel, és a lizoszóma-asszociált membránprotein 2A (Lamp2A) receptorokon keresztül jutnak a lizoszómákba. A legjelentősebb és legjobban ismert típus a makroautofágia, amely során egy kettős, ún. izoláló membrán vagy más néven fagofór képződik, mely elkülöníti, majd magába zárja a citoplazma egy részét, ezzel kialakítva a szintén kettős membránnal rendelkező autofagoszómát. Az autofagoszóma később lizoszómával (vagy még egy ezt megelőző lépésben még kései endoszómával is - mely az ábrán nincs feltüntetve) fuzionál autolizoszómát eredményezve, amelyben a lizoszomális hidrolázok lebontják a beltartalmat és az autofagoszóma belső membránját egyaránt. Cheung és Ip, 2009 nyomán, Szaker Henrik által módosítva

Az autofágia funkciói

Az eukarióta sejtekben működő alapszintű, ún. bazális autofága felelős a sejt hosszú életidejű, rosszul feltekeredett fehérjéinek, és a károsodott vagy feleslegessé vált sejtalkotóinak a lebontásáért. Az autofágia ezen felül különböző hatásokra képes indukálódni - a legismertebb ilyen az éhezési stressz -, amelyek során hozzájárul a sejt és végső soron az egész élőlény túléléséhez azáltal, hogy a lebontás révén energiát és molekuláris építőköveket biztosít a sejt számára (Rabinowitz és White, 2010; Mizushima és Komatsu, 2011). Az autofágia képes a citoplazma-tartalom tömeges lebontására, azonban képes az egyes sejtalkotók szelektív lebontására is (Anding és Baehrecke, 2017). Attól függően, hogy milyen sejtalkotó kerül szelektíven lebontásra,

tásra, megkülönböztetünk mitofágiát (mitokondriumok), retikulofágiát (endoplazmatikus retikulum), ribofágiát (riboszómák) pexofágiát (peroxiszómák), nukleofágiát (sejtmag), lizofágiát (lizoszómák) (Lemasters, 2005; Park és mtsai., 2009; Youle és Narendra, 2011; Cebollero és mtsai., 2012; Hung és mtsai., 2013; Maejima és mtsai., 2013; Mochida és mtsai., 2015; Zientara-Rytter és Subramani, 2016). Az autofágia képes az aggregálódott fehérjék szelektív lebontására is (aggregfágia) (Lamark és Johansen, 2012). A szelektív autofágia során az autofág receptorok molekuláris kapcsolatot teremtenek a lebontandó (gyakran ubikvitinált) struktúrák és az autofág membrán között. Ilyen autofág receptor például a p62, NIX, NBR1, Alfy és Tollip fehérjék (Bjørkøy és mtsai., 2005; Pankiv és mtsai., 2007; Kirkin és mtsai., 2009; Novak és mtsai., 2010; Isakson és mtsai., 2013; Shaid és mtsai., 2013; Lu és mtsai., 2014). Közülük a legáltalánosabb a p62 (emberben: SQSTM1 - Sequestrosome-1, *Drosophila*-ban: Ref(2)P - Refractory to sigma P), amely az ubikvitinált fehérjék és az Atg8/LC3 (lásd később) teremt közvetlen kapcsolatot, és az autofágia során maga is lebomlik, így markerként széleskörűen használják az autofág lebontás vizsgálatára (Bjørkøy és mtsai., 2005; Pankiv és mtsai., 2007; Shvets és mtsai., 2008; Piracs és mtsai., 2012; Nagy és mtsai., 2014b).

A sejtes homeosztázis fenntartásán túl az autofágia szerepet játszik az intracelluláris patogének elemésztésében (xenofágia) (Nakagawa és mtsai., 2004; Levine és mtsai., 2011), valamint számos egyedfejlődési és sejt differenciációs lépésben (Levine és Klionsky, 2004; Mizushima és Levine, 2010). Ilyen egyedfejlődési/differenciációs lépés például a gombák termőtest- és spóráképzése (Otto és mtsai., 2003; Voigt és Poggeler, 2013), a patogén egysejtűek (pl. *Tripanasoma*, *Leishmania*) életciklus átmenetei (Besteiro és mtsai., 2006; Alvarez és mtsai., 2008), a fonálféreg *Caenorhabditis elegans* szóma-csírvonal elkülönülése és embrionális fejlődése (Qu és mtsai., 2007; Zhang és mtsai., 2009; Erdélyi és mtsai., 2011), a rovarok metamorfózisa (pl. a lárvális zsírtest, nyálmirigy, bél) lebontása (Berry és Baehrecke, 2007; Denton és mtsai., 2009; Franzetti és mtsai., 2012; Tracy és Baehrecke, 2013). Gerinctelenekben az apai eredetű mitokondriumok lebontása is autofágiával történik a megtermékenyítést követően (Al Rawi és mtsai., 2011; Sato és Sato, 2011; Politi és mtsai., 2014). Az autofágia emlősökben szükséges az anyai géntermékek eltávolításához az embrionális fejlődés elején (Tsukamoto és mtsai., 2008), és a megszületést követő hirtelen beálló éhezési időszak túléléséhez (Kuma és mtsai., 2004; Komatsu és mtsai., 2005). Az autofág lebontás nélkülözhetetlen számos sejt típus, köztük a zsírsejtek (Baerga és mtsai., 2009), vörösvérsejtek (Schweers és mtsai., 2007; Kundu és mtsai., 2008) és limfociták (Miller és mtsai., 2008; Pua és mtsai., 2009; Bronietzki és mtsai., 2014) megfelelő differenciációjában,érésében.

Az autofágia működési zavara számos betegség patomechanizmusához járul hozzá, mint amilyen a különböző neurodegeneratív betegségek, a daganatos megbetegedések különböző fajtái, máj-, vese- és hasnyálmirigy betegségek, diabétesz és miopátiák (Levine és Kroemer, 2008; Mizushima és mtsai., 2008; Gonzalez és mtsai., 2011; Sandri és mtsai., 2013; Jiang és Mizushima, 2014). Az autofág lebontás károsodása felgyorsult öregedéshez, és ezáltal rövidebb élettartam kialakulásához vezet (Hárs és mtsai., 2007; Juhász és mtsai., 2007; Tóth és mtsai., 2008; Vellai, 2009; Rubinsztein és mtsai., 2011; Martinez-Lopez és mtsai., 2015).

A makroautofágia szakaszai

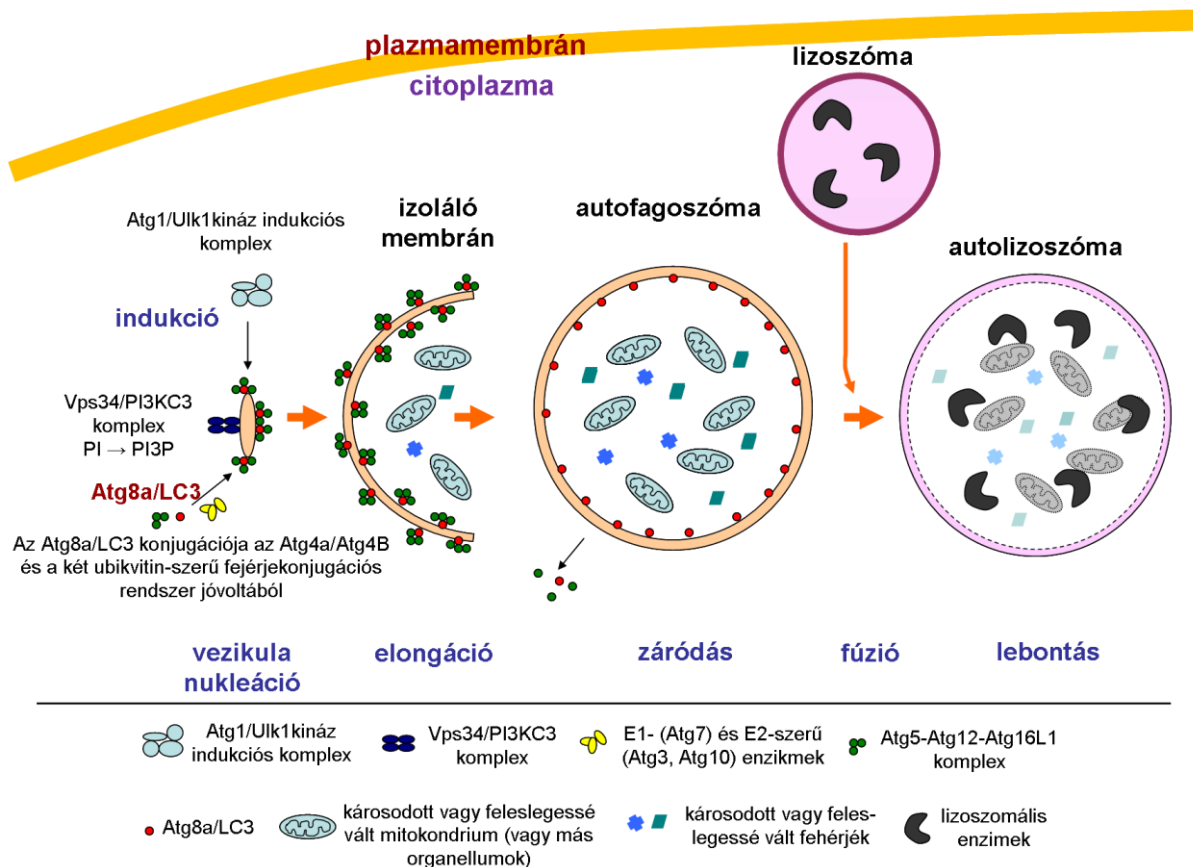
Az autofágia univerzálisan előforduló és mennyiségileg legjelentősebb formája a makroautofágia. Továbbiakban az autofágia kifejezés alatt makroautofágiát értek. Az autofágia folyamata az alábbi lépésekre osztható: indukció, autofagoszóma képződése, fúzió lizoszómával, maga a tényleges lebontás és a lizoszómák újraképződése (2. ábra).

Az első autofágiára vonatkozó megfigyelések emlősökből (patkány májsejtek) származnak (Clark, 1957; Novikoff, 1959; Novikoff és Essner, 1962). 1992-ben Ohsumi laboratóriumában írták le, hogy élesztőben (sörélesztő/pékélesztő – *Saccharomyces cerevisiae*) az autofágia morfológiája hasonló az emlősökben megfigyelhetőhöz (Takeshige és mtsai., 1992). Mivel az autofág struktúrák élesztőben már fénymikroszkóppal is megfigyelhetők voltak, ez lehetővé tette olyan genetikai szűréseket (*screen*-eket), amelyek segítségével autofágia deficiens mutánsokat lehetett azonosítani (Tsukada és Ohsumi 1993; Thumm és mtsai., 1994; Harding és mtsai., 1995). Yoshinori Ohsumi autofág gének meghatározásában végzett úttörő munkásságát és annak jelentőségét 2016-ban Nobel-díjjal is elismerték. A különböző genetikai szűrővizsgálatokban leírt gének elnevezését később *Autophagy-related*-re, azaz *ATG*-re egységesítették (Klionsky és mtsai., 2003). Az *ATG* gének által kódolt fehérjék jelentős része konzervált élesztőtől az emberig (Meijer és mtsai., 2007), és az autofagoszóma-képződésben betöltött szerepük szerint csoportokba osztják őket: az Atg1/ULK1 kináz fémjelezte indukciós komplex, a vezikula nukleációjáért felelős foszfatidilinozitol 3-kináz (PI3K) komplex, két ubikvitin-szerű fehérjekonjugációs rendszer (Atg12-Atg5 és Atg8/LC3-PE), a foszfatidilinozitol-3-foszfát effektor Atg18/WIPI fehérjék, valamint az Atg9 és az Atg2 (2. ábra).

Az izoláló membrán eredete nagyon sokáig vitatott volt. Ma az a leginkább elfogadott nézet, hogy az endoplazmatikus retikulum (ER) egy speciális részéből, az omegaszómából alakul ki (Axe és mtsai., 2008; Hayashi-Nishino és mtsai., 2009; Carlsson és Simonsen, 2015). Az izoláló membrán növekedéséhez azonban már a sejt legkülönbözőbb membránjai szolgálhatnak forrásként: az endoplazmatikus retikulum (Hayashi-Nishino és mtsai., 2009; Yla-Anttila és mtsai., 2009) mellett azonosították már a Golgi apparátust (Yen és mtsai., 2010; Bodemann és mtsai., 2011), a mitokondrium külső membránját (Hailey és mtsai., 2010), a reciklizáló endoszómákat (Puri és mtsai., 2013) és a plazmamembránt is (Ravikumar és mtsai., 2010).

Polarizálatlan emlős sejtekben autofagoszómák a sejt egész területén keletkezhetnek (Jahreiss és mtsai., 2008; Kimura és mtsai., 2008). A létrejött autofagoszóma vagy közvetlenül fuzionál lizoszómával, vagy előtte endoszómával olvad össze, létrehozva az amfiszómát (amely aztán szintén lizoszómával fuzionál). Az, hogy melyik útvonal a domináns, az élőlény-, szerv-, sejt-típus-függő, illetve az autofágiát kiváltó ok függvényének tűnik. Az autofagoszómák rendszerint a sejtmag körüli régióban fuzionálnak lizoszómákkal. Az autofagoszómák mozgatása, szállítása a mikrotubulusok mentén történik, kinezin és dinein motorfehérje-komplexek közreműködésével (Ganley, 2013; Kast és Dominguez, 2017). A fúziós eseményekhez a Rab7 fehérje, a HOPS pályvázó komplex és SNARE fehérjék - köztük a STX17/Syx17 - elengedhetetlen (Jäger és mtsai., 2004; Hegedűs és mtsai., 2013; Jiang és mtsai., 2014). Az autofagoszóma beltartalma és pH-ja is változik az egymást követő fúziós események révén (Kimura és mtsai., 2007). E komplex folyamatot nevezik az autofagoszóma érésének is (Eskelinen, 2005).

Az autofág lebontáshoz esszenciális a lizoszóma biogenezise is, amely magában foglalja a lizoszomális lebontóenzimek (savas hidrolázok) és a lizoszomális membrán fehérjék lizoszóma belsejébe illetve a membránba jutását. A lizoszomális membrán fehérjék szükségesek a lizoszóma belső terének elsavasodásához, a citoszolból történő specifikus fehérjefelvételhez, a fúziós eseményekhez és a lebontás termékeinek citoszolba való visszajuttatásához is (Saftig és Klumperman, 2009). Az autofágia folyamata a lizoszómák autolizoszómából történő újraképződésével zárul le (Yu és mtsai., 2010).



2. ábra. A makroautofágia folyamata és az képződésért felelős főbb komplexek. A makroautofágia során egy kettősmembránnal rendelkező fagofór vagy izoláló membrán képződik, mely elkülöníti, majd magába zárja a citoplazma lebontandó részletét, a nem működő/károsodott vagy feleslegessé vált fehérjéket, organeullomokat, létrehozva az autofagoszómát. Az autofagoszóma lizoszómával fuzionál (vagy még egy ezt megelőző lépésben késői endoszómával is - mely az ábrán nincs feltüntetve). Az így létrejövő autolizoszómában a lizoszomális hidrolázok lebontják a beltartalmat és az autofagoszóma belső membránját is. Az autofagoszóma képződés iniciációjáért az Atg1/Ulk1 kináz indukciós- és a Vps34/PI3KC3 vezikula nukleációs komplexek felelősek. Az utóbbi hozza létre a foszfatidilinozitol 3-foszfátot (PI3P) - amely egy lipidszignalizációs molekula, és kulcsfontosságú az autofagoszóma kialakulásában - a foszfatidilinozitol (PI) hármasképp történő foszforilálása által. Az izoláló membrán növekedéséhez szükség van az Atg4a/Atg4B által már hasított Atg8a/LC3 izoláló membránhoz történő kovalens kapcsolódására, melyet az E1- (Atg7), E2- (Atg3, Atg10) és E3-szerű enzimek (Atg5-Atg12-Atg16(L1) komplex) katalizálnak. Az autofagoszóma záródása előtt vagy után közvetlenül az Atg5-Atg12-Atg16(L1) komplex disszociál a membránról, és a membrán külső oldalán levő Atg8a/LC3-t az Atg4a/Atg4B lehasítja (reciklizálja). Az autofagoszóma képződéséhez szintén szükséges Atg9, Atg18a/WIPI és Atg2 fehérjék nincsenek jelölve. A fúzióhoz szükséges mind az autofagoszómán, mind a lizoszómán jelen levő Rab7 fehérje, illetve a SNARE illetve Syntaxin17 tartalmú HOPS komplexek (az ábrán nincsenek feltüntetve). A szerző saját ábrája

Az autofagoszóma-képződés molekuláris mechanizmusa

Az autofágia mechanizmusa a nagyfokú evolúciós konzerváltság mellett jelentős taxonspecifikus különbségeket is mutat. Továbbá, az autofágia pontos mechanizmusa függhet attól is, hogy mi az, ami kiváltja (stresszfaktor - de milyen?, fejlődési szignál, stb.), illetve hogy az adott élőlény melyik sejttípusáról beszélünk. Bár az autofagoszóma-képződéshez szükséges géneket és fehérjéket először élesztőben írták le, a bemutatásukban elsősorban emlős sejtes

modellrendszerekre és *Drosophila*-ra fókuszálok. E rendszerekben a kanonikusnak tekintett mechanizmus az (aminosav-megvonásos) éhezés által indukált autofágia vizsgálata során került megismerésre.

Az éhezés minden ismert élőlényben képes indukálni az autofágiát. A különböző éhezési szignálok, növekedési faktor megvonások nagyrészt a TOR (target of rapamycin; emlősökben mTOR - mammalian target of rapamycin) kinázon (annak egyik komplexén, az (m)TORC1-n) konvergálnak (Dibble és Manning, 2013). Az éhezés során is fellépő energetikai stressz-jeleket pedig a sejt központi energiaszenzor kináza az AMPK (AMP-aktivált protein kináz) integrálja (Hardie, 2014).

Elsősorban az Atg1/Ulk1 kináz indukációs komplex közvetíti a TOR és az AMPK jeleit az autofagoszóma-képződés felé. A komplex tagjai az Atg1/Ulk1 szerin-treonin kináz, az Atg13, Atg17/Fip200 és az Atg101. (3. ábra) (A „/” jel bal oldalán a *Drosophila*, míg a jobb oldalán az emlős komponens elnevezése olvasható.) Az indukációs komplex szabályozza az egyetlen integráns Atg fehérjét, az Atg9-t, és aktiválja a vezikula nukleációs komplexet, amely a Vps34/PI3KC3, a Vps15/p150, az Atg6/Beclin1 és az Atg14/Atg14L fehérjékből áll. E komplex felelős az autofagoszóma-képződéshez nélkülözhetetlen foszfatidilinozitol 3-foszfát (PI3P) létrejöttéhez. A PI3P lehetővé teszi effektorfehérjék toborzását, mint amilyen az Atg18/WIPI (4. ábra). Az Atg12-Atg5 és Atg8/LC3-PE ubikvitinszerű konjugációs rendszerek működésének eredményeképpen az Atg8/LC3 fehérje foszfatidil-etanolaminhoz (PE-hez) konjugálódik, ezáltal kovalensen kapcsolódik az autofág struktúrák membránjához, és szerepet játszik az izoláló membrán növekedésében, görbülésében és záródásában. Az autofagoszóma záródásához szükséges az Atg2 fehérje is. A következő alfejezetekben e fehérjék is funkciók részletesebb bemutatása következik.

Az Atg1/Ulk1 kináz indukációs komplex

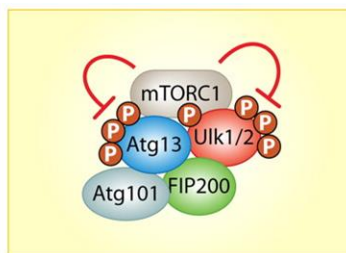
Az élesztő Atg1 szerin/treonin kináz nagyfokú hasonlóságot mutat a *C. elegans* UNC-51 fehérjéjével (Matsuura és mtsai., 1997), amely alapján elnevezésre kerültek az emlős homológok (UNC-51 like kinase-ok; Ulk-k). Az öt Atg1 homológiából csak az Ulk1 és az Ulk2 vesz részt jelenlegi ismereteink szerint az autofagoszóma-képződésben. Az Ulk1 és az Ulk2 széleskörűen kifejeződő fehérjék, és éhezés hatására az izoláló membránhoz toborzódnak (Hara és mtsai., 2008). A két homológ közül az Ulk1 tűnik az éhezés-indukált autofágiában jelentősebbnek (Young és mtsai., 2006; Chan és mtsai., 2007; Ganley és mtsai., 2009; Jung és

mtsai., 2009). Az Ulk1 kinázaktivitása megnő éhezés hatására és szükséges az autofágiához (Chan és mtsai., 2007; Hara és mtsai., 2008). Az Ulk1/2 komplexet alkot az Atg13-mal és a FIP200-zal (Focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD), és az élesztő Atg17-tel lát el analóg funkciót (Hara és mtsai., 2008). Az Atg101 szintén az emlős autofágia indukciós komplex része (Hosokawa és mtsai., 2009b; Mercer és mtsai., 2009).

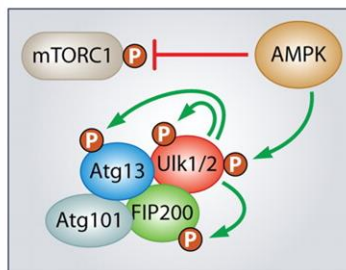
Tápanyagban gazdag környezetben az mTORC1 komplex hozzákapcsolódik az Ulk1-Atg13-FIP200-Atg101 komplexhez, és inaktív állapotban tartja a citoszolban (Hosokawa és mtsai., 2009a). Az mTORC1 hiperfoszforilálja az Atg13-at és az Ulk1-et e körülmények között, amely révén gátlódik az Ulk1 kináz aktivitása és az autofágia folyamat (Ganley és mtsai., 2009; Hosokawa és mtsai., 2009a; Jung és mtsai., 2009). Tápanyaghiány esetén az mTORC1 inaktívulódik, az Ulk1 és az Atg13 defoszforilálódik (Ganley és mtsai., 2009; Hosokawa és mtsai., 2009a; Jung és mtsai., 2009), az Ulk1 komplex és az mTORC1 disszociál, s az Ulk1 komplex áthelyeződik az izoláló membrán képződésének helyére (Chan és mtsai., 2007; Hara és mtsai., 2008; Ganley és mtsai., 2009; Hosokawa és mtsai., 2009a). Az aktív Ulk1 (más pozícióban) autofoszforilálódik, és foszforilálja az Atg13-at és a FIP200-at (Jung és mtsai., 2009). (3. ábra) Az Ulk1 továbbá foszforilálja az AMBRA1-et (activating molecule in Beclin1-regulated autophagy), amely lehetővé teszi a PI3K komplex áthelyeződését az endoplazmatikus retikulumhoz az izoláló membrán képződésének helyéhez és így az autofagoszóma nukleációját (Di Bartolomeo és mtsai., 2010). Az Ulk1 foszforilálja a Beclin1-et is, amely szintén szükséges az éhezés-indukált autofágiához: mind az autofagoszóma nukleációjához, mind az autofagoszóma éréséhez (Russell és mtsai., 2013). Az Atg14-et is foszforilálja, mely fokozza a Vps34/PI3KC3 kinázaktivitását (Wold és mtsai., 2016). Ezen túl szabályozza az Atg9-tartalmú vezikulák toborzását a növekvő izoláló membránhoz (Young és mtsai., 2006; Mack és mtsai., 2012). (3. és 4. ábra)

Drosophila-ban két élesztő Atg1 homológ van, a *Drosophila* Atg1 és az ADUK (Another *Drosophila* Unc-51-like kinase). Szélesebb ismereteink az Atg1-ről vannak, amely az emlős Ulk1 és az Ulk2 ortológja, míg az ADUK az Ulk3 ortológja (Scott és mtsai., 2004; Braden és Neufeld, 2016). Mindkét fehérje komplexet alkot az emlősökben leírtakhoz hasonlóan az Atg13-mal, Atg17/Fip200-zal és az Ag101-gyel, és e komplexek a TOR szabályozása alatt állnak (Scott és mtsai., 2007; Chang és Neufeld, 2009; Kim és mtsai., 2013; Hegedűs és mtsai., 2014; Nagy és mtsai., 2014a; Braden és Neufeld, 2016).

Megfelelő tápanyag
ellátottság esetén



Tápanyaghiányos
körülmények esetén



3. ábra. Az Atg1/Ulk1 kináz indukciós komplex szabályozása. Emlősökben az indukciós komplex tagjai az Ulk1/2, Atg13, FIP200, Atg101 fehérjék. Megfelelő tápanyag ellátottság esetén az mTORC1 hiperfoszforilálja az Ulk1/2-öt és az Atg13-at, ezáltal inaktív állapotban tartva a komplexet. Éhezés hatására az mTORC1 disszociál az indukciós komplexről, amely gyorsan defoszforilálódik (megszűnik az mTORC1 által létrehozott gátló jelzés), az Ulk1 pedig más pozíciókban autofoszforilálódik és foszforilálja az Atg13-t és a FIP200-t (és más *downstream* komponenseket, amelyek az ábrán nincsenek feltüntetve), így előidézve az autofágia indukcióját. Az AMPK is képes elősegíteni az indukciós komplex aktiválódását, mind az mTORC1 gátlása, mind az Ulk1/2 közvetlen aktiválása révén. Alers és mtsai., 2012 nyomán, a szerző által módosítva

Atg9

Az Atg9 az egyetlen transzmembrán fehérje a fő Atg komponensek közül. Az élesztőbeli Atg9-nek két emlős homológja van, az Atg9A és az Atg9B, vagy másik nevezéktan szerint az Atg9L1 és -L2, melyek közül az Atg9A/Atg9L1 fejeződik ki minden sejtben, az Atg9B/Atg9L2 expressziója a placentára és az agyalapi mirigyre korlátozódik. Mindkettő hat transzmembrán doménnel rendelkezik (Yamada és mtsai., 2005; Young és mtsai., 2006). Az Atg9A a transz-Golgi hálózat és különböző endocitotikus kompartmentumok (korai, késői, és reciklizáló endoszómák) között utazik megfelelő tápanyag ellátottság esetén (Young és mtsai., 2006; Orsi és mtsai., 2012). Éhezés hatására az Atg9A eltűnik a transz-Golgi hálózatból és az izoláló membrán növekedéséhez szükséges membránforrás biztosításában (pl. a plazma-membránból és az endoszómákból) játszik szerepet, anélkül, hogy beleolvadna az autofág membránba (Young és mtsai., 2006; Orsi és mtsai., 2012; Puri és mtsai., 2013). A folyamat legalább részben az Ulk1 és az AMPK szabályozása alatt áll (Young és mtsai., 2006; Mack és mtsai., 2012).

Az egy *Drosophila* Atg9 homológ egyelőre kevésbé jellemzett. Szükséges az autofágiához (Pircs és mtsai., 2012; Löw és mtsai., 2013; Tang és mtsai., 2013), fizikailag kölcsönhatásba

lép az Atg18a-val, mely kölcsönhatásnak szerepe lehet az Atg9 izoláló membrán képződésének helyére toborzásában (Nagy és mtsai., 2013).

Vezikula nukleációs komplex

A PI3P (foszfatidilinozitol 3-foszfát) kulcsfontosságú lipidszignalizációs molekula az autofagoszóma képződés kezdetén, melynek létrejöttét, azaz a PI (foszfatidilinozitol) → PI3P átalakulást a Vps34/PI3KC3 (Vacuole protein sorting factor 34 / phosphatidilinositol 3-kinase class 3) kináz komplex katalizálja. Maga a Vps34/PI3KC3 (a továbbiakban fajtól függetlenül Vps34) bír enzimatisz aktivitással az egyetlen III. osztályba tartozó PI3K-ként (foszfatidilinozitol 3-kinázként). Ezzel összhangban a wortmannin és a 3-metiladenin, amelyek gátolják a PI3K-k működését, jól ismert autofág inhibitorok (Blommaert és mtsai., 1997). Az élőlényekben a Vps34 kétféle komplexben fordulhat elő, rajta kívül mindkét komplex tagja a Atg6/Beclin1 és a Vps15/p150 (Volinia és mtsai., 1995; Liang és mtsai., 1999; Petiot és mtsai., 2000; Kihara és mtsai., 2001b; Tassa és mtsai., 2003; Itakura és mtsai., 2008; Obara és mtsai., 2008). Az Atg14 (I-es komplex) és az UVRAG (II-es komplex) fehérjék egymást kölcsönösen kizárva lehetnek tagjai a Vps34 komplexeknek, a vezikula nukleációs komplexben az Atg14 van jelen (Itakura és mtsai., 2008; Sun és mtsai., 2008; Matsunaga és mtsai., 2009; Zhong és mtsai., 2009). Emlősökben Atg14L vagy Barkor néven ismert a fehérje, amely az autofágia-specifikus PI3K komplexet az ER-hez toborozza, hogy omegaszóma képződhessen (Matsunaga és mtsai., 2010). Az Atg14L-Beclin1 dimer fokozza a Vps34 enzimatisz aktivitását (Zhong és mtsai., 2009), és az Atg14L és a Beclin1 kölcsönösen pozitívan hatnak egymás és a Vps34 stabilitására (Itakura és mtsai., 2008). A Vps15/p150 szerin-treonin kináz és a komplex szabályozó alegységeként tartják számon, valószínűleg a komplex membránhoz kapcsolásáért felel (Stack és mtsai., 1993; Stack és mtsai., 1995; Panaretou és mtsai., 1997). A Beclin1 amellett, hogy interakciós platformként szolgál a Vps34 komplex tagjai számára, számos más fehérje átmeneti kapcsolódását és így a komplexek működésének szabályozását is lehetővé teszi (Funderburk és mtsai., 2010; Wirth és mtsai., 2013). Az UVRAG tartalmú II-es komplex az endoszómákon lokalizált, az endoszómák kialakulásában és érésében bír fontos szereppel (Kihara és mtsai., 2001a; Itakura és mtsai., 2008; Liang és mtsai., 2008; Matsunaga és mtsai., 2009; Zhong és mtsai., 2009).

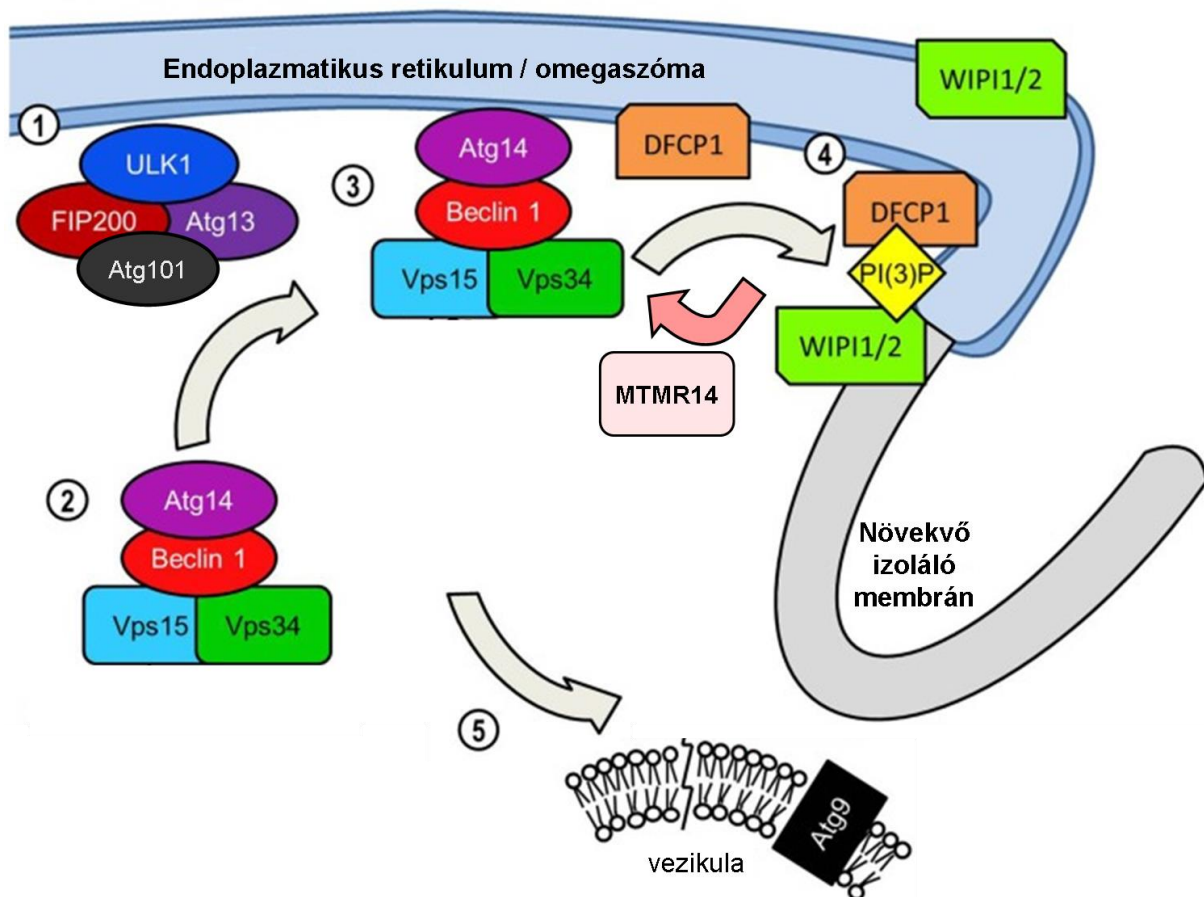
Az emlősökben leírtakhoz hasonlóan, a *Drosophila* Atg6 (Beclin1 ortológ), Vps34 és Vps15 is szükséges a PI3P és az autofagoszóma képződéséhez, valamint a zavartalan endocitózis-

hoz (Juhász és mtsai., 2008; Lindmo és mtsai., 2008; Shrivage és mtsai., 2013). Atg14 hiányában erősen gátlódik az autofágia (Bánréti és mtsai., 2012; Pircs és mtsai., 2012; Lőrincz és mtsai., 2014; Katheder és mtsai., 2017), míg az UVRAG az endoszómák éréséhez kell (Rusten és mtsai., 2007; Lőrincz és mtsai., 2014).

PI3P effektorok

Az autofág fehérjék a PI3P hiányában is képesek az izoláló membrán képződésének helyére toborzódni, de ahhoz, hogy ott is maradjanak, ahhoz a PI3P szükséges (Karanasios és mtsai., 2013; Koyama-Honda és mtsai., 2013). A PI3P lipidszignalizációs hatását effektorfehérjék közvetítik. Az omegaszóma az endoplazmatikus retikulum PI3P-ben feldúsult, riboszóma-mentes része. A DFPC1 (Double FYVE-containing protein 1) egy PI3P effektor fehérje, amely a FYVE-doménjével képes kötni a PI3P-t (4. ábra). A DFPC1 tápanyagban gazdag környezetben a Golgi membránokon és az ER-n található egyenletes eloszolást mutatva, éhezés hatására azonban az ER-nál pontszerű megjelenésű lesz (FYVE-domén függő módon) és részlegesen kolokalizál az izoláló membrán és autofagoszóma markerekkel, a funkciója azonban egyelőre ismeretlen (Axe és mtsai., 2008).

Az élesztő Atg18 ortológjai a WIPI (WD-repeat protein interacting with phosphoinositides) fehérjék, amelyek a PROPPIN (β -propellers that bind phosphoinositides) családba tartoznak és élesztőtől az emberig konzervált PI3P-effektorok. Emberben négy homológjuk van: WIPI1-4, illetve azok *splice*-variánsai (Proikas-Cezanne és mtsai., 2015). Azt tartják róluk, hogy egyfajta hidat képeznek a PI3P és az autofagoszóma-képződésben *downstream* faktorok között. Konkrét molekuláris szerepet eddig csak a WIPI2B-hez sikerült társítani: az ATG16L1-gyel való fizikai kölcsönhatásán keresztül toborozza az LC3 lipidizációjáért felelős komplexet az izoláló membránhoz (Dooley és mtsai., 2014). A WIPI2B mellett a WIPI1 és a WIPI2D is részt vesz az autofágiában emlősökben (Proikas-Cezanne és mtsai., 2004; Polson és mtsai., 2010; Proikas-Cezanne és mtsai., 2015). A WIPI4/EPG-6 szerepét *C. elegans*-ban írták le, feltehetően az ATG-2 toborzásához járul hozzá (Lu és mtsai., 2011).



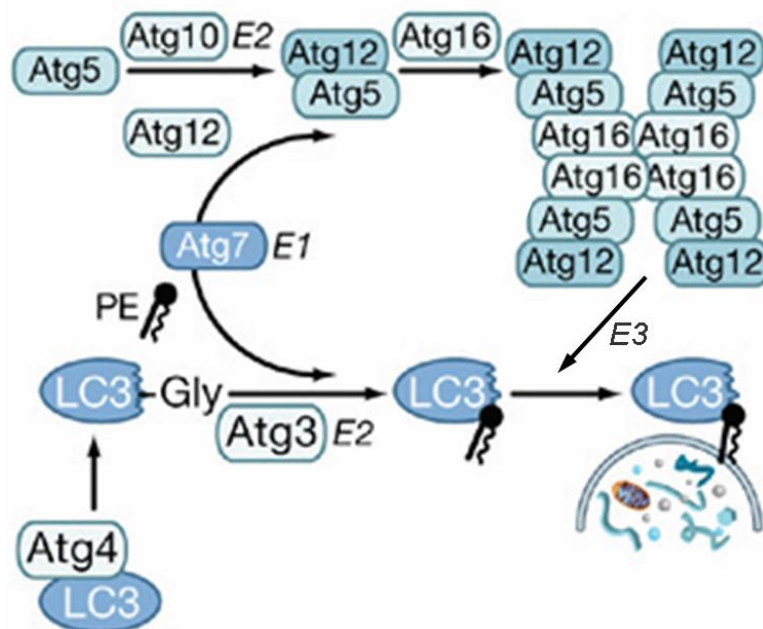
4. ábra. Az Atg1/Ulk1 kináz és a PI3KC3/Vps34 kináz komplexek szükségesek az izoláló membrán képződéséhez. Az Atg1/Ulk1 kináz komplex tagjai emlőskben az Ulk1 (vagy az Ulk2), az Atg13, FIP200 és az Atg101 fehérjék. A komplex az endoplazmatikus retikulumhoz toborzódik az autofágia indukciója során (1). Az Ulk1 kináz foszforilálja a PI3KC3/Vps34 kináz komplex több tagját és ezáltal elősegíti a transzlokációját az izoláló membrán képződési helyére és fokozza az aktivitását (2, 3). A PI3KC3/Vps34 kináz komplex kialakítja az ER speciális részére, az omegaszóma jellemző foszfatidilinozitol 3-foszfát (PI3P) mintázatot (4). A PI3P-hoz effektorfehérjék kapcsolódnak (DFCP1, WIPI1 és WIPI2) melyek közvetítik a jelet a *downstream* komponensek felé. Az MTMR14 myotubularin családba tartozó foszfatáz a PI3P defoszforilálásával képes gátolni az izoláló membrán képződését és így az autofágiát. Az Ulk1 kináz működése elősegíti az Atg9-tartalmú vezikulák izoláló membránhoz érkezését, hogy membránforrásként szolgáljanak a növekedéshez. Randall-Demllo és mtsai., 2013 nyomán, a szerző által módosítva

Drosophila-ban nincs DFCP1, a WIPI1/2 homológja az Atg18a és az Atg18b, a CG11975 pedig WIPI3/4 homológként funkcionál. A CG11975 autofágiában betöltött funkciója eddig nem ismert. Az Atg18a szükséges az autofágiához, kapcsolódik az izoláló membránban található PI3P-hez, és fizikailag kölcsönhat a p62 *Drosophila* ortológjával a Ref(2)P-vel, illetve az Atg9-cel, és az Atg2-vel (Scott és mtsai., 2004; Pircs és mtsai., 2012; Nagy és mtsai., 2013). Az Atg18b eddigi ismereteink alapján az Atg2-vel lép fizikai interakcióba, és éhezés hatására fokozódik az expressziója (Érdi és mtsai., 2012; Nagy és mtsai., 2013).

Az izoláló membrán növekedése és záródása: a két ubikvitin-szerű konjugációs rendszer és az Atg2

Az élesztő Atg8, illetve homológjai ubikvitin szerű fehérjék, amelyek szükségesek az izoláló membrán növekedéséhez és záródásához (Kirisako és mtsai., 1999; Weidberg és mtsai., 2010). Ezen funkciók ellátásához szükséges, hogy a fehérje kovalensen kapcsolódjon az izoláló membrán mindkét oldalán jelenlevő foszfatidil-etanolaminhoz (Ichimura és mtsai., 2000). Ehhez a ciszteinproteáz Atg4-nek (emlősökben Atg4B-nek, *Drosophila*-ban Atg4a-nak) hasítania kell C terminálisan a fehérjét, hogy egy reaktív glicin aminosav képződjön (Hemelaar és mtsai., 2003). Az Atg7 E1-szerű enzim aktiválja az Atg8/LC3-at (Tanida és mtsai., 2001), amely így az E2-szerű Atg3-hoz kapcsolódik (Tanida és mtsai., 2002). Az E3-szerű enzim funkciót az Atg5-Atg12-Atg16 heterotetramer fehérjekomplex látja el, amely eredményeként létrejön a foszfatidil-etanolammal konjugált Atg8/LC3 (Hanada és mtsai., 2007). (Az élesztő illetve *Drosophila* Atg16 emlős megfelelője az Atg16L1, de a továbbiakban az emlős fehérjére is Atg16-ként hivatkozom.) Az Atg5-Atg12-Atg16 komplex létrejöttéhez is hasonló lépések szükségesek. Az Atg12 is egy ubikvitin-szerű molekula, melyet szintén az Atg7 aktivál (Tanida és mtsai., 2001), de az Atg3 mellett nagyobb részt egy másik E2-szerű enzim, az Atg10 hozza létre az Atg5-Atg12 konjugátumot (Tanida és mtsai., 2002; Nemoto és mtsai., 2003), mely aztán kapcsolódik az Atg16-tal és tetramerizálódik (Mizushima és mtsai., 2003) (5. ábra). Az Atg16 felelős az Atg5-Atg12-Atg16 komplex izoláló membránhoz juttatásáért - és így azért is, hogy az Atg8/LC3 az izoláló membránra kerüljön rá - a FIP200 és a WIPI2B fehérjékkel való interakciói révén (Mizushima és mtsai., 2003; Fujita és mtsai., 2008b; Gammoh és mtsai., 2013; Dooley és mtsai., 2014). Az autofagoszóma záródásakor az Atg5-Atg12-Atg16 komplex disszociál (Mizushima és mtsai., 2001; Mizushima és mtsai., 2003), és az autofagoszóma külső membránján található Atg8/LC3-t az Atg4 lehasítja membránról (reciklizálás) (Tanida és mtsai., 2004). A belső membránban viszont ott marad egészen addig, amíg az autolizoszómban a lizoszomális hidrolázok el nem emésztik, vagyis az Atg8/LC3 kapcsolódik legtartósabban az autofág struktúrákhoz. Fluoroforral (pl. GFP-vel vagy mCherry-vel) jelölt változata a legelterjedtebben használt fénymikroszkópos vizualizációs eszköz az autofágia vizsgálatára (Mizushima és mtsai., 2004; Mauvezin és mtsai., 2014). Ráadásul az mCherry/DsRed/RFP sokkal ellenállóbb a savas közeggel és a lizoszomális enzimekkel szemben, mint a GFP, így az mCherry/DsRed/RFP-vel jelölt Atg8a/LC3-mal az autolizoszóma is láthatóvá tehetőek (Kimura és mtsai., 2007; Mauvezin és mtsai., 2014). Emlő-

sőkben nyolc Atg8 ortológ található, MAP1LC3A-C (vagy csak LC3A-C: microtubule associated protein 1 light chain 3 α - γ , az egyiknek két splice-variánsa van), GABARAP (GABA type A receptor-associated protein), GABARAPL1, GATE-16/GABARAPL2 és GABARAPL3. E fehérjék valószínűleg mind részt vesznek az autofágiában, részben annak későbbi lépéseiben (záródás, érés, fúzió). Legjobban az LC3B szerepe ismert (Fujita és mtsai., 2008a; Weidberg és mtsai., 2010; Dunlop és mtsai., 2014; Wang és mtsai., 2015). *Drosophila*-ban két Atg8 homológ van, az Atg8a és az Atg8b. Mindkettő képes rákerülni az autofág membránokra, azonban az utóbbi jóval korlátozottabb expresszióval bír (Scott és mtsai., 2004; Scott és mtsai., 2007).



5. ábra. Az Atg8 homológ LC3 molekula kapcsolódása az izoláló membránhoz - az ubiquitin-szerű konjugációs rendszerek szerepe az autofagoszóma-képződés során. Az ubiquitin-szerű Atg8/LC3 molekulák kovalensen kapcsolódnak az autofág membránokban található a foszfatidil-etanolamin (PE) lipidhez E1-, E2-, E3-szerű molekulák, molekulakomplex segítségével. Ennek előfeltétele, hogy az Atg4 proteáz (Atg4a/Atg4B) C terminálsan hasítsa az Atg8/LC3-t, reaktív glicint (Gly) eredményezve a molecula végén. Az Atg8/LC3-at az E1-szerű Atg7 aktiválja, és adja át az E2-szerű Atg3-nak. Az E3-szerű funkciót az Atg5-Atg12-Atg16 heterotetramer komplex látja el, mely végül kovalensen hozzákapcsolja az Atg8/LC3-t a membránban levő PE-hoz. Az Atg5-Atg12-Atg16 heterotetramer komplex létrejöttéhez is E1- és E2-szerű enzimaktivitás szükséges. Az Atg7 aktiválja az ubiquitin-szerű Atg12-t, az Atg10 E3-szerű enzim pedig hozzákapcsolja az Atg5-höz. Az Atg5-Atg12 konjugátum az Atg16-tal kapcsolódva hozza létre az E3-szerű aktivitással bíró Atg5-Atg12-Atg16 heterotetramer komplexet. Levine és Kroemer, 2008 nyomán, a szerző által módosítva

Az autofagoszóma záródásához az Atg2 nélkülözhetetlen, mind emlősökben (Atg2A és Atg2B), mind *Drosophila*-ban (Velikkakath és mtsai., 2012; Nagy és mtsai., 2013).

Az autofagoszóma-képződésben részt vevő fehérjék az autofágia későbbi lépéseiben is hathatnak. Az Atg9, illetve az Atg12-Atg5 konjugátum valószínűleg részt vesz az autofagoszóma-érésében is (Chen és mtsai., 2012; Bader és mtsai., 2015), míg az Atg14 az autofagoszóma-lizoszóma fúzió során szabályozza a SNARE-komplex működését (Liu és mtsai., 2015).

Az autofágiában betöltött funkcióikon túl az ATG fehérjék más folyamatokban is részt vesznek (Bestebroer és mtsai., 2013; Komatsu és mtsai., 2013; Munz, 2017). Az Atg1/Ulk1 például az autofágiától függetlenül szükséges az axonok növekedéséhez, a neuronok fejlődéséhez, és bennük szabályozza a vezikula transzportot (Tomoda és mtsai., 2004; Toda és mtsai., 2008; Mochizuki és mtsai., 2011). Az Atg8/LC3 a fagocitózisban vesz részt (Romao és mtsai., 2013), míg az Atg12-Atg3 konjugátum a mitokondriális homeosztázisban tölt be fontos szerepet (Radoshevich és mtsai., 2010). Olyan autofág (és makroautofág) útvonalak is léteznek, amelyek nem igénylik valamelyik kanonikus autofág komponens meglétét, így ismert Atg5/Atg7- és Beclin1 független makroautofágia is (Nishida és mtsai., 2009; Juenemann és Reits, 2012; Dupont és mtsai., 2017).

A PI3P, mint szabályozási pont

A PI3P létrejötté kulcsfontosságú az autofágia kezdeti lépésében, a vezikula nukleációban. A Vps34 hozza létre a PI3P-t PI-ból (foszforiláció), míg a myotubularin típusú foszfatázok azok, amelyek az ellenkező irányú reakciót, a PI3P defoszforilációját képesek katalizálni (Robinson és Dixon, 2006). E lipidfoszfatázok másik szubsztrátja a PI3,5P₂ (foszfatidilinozitol-3,5-biszfoszfát) lehet. A myotubularinok családja szintén konzervált élesztőtől az emberig, gerincesekben e család 16 tagot (MTM1, MTMR1-15 [Myotubularin related 1-15]) számlál. Több családtagról, így az MTM1-ről, MTMR2-ről, MTMR3-ról, MTMR6-ról, MTMR8-ról és az MTMR14-ről is kimutatták, hogy hat az autofágiára (Vergne és mtsai., 2009; Hnia és mtsai., 2012; Zou és mtsai., 2012; Al-Qusairi és mtsai., 2013; Liu és mtsai., 2014). Közülük az MTMR14 szerepe a legjobban feltárt: a vezikula nukleáció során képződő PI3P defoszforilálása révén gátolja az autofágiát (Vergne és mtsai., 2009) (4. és 6. ábra). Az MTMR14 gén-csendesítése fokozza az autofagoszóma-képződést és a lebontást is, így az MTMR14 gátlása ígéretes farmakológiai célpont az autofág aktivitás fokozására.

Autofágia az idegsejtekben

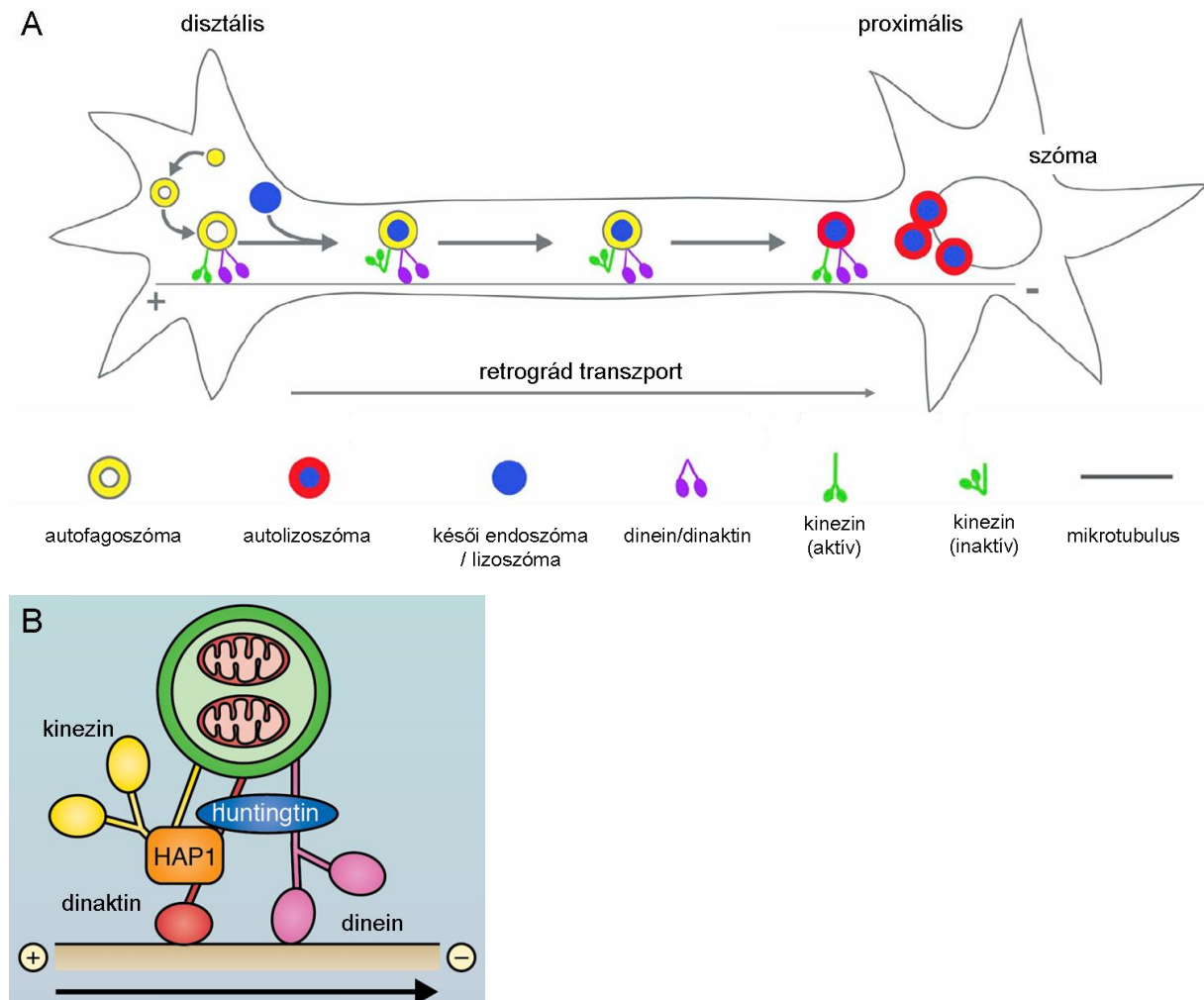
A neuronok terminálisan differenciálódott sejtek, posztmitotikusak, azaz nem osztódnak. Ezért a homeosztázisuk fenntartásában (és így az idegsejtek életben maradásában) a lebontófolyamatok kulcsfontosságúak, mert az esetlegesen képződő hibás sejtalkotók az osztódások hiányában nem tudnak kihígulni. Ráadásul az agyban a legtöbb neuron az embrionális fejlődés folyamán jön létre, azaz az élőlény egész élete során működőképesnek kell maradnia. A nem működő neuronoknak alapvetően nincs sejtes „turnover”-ük, nem cserélődnek ki, mint a terminálisan differenciálódott sejtek nagy része más szervrendszerekben. Ez a fehérjék és sejtalkotók minőségellenőrzésének jelentőségét neuronokban még tovább növeli (Maday, 2016). A neuronok további különlegessége a nagyfokú komplexitás, kompartmentalizáció és polarizáció. Az axonjuk rendkívül hosszú lehet (akár 1 méter is), ez térbeli kihívást jelent az idegsejten belüli folyamatok, így az autofágia számára is (Maday, 2016).

Az első neuronális autofágiára vonatkozó megfigyelések még az 1960-as, 70-es évekből származnak: megfigyelték, hogy axonok elvágása után fokozódik az autofág struktúrák mennyisége (Dixon, 1967; Matthews és Raisman, 1972). Ezt követően Mary Bartlett Bunge idegsejtek növekvő axonját jellemezte az axon csúcsától a szómáig elektronmikroszkóppal sorozatmetszetek segítségével. Számos kettősmembránnal határolt struktúra volt megfigyelhető az axondombban, de végig az axon mentén is jelen voltak (Bunge, 1973). Később, az autofágia markerek kifejlesztésével lehetőség nyílt megerősíteni, hogy ezek valóban autofág struktúrák.

Az autofagoszómák az idegsejtekben viszonylag kis számban vannak jelen (Mizushima és mtsai., 2004; Boland és mtsai., 2008), de folyamatosan képződnek az axonban, kis mértékben a középső részén, nagyobb mértékben pedig a disztális részén (Hollenbeck, 1993; Maday és mtsai., 2012; Maday és Holzbaur, 2014). A neuronokban konstitutív bazális autofágia zajlik, amely éhezés hatására nem indukálódik (Mizushima és mtsai., 2004; Maday és Holzbaur, 2014; Lumkwana és mtsai., 2017). Neuronokban az autofagoszóma képződés a SER DFCP1-pozitív membránjából történik (Bunge, 1973; Maday és Holzbaur, 2014).

Az axon disztális részén képződő autofagoszómák retrográd transzporttal a szóma irányába vándorolnak dinein motorok segítségével (Hollenbeck, 1993; Lee és mtsai., 2011; Maday és mtsai., 2012; Cheng és mtsai., 2015) (6A ábra). Az autofagoszómák érése és vándorlása kölcsönösen egymásra utalt, az autofagoszómák ezen axonbeli vándorlás során érnek meg (Lee

és mtsai., 2011; Maday és mtsai., 2012), de az első fúziós esemény elősegíti a dinein toborzását, és ezáltal a vándorlás megkezdését (Cheng és mtsai., 2015). A dineinek révén való mozgást elősegíti a JIP1 (Fu és mtsai., 2014) és a Huntingtin (6B ábra) (Wong és Holzbaur, 2014).



6. ábra. Az autofág struktúrák retrográd transzportja az axonban. (A) Az autofagoszómák nagy része az axondombban képződik, és dinein/dinaktin motor segítségével a mikrotubulus mentén retrográd irányba, azaz a szóma felé szállítódnak. A retrográd transzportot kiváltja az autofagoszóma első fúziója késői endoszómával, melyet több további fúziós esemény követ késői endoszómával és lizozómával (a további fúziós események az ábrán nincsenek feltüntetve), így a szómában már erősen savas autolizozómák találhatóak. A szómában és rövid ideig az axondombban az autofág struktúrák kétirányú mozgása is megfigyelhető. Az anterográd irányú transzportért a kinezin motorfehérje a felelős, amely inaktív a retrográd transzport során (B) A Huntingtin fehérje fontos szerepet játszik a retrográd transzportban. Képes fizikai kölcsönhatásra lépni közvetlenül a dineinnel és közvetetten - a HAP1 (Huntingtin-asszociált protein 1) fehérjén keresztül - a dineint szabályozó dinaktin komplexszel Maday és mtsai., 2012, valamint Wong és Holzbaur, 2015 nyomán, a szerző által módosítva

Ezekkel összhangban az axon közepén levő autofág struktúrák már pozitívak a késői endoszóma/lizoszóma marker LAMP1-re, azaz késői endoszómával vagy lizoszómával való összeolvadásra már sor került (Maday és mtsai., 2012). A szómához közel már teljesen elsavasodott autofág struktúrák, autolizozómák találhatóak (Lee és mtsai., 2011; Maday és mtsai., 2012). Az axonon belüli végighaladás a kiindulási fúziós eseményen túl további fúziókkal jár feltehetően, ugyanis az autofagoszóma-szállítás hibái gátolják az autofagoszómák érését és a

lebontást (Fu és mtsai., 2014; Wong és Holzbaur, 2014). Mivel a fehérjeszintézis elsődleges helye a neuronokban a szóma, így az autofág struktúrák szómába szállítása feltehetően elősegíti a lebontás termékeinek újrahasznosulását (Maday, 2016).

Az autofág gének minden sejtet érintő deléciója egerekben embrionális vagy újszülött-kori életképtelenséghez vezet, az állatok legkésőbb a születést követő első napon elpusztulnak (Kuma és mtsai., 2004; Komatsu és mtsai., 2005). Ezért az idegsejtekben már embrionális korban indukálódó promóterrel vezérelve hoztak létre olyan mozaikos mutáns egértörzseket, amelyekben vizsgálható volt az autofágia szerepe az idegrendszerben. Az autofág gének idegrendszeri kiütésének következményei igen súlyosak, a pleiotróp fenotípusok között progresszív neurodegeneráció, motoros funkciócsökkenés, viselkedési elváltozások és rövid élettartam is megfigyelhető volt (Hara és mtsai., 2006; Komatsu és mtsai., 2006; Nishiyama és mtsai., 2007; Liang és mtsai., 2010). Az *Atg5* illetve *Atg7* mutáns egerek már két-három hetes koruktól kezdve motoros és viselkedésbeli elváltozásokat mutatnak: abnormális hátsó végtag összehúzás, tremor, csökkent egyensúlyérzék, zavart mozgáskoordináció és abnormális járás jellemző rájuk (Hara és mtsai., 2006; Komatsu és mtsai., 2006). Pusztulásuk a születést követő negyedik és huszonnyolcadik hét között történik meg (Komatsu és mtsai., 2006).

Érdekes módon a különböző neuronok nem egyformán érzékenyek az autofágia hiányára. A kisagyi Purkinje-sejtek pusztulása a legjelentősebb, de az agykérgi neuronok, különösen a piramis sejtek pusztulása is igen kifejezett (Hara és mtsai., 2006; Komatsu és mtsai., 2006). Autofágia hiányában a legkorábban jelentkező idegsejt-fenotípus is a Purkinje-sejteket érinti. Az *Atg5*, az *Atg7* vagy a *Fip200* hiánya a Purkinje-sejtek axonvégződésének megduzzadásához és sorvadásához (atrófiájához) vezet (Hara és mtsai., 2006; Komatsu és mtsai., 2007b; Nishiyama és mtsai., 2007; Liang és mtsai., 2010). Aztán az axonok duzzadása több ponton is megfigyelhetővé válik (Hara és mtsai., 2006), és csak mindezeket követően pusztulnak el a Purkinje-sejtek. Bár ezen neuronok igen kiterjedt dendritfával rendelkeznek, a dendritekben nem volt elváltozás (Komatsu és mtsai., 2007b; Nishiyama és mtsai., 2007), ahogyan a szómában sem (Nishiyama és mtsai., 2007). Axondegeneráció más agyi területeken is jelentkezik, többek között az agykéregben, a *nucleus gracilis*-ben, a talamusz magvaiban, a hippokampuszban és a híd magvaiban is (Hara és mtsai., 2006; Komatsu és mtsai., 2007a).

Autofágia hiányában jellemző, hogy ubikvitin- és p62-pozitív fehérje aggregátumok jelennek meg az állatok korának előrehaladtával, amelyek ugyan a normális agyi öregedés során is

megfigyelhetőek, azonban az *Atg* mutánsokban sokkal korábban jelentkeznek (Hara és mtsai., 2006; Komatsu és mtsai., 2006; Komatsu és mtsai., 2007a; Liang és mtsai., 2010). Azonban aggregátumok sem egyforma mértékben jelennek meg a különböző agyi régiókban, neurontípusokban, pl. a Purkinje-sejtekben alig képződnek (Hara és mtsai., 2006; Komatsu és mtsai., 2006). Mivel autofágia hiányában Purkinje-sejtek mutatnak leghamarabb elváltozásokat és e sejtek pusztulnak el a legnagyobb mértékben, ez azt sejteti, hogy az aggregátumok citoprotektív szereppel bírnak. A fehérjeaggregátumok képződését pedig megelőzi az oldható (szolúbilis) ubikvitinált fehérjék és az oldható p62 felhalmozódása (Hara és mtsai., 2006; Komatsu és mtsai., 2007a). Az autofágia feltehetően szerepet játszik az axonbeli membrán reciklizációban is, ugyanis mind *Atg5*, mind *Atg7* mutánsban aberráns membránstruktúrák halmozódnak fel (Komatsu és mtsai., 2007b; Nishiyama és mtsai., 2007).

Mindezek után nem meglepő, hogy az autofágia működésének különböző zavarai is jellemzőek a neurodegeneratív betegségek esetén. Az adott betegséghez vezető valamelyik mutáció az autofágia megváltozott (általában csökkent) működéséhez vezet, amely önmagában neuronális funkciók csökkenéséhez vezet, és tovább súlyosbítja a mutáns fehérje hatását (mert a csökkent autofág aktivitás miatt a mutáns fehérje eltávolítása is kevésbé hatékony). Az autofágia bizonyítottan érintett az Alzheimer- (lizoszomális lebontás hibái), a Parkinson- (károsodott mitofágia és CMA, lizoszomális pH növekedése) és Huntington-kórban (lásd részletesen a következő fejezetben), az amiotrófiás laterális szklerózisban (ALS) (p62 funkcióváltozás), a prionbetegségekben és a spinocerebelláris ataxia több formájában (sérült mitofágia) (Menzies és mtsai., 2011; Nixon, 2013; Hu és mtsai., 2014; Menzies és mtsai., 2017).

A Huntington-kór és a Huntingtin fehérje - terápiás megközelítések és kapcsolat az autofágiával

A Huntington-kór tünetei, lefolyása és genetikai háttere

A Huntington-kór (*Huntington's Disease*, HD) egy progresszív, domináns, autoszómás öröklődést mutató neurodegeneratív betegség, széles spektrumú motoros, kognitív és pszichiátriai tünetekkel (Martin és Gusella 1986; Rüb és mtsai., 2016). 100.000 emberből 5-8-at érint (Rüb és mtsai., 2016). Az érintett személy élete folyamán bármikor kialakulhat a HD, de leggyak-

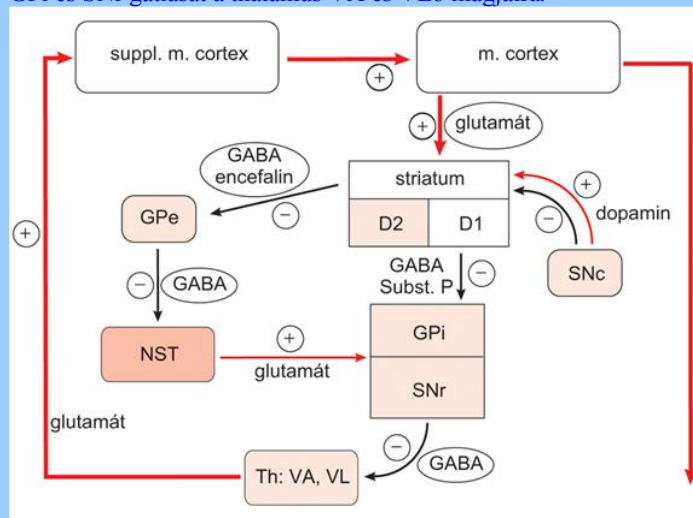
rabban felnőtt korban, 20 és 65 éves kor között kezdődik (Walker, 2007; Wyant és mtsai., 2017). A betegség tíz-húsz éven át egyre súlyosbodik, és mindig halálos kimenetelű (Wyant és mtsai., 2017). A kezdeti tünetek gyakran a negyvenes évek közepén járó egyéneknél jelentkeznek (Rüb és mtsai., 2016). E kezdeti tünetek közé tartozik a kognitív képességek folyamatos romlása és olyan nem jellegzetes motoros tünetek, amelyeket gyakran ügyetlenségként, remegésként, egyensúlyhiányként írnak le. Az akaratlan, vitustáncszerű mozdulatok (chorea) a kórjelző és legjobban ismert mozgási rendellenességek a HD-ban szenvedő embereknel. Másik jellemző, korai és egyértelmű tünetcsoport a szemmozgások különböző zavara. A vitustáncszerű akaratlan mozdulatok fokozatosan alakulnak ki a betegség tüneti fázisában, és először a test vagy a fej bizonyos részeire korlátozódnak. Ezek kialakulásával együtt járnak (de akár meg is előzhetik) bizonyos személyiségbeli változások, a viselkedésnek bizonyos megváltozásai vagy akár pszichiátriai tünetek (pl. depresszió, skizofrénia-szerű tünetek, a szégyen és zavar érzésének elvesztése, nyugtalanság, ingerlékenység, szorongás) és/vagy neurofiziológiai tünetek. A vitustáncszerű mozgások egyre súlyosabbá válnak a korai, kismértékű megjelenéseiket követően, egyre kisebb mértékben lesznek akaratlagosan befolyásolhatóak, és így egyre inkább gátolják az akaratlagos mozgásokat és a mindennapi életet. A HD előrehaladottabb állapotában a vitustáncszerű mozgások nem erősödnek tovább vagy akár el is tűnhetnek, átadva a helyüket más (szomato)motoros tüneteknek, mint amilyen a merevség, a bradikinézia (mozgások lelassulása, meglassultság), az ataxia (izommozgások koordinációjának zavarából adódó bizonytalan és ügyetlen mozgás), a dystonia (akaratlan, abnormális tartós izomösszehúzódás, amely kóros izületi helyzetet eredményez), az izom hipotónia, a testtartás instabilitása, a finommotoros képességek romlása, a dysarthria (a beszédmozgások koordinációs kivitelezésének zavara), és a dysphagia (nehezített nyelés). Ezen tünetek mellett érzékszervi zavarok is előfordulhatnak, melyek a betegség előrehaladtával folyamatosan súlyosbodnak. A későbbi fázisban - egyelőre ismeretlen okokból - jelentős testsúlyvesztés is bekövetkezik, ami előbb vagy utóbb cachexia-hoz (kóros lesoványodáshoz) vezet, és így erősen élettartam meghatározó a HD betegekben. A pszichiátriai és neurofiziológiai tünetek is egyre súlyosabbak lesznek. Végül, nagymértékű cachexia és kognitív leromlás mellett általában nyelési zavar nyomán kialakuló tüdőgyulladás szövődményei következtében hunynak el a páciensek (Rüb és mtsai., 2016).

A HD-ért felelős mutációt tartalmazó gént (*IT15*, *Interesting Transcript 15*) 1993-ban azonosították, és a *Huntingtin* (*HTT*) nevet kapta (Group, 1993). A *HTT* gén egy nagy, ~3144 aminosavból álló ~350 kDa-s fehérjét kódol, és az első exonjában meiotikusan instabil CAG-

ismétlődésekből álló szekvenciát tartalmaz (Saudou és Humbert, 2016). Ha replikáció során replikációs csúszás történik, és az elcsúszó hibás bázispárosodás (*slippery mismatching*) stabilizálódik, úgy, hogy a szintetizálódó szál kihurkolódik - ekkor történik inszerció, ez vezet a CAG ismétlődések számának növekedéséhez. A CAG ismétlődések polimorf poliglutamin (polyQ) szakaszt kódolnak. A CAG ismétlődések száma 9 és 35 között van a HD által nem érintett embereknél (Kremer és mtsai., 1994). A legfrissebb kutatások szerint a 28-35 közötti ismétlődés esetén a szakasz már nem stabil és expandálódhat, amely a tünetek kialakulásához vezethet (Rüb és mtsai., 2016). A 36-39 közötti CAG-ismétlődéssel rendelkezők között a betegség penetranciája nem teljes, és akikben ki is alakul a HD, jóval később jelentkeznek a tünetek, mint azon emberek esetében, akikben 40 vagy afeletti a CAG ismétlődések száma. Minél hosszabb a CAG-szakasz, annál fiatalabb korban jelentkeznek a tünetek (Kremer és mtsai., 1994; Lee és mtsai., 2012). Az abnormális polyQ expanzió a HD mellett több idegrendszeri betegség kialakulásáért felelős, melyeket összefoglaló néven poliglutamin betegségeknek nevezünk (Fan és mtsai., 2014). A HD általában a közepes méretű tüskés neuronok pusztulásával jár a striatumban (a *nucleus caudatus*-ban és a putamenben) (Reiner és mtsai., 1988), de szinte minden más agyi terület is érintett lehet, köztük az agykéreg, az agytörzs, a kisagy, a *globus pallidus* és a hippokampusz (Rosas és mtsai., 2003; Rosas és mtsai., 2008).

Idegrendszeri kitekintés

Két központi idegrendszeri mozgásszabályozó kört ismerünk, a striatum-kört és a cerebellum-kört. Az agykéreg szinte minden területéről a törzsdúcokba érkező információ nagyrészt a striatumon keresztül érkezik. A bazális ganglionok által feldolgozott információt a thalamusz közvetíti 'vissza' az agykéregbe. A bazális ganglionokat vagy törzsdúcokat (*nuclei basales*) az agyféltekék mélyén található szürkeállomány alkotja, a következő magvak alkotják: *nucleus caudatus* (NC), *nucleus accumbens*, *putamen*, *globus pallidus* (GP) (más néven pallidum), *nucleus subthalamicus* (NST) és a *substantia nigra*. A *nucleus caudatus* (caudatum) és a *putamen* funkcionális egységet alkot, ez a striatum vagy neostriatum. A GP *pars internára* (GPi) és *pars externára* (GPe) osztható. A *substantia nigra* két részből áll, a *dorsalis pars compactából* (SNc) és a *ventralis pars reticularisból* (SNr). A GPi és a SNr hisztológiai és működési szempontból hasonló szerkezetek, a mozgásszabályozásban egységnek tekinthetők. A *nucleus caudatus* és a *putamen* szöveti felépítése hasonló, funkciójuk azonban jelentősen különbözik. A *putamen* bemenete mozgását a motoros kéregből, részben a somatosensoros és a Br5 areából, származik; elsősorban a vázizmok mozgását szabályozza, kiesése mozgászavart eredményez, ezért a neve *motoros striatum*. A *putamen* a *globus pallidus* mindkét (GPe és GPi) területével, mind a SNr-sal kapcsolatban áll. A *caudatum centrális és dorsolaterális* régiója részt vesz a szemmozgás, a gondolkodás és szélesebb értelemben az *egzekutív* (kivitelezés, végrehajtás) működések szervezésében. A *ventralis és ventromedialis* magrészt a *memória, emóciók, a magartás* egyik integrátora. A területnek gazdag kapcsolatai vannak a *limbicus asszociációs* és *praefrontalis* szerkezetekkel ezért nevezik *asszociációs- és limbicus striatumnak*. A *striatum kör* (cortico-striato-thalamo-corticalis kör) az agykéreg mozgató, érző és asszociációs területeiről szedődik össze; a striatumban (nucl. caudatus és putamen) kapcsol át a *ventralis anterior* (VA), *ventralis lateralis* (VL), a *ventralis lateralis oralis* (VLo) és *mediodorsalis* thalamus magokra. A thalamocorticalis projekciók főként a szupplementer motoros kéregben, kisebb számban a praemotoros és primer motoros kéregben végződnek, majd a kör cortico-corticalis kapcsolatokkal zár a primer mozgatókéregben. A *striatum kör* a kognitív szerkezetekkel létesült kapcsolatai révén irányítja a mozgástervezést, valamint az összetett mozgásminták kivitelét. Bonyolult mozgásminták (pl. zene) tanulása során is aktiválható. A striatum kör direkt és indirekt pályarendszerekből áll. A *direkt cortex-neostriatalis pálya* excitatoros működésű glutamaterg neuronokat tartalmaz. A striatumból mind a GPi-hez és a SNr-hoz GABA-erg és substance P átvitelű neuronok kapcsolnak át, ez a rendszer gátló hatású. A GPi-ből és a SNr-ből ugyancsak gátló hatású GABA-erg pálya éri el a thalamust. A direkt pályarendszer elsősorban D1-dopaminreceptorokat tartalmaz. A thalamus akkor aktiválja a szupplementer motoros kérget, ha a gátlás alól felszabadul. Ez akkor lehetséges, ha a striatum gátolja a GPi és SNr gátlását a thalamus VA és VLo magjaira.



A **mozgásszabályozó körök élettani működése**. A piros nyilak serkentést, a feketék gátlást jeleznek. SNr: *substantia nigra pars reticularis*; SNc: *substantia nigra pars compacta*; Th VA, VL: *ventralis anterior/ventralis lateralis* thalamus magok; NST: *nucl. subthalamicus*; GPe: *globus pallidus externus*; GPi: *globus pallidus internus*; suppl. m. cortex: szupplementer motoros kéreg; m. cortex: primer motoros kéreg

Az *indirekt pálya* ettől eltérően működik. A gátló pálya (GABA- és encefalinerg synapsisok) szintén a striatumból indul, a GPe-ba vezet, majd innen a nucl. subthalamicusba, amelyet GABA-erg gátlás alatt tart, végül glutamaterg excitatoros synapsisokkal kapcsol vissza a kimeneti magokhoz (GPi, SNr). Az indirekt pálya elsősorban D2- (GABA-encefalin) receptorokat tartalmaz. A corticostriatalis serkentés a GPe-ban GABA- és encefalinmediált gátlást hoz létre, amely felszabadítja a gátlás alól a nucl. subthalamicust (NST). A NST glutamaterg rendszeren keresztül aktiválja a kimeneti gátló magokat (GPi és SNr), amelyek a thalamus működését gátolják, így a szupplementer motoros kéreg aktiválása csökken.

A SNc-ből származó dopamin a striatum direkt striatopallidális pálya D1-receptorhelyeit serkenti, a D2-receptorhelyeket viszont az indirekt striatopallidális pályában gátolja.

Forrás: Szirmai Imre, Neurológia, 2011, Medicina Könyvkiadó Zrt., módosítva

A vad típusú Huntingtin (HTT) fehérje

A HTT expressziója, lokalizációja, interakciói

A vad típusú *HTT* gén terméke a legtöbb emberi szervben és szövetben megtalálható, és már az embrionális fejlődés elején is kifejeződik (Marques Sousa és Humbert, 2013; Saudou és Humbert, 2016). A sejtben nagymértékben citoplazmában, kisebb mértékben a sejtmagban található. Működését számos poszttranszlációs módosítás befolyásolja.

Az első exon által kódol fehérjerészlet a leginkább jellemzett. Az emberi HTT-ben a polyQ szakaszt 17 aminosav előzi meg, amely nukleáris export szignálként (NES-ként) funkcionál, és α -hélix struktúrájú. A polyQ szakasz 17Q esetén egy flexibilis régió, többféle konformáció felvételére képes. A polyQ szakaszt egy prolin-gazdag régió (*proline-rich domain*, PRD) követi, amely a triptofántartalmú (WW) fehérjékkel illetve az SH3 doménekkal való interakciót tesz lehetővé. A PRD prolin-prolin hélix konformációt vesz fel, mely egy rigid struktúra, és feltehetően a polyQ szakasz által felvett szerkezet stabilitásában játszik szerepet. A fehérje többi része, bár 66 exon kódolja és a teljes fehérje 97,8%-át alkotja: jóval kevésbé jellemzett. Számos HEAT ismétlődés domént tartalmaz, amelyek 5-7 α -rod-ba csoportosulnak. A HEAT ismétlődés domének szolenoid-szerű struktúrát alkothatnak, és számos fehérje-fehérje interakciót valamint intramolekuláris kapcsolatokat tehetnek lehetővé. A tisztított HTT fehérje több mint százféle konformációt képes felvenni (Saudou és Humbert, 2016).

A vad típusú HTT-nek több mint 350 interakciós partnerét azonosították. Ezen kölcsönhatások sok esetben nagy komplexek formájában fordulnak elő, ami a HTT állványfehérje (*scaffold*) funkciójából is fakad. Ezen kölcsönhatásoknak csak egy része az, amely az idegrendszerre is jellemző és egy még kisebb része az, amely a striatumra (Saudou és Humbert, 2016).

A HTT funkciói

A HTT részt vesz a vezikulák és organelumok szállításában. Kölcsönhat a molekuláris motorok apparátusával vagy közvetlenül a dineinnel, vagy közvetetten: a Huntingtin-asszociált protein 1-en (HAP1-en) keresztül a dineint szabályozó dinaktin komplex egyik alegységével. A kinezin egyik tagjával (Kinesin heavy chain isoform 5C-vel) is a HAP1-n keresztül lép

kapcsolatba (6B ábra). E kölcsönhatásokon keresztül a HTT szabályozza az organellumok transzportját a neuronokban mind anterográd, mind retrográd irányban, az axonokban és dendritekben egyaránt. Ezen organellumok lehetnek többek közt szinaptikus vezikula prekursorok, autofagoszómák, endoszómák, lizoszómák, BDNF (brain-derived neurotrophic factor - agyi eredetű növekedési faktor)-tartalmú vezikulák, RNS granulomok, és GABA-receptor tartalmú vezikulák (Ma és mtsai., 2011; Saudou és Humbert, 2016). A HTT emellett képes fokozni a szállítás sebességét a mikrotubulusok mentén azáltal, hogy a GAPDH-t hozzácsatolja a vezikulákhoz, mely így ott helyben biztosít a gyors axonális transzporthoz energiát. Eltérő poszttranszlációs módosításai révén a HTT a szállítás irányát is befolyásolja. A HTT vezikula és organellum transzportban betöltött funkciói konzerváltak az ember és az *ecetmuslica* között.

A HTT részt vesz a neuroblasztok és nem neurális sejtek osztódásában: a magorsó és az orsófonalak megfelelő orientációjához szükséges. E funkció is konzervált *Drosophila* és emlősök között (Saudou és Humbert, 2016).

A HTT nélkülözhetetlen a csilló képződéséhez és működéshez, illetve az idegsejtek elsődleges csillójának kialakulásához (az elsődleges csillók nem mozognak, szenzoros funkciót látnak el). A HTT szükséges a PCM1 (Pericentriolar material 1) fehérje szállításához a pericentrioláris anyaghoz és onnan vissza (Keryer és mtsai., 2011; Saudou és Humbert, 2016).

A HTT endocitózisbeli szerepe szerteágazó. Részt vesz a membránbetűródésben, klatrinburok összeállításában és a membrán lefűződésben is. Az endoszómák mozgását is befolyásolja, a HAP40-en (Huntingtin-asszociált protein 40) keresztül kapcsolódik a Rab5-höz, és a korai endoszómákon lokalizálódik, és az aktinvázalattal kölcsönhatva lassítja az endoszómák mozgását és elősegíti a mikrotubulusokról az aktinvázra való átváltást. A HTT kölcsönhat a Rab8-optineurin-miozin VI komplexszel is a HAP1-dinaktin komplex mellett. A mikrotubulusokról aktinvázra történő váltás mind a plazmamembránnál, mind a transz-Golgi hálózatban bekövetkezhet. A fent említetteken túl a HTT fontos szereppel bír a reciklizáló útvonalban is: aktiválja a Rab11-et a reciklizáló útvonal fő szervezőjét (Saudou és Humbert, 2016).

A PolyQ szakaszt tartalmazó fehérjék transzkripciós faktorként is működnek. A HTT-ről ismert, hogy kölcsönhat számos transzkripciós faktoral (CBP, NeuroD, SP1, NF-kB, p53), és transzkripciós aktivátorokkal, illetve represszorokkal (CA150, TAFII130, NCOR, EST/NRSF, CtBP). Ebből kifolyólag a HTT számos sejtbiológiai folyamatra hatással van pl. a p53-mal való kölcsönhatása révén - annak célgénjeinek expressziójának befolyásolásán keresztül - a sejtciklus szabályozásra, DNS hibajavításra, apoptózisra, sejtes stresszválaszokra (Bae és mtsai., 2005). A HTT hathat *scaffoldként* is, közvetlen kapcsolatot teremtve egy

transzkripció szabályozó faktor és a bazális transzkripció apparátus között vagy lehet maga is transzkripció kofaktor. Ezek mellett a kromatinszerveződést is képes szabályozni, és részt vehet a transzkripció faktorok sejtmagba történő szállításában is (Saudou és Humbert, 2016).

Egérben a HTT nélkülözhetetlen az embrionális fejlődéséhez, szükséges az agykéreg, a striatum és a talamusz fejlődéséhez, elengedhetetlen ezen agyi régiókban a neuroblasztok differenciációjához és a kérgi neuronok migrációjához (Saudou és Humbert, 2016).

A HTT antiapoptotikus, túlélést elősegítő faktor is. Hiányában könnyebben halnak meg a neuronok, míg a túltermelődése esetén jobban bírják az idegsejtek az őket érő káros hatásokat. Ennek egyik lehetséges magyarázata az, hogy a HTT gátolja a kaszpáz-3 és -9 aktiválódását, egy másik pedig a BDNF szignalizációban betöltött komplex szerepe. A striatumban nem termelődik a BDNF, az agyi eredetű növekedési faktor, hanem a cortico-striatumi afferensekre van utalva. A HTT elősegíti a BDNF transzkripcióját a kortexben, és a BDNF-tartalmú vezikulák szállítását az axonban a cortico-striatumi szinapszishoz. A szinaptikus részbe ürült BDNF-t a TrkB receptorok veszik fel, rajtuk keresztül kerül endocitózisra a BDNF, amely aztán a HTT (HTT-dinein komplex) segítségével retrográd transzporttal jut el a striatum neuronjainak sejttestébe és ott aktiválja a túléléshez szükséges jelátvitelt. Tehát a HTT-nek több ponton is fontos szerep jut abban, hogy a striatum sejtszöveti BDNF-hez jussanak. Ez valószínűleg összefüggésben van azzal, hogy a HD-ban szenvedő betegekben a striatum idegsejtszövet pusztul el először (Saudou és Humbert, 2016).

Mutáns HTT patológiához vezető funkciói

A magas CAG ismétlődéssel rendelkező *HTT* gén terméke aberráns és rosszul feltekeredett fehérje, amely aggregálódik és fehérjezárványokat (*inclusion body*-kat) képez - ez a HD neuropatológiai tulajdonsága -, de nem minden sejtben. A zárványok lehetnek citoplazmatikusak és sejtmagiak is (DiFiglia és mtsai., 1997). A zárványok hatása feltehetően összetett, eredendően azt feltételezték, hogy a jelenlétükkel károsítják a sejttes folyamatokat, és így toxikusak, azonban jelenleg az a sokkal valószínűbb, hogy az érintett sejtekben valójában citoprotektív funkcióval bírnak a jóval toxikusabb oldott mutáns HTT-szint csökkentése révén (Arrasate és mtsai., 2004; Ross és Poirier, 2005; Miller és mtsai., 2010; Ross és Tabrizi, 2011). Ezzel összhangban van az a megfigyelés, hogy nem azok az idegsejtek pusztulnak el elsősorban, amelyekben nagyfokú az aggregátumképződés.

A sejtmagi zárványok mutáns HTT mellett ubikvitint és p62-t tartalmaznak (Sieradzan és mtsai., 1999; Nagaoka és mtsai., 2004). E sejtmagi zárványokban csonkolt mutáns HTT mutatható ki. A csonka HTT proteolitikus hasítások révén jön létre, amelyet kaszpázok és más proteázok végeznek (Sawa és mtsai., 2005). Így többféle, a polyQ szakaszt tartalmazó N-terminális fragmentum jön létre, amelyek annál toxikusabbak, minél rövidebbek. Ezek egy része transzlokálódik a sejtmagba és megmaradhatnak oldott formában, vagy zárványokat alkothatnak. Oldott állapotban hozzájárulnak az idegsejtek pusztulásához a transzkripcióra gyakorolt domináns negatív hatásuk révén, míg zárványokba zárva feltehetően nem vagy jóval kevésbé toxikusak (Valor, 2015). A mutáns HTT proteolízise során olyan HTT fragmentumok is képződnek, amelyek az eredeti fehérje C-terminális részei (tehát nem tartalmazzák a polyQ-szakaszt) mégis toxikusak (El-Daher és mtsai., 2015).

A citoplazmatikus zárványok lehetnek a szómában, axonokban, axonterminálisokban és dendritekben egyaránt, de nem mindig ugyanazon sejtekben fordulnak elő, amelyekben a nukleáris zárványok is megfigyelhetők. A citoplazmatikus zárványok tartalmaznak mutáns HTT-t, csonkoltat és teljeset egyaránt (Sieradzan és mtsai., 1999) és tartalmazhatnak Beclin1 (Shibata és mtsai., 2006) és mTOR fehérjét (Ravikumar és mtsai., 2004). A citoplazmatikus aggregátumok egy része tartalmaz, míg a másik része nem tartalmaz p62-t (Iwata és mtsai., 2005; Rue és mtsai., 2013). A p62-pozitív mutáns HTT tartalmú citoplazmatikus aggregátumok/zárványok tartalmaznak LC3-at és ubikvitint is (HeLa sejtes- és egérmodellben legalábbis) (Björkøy és mtsai., 2005; Iwata és mtsai., 2005; Heng és mtsai., 2010).

Különböző HD modellekben a mutáns HTT (teljes vagy fragmentum) túltermelésével végzett kísérletek szerint a mutáns HTT képes gátolni a proteaszomális és az autofág lebontást, mitokondriális abnormalitásokhoz (rendellenes fúzió és fisszió) és ehhez kapcsolódóan energetikai- és anyagcserezavarokhoz vezet. Megváltoztatja az endocitózist és a vezikulák transzportját, transzkripciót zavart eredményez, fokozott kalcium jelátvitelt okoz (a mutáns HTT hozzáköt az IP₃ receptorhoz, mely a legjelentősebb Ca²⁺-csatorna a neuronokban), károsítja a szinaptikus működést. Így excitotoxicitáshoz és különböző neurotranszmitter receptorok (glutamát-, adenosin A₂-, kannabinoid- és GLT-1 receptorok) jelátvitelének zavarához is vezet (Ross és Tabrizi, 2011; Dayalu és Albin, 2015; Saudou és Humbert, 2016). Tehát a vad típusú HTT-hez társított összes funkció megváltozik az abnormális méretű polyQ-szakasz jelenléte következtében.

Ugyanakkor a HD-ban szenvedő emberekben - lévén heterozigóták - kettős változás van: rendelkeznek egy mutáns alléllal, amely egy abnormálisan magas számú CAG-ismétlődést tar-

talmaz, és ráadásul csak egy példányban lesz jelen a vad típusú allél. A csökkent vad típusú HTT mennyiség tovább árnyalja a mutáns HTT túltermelésével megfigyelt képet, ugyanis a csökkent (vad típusú) HTT hatására csökken a BDNF transzportja, amelyet tovább ront a mutáns HTT jelenléte (Saudou és Humbert, 2016). További komplexitás-fokozódás lehetséges akkor, amikor a vad típusú HTT hiánya és a mutáns fehérje ellentétesen hat valamire, mint amilyen a csillók kialakulása. HTT hiányában a PCM1 nem szállítódik a pericentrioláris anyaghoz, aminek következtében rövid csilló lesz, vagy egyáltalán nem alakul ki csilló. Azonban amennyiben abnormálisan hosszú a polyQ-szakasz a HTT-ben, úgy a PCM1 nem szállítódik el a pericentrioláris anyagtól, és abnormálisan hosszú csilló alakul ki (Keryer és mtsai., 2011). Egérmodelleken végzett kísérletek alapján a vad típusú HTT részleges hiánya is hozzájárulhat a HD-ra jellemző patológia kialakulásához (Dragatsis és mtsai., 2000; Van Raamsdonk és mtsai., 2005b; Saudou és Humbert, 2016).

A HD-ra jellemző neuronális diszfunkciók és az idegsejtpusztulás valószínűleg már a végeredménye, végkövetkezménye az addig végbemenő komplex változásoknak (Dayalu és Albin, 2015).

Autofágia a HD-ban és a HTT az autofágiában

Azt, hogy megváltozik az autofág aktivitás a Huntington-kór esetében, először betegek agyából mutatták ki posztmortem (Tellez-Nagel és mtsai., 1974). Többen megfigyelték, hogy a mutáns HTT fehérje hatására az autofág struktúrák mennyisége megnő egér striatumi idegsejtekben (Kim és mtsai., 1999; Kegel és mtsai., 2000; Petersen és mtsai., 2001), és HD betegek limfoblasztjaiban (Nagata és mtsai., 2004; Martinez-Vicente és mtsai., 2010). Az autofág struktúrák megnövekedett mennyisége ugyanakkor nem fokozott autofág aktivitásra, hanem az autofág folyamat zavarára utal (Martinez-Vicente és mtsai., 2010; Hu és mtsai., 2014; Martin és mtsai., 2014).

A vad típusú HTT fehérjét az ubikvitin-proteaszóma rendszer és a szelektív autofágia is képes lebontani, azonban a progresszív proteaszomális károsodás és az aggregátumok képződése a betegség során az autofág degradáció felé tolja el a lebontását (Bennett és mtsai., 2005; Bennett és mtsai., 2007; Kaushik és mtsai., 2010). A mutáns HTT egy autofágia szubsztrát (Ravikumar és mtsai., 2002): a mutáns HTT-t az autofágia szelektíven képes lebontani. Ezzel összhangban az autofág receptoroknak, a SQSTM1/p62-nek, az ALFY-nak és a Tollipnak na-

gyon fontos szerepe van a mutáns HTT lebontásában (Bjørkøy és mtsai., 2005; Filimonenko és mtsai., 2010; Lu és mtsai., 2014). Idővel a mutáns HTT makroautofágia általi lebontása is sérül, ezt részben kompenzálhatja a CMA (Koga és mtsai., 2011).

A HD-ban a hibás autofág működésnek több oka lehet, egyelőre nem tudni, hogy az alábbiak közül mikor melyik hatás a domináns (Martin és mtsai., 2015). Elképzelhető, hogy függ a kérdéses sejtípustól és a betegség stádiumától. A mutáns HTT képes hozzákötni a p62-höz, így gátolva a lebontandó struktúrák autofagoszómákba kerülését (ún. „üres autofagoszómák” képződnek). Ezáltal a mutáns HTT gátolja a szelektív autofágiát és önnön maga lebontását is (Martinez-Vicente és mtsai., 2010). Gátolhatja továbbá az ATG14 és a Beclin1 ULK1 általi foszforilációját, ezáltal a Vps34 kináz csökkent aktivitású lesz az autofagoszóma-képződés során (Wold és mtsai., 2016). A mutáns HTT zárványokba csapdázhatja a Beclin1-et (Shibata és mtsai., 2006), míg az oldott mutáns HTT kölcsönhatásba léphet a Beclin1-gyel, ekkor gátolja a Beclin1 és az Ataxin-3 közti kölcsönhatást, amely a Beclin1 fokozott proteasomális lebontásához vezet (Ashkenazi és mtsai., 2017). Ezek a folyamatok a Beclin1-függő autofágia gátlását eredményezik. A mutáns HTT hat a vezikulák - köztük az autofagoszómák - transzportjára is, gátolja az autofagoszómák mozgását, és ezáltal megakadályozza az autofagoszómák fúzióját a lizoszómákkal (Wong és Holzbaur 2014). Az optineurin/Rab8-cal való kölcsönhatáson keresztül a mutáns HTT megzavarja a poszt-Golgi lizoszomális enzimtranszportot, amelynek nyomán csökken a lizoszómák aktivitása (del Toro és mtsai., 2009).

A vad típusú HTT fehérje maga több ponton is fontos szerepet játszik a szelektív autofágiában. HTT hiányában ubikvitin és p62 kettős pozitív aggregátumok halmozódnak fel a neuronokban, ugyanúgy, mint ahogyan az *Atg* mutáns idegsejtekben (Steffan, 2010; Ochaba és mtsai., 2014). A HTT állványfehérjeként fizikailag kölcsönhat a p62-vel és LIR motívumai révén valószínűleg az LC3-mal is, és elősegíti a p62-nek az ubikvitinált fehérjékhez és az LC3-hoz való kapcsolódását (Ochaba és mtsai., 2014; Rui és mtsai., 2015). A HD betegekben és modellekben megfigyelt „üres autofagoszóma” (Martinez-Vicente és mtsai., 2010) fenotípus így valószínűleg nem csak a mutáns HTT következtében alakul ki, hanem a vad típusú HTT mennyiségének csökkenése is hozzájárul. Éhezés hatására az mTORC1 aktivitása gátlódik, így az autofágia iniciációját végző ULK1-komplex aktiválódik, amely éhezés-indukálta autofágiához vezet (3. ábra). A szelektív autofágia ezzel szemben megfelelő tápanyag ellátottság, és aktív mTORC1 mellett is képes aktiválódni. Ez legalább részben a HTT-nek köszön-

hető, amely közvetlenül hozzákapcsolódik az ULK1-hez, és ezáltal eltávolítja az mTORC1-től (a HTT-ULK1 és az mTOR-ULK1 komplexek egymást kölcsönösen kizárók) (Rui és mtsai., 2015). A HTT e hatását segítheti az is, hogy szintén fizikai kölcsönhatásba léphet az indukciós komplexből az ATG13-mal és a FIP200-zal is (Ochaba és mtsai., 2014). Ezen kölcsönhatások egy lehetséges oka, hogy a HTT C-terminális része bizonyos fokú hasonlóságot mutat az élesztő Atg11 fehérjéjével, amely szintén *scaffoldként* működve kölcsönhat egy szelektív autofágiához hasonló, ún. Cvt (*cytoplasm-to-vacuole*) útvonal iniciációjában részt vevő Atg fehérjékkel és egy autofág receptorral (Steffan 2010; Ochaba és mtsai., 2014). A HTT közvetlen kölcsönhatásba lép a Beclin1-gyel is (Ochaba és mtsai., 2014), de hogy ez hatással van-e az autofág aktivitásra, és ha igen, akkor hogyan befolyásolja, az egyelőre ismeretlen.

A HTT szerepet játszik az autofágia későbbi lépéseiben is. Szükséges a dinein-dinaktin-HAP1 komplexen keresztül az autofagoszómák axonok mentén történő mozgásához és így az autofagoszómák éréhez is (Wong és Holzbaur, 2014). Érdekes módon, a polyQ szakasz deléciója, eltávolítása a vad típusú HTT fehérjéből mTOR-független módon fokozza az autofág aktivitást (Zheng és mtsai., 2010).

A HD-ban a neuronok egy részében citoplazmatikus zárványokba csapdázódik az mTOR is, melynek következtében megnő ezen neuronokban az autofág aktivitás (Ravikumar és mtsai., 2004). Ezzel szemben azokban a sejtekben, amelyekben oldott állapotban marad a HTT, nem nő meg az autofágia ilyen módon. Ez lehet az egyik oka annak, hogy a mutáns HTT aggregátumokat tartalmazó sejtek között kisebb mértékű a sejthalál, mint az aggregátumot nem (csak oldott mutáns HTT-t) tartalmazó sejtek esetében (Arrasate és mtsai., 2004; Rubinsztein, 2006; Miller és mtsai., 2010). Ugyanakkor minden bizonnyal ennél jóval komplexebb az mTOR érintettsége a HD-ban. Egy másik tanulmány szerint ugyanis pont a lecsökkent mTORC1 aktivitás helyreállítása az, ami javítja a striatum neuronjainak működését, és javítja a motoros tüneteket HD egérmodellben (Lee és mtsai., 2015). De megfigyelték már az mTORC1 szabályozásának a felborulását (Gines és mtsai., 2003; Xifró és mtsai., 2011) és fokozódását is egér striatum HD modellsejtekben (Pryor és mtsai., 2014; Walter és mtsai., 2016).

A HD terápiais lehetőségei

Farmakológiai megközelítések

A jelenleg létező kezelési lehetőség a tünetek enyhítésére irányulnak, azt teszik lehetővé - jó esetben (Wyant és mtsai., 2017). A motoros tünetek közül a vitustáncszerű tüneteket lehet viszonylag jól kezelni. A *chorea*-t feltehetően a striatumbeli GPe neuronok pusztulása okozza, amely neuronok kulcsfontosságúak az indirekt pályában (bővebb információért lásd a keretes írást a 28. oldalon). Az indirekt pálya ezen hibája a *nucleus subthalamicus* gátlását eredményezi, amely hiperkinetikus zavart eredményez (fokozódik az izom aktivitása, amely nyomán túlzott normális és/vagy abnormális mozgások jelentkeznek) (Reiner és mtsai., 1988; Deng és mtsai., 2004). A SNc-ből (*substantia nigra pars compacta*) érkező dopamin mennyiségének csökkentése vagy a D2 receptor blokkolása a jelenleg létező gyógyszerészeti megközelítések célja annak érdekében, hogy a túlzott mozgást csökkentsék. A Tetrabenazine (TBZ) jelenleg az egyetlen FDA által jóváhagyott készítmény a vitustáncszerű tünetek kezelésére. A TBZ reverzibilisen gátolja a vezikuláris monoamin transzporter 2-t (VMAT2) a központi idegrendszerben. A VMAT-2 csomagolja a dopamint, szerotonint és norepinefrint a citoszolból a preszinaptikus vezikulákba. Így a VMAT-2 gátlása fokozza e három neurotranszmitter lebomlását és gátolja a szinaptikus résbe ürülését (Hayden és mtsai., 2009; Wyant és mtsai., 2017). A dopamin mennyiség csökkentése enyhíti ugyan a vitustáncszerű tüneteket, azonban a szerotonin és az epinefrin depléciója ronthat a depressziós és szorongásos tüneteken, így fokozhatja az öngyilkos késztetést és az öngyilkossági kísérletek gyakoriságát a betegekben. Ráadásul a depresszió és az öngyilkossági késztetés is általános a HD-ban, és sokszor nagyobb problémát jelent, mint a vitustáncszerű mozgás. Ezek erőteljes érvek a TBZ használatával szemben (Wyant és mtsai., 2017).

A vitustáncszerű tünetek kezelésére a TBZ-nek egy változata (deutetrabenazine avagy SD-809), illetve más gyógyszerek (antipszichotikumok, dopaminstabilizátorok, vagy a Parkinson-kórban szenvedők esetében használt Amantadine) hatását is vizsgálták HD-betegeken. Azonban az alacsony hatékonyság, illetve a mellékhatások sokasága és súlyossága miatt a kapott eredmények a „nem egyértelműen pozitív”-tól a „kétségbeejtő”-ig terjedtek (Lundin és mtsai.,

2010; Frank és mtsai., 2016; Wyant és mtsai., 2017). A többi motoros tünet kezelési lehetőségei viszont méginkább korlátozottak (Wyant és mtsai., 2017).

A progresszív kognitív zavarok, általában előbb jelentkeznek a HD-ban, mint a motoros tünetek. A HD-ra a szubkortikális demencia a jellemző. A feldolgozás sebessége, figyelem, probléma-megoldó képesség, emlékek visszakeresése tartoznak a sérült funkciók közé (szemben az Alzheimer-kórral, melyben agykérgi demencia van, így megjegyzés, nyelv, és látótérbeli zavarok figyelhetőek meg). A striatum az agykéregből erőteljes glutamáterg beidegzésben részesül, és feltételezik, hogy a HD-ban fokozott glutamáterg neurotranszmisszió kiváltotta excitotoxicitás is hozzájárul a striatum idegsejtjeinek pusztulásához. Egy gyógyszerkísérletről tudni, amely a HD-ban szenvedők kognitív zavarainak javítását célozta meg a glutamát jelátvitel stabilizálásával (a memantin alkalmazásával, amely egy NMDA receptor gátló) (Beister és mtsai., 2004). Az eredmények biztatóak voltak ugyan, de további, szigorúbb kontrollok mellett végzett kísérletek szükségesek (Wyant és mtsai., 2017).

A HD betegekben sokféle pszichiátriai tünet fordulhat elő, mint pl. depresszió, pszichózis, kényszerbetegség. Ezek, illetve más érzelmi és viselkedésbeli változások valószínűleg a striatum kör degenerációja, a frontális lebeny és a ventrális anterior és mediális dorzális talamuszi magvak degenerációja révén alakul ki (Paulsen és mtsai., 2001). A pszichiátriai tünetek kezelésének kilátásai jobbak, mint a kognitívoké. A depresszió a leggyakoribb pszichiátriai tünet a HD-ban, és jól reagál a kezelésekre, a depressziós állapotot javító beavatkozások igen ígéretesek. Az öngyilkos-késztetés is komoly probléma a HD betegek jelentős részében, erre hatni azonban elsődlegesen szociálisan lehet (Wyant és mtsai., 2017).

Genetikai megközelítések

Az antiszensz oligonukleotidok (ASO) kicsi, egyszálú molekulák, melyeket azzal a céllal szintetizálnak, hogy a szekvencia-komplementaritás alapján a betegséget okozó gén pre-mRNS-éhez vagy mRNS-éhez kapcsolódjanak. Az ASO-k egyik fajtája a sejtmagban működik és a pre-mRNS-hez kapcsolódva aktiválja az RNáz H-t, amely lebontja az mRNS-t (az ASO-t meg nem). Az ASO-k másik fajtája a citoplazmában lép kölcsönhatásba az mRNS-sel, és gátolja annak translációját (Chan és mtsai., 2006). A HD-ban az ASO támadhatja a CAG ismétlődést, SNP-t, vagy intront (a pre-mRNS-ben) (Kay és mtsai., 2014; Skotte és mtsai., 2014).

Az ASO csökkenti a mutáns HTT mennyiségét humán fibroblasztokban (Hu és mtsai., 2009; Gagnon és mtsai., 2010; Sun és mtsai., 2014) és javítja a HD-jellegű fenotípust egérmodellekben (Carroll és mtsai., 2011; Kordasiewicz és mtsai., 2012; Sun és mtsai., 2014). Jobbára szelektívek ezek a mutáns allélra, és a vad típusú géntermék mennyiségét kevésbé csökkentik.

A kezeléssel ugyanakkor vannak problémák. Hogyha az ASO a CAG-ot támadja, akkor az megzavarhatja más CAG-ismétlődést tartalmazó gének működését is, különösen akkor, hogyha a patogén *HTT*-ben viszonylag kicsi a CAG ismétlődések száma. Az ASO-k nem mennek át a vér-agy gáton, így intratekálisan kell őket beadni, azaz az agyat és a gerincvelőt körülvevő, agy-gerincvelői folyadékkal teli térbe kell bejuttatni. Onnan képesek belépni a neuronokba és azok sejtmagjába (Kay és mtsai., 2014), de lumbális szűrés esetén kérdése, hogy mennyi ASO éri el a striatumot, azaz mennyire képesek ott hatni, ahol a leginkább szükség lenne rájuk (Wild és Tabrizi 2014).

Az RNS interferencia (RNSi) alapú megközelítésekben a siRNS-ek kisfokú komplementaritáson keresztül is képesek hatni, így nem tudnak megbízhatóan csak a mutáns HTT-re specifikusak lenni. Ugyanakkor SNP alapon tudnak támadni, így olyan SNP alapon is, amely néhány észak-amerikai és európai HD betegben megtalálható (Aronin és DiFiglia, 2014; Kumar és mtsai., 2015). E polimorfizmusok nélkül különböző siRNS-ek kombinációját kell alkalmazni ahhoz, hogy szelektíven a mutáns *Htt*-t célozzák.

Egy egérmodellben egy *Htt* csendesítő miRNS nagy arányban bejutott a striatum sejtjeibe (több mint 80%), és kb. 40%-ra csökkentette a mutáns, de a vad típusú HTT mRNS és fehérje mennyiségét is (Stanek és mtsai., 2014). Az RNSi alapú megközelítés legnagyobb problémája az, hogy egy virális hordozóvektorra van szükség, és jelenleg mindkét oldali striatumba kell bejuttatni ahhoz, hogy hasson. Ráadásul sokkal gyorsabban bomlik le a vektorról képződő RNS, mint az ASO-k. HD-ban szenvedő pácienseken még nem vizsgálták (Wyant és mtsai., 2017).

A cink-ujj fehérjék (ZFP-k) represszorként való alkalmazása egy további lehetőség. Specifikusan a CAG ismétlődésekhez lehet irányítani őket, és mivel közel van a CAG-ismétlődés az 5' UTR-hez, ezért az a várakozás, hogy szelektívek a mutáns HTT-re és nem interferálnak más poly-CAG génekkel (Wild és Tabrizi, 2014). Egy egérmodellben hatékonyan csökkentették a ZFP-k a mutáns *Htt* mRNS és fehérje szintjét, míg más poly-CAG géneket nem befolyásoltak (Garriga-Canut és mtsai., 2012). Hátrány, hogy ezek alkalmazásához is virális vektorra van szükség (Wild és Tabrizi, 2014).

A CRISPR-Cas9 rendszer genomszerkesztést és így genomszintű szerkesztést és kezelést tesz lehetővé. Specifikusan a mutáns gén inaktiválására van lehetőség, HD betegekből származó fibroblasztokban és egér modellben már sikeresen alkalmazták (Aronin és DiFiglia, 2014; Monteys és mtsai., 2017). A vad típusú HTT mennyiségének feleződéséből fakadó funkciócsökkenésekre egyik genetikai kezelés sincsen hatással.

Az autofágia, mint terápiás célpont a HD-ban

Az autofágia kitüntetett szerepe a neuronok homeosztázisának és működésének fenntartásában, mert azok nem tudják osztódással kihígítani a károsodott fehérjéket és más sejtalkotókat, ráadásul több ponton károsodik is a HD folyamán (Nixon, 2013; Hu és mtsai., 2014; Martin és mtsai., 2015; Menzies és mtsai., 2017). Ugyanakkor, az autofágia legalább részben képes a mutáns HTT lebontására, így a betegségért felelős legfőbb faktor mennyiségét csökkenteni. Ezek miatt az autofág aktivitás fokozása ígéretes célpont több neurodegeneratív betegség kezelésében, köztük a HD-ban is (Ravikumar és mtsai., 2002; Sarkar és Rubinsztein, 2008; Sarkar és mtsai., 2009; Martinez-Vicente 2015; Huang és Adachi, 2016; Menzies és mtsai., 2017).

A rapamycin és rapamycin-analógok általi autofágia aktiválás az eddig legjobban tanulmányozott megközelítés a neurodegeneratív betegségekben, így a HD-ban is. A rapamycin az FKBP12 (peptidil-prolil cisz/transz izomeráz FK506-binding protein 12) fehérjéhez köt, és az FKBP12-rapamycin komplex az, amely gátolja a TOR működését, pontosabban specifikusan az mTORC1 működését (Sabatini és mtsai., 1994; Laplante és Sabatini, 2009).

Az mTOR-függő megközelítések közé tartozó rapamycin és a jobb vízoldékonysággal rendelkező rapamycin észter (CCI-779 avagy Temsirolimus) több különböző modellben sikeresen csökkentette a HD-ra jellemző patológiákat (Ravikumar és mtsai., 2002; Ravikumar és mtsai., 2004; Berger és mtsai., 2006; Sarkar és mtsai., 2008).

A metformin, mely a 2-es típusú cukorbetegség kezelésére használt gyógyszer, az AMPK-n keresztül gátolja az mTOR-t és aktiválja az ULK1-t, így részben mTOR-függő, részben mTOR-független módon fokozza az autofágiát, és javítja a HD modellekben megfigyelhető patológiás elváltozásokat (Ma és mtsai., 2007; Vazquez-Manrique és mtsai., 2016) Szintén az AMPK-n keresztül hat az Onjisaponin B (Wu és mtsai., 2013) és egy reverzibilis AMPK-

aktivátor, az A769662, melyek javítják a HD patológiákat modell sejtekben (Walter és mtsai., 2016).

A rapamycin bár citoprotektív, hátránya, hogy sok mellékhatással bír (immunszuppresszáns tulajdonságát transzplantációk alkalmával ki is használják), mivel az mTOR nagyon sok fontos sejtes funkciót szabályoz (Abraham és Wiederrecht, 1996; Kahan, 1997; Laplante és Sabatini, 2009; Laplante és Sabatini, 2012; Fantus és mtsai., 2016). Ráadásul az mTOR érintettsége a HD-ban valószínűleg komplex, az aktivitásának fokozásával is megfigyeltek már pozitív hatást egér HD modellben (Lee és mtsai., 2015). Ezért az mTOR-gátlók használata valószínűleg nem ideális. Különösen igaz ez a neurodegeneratív betegségek esetében, amelyeknél hosszantartó gyógyszeres kezelés szükséges (Sarkar és mtsai., 2007b).

Az mTOR-tól független megközelítéseként több különböző tulajdonságú molekulát vizsgáltak már. Szintén az FDA által jóváhagyott készítmény a rilmenidin és a klonidin, melyeket magas vérnyomás kezelésére használnak, és a cAMP szint csökkentése révén fokozzák az autofágiát (Williams és mtsai., 2008). A klonidint *Drosophila* és zebrahal HD modellekben tesztelték, és javította a vizsgált patológiákat (Williams és mtsai., 2008). A rilmenidin javítja a HD modell egerek motoros funkcióit és csökkenti a mutáns HTT mennyiségét, de nem tudja meggátolni a súlyvesztést és nincsen pozitív hatással az élettartamra (Rose és mtsai., 2010).

A verapamil kalcium-antagonista, gátolja a kalcium bejutását a sejtbe, és szintén vérnyomáscsökkentő, értágító hatású. A valproát egy antiepileptikum és az IP₃ szint csökkentése révén fokozza az autofágiát (Sarkar és mtsai., 2005). A klonidinhez hasonlóan a verapamil és a valproát is csökkentette a neurodegenerációt *Drosophila* és zebrahal HD modellekben (Williams és mtsai., 2008). A HD-ban megnövő intracelluláris kalciumszint egyik következménye a kalpainok fokozott aktiválódása (a kalpainok Ca-függő nem lizoszomális cisztein proteázok) (Gafni és Ellerby, 2002). A kalpainok közvetlen gátlása kalpasztatinnal vagy calpeptinnel fokozza az autofágiát. Ennek oka az lehet, hogy a kalpainok egyik szubsztrátja egy heterotrimer G-fehérje α alegysége (G α), amely adenil cikláz aktivitással bír, és az aktivitása (így a cAMP képződése) fokozódik a kalpaionok hasítását követően (Williams és mtsai., 2008; Menzies és mtsai., 2015). A kalpasztatin túltermeltetése csökkenti a mutáns HTT mennyiségét, és javítja a motoros funkciókat egér HD modellben (Menzies és mtsai., 2015).

Trehalóz egy chaperonként is ható, gerincesekben endogén módon nem képződő, nem redukáló diszacharid, amely az mTOR-tól függetlenül a glükóztranszporterek gátlása révén aktiválja

az autofágiát. Neuroprotektív hatású különféle HD modellekben, és csökkenti a mutáns HTT mennyiségét és annak toxicitását, és javítja a HD betegekből származó fibroblasztok működését (Tanaka és mtsai., 2004; Sarkar és mtsai., 2007a; Fernandez-Estevez és mtsai., 2014; DeBosch és mtsai., 2016; Perucho és mtsai., 2016). Egérmodellben ráadásul antidepresszáns-szerű hatást figyeltek meg az alkalmazása során (Kara és mtsai., 2013), ami azért is fontos, mert a HD-ban a depresszió a leggyakoribb pszichiátriai tünet.

A cAMP, az intracelluláris kalcium, az IP₃ mennyisége vagy a glükóztranszporterek működése szintén számos folyamatra van hatással. Ezért az mTOR-tól függetlenül, de specifikusabb módon ható megközelítések szükségesek.

Az egyik lehetséges ilyen célpont a Vps34 komplex. A Tat-Beclin1 egy Beclin1 fehérjéből származó 18 aminosavból álló részlet a HIV-1 vírus Tat transzdukciós fehérjéjével fuzionálva, amely autofágiát indukál (Shoji-Kawata és mtsai., 2013). Ez a molekula a GAPR-1-hez köt (GAPR1: Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1, más néven GLIPR2) (Shoji-Kawata és mtsai., 2013). A GAPR1 a Golgi-membrán citoszolikus oldalához, annak lipidgazdag régióihoz kapcsolódik (Eberle és mtsai., 2002). A GAPR1 a Golgi-hoz köti a Beclin1-et, a Tat-Beclin1 peptid hatására azonban megváltozik a Beclin1 lokalizációja és átkerül a EEA1, a Lamp1, a WIPI2 és a PD1-pozitív struktúrákra (az utóbbi egy ER-marker) (Shoji-Kawata és mtsai., 2013). Ez vezet az autofág aktivitás fokozódásához, amely révén csökkenti egér HD modellben az aggregátumok mennyiségét (Shoji-Kawata és mtsai., 2013). De a Beclin1 tartalmú Vps34 komplexek az autofágia mellett az endocitózisban is szerepet játszanak, így feltehetően a Tat-Beclin1 nem csak az autofágiára hat, hanem az endocitózisra is - ahogyan szintén erre utal a Beclin1 kolokalizációja az EEA1-gyel (amely korai endoszóma marker) és LAMP1-gyel (amely késői endoszóma- és lizoszóma marker).

Az L-NAME egy NOS inhibitor, mely komplex módon hat az autofágiára, részben a Vps34-en keresztül fokozza azt. Ugyanakkor a HD modellekben kapott eredmények ellentmondások (Deckel és mtsai., 2001; Sarkar és mtsai., 2011).

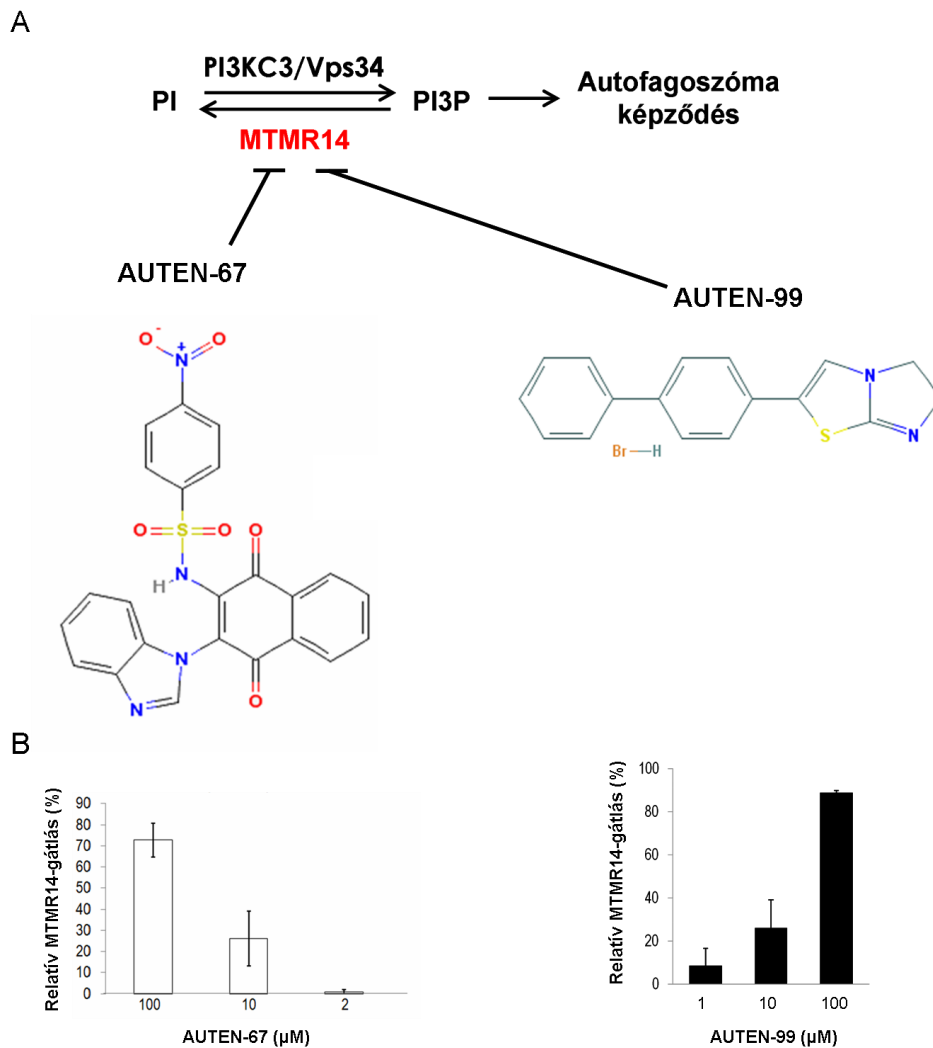
Az mTOR-tól függetlenül vagy tőle *downstream* hatnak egy élesztő *screen*-ből származó kis molekulatömegű *enhancerek* (*small-molecule enhancer* - SMER). Ezek a molekulák csökkentik a mutáns HTT mennyiségét, illetve a fotoreceptorok degenerációját *Drosophila* HD modellben (Sarkar és mtsai., 2007b).

Egyelőre ismeretlen hatásmechanizmusú autofág aktivitást növelő természetes vegyületek közé tartozik az epigallokatekin-gallát (EGCG), egy catechin típusú polifenol, mely legnagyobb mennyiségben a zöld tea levelében található. Fokozza az autofágiát és ezen hatásán keresztül csökkenti a mutáns HTT toxicitását különböző HD modellekben (Ehrnhoefer és mtsai., 2006; Huang és Adachi 2016). A borbolyákban és rokonaikban előforduló berberin szintén egyelőre nem ismert módon fokozza az autofág aktivitást, és egér- illetve sejtes HD modellben javította a mutáns HTT akkumulációját, a motoros funkciókat és növelte az élettartamot (Jiang és mtsai., 2015).

Az autofágia fokozása az Atg14-tartalmú, autofágiára specifikus Vps34 komplex működésén keresztül

Az AUTEN-67 és AUTEN-99 (autophagy enhancer-67 és -99) kismolekulák egy olyan szűrővizsgálatból származnak, melyet azzal a céllal végeztek el, hogy olyan új hatóanyagokat azonosítsanak, amelyek célzottan, közvetlenül és specifikusan fokozzák az autofág aktivitást: ezzel a céllal kerestek MTMR14-gátlókat (7A ábra) (Papp és mtsai., 2016; Kovács és mtsai., 2017). A két molekula a Velgene Three Kft. tulajdona, és szabadalmi bejegyzés alatt állnak. Az MTMR14 (Myotubularin related 14, más néven (h)Jumpy vagy MIP) a myotubularinok családjába tartozó lipidfoszfatáz, és az autofágia iniciációjának egyik kulcslépésével, a Vps34 kináz komplex által katalizált $PI \rightarrow PI3P$ reakcióval ellentétes folyamatot katalizál (4. és 7A ábra). Az MTMR14 gátolja a bazális és az éhezéss indukált autofágiát HeLa sejtekben és humán makrofágokban. A géncsendesítése fokozza a PI3P-effektor WIPI1 és az Atg9-tartalmú vezikulák toborzását az izoláló membránhoz, ezáltal serkenti az autofagoszómák képződését, érését és magát a lebontást (Vergne és mtsai., 2009). A géncsendesítése vagy mutációja egér embrionális fibroblasztokban és egér vázizomban is az autofág aktivitás fokozódását eredményezi (Hnia és mtsai., 2012; Liu és mtsai., 2014). Ráadásul az MTMR14 humán makrofágokban nem kolokalizál a korai endoszóma marker EEA1-gyel (Vergne és mtsai., 2009). Ez az sejteni, hogy - legalábbis azokban a sejtekben - az MTMR14 az UVRAG-ot tartalmazó II-es Vps34 komplexnek nem antagonistája, míg az ATG14-tartalmú, I-es Vps34 komplexnek igen, azaz csak az autofág membránokon jelenlevő PI3P defoszforilálását végzi, a korai endoszómán jelenlevőt nem. Az AUTEN-67 és az AUTEN-99 koncentráció-függő módon gátolja az MTMR14 foszfatáz aktivitását *in vitro* (7B ábra) (Papp és mtsai., 2016; Kovács és mtsai., 2017).

Kutatócsoportunkban már korábban elkezdtek az *MTMR14 Drosophila* ortológjának, az *EDTP*-nek (*Egg-derived tyrosine phosphatase*) funkcionális jellemzését és autofájiára gyakorolt hatásának vizsgálatát. Ezen eredményeket majd Manzéger Anna doktori értekezéséből lehet megismerni. Az AUTEN-67 és -99 autofájiára gyakorolt hatásának vizsgálatát emlős



7. ábra. Az AUTEN-67 és AUTEN-99 kismolekulák gátolják az MTMR14-et. (A) Az autofágia iniciációjának egyik kulcslépése a foszfatidilinozitol (PI) - foszfatidilinozitol 3-foszfát átalakulás, melyet a PI3K3/Vps34 kináz katalizál. E folyamat antagonistája a myotubularin családba tartozó MTMR14 (Myotubularin related 14), melynek gátlása révén az AUTEN-67 és AUTEN-99 kismolekulák képesek fokozni az autofagoszóma képződést és az autofág lebontást. (B) Az AUTEN-67 és az AUTEN-99 *in vitro* koncentrációfüggő módon gátolja az MTMR14 foszfatáz aktivitását. Papp és mtsai., 2016; Kovács és mtsai., 2017 nyomán, a szerző által módosítva

sejtkultúrákon Dr. Papp Diána, Dr. Schlett Katalin, Dr. Tárnok Krisztián és Liliom Hanna végezte. Mi e molekulák hatását jellemeztük *in vivo*, *Drosophila melanogaster* modellorganizmusban, és vizsgáltuk Parkinson- és Huntington-kór modellállatokon, hogy vajon képesek-e a neurodegeneratív folyamatok hatásait csökkenteni. A doktori értekezésemben a munkánk azon részét mutatom be, amely során az AUTEN-67 és az AUTEN-99 hatását vizsgáltuk

Drosophila HD modellben. A többi *Drosophila*-kísérlet eredménye Kovács Tibor értékezésének tárgyát képezi.

Az ecetmuslica (Drosophila melanogaster) mint HD modell

Az ecetmuslica - *Drosophila melanogaster* - egy általánosan használt genetikai modellállat, melynek kutatása több mint száz éves múltra tekint vissza. Ennek köszönhetően széles genetikai eszköztár került már kifejlesztésre a *Drosophila* genetikusok jóvoltából, amely többek között magában foglalja a transzgének célzott, sejt-, szövet- vagy szervspecifikus kifejeztetését is. A bináris UAS-Gal4 rendszer mindkét eleme élesztőből (*Saccharomyces cerevisiae*-ből) származik, az egyik az UAS (*upstream activating sequence*) cisz elem, a másik a Gal4 transzkripció faktor. A Gal4 az UAS elemhez kapcsolódva képes az UAS-től *downstream* elhelyezkedő gén (pl. transzgén vagy riportergén) transzkripcióját aktiválni. Ma már több mint hétezer különböző promóterrel rendelkező Gal4-et hordozó transzgenikus muslicatörzs áll a kutatók rendelkezésére, amellyel szinte tetszés szerinti sejtben, szervben, szövetben lehet irányított génextpressziót indukálni. Az UAS-Gal4 rendszer hőmérsékletfüggést mutat, a Gal4 DNS kötési optimuma 29°C (vagyis az UAS-Gal4 rendszer 29°C-on a leghatékonyabb) (Duffy, 2002; Lewis és Smith, 2015).

A *Drosophila*-t széleskörűen használják különböző neurodegenerációs betegségek modellezéséhez is (Fernandez-Funez és mtsai., 2015; Lewis és Smith, 2015; McGurk és mtsai., 2015; Sun és Chen, 2015; Xu és mtsai., 2015; Krench és Littleton, 2017). A HD-t illetően a *Drosophila* modell rekapitulálja a HD patológiai tulajdonságainak nagy részét, ráadásul a patológiához hozzájáruló egyes mechanizmusok jobb megismerését is lehetővé teszi. Ebben a rendszerben kiváló lehetőség rejlik a terápiás megközelítések, hatóanyagok és gyógyszerjelölt molekulák vizsgálatára (Marsh és mtsai., 2003; Lewis és Smith, 2015; Xu és mtsai., 2015; Krench és Littleton, 2017).

Neurodegeneráció

Az első *Drosophila* HD modellt közel húsz évvel ezelőtt hozták létre. Az emberi HTT N-terminális fragmentumának a felhasználásával készült, az első 142 aminosavat kódolták a transzgének (HTT¹⁻¹⁴²) rövid (2Q), illetve abnormális hosszúságú (75Q illetve 142Q) patogén polyQ szakasszal. GMR promóterű (a fotoreceptorokban és a fejlődő összetett szem járulékos

sejtjeiben vezet kifejeződéshez) konstrukciók vizsgálatával megállapították, hogy az abnormálisan hosszú polyQ szakaszt tartalmazó mutáns HTT a fotoreceptorok progresszív neurodegenerációjához vezet, míg a rövid polyQ szakaszt tartalmazó transzgén nem vezetett ezen idegsejtek pusztulásához (Jackson és mtsai., 1998). A neurodegeneráció minden más vizsgált *Drosophila* HD modellben is megfigyelhető (Xu és mtsai., 2015).

Aggregátumképződés

A mutáns HTT nem csak neurodegenerációhoz vezet *Drosophila* HD modellekben, hanem képes aggregálódni is, az aggregátumok léte, mérete és lokalizációja pedig függ a fragmentum, a csonkolt mutáns HTT méretétől.

Mivel a HTT-ben a polyQ szakasz az első exonban van, és az N-terminushoz nagyon közel helyezkedik el, és mind betegekből származó mintákban, mind az állati modellekben sokféle N-terminális mutáns HTT fragmentum figyelhető meg a proteolitikus hasítások következtében, ezért sok vizsgálatban nem vagy nem csak az egész (teljes hosszúságú) mutáns HTT fehérjét fejeztetik ki, hanem valamekkora N-terminális fragmentumot. A normális hosszúságú polyQ szakasszal bíró kontroll fehérje főleg citoplazmatikus lokalizációt mutat, nem aggregálódik és nem citotoxikus. Ezzel szemben a hosszú polyQ szakaszt tartalmazó HTT fehérjék vagy fehérjefragmentumok toxicitást mutatnak, de a hatásuk jelentősen különbözik egymástól. A teljes hosszúságú 128 ismétlődést tartalmazó (128Q) HTT csak citoplazmatikus lokalizációt mutat, nem képez aggregátumokat a neuronokban, és csak későn megjelenő neurodegenerációhoz vezet (Romero és mtsai., 2008). Ha csak az első exon kerül kifejeződésre (pl. 46Q vagy 93Q), akkor citoplazmatikus aggregátumok figyelhetőek meg, és a 93Q esetén súlyos degeneráció is (Zhang és mtsai., 2010). A HTT első 136 aminosavát tartalmazó, 128 hosszúságú polyQ ismétlődést tartalmazó változata főleg sejtmagi aggregátumokat képez (Branco és mtsai., 2008; Romero és mtsai., 2008). Hét természetesen előforduló HTT fragmentum vizsgálata során (mindegyik 120Q) az nyert megállapítást, hogy a legrövidebb fragmentum a leginkább toxikus és a leginkább aggregációra hajlamos, és mindkét tulajdonság mértéke csökken a fragmentum méretének növekedésével (Barbaro és mtsai., 2015).

Az axonális transzport zavara

Axonális szállítás is sérül a *Drosophila* HD modellekben. A lárvális motorneuronokban vad típusú és rövid polyQ-szakaszú transzgént kifejező kontroll állatokban a szinaptikus vezikulák és más organellumok hatékonyan szállítódnak a neuromuszkuláris kapcsolat (junkció) felé. Ugyanakkor hogyha egy olyan, citoplazmatikus aggregátumokat képző HTT fragmentum fe-

jeződik ki, amely az első 548 aminosavat tartalmazza (és 128Q-t: 128Q-HTT¹⁻⁵⁴⁸), akkor az nagymértékben gátolja az organellemek axonmenti szállítását, és axonduzzadáshoz vezet. Az érintett lárvák mozgása lelassul, jelezve a motorneuron működésében beálló zavart (Gunawardena és mtsai., 2003; Lee és mtsai., 2004).

Motoros funkciók romlása

A lárvák mozgásának változásán túl a felnőttek motoros képességei is csökkennek. Az egyik könnyen tesztelhető motoros tulajdonság a felnőttek mászó képessége, amely a többi patológiai tulajdonsághoz hasonlóan progresszív (Marsh és mtsai., 2003). A mutáns HTT a mászó-képesség romlása mellett csökkent repülési képességet is eredményez (Romero és mtsai., 2008).

Fokozott neurotranszmisszió és megemelkedett kalcium-szint

A 128Q-HTT¹⁻⁵⁴⁸ HD modellben fokozott neurotranszmissziót lehet tapasztalni (Lee és mtsai., 2004), de az axonális transzport károsodása is jellemző. Ezért nem lehetett tudni, hogy a fokozott neurotranszmisszió ok vagy okozat. Az ugyanakkora polyQ-szakaszt tartalmazó, de teljes hosszúságú HTT fehérje (128Q-HTT^{FL}) jelenléte is fokozott neurotranszmisszióhoz vezet, még bármiféle látható neurodegeneráció előtt (Romero és mtsai., 2008). A vizsgált lárvális neuronokban nem volt megfigyelhető sem citoplazmatikus zárvány, sem sejtmagi zárvány, sem az axonális transzport zavara, ellenben rendellenesen magas volt a preszinaptikus Ca²⁺-szint (Romero és mtsai., 2008). A preszinaptikus Ca²⁺-szint csökkentésével javítani lehetett az ingerületátviteli rendellenességen és a neurodegeneráción. Ez azt sugallja, hogy a preszinaptikusan abnormálisan magas Ca²⁺-szint vezet a fokozott neurotranszmisszióhoz (Romero és mtsai., 2008). HD betegekben és egérmodellekben is abnormális kalciumszint figyelhető meg, amely valószínűleg egy korai patológiai jelenség (Raymond, 2017).

Transzkripció megváltozása

HDAC (hisztondeacetiláz) farmakológiai vagy genetikai gátlása javítja a *Drosophila* HD modell patológiai tulajdonságait, így a HDAC érintettsége révén elképzelhető, hogy a transzkripció szabályozása is felborul *Drosophila* HD modellben is (Steffan és mtsai., 2001).

Csökkent élettartam

Az abnormális hosszúságú polyQ szakaszt tartalmazó mutáns HTT-t kifejező állatok rövidebb ideig élnek, mint a kontroll egyedek. A mutáns HTT tehát megrövidíti az élettartamot

Drosophila HD modellekben is (Marsh és mtsai., 2003; Lee és mtsai., 2004; Romero és mtsai., 2008).

Jelenleg a Huntington-kór gyógyíthatatlan, illetve a tüneti kezelések is mérsékelten hatékonyak viszonylag sok mellékhatással (Wyant és mtsai., 2017). Ezért mind a mai napig igen fontosak azok a farmakológiai kísérletek, amelyek a Huntington-kór gyógyítását és a tünetek enyhítését célozzák. A *Drosophila* HD modellek jól megjelenítik a HD számos patológiai tulajdonságát, így hatóanyagok, potenciális gyógyszermolekulák tesztelésére kiválóan alkalmas az emlősmodellek előtt.

A fentebb említett autofágia-fokozó molekulák közül a rapamycin (Ravikumar és mtsai., 2004), a klonidin, a verapamil, a valproát (Williams és mtsai., 2008), egy élesztő genetikai szűrővizsgálatból származó három kis molekulatömegű enhancer (Sarkar és mtsai., 2007b) és az EGCG (Ehrnhoefer és mtsai., 2006) bír jótékony hatással *Drosophila* HD modellekben.

A neurodegeneráció mértékét csökkenti továbbá a polyQ oligomerek növekedését gátló kongóvörös (Apostol és mtsai., 2003; Takahashi és mtsai., 2008), az Alzheimer-kórban szenvedők esetében is ígéretes metilénkék (Sontag és mtsai., 2012) és egy szerves diszulfid, a transzglutamináz inhibitor cisztamin (Apostol és mtsai., 2003). Szintén neuroprotektívnek bizonyult a SAHA (*suberoylanilide hydroxamic acid*) és a butirát hisztondeacetiláz gátlók alkalmazása (Steffan és mtsai., 2001). Hasonló pozitív eredményekhez vezetett az Y-27632, amely egy ROCK gátló és rajta keresztül a sejtvázszerveződésre hat (Pollitt és mtsai., 2003), és egy HSP90 gátló, a geldanamycin alkalmazása (Agrawal és mtsai., 2005). Mesterségesen tervezett peptidalapú mutáns HTT-gátlók szintén csökkentették a fotoreceptorok degenerációját (Kazantsev és mtsai., 2002; Nagai és mtsai., 2003). Kombinációk vizsgálata is történt azzal a céllal (pl. a cisztamin, a kongóvörös és a SAHA esetében), hogy alacsonyabb koncentrációban lehessen használni az egyes összetevőket, és így csökkenteni lehessen az egyes komponensek által okozott mellékhatásokat (Agrawal és mtsai., 2005). Amennyiben a HTT-specifikus ellenanyaggal kombinálták a cisztamin hatását, az tovább fokozta a neuroprotektív hatást (Bortvedt és mtsai., 2010).

A *Drosophila* az autofágia-alapú kutatásokra is kiválóan alkalmas modell, a sokrétű és széleskörűen tesztelt és alkalmazott módszerek miatt, valamint azért, mert az ecetmuslicában és az emlősökben lejátszódó makroautofágia igen sok hasonlóságot mutat (Chang és Neufeld, 2010;

Mauvezin és mtsai., 2014; Mulakkal és mtsai., 2014; Nagy és mtsai., 2014b). Ráadásul a HTT/Htt szelektív autofágiában betöltött szerepe is legalább részben konzervált az emlősök és a *Drosophila* között (Rui és mtsai., 2015). Mivel a *Drosophila* HD modellek rekapitulálják a(z emberi) HD patológiai tulajdonságainak jelentős részét, és kiválóan alkalmas autofágia-alapú kutatásokra és gyógyszerjelölt molekulák tesztelésére, így az autofágiát fokozó kismolekulák - mint amilyen az AUTEN-67, és az ATUEN-99 - Huntington-kórra kifejtett hatásának kezdeti vizsgálatára is alkalmas modell.

Célkitűzések

A Huntington-kór (HD) egy súlyos, gyógyíthatatlan neurodegeneratív betegség. A különböző HD modellekben az autofág aktivitás genetikai vagy farmakológia fokozása neuroprotektív hatású. Azonban az eddigi autofágia aktiváló megközelítések célpontjai a központi autofág apparátustól *upstream* és/vagy távol ható szabályozó fehérjék, amelyek nem csak az autofágiára hatnak, hanem számos más sejtbiológiai folyamatra is. Így e megközelítések jelentős mellékhatás-kockázatokkal bírnak.

Az autofágia iniciáció egyik antagonistája az MTMR14. Célunk az MTMR14 gátlásán keresztül ható AUTEN-67 és AUTEN-99 autofágia-fokozó kismolekulák hatásának vizsgálata volt *Drosophila melanogaster* Huntington-kór modellben. Konkrét céljaink:

1. A táplálékkal felvett gyógyszerjelölt molekulák képesek-e a felnőtt állatok agyában is fokozni az autofágiát (ahogyan az a lárvák/lárvális zsírtest esetén elmondható).
2. Pozitív eredmény esetén célunk volt a gyógyszerjelölt molekulák
 - autofágiára gyakorolt hatásának elemzése az autofág receptor Ref(2)P/p62 és az ubiquitinált fehérjék vizsgálatával
 - motoros funkciókra gyakorolt hatásának vizsgálata (mászó- és repülési képesség tesztelése)
 - mutáns HTT mennyiségére kifejtett hatásának vizsgálata
 - élettartamra gyakorolt hatásának vizsgálata

a nem patogén 16Q-HTT-t és a patogén 128Q-HTT-t kifejező HD modellállatokban.

Anyagok és módszerek

A használt *ecetmuslica* törzsek és tartásuk

Az *ecetmuslica* törzsek fenntartása, illetve a velük végzett genetikai munka, keresztezések egyaránt 18°C-25°C-os környezetben történtek. A kísérletek során a maximális UAS-Gal4 hatékonyság végett 29°C-on tartottuk az állatokat. A hagyományos agar-kukoricaliszt-cukor-élesztő tartalmú táptalajok egyikét használtuk a munkánk során, melynek összetétele és elkészítése a következő:

Egy liter táptalaj főzéséhez

- 66,85g kukoricalisztet,

- 32,59g cukrot,

- 10g agart,

- 26g élesztőt használunk.

Miután ezt összemértük, 1 liter hideg vizet adunk hozzá, jól összekeverjük, és mikrohullámú sütőben 17-20 percig főzzük (800W), közben másfél-két percenként csomómentesre keverjük. A kész táptalajt 20 percig hűlni hagyjuk, majd (amikor már kb. csak 60°C-os) 10ml 25%-os (m/V) nipagin (4-hidroximetil-benzoát) 96%-os etanollal alkotott oldatát adjuk hozzá. Ezt követően adagoljuk a táptalajt az üvegfiolákba, kb. 4-7 ml-t csövenként.

Az alábbi *ecetmuslica* törzseket használtuk: w^{1118} (BL5905), *Appl-Gal4*, y^l , w^* (BL32040), w^{1118} ; *Ddc-Gal4* (BL7009), w^{1118} ; *UAS-16Q-HTT/CyO* (BL33810), w^{1118} ; *UAS-128Q-HTT* (BL33808) - ezeket a bloomingtoni törzsközpontból (Bloomington Drosophila Stock Center) rendeltük. Az autofág struktúrák vizsgálatához használt *UAS-mCherry-Atg8a*-t (Chang és Neufeld, 2009) Dr. Juhász Gábor (ELTE, Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék) bo-csátotta rendelkezésünkre.

Hatóanyag-kezelések

A felnőtt állatok kezeléséhez az AUTEN-67-et, illetve az AUTEN-99-et DMSO-ban (Sigma, D8418) oldottuk majd élesztősuszpenzióhoz adtuk (az élesztősuszpenzió 2 g szárított élesztő és 10 ml víz felhasználásával készült) úgy, hogy az AUTEN-koncentráció a végtérfogatra

számítva a kívánt mértékű (pl. 50, 100 vagy 200 μM -os) legyen. Kontrollként mindig az adott kezeléshez alkalmazott DMSO-val megegyező térfogatú DMSO-t kevertünk az élesztősuszpenzióba. Az így készült élesztősuszpenziókat szétosztottuk (1-1,2 ml-enként) és lefagyasztottuk, -20°C -on tároltuk az adott kísérlet végéig.

A vizsgálataink során a megfelelő genotípusú (AUTEN-67-tel vagy az AUTEN-99-cel kezelni kívánt) felnőtt állatokat a bábból való kikelés után 1-11 órával a már előző nap el- és előkészített hatóanyagcsövekbe tettük: a táptalaj felszínére 65 μl AUTEN-t (vagy csak DMSO-t) tartalmazó élesztősuszpenziót adtunk, és egyenletesen eloszlattuk a felszínén. Az állatokat vizsgálattól függetlenül minden második nap tovább ráztuk új, frissen készült hatóanyagcsövekbe.

Mászóképesség vizsgálata és átlagsebesség meghatározása

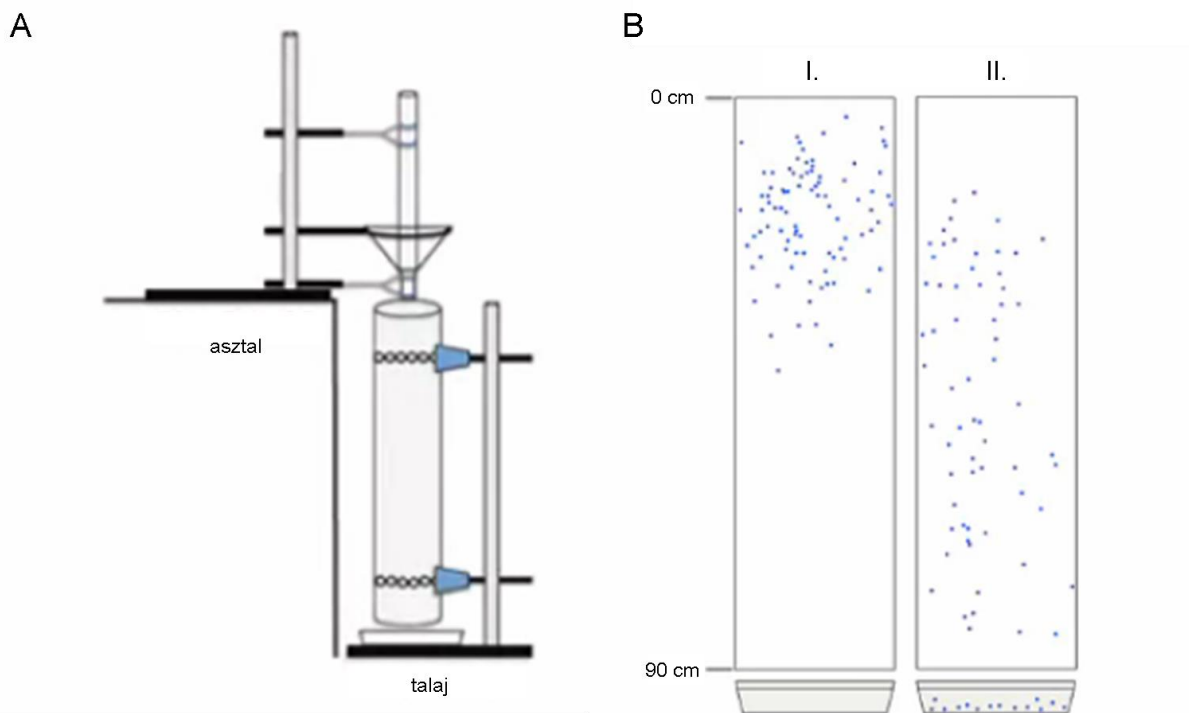
Klasszikus, „hosszútávú” mászóképeség-vizsgálathoz az állatokat tartalmazó csövekből 20-20 nőtényt választottunk ki véletlenszerűen, és ezekkel végeztük a vizsgálatot. A széndioxiddal való altatást követően egy vékony, speciálisan erre a célra gyártott üvegcsőbe (hossza 25 cm; átmérője 1,5 cm) tettük az állatokat, majd vattával bedugóztuk. Az altatást követően vártunk két órát, és ezt követően kezdtük el a mérést. Az állatokat tartalmazó üvegcső alját függőlegesen tartva finoman leütöttük ötször a csövet, így minden állat biztosan leesett a cső aljára. Erre a hatásra az állatok negatív geotaxissal válaszolnak, és elkezdenek fölfelé mászni az üvegcső falán (a csőben a hely szűkössége nem kedvez a repülésnek). Az állatokat megfigyelve feljegyeztük, hogy 20, 40 illetve 60 mp alatt hány állat ért fel a cső tetejére (hány állat érte el a 21,8 cm magasan levő vonalat). Minden esetben 3-6 párhuzamossal dolgoztunk, és háromszor ismételtük meg a kísérleteket (20 perces szüneteket beiktatva).

„Rövidtávú” mászóképeség-vizsgálat és átlagsebesség meghatározása során az állatok mászóképeségét egy másik rendszerben vizsgáltuk. A vizsgálatra szánt állatokat tartalmazó csövekből 10-10 nőtényt véletlenszerűen kiválasztottunk és széndioxid-dal való altatást követően egy 9 cm magas, 2,2 cm széles üvegcsőbe, a fenntartásokhoz is használt üvegfiolába tettük őket. Az altatást követő felépülési idő leteltével az állatokat tartalmazó fiolákat egyszer finoman de határozottan leütöttük, hogy az állatok leessenek a fiola aljára. Az állatok erre a hatásra ez esetben is negatív geotaxissal válaszolva elindultak fölfelé az üvegfalon. A vizsgálatot videóra vettük, a felvételeket vizsgálva megállapítottuk, hogy melyik állat mennyi idő alatt (hány másodperc, hány tizedmásodperc alatt) érte el az 5 cm magasságban levő vonalat. Az így kapott adatokat többféleképpen elemeztük. Egyrészt megállapítottuk, hogy a 10-ből hány

állat érte el 10 illetve 20 mp alatt az 5 cm magasságban levő vonalat, illetve megbecsültük az állatok átlagsebességét (egyenes vonalú mozgásként kezelve a mászásukat). Minden esetben 3 párhuzamossal dolgoztunk és háromszor ismételtük meg a kísérleteket (20 perces szüneteket beiktatva).

Repülésvizsgálat

Az állatok repülésének vizsgálatához egy 11 cm átmérőjű, 97 cm hosszú hengert használtunk, melybe egy kartonlapot helyeztünk, melynek belső oldalát rovarcsapda ragasztóval dekoráltuk előzőleg. 20 nőstény állatot tartalmazó csöveket egy tölcsér és egy keskeny cső segítségével beleráztunk a függőlegesen álló hengerbe (8A ábra), majd a ragasztós 90 cm hosszú kartonlapot kiszedve és kiterítve megállapítottuk, hogy az egyes állatok a kiinduláshoz képest hány cm-t megtéve ragadtak bele a ragasztós kartonlapba, azaz mekkora utat tettek meg a levegőben (8B ábra). Az így megtett út fordítottan arányos a repülési képességgel, minél jobb az adott állat repülési képessége, annál hamarabb szárnyra kap (Babcock és Ganetzky, 2014). Az eredményeket a repülési index származtatott mennyiséggel mutattuk be, az állatok zuhanással megtett távolságát kivontuk a vizsgált teljes távolságból (mm-ben) és 100-zal osztottuk, hogy a kapott érték 0 és 9 közé essen. Az állatok egy része egyáltalán nem kapott szárnyra. Ezek az állatok belezuhantak a henger alatt elhelyezett paraffinolaj tartalmú tálba, amelyben szintén megszámlálhatóak voltak a teljesen röpképtelennek bizonyuló állatok. 3-3 párhuzamost használtunk, és a legjobban repülő 33 állat eredményét jelenítettük meg a vizsgált 60-ból, mert legalább 33 minden esetben szárnyra kapott.



8. ábra. A repülésvizsgálathoz használt berendezés és egy a vizsgálat során kapható eredmény sematikus rajza. (A) Az állatok repülésének vizsgálatához egy 11 cm átmérőjű, 97 cm hosszú hengert használtunk, melybe egy kartonlapot helyeztük, melyet rovarcsapda ragasztóval dekoráltunk belülről. Az állatokat tartalmazó csövet egy tölcser és egy keskeny cső segítségével beleráztunk a függőlegesen álló hengerbe. Az esetünkben a tölcser alja beleért a hengerbe (az ábrán feltüntetettel ellentétben). (B) Az állatok által a csőben zuhanással megtett út fordítottan arányos a repülési képességgel. A hengerből kiszedett majd kiterített kartonlapon megállapítható, hogy hány cm-t tett meg a kiindulástól (a tölcser aljától) minden egyes állat zuhanva a hengerben, mielőtt szárnyra kapva belerepült volna a hengert bélelő ragasztóval ellátott kartonpapírba. Az I. törzs jobb repülési képességgel rendelkezik, mint a II. törzs. Rosszabb repülési képesség esetén az állatok egy része egyáltalán nem képes szárnyra kapni, és belezuhannak a henger alá helyezett paraffinolaj tartalmú tálba. Babcock és Ganetzky, 2014 nyomán, a szerző által módosítva

Élethosszmérés

Nőstény állatok élettartamát határoztuk meg. 5-11 párhuzamost használtuk, csőenként 20-30 nősténnyel és kb. ötödanni hím egyeddel (hogy megtermékenyítsék a nőstényeket). Minden nap feljegyeztük az aznapra elpusztult állatok számát.

Mikroszkópia

A szemikonfokális fluoreszcens felvételeket Zeiss Axioimager Z1 *upright* mikroszkóppal (Plan-NeoFluar 10x 0,3 NA, Plan-NeoFluar 20x 0,5 NA és Plan-Apochromat 63x 1,4 NA objektívekkel) szemikonfokális ApoTome feltétellel készítettük az AxioVision 4.82 program segítségével.

A mintaelőkészítés az autofágia felnőtt agyban való mikroszkópos vizsgálatához

Felnőtt agyakat PBS-ben boncoltuk (Sigma, P4417), majd glicerin-PBS 4:1 arányú oldatával fedtünk, amely a sejtmagok jelöléséhez sejtmagfestéket, Hoechst 33342-t (0,1 mg/ml, Molecular Probes, H-1399) is tartalmazott.

Immunhisztokémia

A felnőtt állatokat lefejeztük, majd eltávolítottuk a szájszervet és a feji kutikulát felnyitottuk PBS-ben olyannyira, hogy az eljárás folyamán használt oldatok zavartalan áramlása biztosítva legyen. A mintákat 400 µl 4%-os formaldehidben (PBS-ben oldott) fixáltuk egy éjszakán át, 4°C-on, ezután háromszor 20 percig mostuk 400µl PBT-ben (PBT: olyan PBS, amely 0,1%-ban Tween 20-t is tartalmaz). Ezután következett a blokkolás, amelyhez PBT-ben oldott 5%-os kecskeszérumot (Life Technologies, PCN5000) használtunk (ez a blokkoló oldat, a térfogat 400 µl - ahogyan minden további lépés esetén is), egy órán át. A kívánt elsődleges ellenanyagot blokkoló oldatban adtuk a mintákhoz, és 4°C-on inkubáltuk egész éjszakán át. Ezt követően egyszer mostunk 20 percig 5xNaCl PBS-sel és PBT-ben (szintén 20 perc). Ezt követte az újabb blokkolás (20 perc), majd a blokkoló oldatban a másodlagos ellenanyag (60 perc), két ugyanolyan mosási lépés, mint az elsődleges ellenanyag után, a sejtmagfestés PBS-ben oldott Hoechst-tel (Hoechst 33342 PBS-ben oldva, 1mM, 1:20) 6 percen át. Utána PBT-ben, majd PBS-ben mostuk a mintákat, végül PBS-sel öblítettük. A mintákat ekkor boncoltuk PBS-ben. A fedéshez ProLong Gold antifade reagenst (Molecular Probes, P36934) használtunk. Az így jelölt minták vizsgálatára legkorábban másnap kerülhetett sor. A munkánk során az alábbi ellenanyagokat használtuk:

Elsődleges ellenanyagok

- anti-Ref(2)P, nyúlban termeltetett, 1:200 (Pircs és mtsai., 2012)
- anti-polyQ, egérben termeltetett, 1:100 Merck, MAB1574
- anti-Ubi, egérben termeltetett, 1:500, Merck, ST1200

Másodlagos ellenanyagok:

- anti-nyúl Alexa Fluor 488, 1:500 (Life Technologies, A11008)
- anti-egér Texas Red, 1:500 (Life Technologies, T862)

Fehérjeizolálás és western blot analízis

A western blot kísérletekhez a fehérjét az állatok fejéből izoláltuk, hét fejet használva egy technikai párhuzamozáshoz. A fejekhez 28,6 µl Fly lysis buffert (1% Tween20, 50mM Tris 7,5pH, 150mM NaCl, 1mM EDTA, kétszer desztillált víz, 1 proteináz inhibitor tabletta [cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail, Sigma, 11836153001]) és 28,6 µl 2x SDS mintafelvívőt (950 µl 2x Laemmli Sample Buffer [Bio-Rad #161-0737] és 50 µl β-merkaptoetanol [Reanal, 60-24-2]) adtunk. 95°C-on forraltuk 5 percen át, majd homogenizáltuk és újra forraltuk 95°C-on 5 percig. Ezt egy 5 perces centrifugálási lépés követte (8000 g), majd a felülúszó áthelyezése új eppendorf csőbe. A mintákat felhasználásáig -20°C-on tároltuk.

Western blot analízishez 5 percen keresztül forraltuk a fehérjemintákat további denaturálás végett. A géltre (mini-PROTEAN TGX precast gels, 4-20%, Biorad, 456-1093) azonos térfogatú mintákat vittünk fel (15 vagy 20 µl), a nedves blottolás nitrocellulóz membránra (Kisker Biotech, 30805150) történt. Ezt mosás követte TBST-ben (tris-buffered saline + Tween-20), majd az egy órán át tartó blokkolás, 3% tejportartalmú (Biorad, 170-6404) TBST-ben. A kívánt elsődleges ellenanyagot blokkoló oldatban adtuk a mintákhoz, és 4°C-on egész éjszakán át inkubáltuk. Ezt követően 3-szor tíz percen át mostuk TBST-ben, majd a megfelelő, alkalis foszfatáz-konjugált másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk a membránt blokkoló oldatban egy órán át. Ezt újabb háromszor tíz perces TBST-s mosás követte. Majd alkalikus foszfatáz (AP) pufferrel mostunk kétszer 5 percen át. Az előhívás NBT-BCIP (Sigma, 72091) kemilumineszcens AP szubsztrát segítségével történt.

A munkánk során az alábbi elsődleges ellenanyagokat használtuk:

- α-Tub84B, egérben termeltetett, 1:2500, Sigma, T6199
- anti-Ref(2)P, nyúlban termeltetett, 1:2500 (Pircs és mtsai., 2012)
- anti-Ubi, egérben termeltetett, 1:500, Merck, ST1200
- anti-polyQ, egérben termeltetett, 1:1000, Merck, MAB1574
- anti-HTT, nyúlban termeltetett, 1:1000, Viva Bioscience, VB3130

Másodlagos ellenanyagok:

- anti-nyúl IgG alkáli foszfatáz (1:1000, Sigma, A3687)
- anti-egér IgG alkáli foszfatáz (1:1000, Sigma, A8438)

Az elektroforézishez 1x-es fehérje futtató - *running* - puffert használtunk.

A tömény, 10x puffer összetétele 1 literre vonatkozóan:

- 30,3 g Tris bázis (Sigma, T1503-KG)
- 144 g glicin (VWR, 97061-128)

- 5 g SDS (Sigma, L-4390)
- 1 liter kétszer desztillált víz

Használat: 1x-esre hígítva

A nedves blottolás 1x transzfer pufferben történt.

A tömény 10x transzfer puffer összetétele 1 literre vonatkozóan:

- 30,3 g Tris bázis (Sigma , 1503-KG)
- 144 g glicin (VWR, 97061-128)
- 1 liter kétszer desztillált víz

Használat: 1x-esre hígítva kétszer desztillált víz metanol 8:1 arányú oldatával (kétszer desztillált víz + metanol + 10x transzfer puffer sorrendben).

AP (alkalikus foszfátáz) puffer összetétele 100 ml-re vonatkozóan:

- 10 ml 1M Tris-HCl (pH 9,5) [1 ml 6N HCl + 8 ml 1N HCl]
- 5 ml 1M MgCl₂
- 2 ml 5M NaCl
- 100 µl 20% Tween 20
- 100 ml-ig kétszer desztillált víz

A felvételek mennyiségi kiértékelése

A képek elemzéséhez, a felvételek kvantitatív kiértékeléséhez az AxioVision 4.82 és az ImageJ 1.45s (Schneider és mtsai., 2012) szoftvereket használtuk. A pontszerű struktúrák kvantifikálását *Cut View* képeken végeztük, amelyeket az AxioVision 4.82-ben állítottunk elő az egyedi 1 µm vastag optikai szeletekből *maximum intensity projection* eljárással. Az ImageJ 1.45s képelemző szoftverben sorban az alábbiakat végeztük az adott kép megnyitását követően: csatorna osztás, háttérkivonás, alapértelmezett küszöböt használtuk, vagy azt módosítottuk valamelyik irányba, ha szükséges volt, majd analizáltuk a partikulumokat.

A sejt-/régiószintű kolokalizációk, együttes előfordulások elemzése során a mikroszkópos felvételeken - szintén AxioVision 4.82 és ImageJ 1.45s szoftverek segítségével - meghatároztuk azon területek nagyságát, amelyek a piros és a zöld csatornákon is intenzíven jelölődtek, és azokét is, amelyek csak az egyik csatornán.

A western blot kísérletek eredményeként kapott képeket ImageJ-ben értékeltük ki, denzitometriai elemzést használva. Ezen utóbbi mennyiségi meghatározások nagyban függenek az expozíciós időtől, így az általuk kapott számértékek csak gyenge becsléseknek tekinthetőek.

Statisztika

Annak eldöntésére, hogy az általunk vizsgált minta normáleloszlású-e vagy sem, Lilliefors vagy Kolmogorov-Smirnov normalitás tesztet használtunk. A munkánk során csak független mintákkal dolgoztunk. Amennyiben mindkét összehasonlítandó minta normáleloszlású volt, akkor F tesztet használtunk a varianciájuk összehasonlítására. Amennyiben a varianciák megegyeztek (az F teszt eredményeül kapott $p > 0,05$), kétmintás t-próbát alkalmaztunk, ha a varianciák különböztek, akkor d-tesztet (más néven Welch-tesztet) végeztünk. Hogyha az összehasonlítandó független minták nem voltak normáleloszlásúak (legalább az egyik nem volt az), akkor Mann-Whitney U tesztet használtunk. Ezekhez a MatLab 7.12.0.635 (R2011a) vagy az RStudio 0.98.1102 programot használtuk. Amennyiben szükséges volt, Bonferroni *post hoc* korrekciót végeztünk. Az élethossz mérések során kapott túlélési görbék összehasonlítását log-rank (Mantel-Cox) tesztel végeztük, SPSS 17.0 szoftverben. Az egyes p értékekre a diagramokon különböző számú csillagokkal utaltam: *: $0,01 < p < 0,05$. **: $0,005 < p < 0,01$. ***: $p < 0,005$.

Eredmények és értékelésük

Az AUTEN-67 és -99 kismolekulák növelik az autofág struktúrák mennyiségét Drosophila felnőtt agyban

Az AUTEN-67 és -99 kismolekulák autofág aktivitásra gyakorolt hatásának lárvális zsírtestben történő sokrétű vizsgálata Kovács Tibor kollégám doktori munkájában ismerhető meg részletesen. Mind a két molekula fokozza az autofág aktivitást, és ez a hatás az EDTP-n keresztül valósul meg (*EDTP* mutáns genetikai háttérben a molekulák nem tudják fokozni az autofág lebontást) (Papp és mtsai., 2016; Kovács és mtsai., 2017).

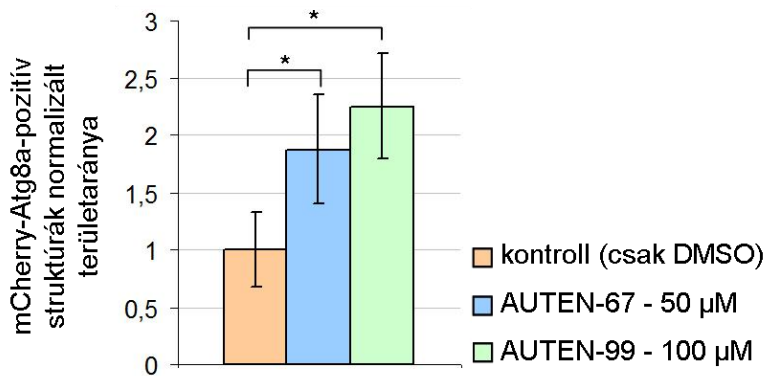
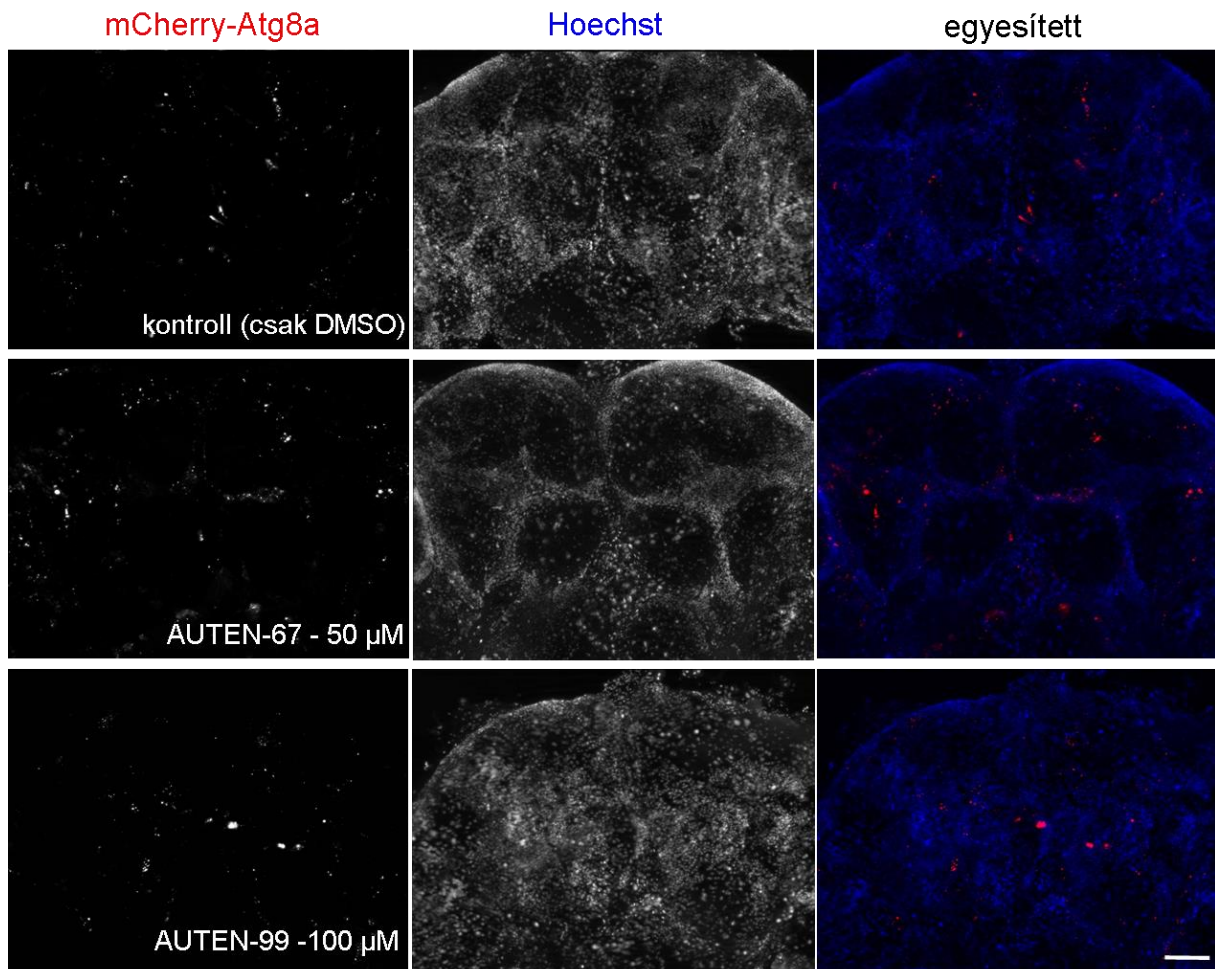
Az *EDTP* kifejeződik a felnőtt állatok agyában, mind a FlyAtlas nagy áteresztőképességű vizsgálatok eredményeit tartalmazó adatbázis szerint (Robinson és mtsai., 2013), mind Kovács Tibor, Murányi Gábor és Szinyákovics Janka volt, illetve jelenlegi kollégáim eredményei alapján. Az MTMR14 agyi expresszióját eddig csak korlátozottan vizsgálták, de a vizsgált régiókban (agykéreg, kisagy, felső halántéki tekervény) kifejeződik (Uhlen és mtsai., 2015; Kovács és mtsai., 2017), ezért az *EDTP* gátlásán keresztül ható molekulák vizsgálata az *ecetmuslica* felnőttek agyában megalapozottnak és indokoltnak tűnik.

Annak a kérdésnek az eldöntésére, hogy képes-e a két gyógyszerjelölt molekula a felnőtt agyban fokozni az autofág aktivitást, *UAS-mCherry-Atg8a* és *Ddc-Gal4* transzgéneket egyaránt hordozó hét napos állatokat vizsgáltunk. Az *mCherry-Atg8a* riporterfehérje minden autofág struktúrát megjelöl, azonban a méretből (és ezzel összefüggésben a fluorofor révén a fényességéből) fakadóan főként az autolizoszómákat teszi láthatóvá (Mauvezin és mtsai., 2014; Nagy és mtsai., 2014b). A *Ddc-Gal4* a Dopa dekarboxiláz (*Dopa decarboxylase - Ddc*) promótere révén a dopaminerg és szerotoninerg idegsejtekben fejezi ki a Gal4 fehérjét, így ezen neuronokban vizsgáltuk az autofág struktúrák mennyiségét kontroll, illetve AUTEN-67-, -99-kezelt mintákban. (A választás azért esett a *Ddc-Gal4*-re és így a dopaminerg és szerotoninerg neuronokra, mert így egyidejűleg arra a kérdésre is választ kaphattunk, hogy a *Ddc-Gal4*-vezérelt mutáns emberi Parkin fehérjét kifejező Parkinson-kór modell állatok esetében is vezethet-e

eredményre az AUTEN-67 és -99 alkalmazása. A Parkinson-kór modellen kapott eredményekről Kovács Tibor doktori értekezésében lehet olvasni.)

A vizsgált hatóanyag koncentráció (az AUTEN-67 esetében 50 μM , míg az AUTEN-99 esetében 100 μM), mindkét gyógyszerjelölt molekula esetében szignifikánsan fokozta az autofág struktúrák mennyiségét (területarányát) felnőtt agyban (9. ábra). Az általunk vizsgált két hatóanyag tehát a táplálékként szolgáló élesztőszuszpenzióval felvéve képes hatni, így érdemesnek tartottuk a molekulák HD modellállatokra gyakorolt hatásának vizsgálatát.

Az általunk választott HD modellben a patogén fehérjét az *UAS-128Q-HTT* transzgén kódolja, azaz 128Q hosszúságú poliglutamin szakaszt tartalmazó teljes emberi fehérjét kódoló transzgént hordozó állatokat használtunk. Kontrollként egy rövid, nem patogén, 16Q hosszúságú poliglutamin szakaszt tartalmazó HTT fehérjét kifejező (*UAS-16Q-HTT*) muslicákat alkalmaztunk. A nevezéktani szabályokkal összhangban *HTT/HTT* rövidítés minden esetben az emberi *Huntingtin* génre / Huntingtin fehérjére utal. Egy korábbi tanulmányban e transzgéneket a motoneuronokban expresszálandó *C164-Gal4*-gyel fejeztették ki (Romero és mtsai., 2008). A HD tünetei azonban nem korlátozódnak csak a motoros idegrendszerre, a kognitív képességek hanyatlása és pszichiátriai kórképek is jellemzőek a betegekre, ezért egy szélesebb expressziójú Gal4-gyel, a pánneurális *Appl-Gal4*-gyel vezéreltük a transzgének expresszióját, amely a látólebenyek kivételével a teljes protocerebrumban kifejeződik (Torroja és mtsai., 1999).

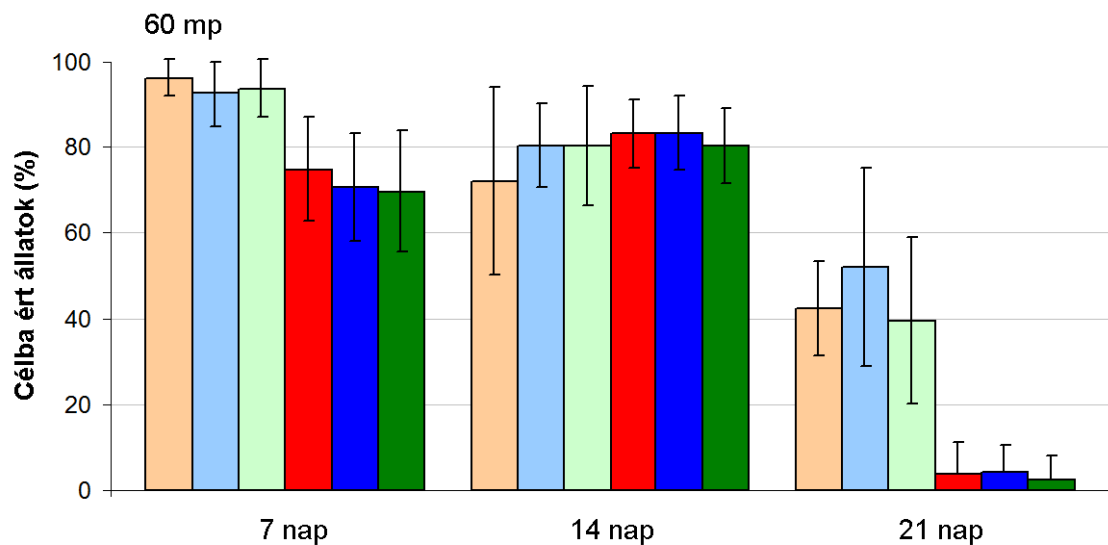
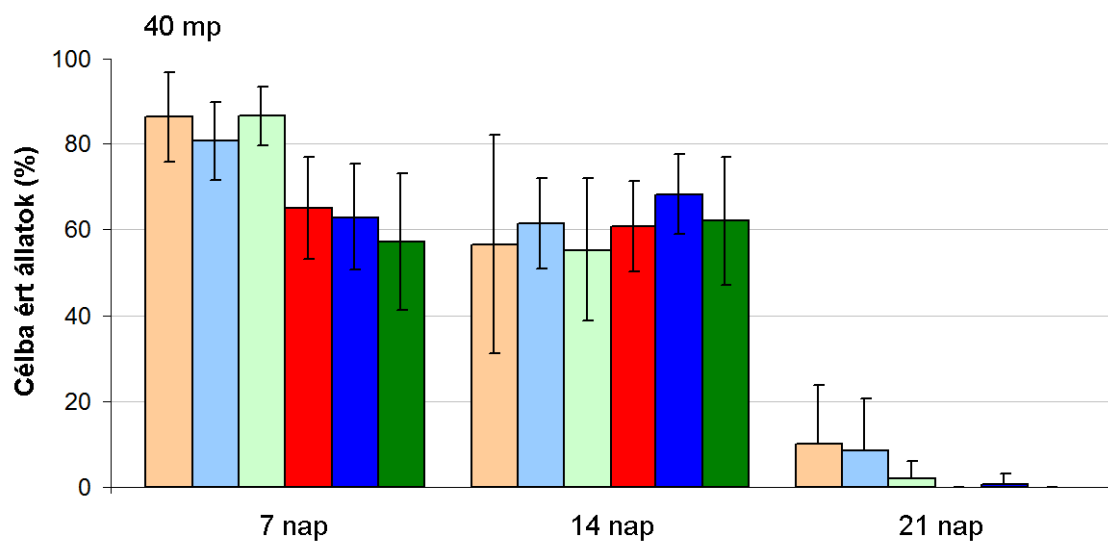
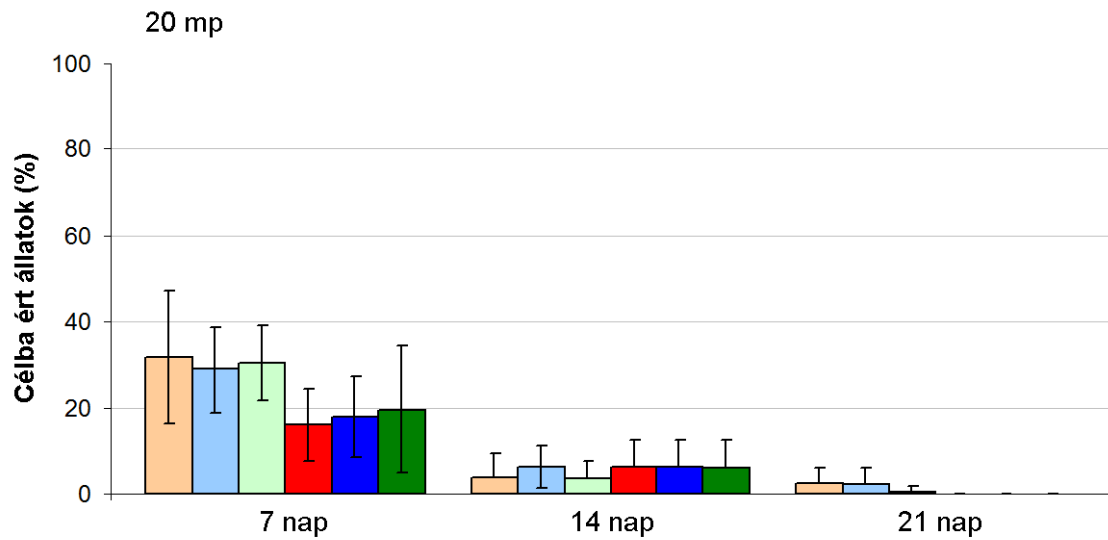


9. ábra Az AUTEN-67 (50 μM) és az AUTEN-99 (100 μM) kismolekula fokozza az autofág struktúrák mennyiségét *Drosophila* felnőtt agyban. A kontroll (csak DMSO-t kapó, n=7) állatok agyához képest, mind az AUTEN-67 (n=7), mind az AUTEN-99 (n=6) hatására megnő az mCherry-Atg8a-val jelölt pontszerű autofág struktúrák (piros csatorna) területaránya. 29°C-on tartott, 7 napos állatok. A Hoechst festés a sejtmagokat jelöli (kék csatorna). A genotípus mindhárom esetben: *w**; *UAS-mCherry-Atg8a/+*; *Ddc-Gal4/+*. A mérce 50 μm-t jelöl. A diagramon az átlag±szórás értékek vannak ábrázolva, és csak a szignifikáns eltérések vannak jelölve. *: $p < 0,05$

Az AUTEN-67 és AUTEN-99 kismolekulák javítják a mászóképeséget *Drosophila HD* modellben

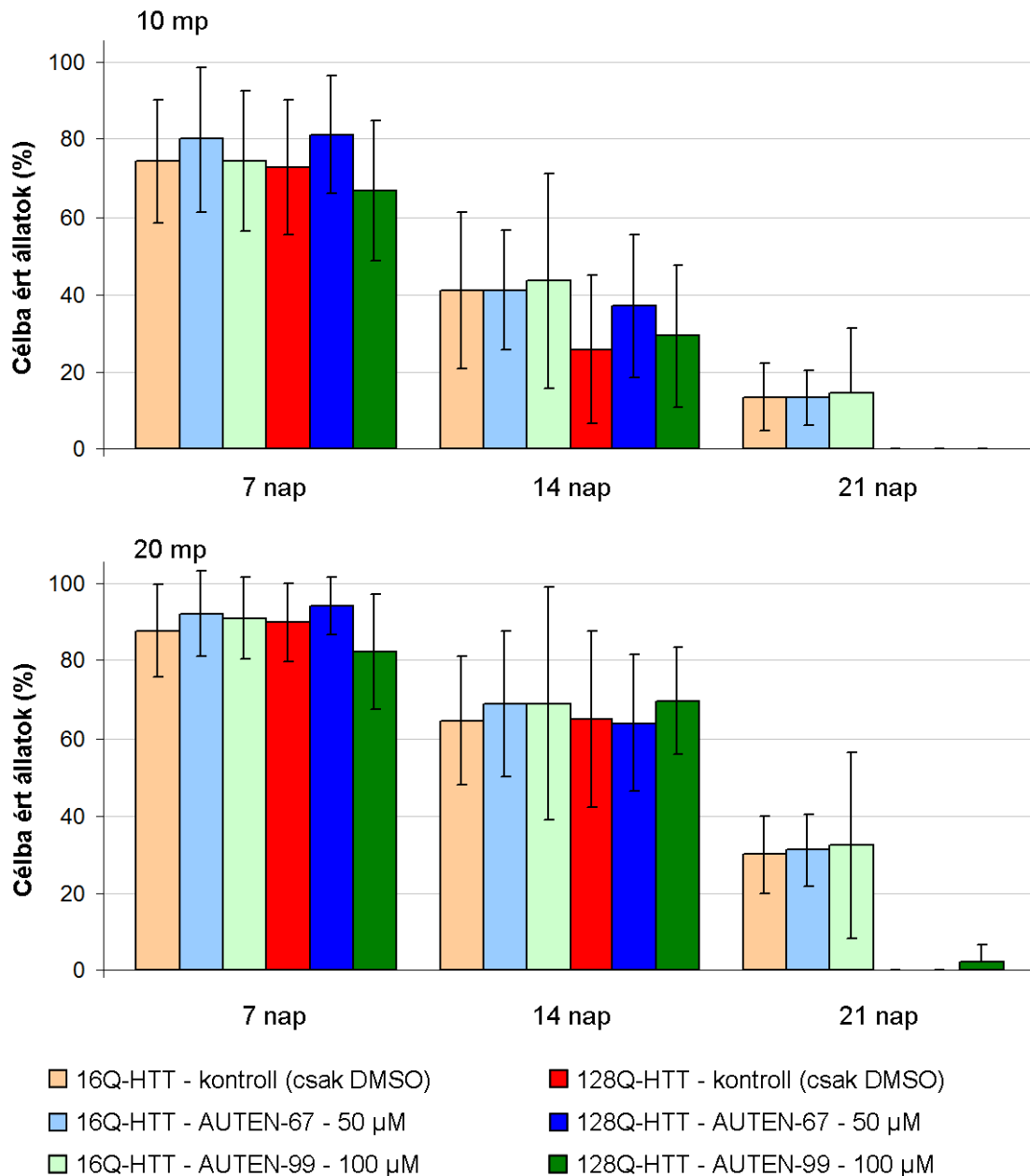
A HD egyik legjellemzőbb tünete a chorea, de párhuzamosan vagy azt követően több más mozgáskoordinációs tünet is jelentkezhet (Rüb és mtsai., 2016). A felnőtt *Drosophila*-kban, mind az öregedés során bekövetkező, mind a neurodegenerációs változások következtében fellépő motoros funkcióvesztés tanulmányozására leggyakrabban mászóképeség-vizsgálatot alkalmaznak (Ganetzky és Flanagan, 1978; Feany és Bender, 2000; Marsh és mtsai., 2003). Ezért mi is vizsgáltuk az állatok mászóképeségét, melynek során arra voltunk kíváncsiak, hogy 20-20 állatból adott idő alatt (20, 40, 60 mp) hány állat képes felmászni egy keskeny üvegcső tetejére (21,8 cm), miután az üvegcsőveket leütöttük. Az ilyen jellegű ingerre (ijesztésre) az állatok negatív geotaxissal válaszolnak, azaz elkezdenek felfele mászni a cső falán. Mivel az üvegcső átmérője kicsi, az állatok a mászást részesítik előnyben a repüléssel szemben. Az állatokat 7, 14 és 21 napos korukban vizsgáltuk. (21 nap után a 128Q-HTT-t kifejező állatok elpusztulnak.) A 16Q-HTT-t kifejező kontroll muslicák nagy része elérte a cső tetejét hét napos korukban, majd az állatok teljesítménye romlott az életkor előrehaladtával (10. ábra). A 128Q-HTT-t expresszáló muslicák 7 napos korukban rosszabbul teljesítettek a 16Q-HTT-t kifejező állatoknál, 14 napos korukban csak a 20 mp alatt felért állatok arányában volt különbség, a 40 illetve 60 mp alatt felért állatok esetében pedig nem tapasztaltunk eltérést. Ugyanakkor, jelentős mértékű mászóképeség-romlás jelentkezett a háromhetes felnőtt állatokban (10. ábra).

Ebben a kísérleti elrendezésben egyik gyógyszerjelölt molekula alkalmazásával sem tapasztaltunk pozitív hatást a célba ért állatok arányát tekintve (10. ábra), azonban megfigyeltük, hogy az AUTEN-67-tel kezelt állatok az ijesztést (az üvegcső leütését) követően gyorsabban másznak a kontroll (csak DMSO-t kapó) társaikhoz képest. E kezdeti gyorsabb haladás azonban nem volt elegendő ahhoz, hogy nagyobb arányban ériék el az üvegcsővek tetejét. A klasszikus, „hosszútávú” mászóképeséget vizsgálva tehát nem teljesítettek jobban, de „rövidtávon” gyorsabbnak tűntek (10. ábra). Ezen kezdeti megfigyelés megerősítésére vagy elvetésére vizsgáltuk az állatok mászóképeségét oly módon, hogy a célvonalat nem 21,8 cm magasra, hanem csak 5 cm-re húztuk meg a cső aljától. Ebben a kísérletes elrendezésben 10-10 állatot vizsgáltunk csövenként (a biztos beazonosíthatóság végett), és azt néztük, hogy közülük 10 ill. 20 mp alatt hányan másznak fel legalább 5 cm magasra (11. ábra).



- | | |
|---|---|
| ■ 16Q-HTT - kontroll (csak DMSO) | ■ 128Q-HTT - kontroll (csak DMSO) |
| ■ 16Q-HTT - AUTEN-67 - 50 µM | ■ 128Q-HTT - AUTEN-67 - 50 µM |
| ■ 16Q-HTT - AUTEN-99 - 100 µM | ■ 128Q-HTT - AUTEN-99 - 100 µM |

10. ábra. Klasszikus, „hosszútávú” mászóképeség vizsgálatban az AUTEN-67 (50 μ M) és az AUTEN-99 (100 μ M) nem befolyásolja az állatok teljesítményét. 7, 14, 21 napos korban vizsgálva az állatok mászóképesége, %-ban kifejezve a 20, 40, 60 mp alatt célba (21,8 cm) ért állatok aránya. 7 és 21 napos korban a 128Q-HTT-t kifejező állatok mindhárom vizsgált időpillanatban rosszabbul teljesítenek, mint a 16Q-HTT-t expresszáló kontroll állatok. 14 napos korban csak a 20 mp alatt célba ért állatok arányában van különbség. A 16Q-HTT-t kifejező állatok teljesítménye az életkorral folyamatosan romlik a vizsgált időablakban. A 128Q-HTT-t expresszáló állatok esetében ilyen trend csak a 20 mp alatt felérő állatoknál figyelhető meg. 40 és 60 mp esetében a mászóképeségben jelentős romlás 21 napos korra következik be. A diagramokon az átlag \pm szórás értékek vannak ábrázolva, az azonos genotípusú állatokat összevetve a különbségek egyik esetben sem szignifikánsak ($p>0,05$). Genotípus: *Appl-Gal4, y^l, w^{*/+}*; *UAS-16Q-HTT/+* illetve *Appl-Gal4, y^l, w^{*/+}*; *UAS-128Q-HTT/+*. 29°C-on nevelt állatok



11. ábra. „Rövidtávú” mászóképeség vizsgálatban az AUTEN-67 (50 μ M) és AUTEN-99 (100 μ M) kismolekula nem javítja szignifikánsan az állatok teljesítményét. 7, 14, 21 napos korban vizsgálva az állatok mászóképesége, %-ban kifejezve a 10, 20 mp alatt célba (5 cm) ért állatok aránya. Mind a 16Q-HTT-t, mind a 128Q-HTT-t kifejező állatok rövidtávú mászóképesége romlik az idő előrehaladtával és nő közöttük a különbség. AUTEN-67 hatására kismértékű, nem szignifikáns javító hatás figyelhető meg a 10 mp alatt célba ért állatok esetében. A diagramokon az átlag \pm szórás értékek vannak ábrázolva, az azonos genotípusú állatokat összevetve a

különbségek egyik esetben sem szignifikánsak ($p > 0,05$). Genotípus: *Appl-Gal4, y^l, w^{*/+}*; *UAS-16Q-HTT/+* illetve *Appl-Gal4, y^l, w^{*/+}*; *UAS-128Q-HTT/+*. 29°C-on nevelt állatok

Az AUTEN-67-tel kezelt 128Q-HTT-t expresszáló állatok e rövidebb távon valóban jobb mászóképeséggel rendelkeztek, mint a nem kezelt (csak DMSO-t kapó) kontroll állatok. A kezelt állatok nagyobb hányada ért fel 5 cm magasra 10 mp alatt. Ez a hatás 7 és 14 napos korban is megfigyelhető volt, azonban e trend nem bizonyult szignifikánsnak (11. ábra, felső rész). A 20 mp alatt felért állatok arányában azonban már nem mutatkozott meg ilyen különbség (11. ábra, alsó rész). Az AUTEN-67 hatására tehát az állatok gyorsabban másztak. Meghatároztuk minden egyes mászás esetén az első öt célba érő állat átlagsebességét, illetve az összes állat átlagos sebességét. Mindkét összevetés szerint az AUTEN-67 szignifikánsan növelte a 12Q-HTT-t kifejező állatok átlagsebességét 7 napos korban (12. ábra).

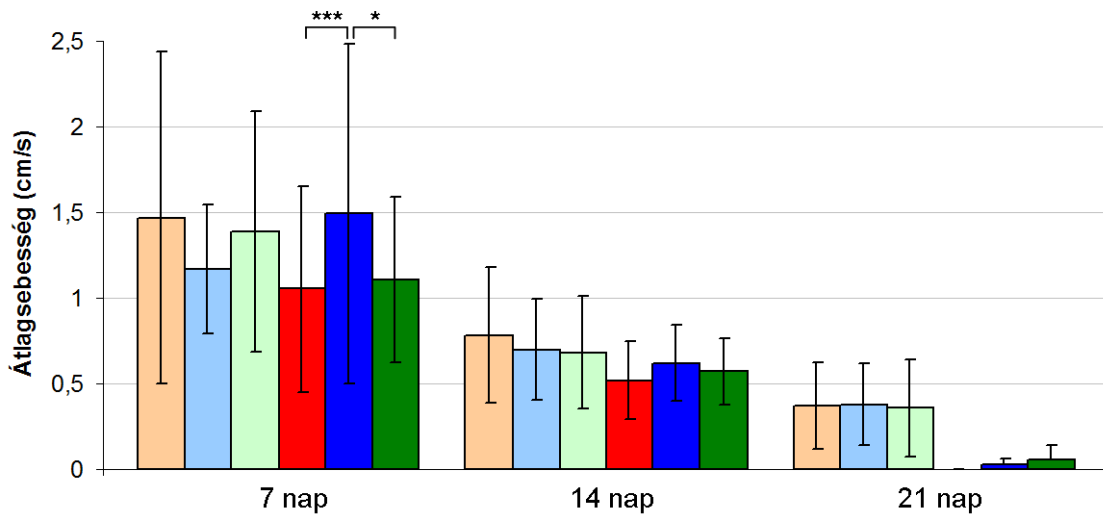
Kíváncsiak voltunk arra, hogy a koncentráció emelésével az AUTEN-67 pozitív hatása kiterjeszhető-e a hosszútávú mászásra is, illetve, hogy az AUTEN-99 esetén jelentkezik-e hasonló hatás. Ezért a gyógyszerjelölt molekulák koncentrációját megkétszerezve is vizsgáltuk a hosszútávú mászóképeségre gyakorolt hatásukat.

Az AUTEN-67 (100 μ M) kezelés képes volt fokozni a 128Q-HTT-t expresszáló állatok „hosszútávú” mászóképeségét 7, 14 és 21 napos korban (13. ábra). Több AUTEN-67 kezelt állat ért célba 20 és 40 mp alatt, mint nem kezelt (csak DMSO) kontroll állat. A 60 mp alatt célba ért állatok számában már nem volt különbség, így összességében elmondható, hogy az AUTEN-67 koncentrációfüggő módon javítja az állatok mászóképeségét az által, hogy az állatok mászási sebességére képes pozitív hatást gyakorolni (13. ábra).

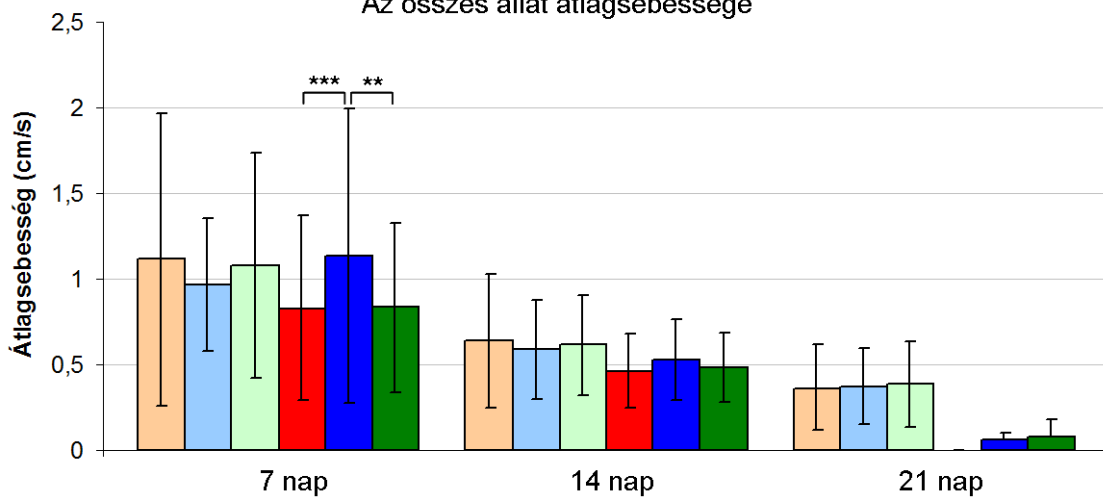
Az AUTEN-99 kezelés 14 napos korban szignifikánsan javította a 128Q-t kifejező állatok mászóképeségét. 20 mp alatt 5-6-szor annyi állat ért célba, mint a csak DMSO-t kapó csoportban. Ez a különbség fokozatosan eltűnt a 40., illetve a 60. mp-re (13. ábra). Tehát az AUTEN-99-cel kapcsolatban is azt lehet feltételezni, hogy azáltal javítja az állatok mászóképeségét, hogy fokozza a mászás sebességét.

A 16Q-HTT-t kifejező állatok mászóképesége, illetve átlagsebessége egyik kísérleti felállásban sem változott szignifikánsan az AUTEN-ek hatására semelyik vizsgált életkorban (10-13. ábrák).

A mérésenkénti leggyorsabb öt állat átlagsebessége

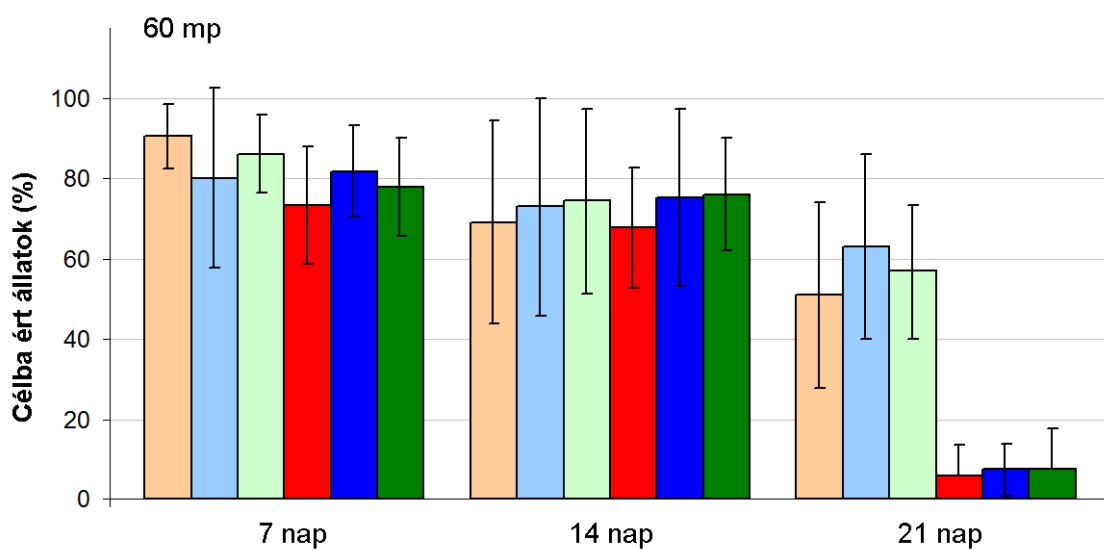
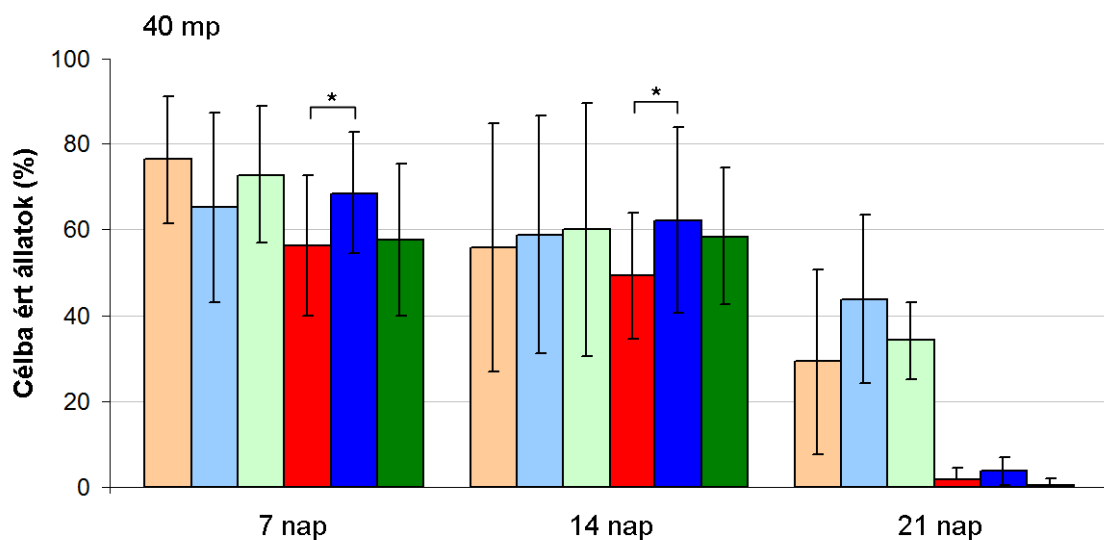
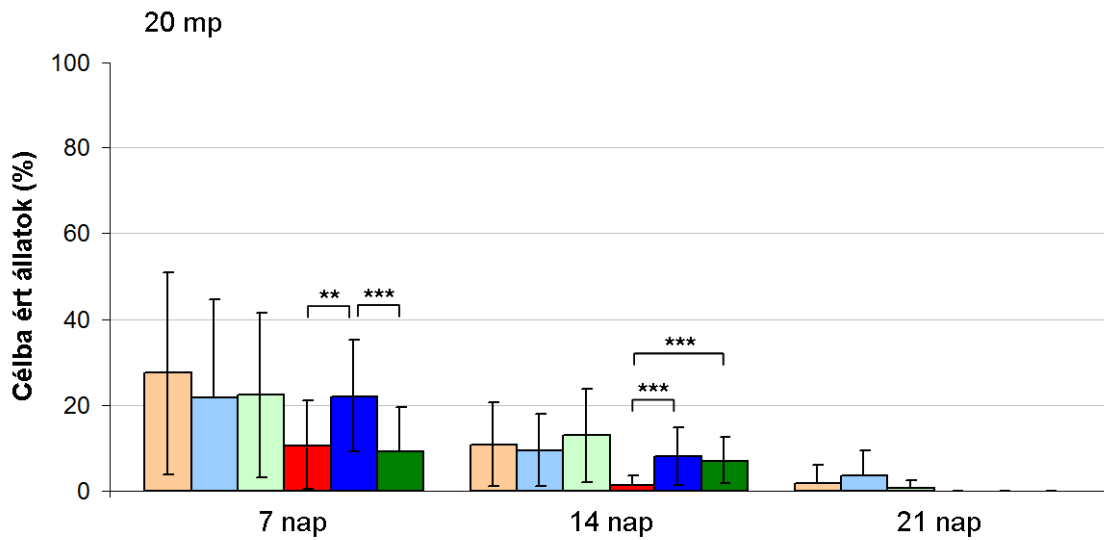


Az összes állat átlagsebessége



- | | |
|--------------------------------|---------------------------------|
| 16Q-HTT - kontroll (csak DMSO) | 128Q-HTT - kontroll (csak DMSO) |
| 16Q-HTT - AUTEN-67 - 50 µM | 128Q-HTT - AUTEN-67 - 50 µM |
| 16Q-HTT - AUTEN-99 - 100 µM | 128Q-HTT - AUTEN-99 - 100 µM |

12. ábra. AZ AUTEN-67 (50 µM) szignifikánsan növeli a 128Q-HTT-t expresszáló 7 napos felnőtt állatok átlagsebességét. 7, 14, 21 napos korban vizsgálva az állatok átlagsebessége, a „rövidtávú” mászóképeség során az 5 cm magasra felért állatok idejéből számítva, vagy a mérésenkénti leggyorsabb öt állat átlagsebességét (felső rész), vagy a kísérletben részt vevő összes állat átlagsebességét felhasználva (alsó rész). A 16Q-HTT-t és a 128Q-HTT-t kifejező állatok átlagsebessége az életkorral csökken. A diagramokon az átlag±szórás értékek vannak ábrázolva. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,005$, a többi azonos genotípusú állatok összevetéséből származó különbség nem szignifikáns. Genotípus: *Appl-Gal4, y^l, w^{*/+}*; *UAS-16Q-HTT/+* illetve *Appl-Gal4, y^l, w^{*/+}*; *UAS-128Q-HTT/+*. 29°C-on nevelt állatok



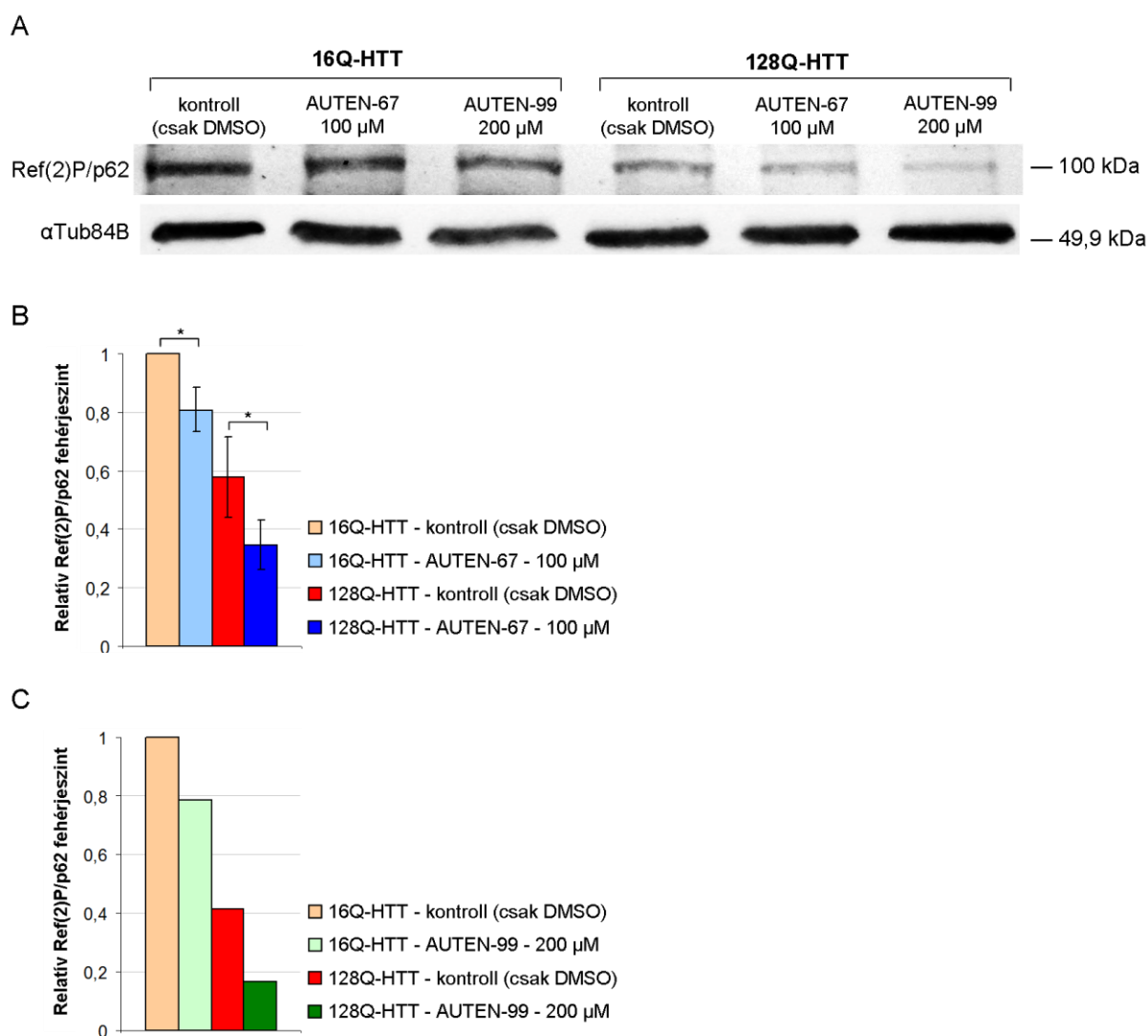
- 16Q-HTT - kontroll (csak DMSO)
- 16Q-HTT - AUTEN-67 - 50 μ M
- 16Q-HTT - AUTEN-99 - 100 μ M
- 128Q-HTT - kontroll (csak DMSO)
- 128Q-HTT - AUTEN-67 - 50 μ M
- 128Q-HTT - AUTEN-99 - 100 μ M

13. ábra. Klasszikus, „hosszútávú” mászóképeség vizsgálatban az AUTEN-67 (100 μ M) és az AUTEN-99 (200 μ M) képes szignifikánsan javítani az 128Q-HTT kifejező állatok teljesítményét. 7, 14, 21 napos korban vizsgálva az állatok mászóképesége, %-ban kifejezve a 20, 40, 60 mp alatt célba (21,8 cm) ért állatok aránya. 7 és 21 napos korban a 128Q-HTT-t kifejező állatok rosszabbul teljesítenek, mint a 16Q-HTT-t expresszálóok minden vizsgált időpillanatban. 14 napos felnőttekben csak a 20 mp alatt felérő állatok arányában van különbség. A 16Q-HTT-t kifejező állatok teljesítménye az öregedéssel folyamatosan romlik a vizsgált időszakban. A 128Q-HTT-t expresszáló állatoknál ilyen trend csak a 20 mp alatt felérő állatok esetében mondható el. 40 és 60 mp esetében a mászóképeségben jelentős romlás csak a 21 napos felnőttekben következik be. Az AUTEN-67-tel kezelt állatok közül 7 és 14 napos korban szignifikánsan több 128Q-HTT-t kifejező állat ér fel 20 és 40 mp alatt. Az AUTEN-99-cel kezelve 14 napos korban, 20 mp alatt teljesítenek jobban az állatok. A diagramokon az átlag \pm szórás értékek vannak ábrázolva. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$, a többi azonos genotípusú állatok összevetéséből származó különbség nem szignifikáns. Genotípus: *Appl-Gal4, y^l, w^{*/+}*; *UAS-16Q-HTT/+* illetve *Appl-Gal4, y^l, w^{*/+}*; *UAS-128Q-HTT/+*. 29°C-on nevelt állatok

Az AUTEN-67 és AUTEN-99 kismolekulák csökkentik a p62 autofág szubsztrát mennyiségét *Drosophila* agyban

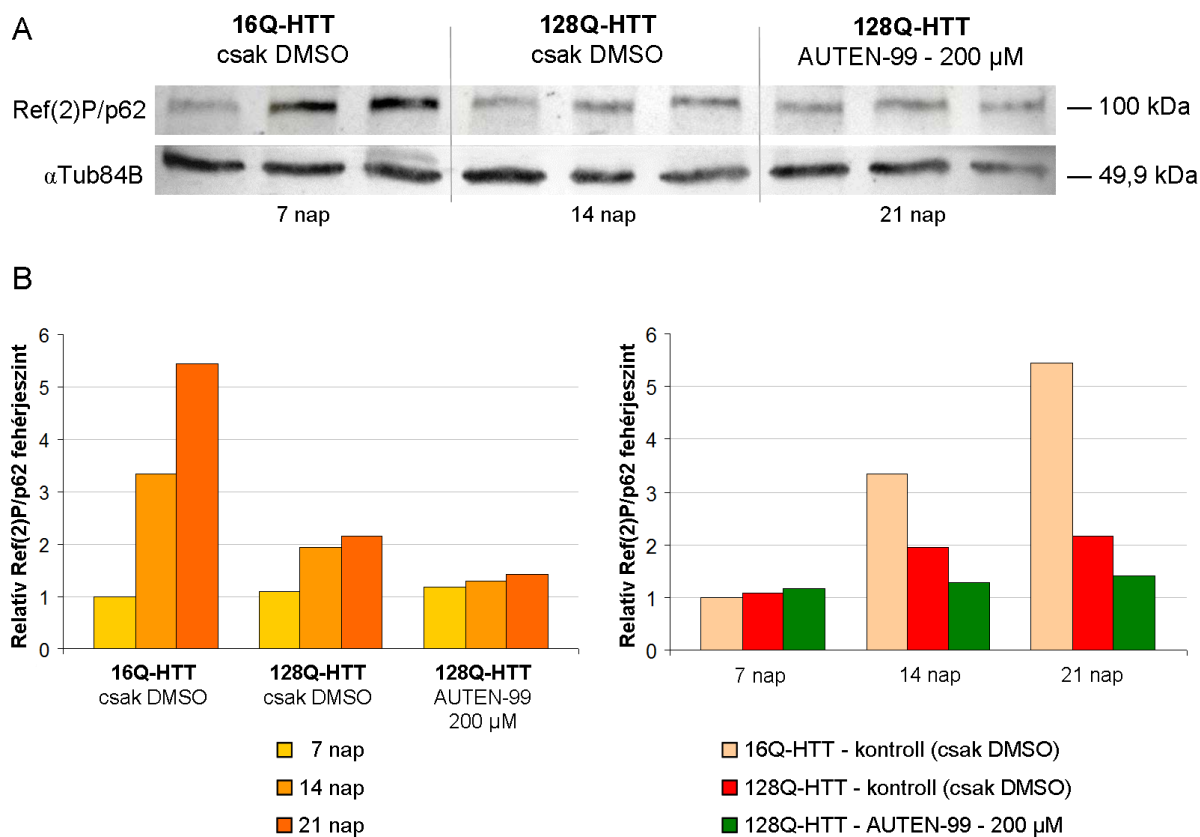
Az AUTEN-67 és AUTEN-99 egyaránt javította a mászóképeséget a 128Q-HTT-t kifejező muslicákban (13. ábra). Ezt a hatást a hatóanyagok feltehetően az állatok mászási sebességének növelésén keresztül érték el. Annak érdekében, hogy megtudjuk, hogy e pozitív hatás legalább részben az állatok agyában előidézett autofág aktivitás fokozása révén valósul-e meg, vizsgáltuk a HTT-t kifejező állatok fejében az autofág receptor, Ref(2)P/p62 (a továbbiakban csak p62) mennyiségét. A p62 lebomlik a szelektív autofágia során, így mennyisége gyakran fordítottan arányos az autofágia intenzitásával, széleskörűen alkalmazott markere az autofág lebontásnak (Pankiv és mtsai., 2007; Shvets és mtsai., 2008; Piracs és mtsai., 2012; Nagy és mtsai., 2014b). Ebben az esetben és minden további kísérletben a magasabb koncentrációt használtuk (tehát a koncentráció az AUTEN-67 esetében 100 μ M, az AUTEN-99 alkalmazásakor 200 μ M volt). 21 napos felnőtt 16Q-HTT-t, illetve 128Q-HTT-t kifejező állatok fejéből származó fehérjemintákban mindkét gyógyszerjelölt molekula hatására csökkent a p62 mennyisége (14. ábra). Ez fokozott autofágiára utalhat a kezelt állatokban.

Az AUTEN-67-tel szemben az AUTEN-99 7 napos korban még nem volt pozitív hatással a mászóképesésre (13. ábra, bal oldal), míg az 14 napos állatok esetében már igen (13. ábra, felső rész). Így az AUTEN-99 p62 mennyiségére kifejtett hatásának időbeliségét is megvizsgáltuk (15. ábra). Az AUTEN-99 hatására 7 napos korban a p62 mennyisége nem változott (összhangban a mászóképesésre gyakorolt pozitív hatás hiányával), ugyanakkor 14 napos korban már megfigyelhető volt a p62 fehérje mennyiségének csökkenése (15. ábra). Ennek az egybeesése azzal, hogy az AUTEN-99 14 napos korban már javítja a 128Q-HTT-t kifejező állatok mászóképeségét ok-okozati összefüggésre is utalhat: az AUTEN-99 a HD modellállatok fejében fokozza az autofág aktivitást, és ezáltal vezet jobb mászóteljesítményhez.



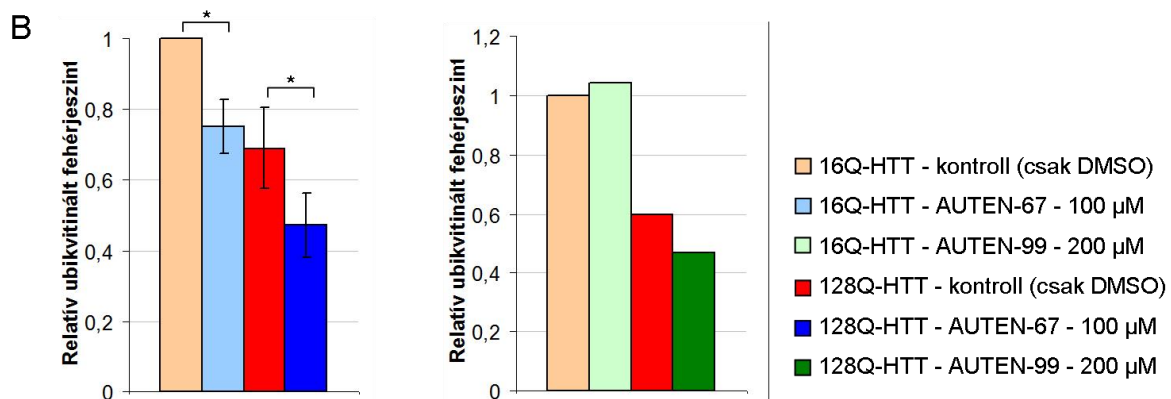
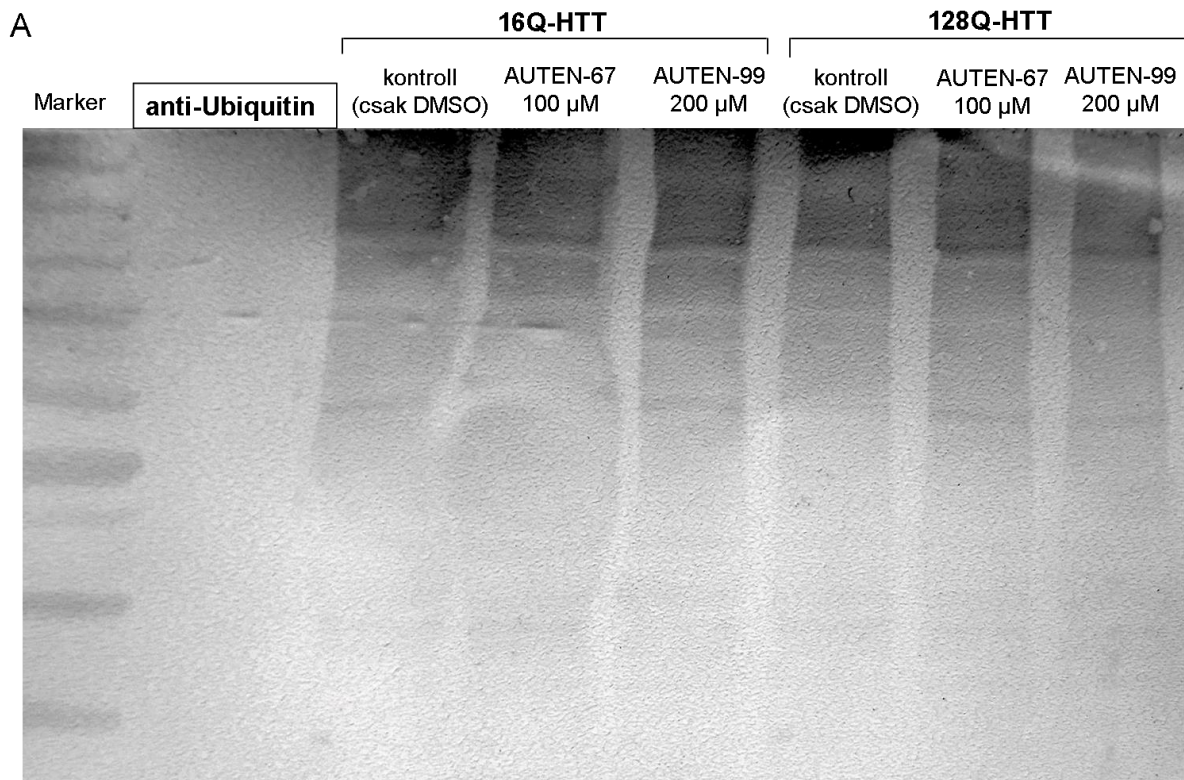
14. ábra. Az AUTEN-67 és az AUTEN-99 kismolekula csökkenti a Ref(2)P/p62 autofág receptor mennyiségét 16Q-HTT-t és 128Q-HTT-t kifejező állatokban. A fehérjeminták 21 napos állatok fejéből származnak. Belső kontrollként α Tub84B szolgál. A 16Q-HTT-t kifejező állatokban magasabb az oldott p62 fehérje mennyisége, mint a 128Q-HTT-t kifejezőkben. (A) Egy reprezentatív western blot kísérlet képe, melyen mindkét genotípus és mindkét gyógyszerjelölt molekulával végzett kezelés hatása látható. (B) Az AUTEN-67-tel végzett kezelések hatásának kvantifikálása, négy biológiai párhuzamos felhasználásával. Az átlag \pm szórás értékek vannak ábrázolva. Csak az azonos genotípusú állatok esetén van jelölve a statisztikai teszt eredménye. *: $p < 0,05$. (C) Az AUTEN-99-cel végzett kezelések hatásának kvantifikálása, három technikai párhuzamos felhasználásával (így szórásértékek nem kerültek feltüntetésre). A Ref(2)P/p62 fehérjemennyiségekhez tartozó értékek a belső kontroll (α Tub84B) fehérjemennyiségek értékével korrigálva, és a 16Q-HTT kontroll (csak DMSO) mintákat 1-nek véve normalizálva kerültek ábrázolásra. Genotípus: *Appl-Gal4, y^l, w^{*}/+*; *UAS-16Q-HTT/+* illetve *Appl-Gal4, y^l, w^{*}/+*; *UAS-128Q-HTT/+*. 29°C-on nevelt állatok

Az állatok öregedése során megfigyelhető a p62 mennyiségének növekedése, mind a 16Q-HTT-t, mind a 128Q-HTT-t kifejező nem kezelt (csak DMSO) állatcsoportban. Az AUTEN-99 viszont csökkentette a p62 kor-függő halmozódását a 128Q-HTT-t kifejező állatok fejében.



15. ábra. Az AUTEN-99 csökkenti a Ref(2)P/p62 mennyiségét 14 és 21 napos felnőtt állatokban. A fehérjeminták 7, 14 és 21 napos állatok fejéből származnak. A 16Q-HTT-t kifejező állatok fejében halmozódik a legnagyobb mértékben az oldott Ref(2)P/p62 mennyiége. Belső kontrollként α Tub84B szolgál. (A) Egy reprezentatív western blot kísérlet képe. (B) A kezelések hatásának kvantifikálása, három technikai párhuzamos felhasználásával (a szórás- nem, csak az átlagértékek kerültek feltüntetésre). A baloldali diagramon a western blot képen látható sorrenddel megegyezően kerültek feltüntetésre az értékek, míg a jobboldalon ugyanazon értékek más csoportosítás szerint láthatóak. A Ref(2)P/p62 fehérjemennyiségekhez tartozó értékek a belső kontroll α Tub84B fehérjemennyiségek értékével korrigálva, és a 16Q-HTT kontroll (csak DMSO) mintákat 1-nek véve normalizálva kerültek ábrázolásra. Genotípus: *Appl-Gal4, y¹, w^{*}/+*; *UAS-16Q-HTT/+* illetve *Appl-Gal4, y¹, w^{*}/+*; *UAS-128Q-HTT/+*. 29°C-on nevelt állatok

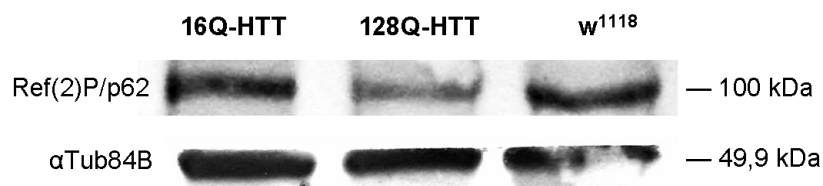
Nem csak a p62 akkumulációja jellemző a HD agyban, illetve az agy idősödése során, hanem a károsodott, lebontásra kijelölt ubikvitinált fehérjék mennyisége is. Kíváncsiak voltunk arra, hogy vajon a csökkent p62-szintből feltételezhető fokozódott autofág aktivitás révén csökken-e a lebontásra kijelölt ubikvitinált fehérjék mennyisége az AUTEN-kezelések hatására. A kérdés megválaszolására western blot kísérletben vizsgáltuk az anti-Ubiquitinnel (anti-Ubi) jelölt fehérjék szintjét is, 21 napos állatok fejéből származó mintákban. Az AUTEN-67 szignifikánsan csökkentette a 16Q-HTT-t és a 128Q-HTT-t kifejező állatokból származó fehérjemintában az ubikvitinált fehérjék mennyiségét (16. ábra). Az AUTEN-99 azonban a 16Q-HTT-t kifejező állatokban nincs hatással az ubikvitinált fehérjék mennyiségére, a 128Q-HTT-t expresszálóknban pedig csak kismértékben csökkenti.



16. ábra. Az AUTEN-67 szignifikánsan csökkenti a 16Q-HTT és a 128Q-HTT-t kifejező állatokból származó fehérjemintában az ubikvitinált fehérjék mennyiségét. A fehérjeminták 21 napos állatok fejéből származnak. A 16Q-HTT-t kifejező állatokban magasabb az ubikvitinált fehérjék mennyisége, mint a 128Q-HTT-t kifejezőkben. (A) Egy reprezentatív western blot kísérlet képe, melyen mindkét genotípus és mindkét gyógyszerjelölt molekulával végzett kezelés hatása látható. (B) Az AUTEN-67-tel végzett kezelések hatásának kvantifikálása, három biológiai párhuzamos felhasználásával. Az átlag \pm szórás értékek vannak ábrázolva. Csak az azonos genotípusú állatok esetén van jelölve a statisztikai teszt eredménye. *: $p < 0,05$. Az AUTEN-99-cel történt kezelés a 16Q-HTT-t kifejező állatokban nincs hatással az ubikvitinált fehérjék mennyiségére, a 128Q-HTT-t expresszálóknban pedig feltehetően kismértékben csökkenti, három technikai párhuzamos alapján. A szórás értékek nincsenek feltüntetve. Az ubikvitinált fehérjemennyiségekhez tartozó értékek másik gélen futtatott, de egyazon fehérjeizolálásból származó belső kontroll α Tub84B fehérjemennyiségek értékével kerültek korrigálásra. A 16Q-HTT kontroll (csak DMSO) mintákat 1-nek véve normalizálva kerültek ábrázolásra. Genotípus: *Appl-Gal4, y¹, w^{*/+}; UAS-16Q-HTT/+* illetve *Appl-Gal4, y¹, w^{*/+}; UAS-128Q-HTT/+*. 29°C-on nevelt állatok

Érdekes módon, mind a p62, mind az ubikvitinált fehérjék mennyisége több a 16Q-HTT-t kifejező állatokban, mint a 128Q-HTT-t kifejezőkben 21 napos állatok fejéből származó mintákban. Ez azért meglepő, mert a 128Q HD modelltől azt várnánk, hogy benne az autofágia

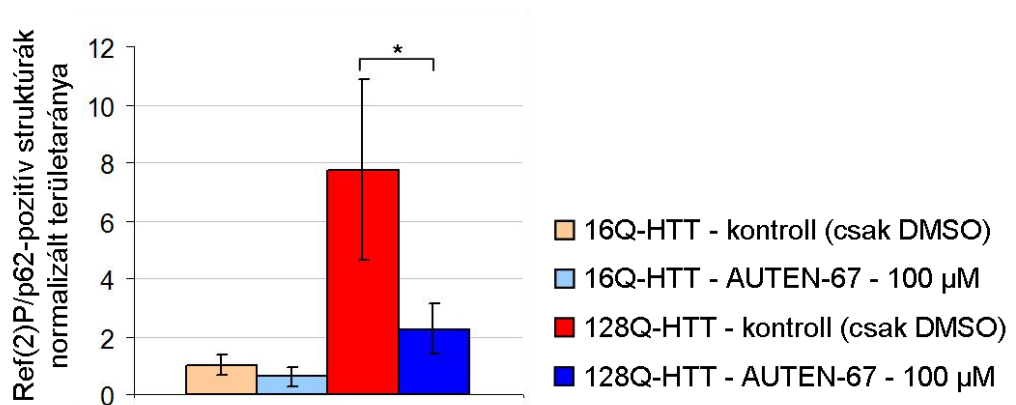
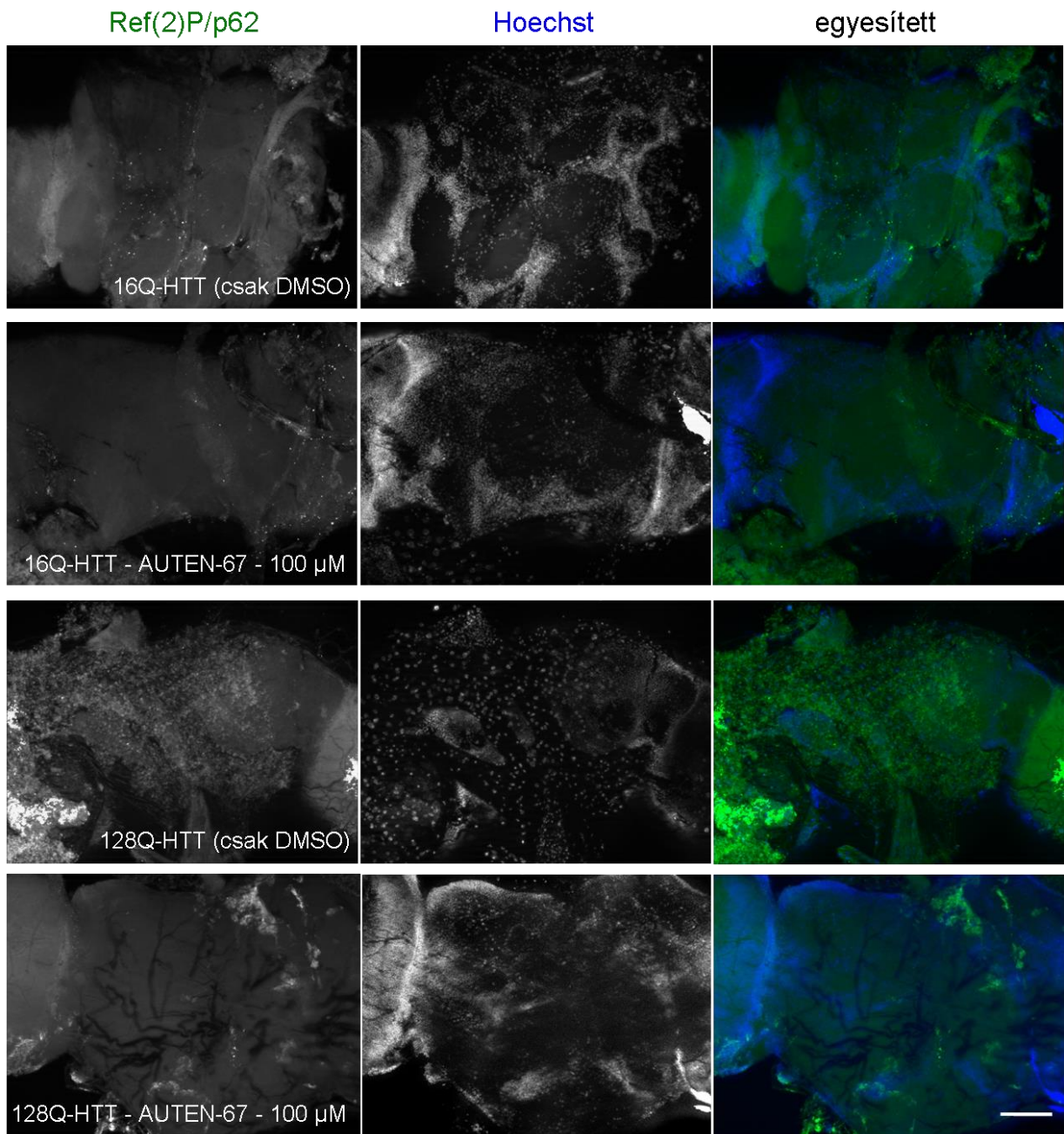
gátolt a mutáns HTT túltermeltetése miatt (Martin és mtsai., 2015), így a csökkent autofág működés miatt nagyobb mennyiségű p62 és ubikvitinált fehérje mennyiségekre számítottunk. Annak eldöntésére, hogy valamilyen okból kifolyólag a 16Q-HTT-t kifejező állatokban van-e a vártnál több, vagy a 128Q-HTT-t expresszáló állatokban van-e a vártnál kevesebb fehérje, az összehasonlításba bevontunk humán HTT-t nem expresszáló, csak az *Appl-Gal4*-t hordozó állatokat. Azt tapasztaltuk, hogy az UAS-HTT transzgént nem tartalmazó állatok fejében a p62 felhalmozódás mértéke megegyezik a 16Q-HTT-t kifejező állatokban észlelt felhalmozódás mértékével (17. ábra). A 128Q-HTT-t kifejező állatokban tehát a vártnál kevesebb p62 (és feltehetően ubikvitinált) fehérje van.



17. ábra. A Ref(2)P/p62 fehérje mennyisége a 128Q-HTT-t kifejező állatokban kevesebb, mint a 16Q-HTT-t kifejező vagy humán HTT-t nem expresszáló kontrollban. A fehérjeminták 21 napos állatok fejéből származnak. Genotípus: *Appl-Gal4, y^l, w^{*/+}; UAS-16Q-HTT/+*. *Appl-Gal4, y^l, w^{*/+}; UAS-128Q-HTT/+* illetve *Appl-Gal4, y^l, w^{*/+}*. 29°C-on nevelt állatok

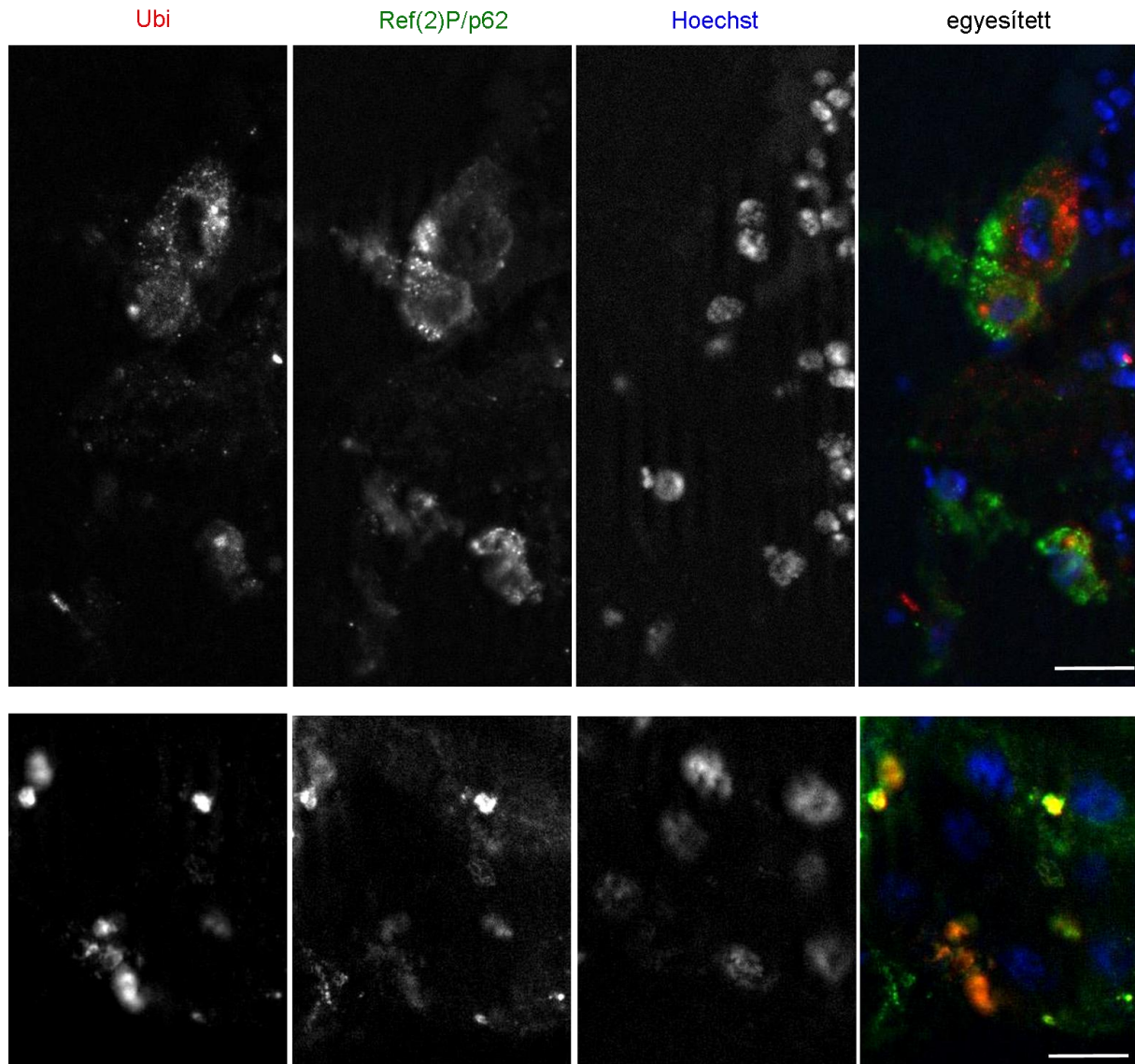
Ennek egy lehetséges oka az, hogy a p62 és az ubikvitinált fehérjék a 128Q-HTT-t kifejező állatokban nagyrészt oldhatatlan formában, fehérjeaggregátumokként, zárványokban találhatóak meg, amelyek az általunk végzett western blot kísérletekben nem mutathatóak ki. A kérdés megválaszolására anti-p62-vel és anti-Ubi-nel immunhisztokémiai elemzést végeztünk. A 16Q-t kifejező állatok agyában kevés, kisméretű p62-pozitív pontszerű struktúra volt megfigyelhető (18. ábra, első sor). Ez összhangban volt azzal, ami a vad típusú *Drosophila* agyra jellemző (Nezis és mtsai., 2008). A p62 nagy zárványokat képzett 128Q-HTT-t kifejező állatok agyában (18. ábra, harmadik sor). A 128Q-HTT mintákban anti-Ubi-pozitív zárványokat is meg lehetett figyelni, amelyek egyben p62-pozitívak is voltak (19. ábra). Tehát a 128Q-HTT állatok agyában a p62 és az ubikvitin nagyrészt oldhatatlan formában található meg.

7 napos korban a 16Q-HTT-t és a 128Q-HTT-t kifejező állatok fejében az oldott p62 fehérje szintek között úgy tűnik, hogy nincsen jelentős különbség (15B ábra). A mászóképes vizsgálatokban mégis rosszabbul teljesítenek a mutáns HTT-t expresszáló állatok (10., 12., 13. ábrák bal oldalai). A 128Q-HTT-t kifejező 21 napos állatok agyában megfigyelhető zárványok alapján elképzelhető, hogy már 7 napos korban is zárványokban van a p62 egy része. Az is lehetséges, hogy a 7 napos fejekből származó fehérjeminták esetében a western blot kísérlet nem bizonyult elég érzékenynek a szolúbilis frakción belüli különbségek felderítéséhez.



18. ábra. A Ref(2)P/p62 nagyrészt oldhatatlan zárványokban található a 128Q-HTT-t kifejező állatok agyában, és mennyisége jelentősen csökken az AUTEN-67 kezelés hatására. 21 napos felnőttekből származó

agyminták (n=4-5). A Ref(2)P/p62 (zöld csatorna) a 16Q-HTT-t kifejező állatokban kisméretű és kisszámú pontszerű struktúra formájában található oldhatatlan állapotban, míg a mutáns HTT-t kifejező állatok agyában rengeteg nagyméretű fehérjeaggregátum, zárvány látható. AUTEN-67 hatására ez utóbbi struktúrák mennyisége jelentősen csökken. A Hoechst festés a sejtmagokat jelöli (kék csatorna). A diagramon az átlag±szórás értékek vannak ábrázolva. Csak az azonos genotípusú állatok esetében van jelölve a szignifikáns különbséget adó statisztikai teszt eredménye. *: $p < 0,05$ (a 16Q-HTT-t kifejező állatok összevetése esetén $p > 0,05$). A mérce 50 μm -t jelöl. Genotípus: *Appl-Gal4, y^l, w^{*/+}; UAS-16Q-HTT/+* illetve *Appl-Gal4, y^l, w^{*/+}; UAS-128Q-HTT/+*. 29°C-on nevelt állatok



19. ábra. Az ubikvitin (Ubi) nagyméretű citoplazmatikus fehérjeaggregátumokba, zárványokba csapódódik a 128Q-HTT-t kifejező állatok agyában, és jelentős mértékben kolokalizál a Ref(2)P/p62-vel. A 128Q-HTT-t kifejező állatok agyában a sejtek egy részében az anti-Ubi-nel jelölt struktúrák (piros csatorna) is nagy fehérjeaggregátumok, zárványok formájában vannak jelen, akárcsak a Ref(2)P/p62-pozitív struktúrák (zöld csatorna). A struktúrák jelentős része kettőspozitív, azaz Ref(2)P-t és ubikvitint egyaránt tartalmaz. A Hoechst festés a sejtmagokat jelöli (kék csatorna). A mérce 10 μm -t jelöl. Genotípus: *Appl-Gal4, y^l, w^{*/+}; UAS-128-HTT/+*. 29°C-on nevelt állatok

Ennek a legfőbb oka az lehet, hogy a 21 napos 16Q-HTT mintában sokkal nagyobb volt a p62 mennyisége, és a túlhívás elkerülése végett az előhívó reakció leállítását a 16Q-HTT mintához kellett igazítanunk.

Vizsgáltuk az AUTEN-67 kezelés hatását a 21 napos állatok agyában megfigyelt p62-pozitív struktúrák mennyiségére is. Az AUTEN-67 hatására kevesebb kisméretű p62-pozitív struktúra figyelhető meg a 16Q-HTT-t kifejező állatok agyában, azonban a különbség nem szignifikáns. A mutáns HTT-t kifejező állatok esetén ugyanakkor a nagy citoplazmatikus zárványok mennyisége nagymértékben és szignifikánsan csökkent a kezelés hatására (18. ábra).

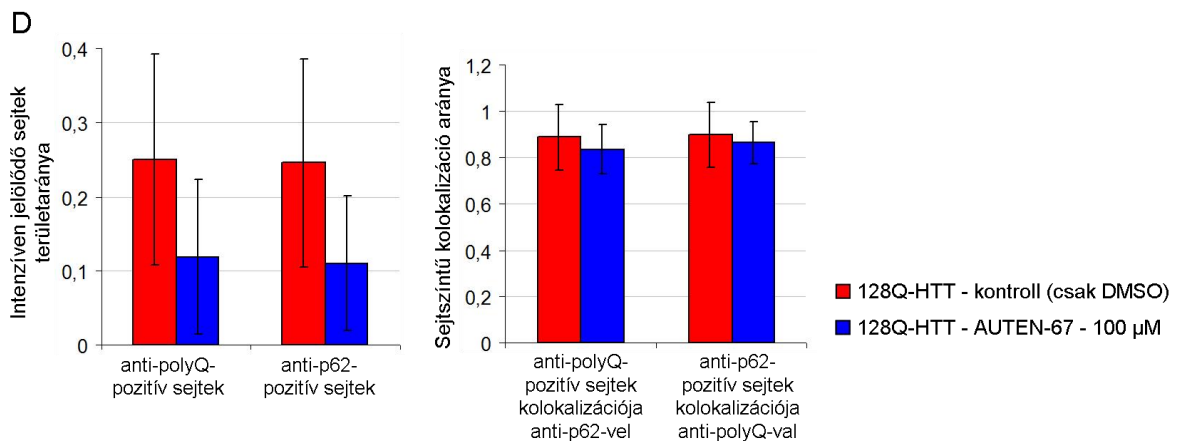
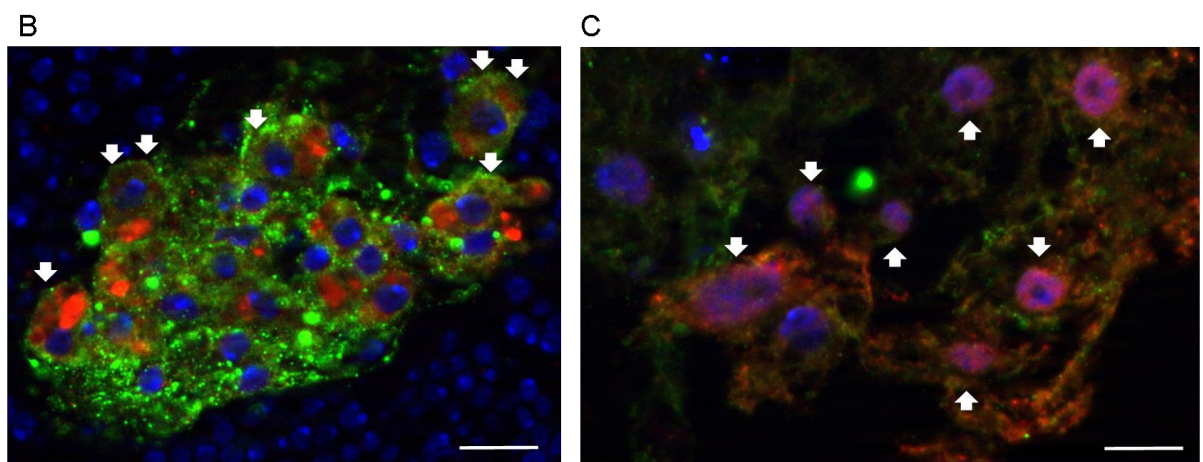
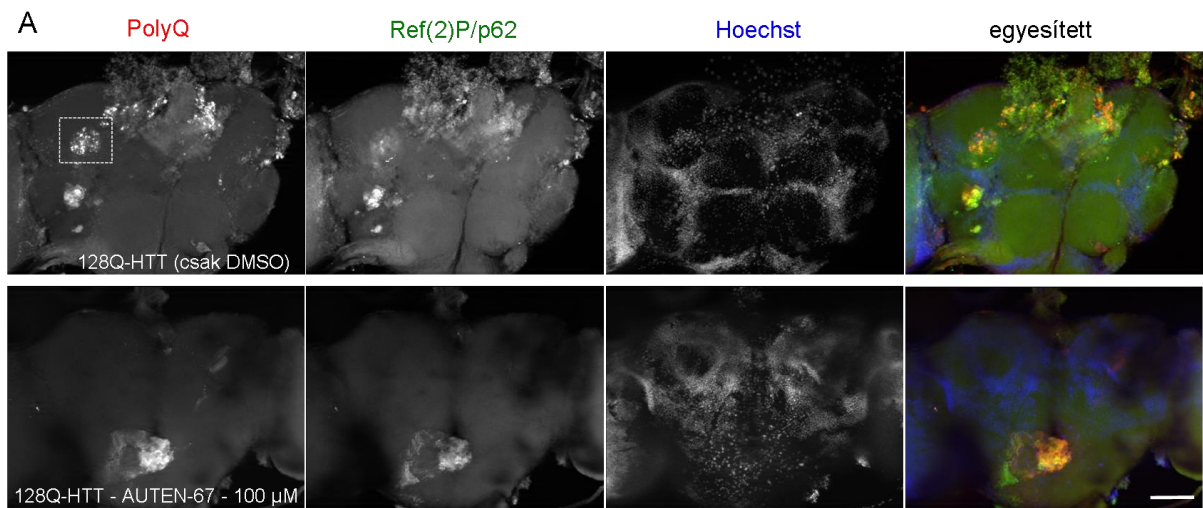
Az AUTEN-67 és AUTEN-99 kismolekulák csökkentik a toxikus mutáns HTT fehérje mennyiségét Drosophila HD modellben

HD betegek agyában, illetve más HD modellekben a mutáns HTT fehérje is része a p62- és Ubi-pozitív zárványoknak (Björkøy és mtsai., 2005; Heng és mtsai., 2010). Ezért vizsgáltuk, hogy vajon az általunk a 128Q-HTT állatok agyában megfigyelt p62- és Ubi-pozitív zárványokban megtalálható-e a mutáns HTT fehérje.

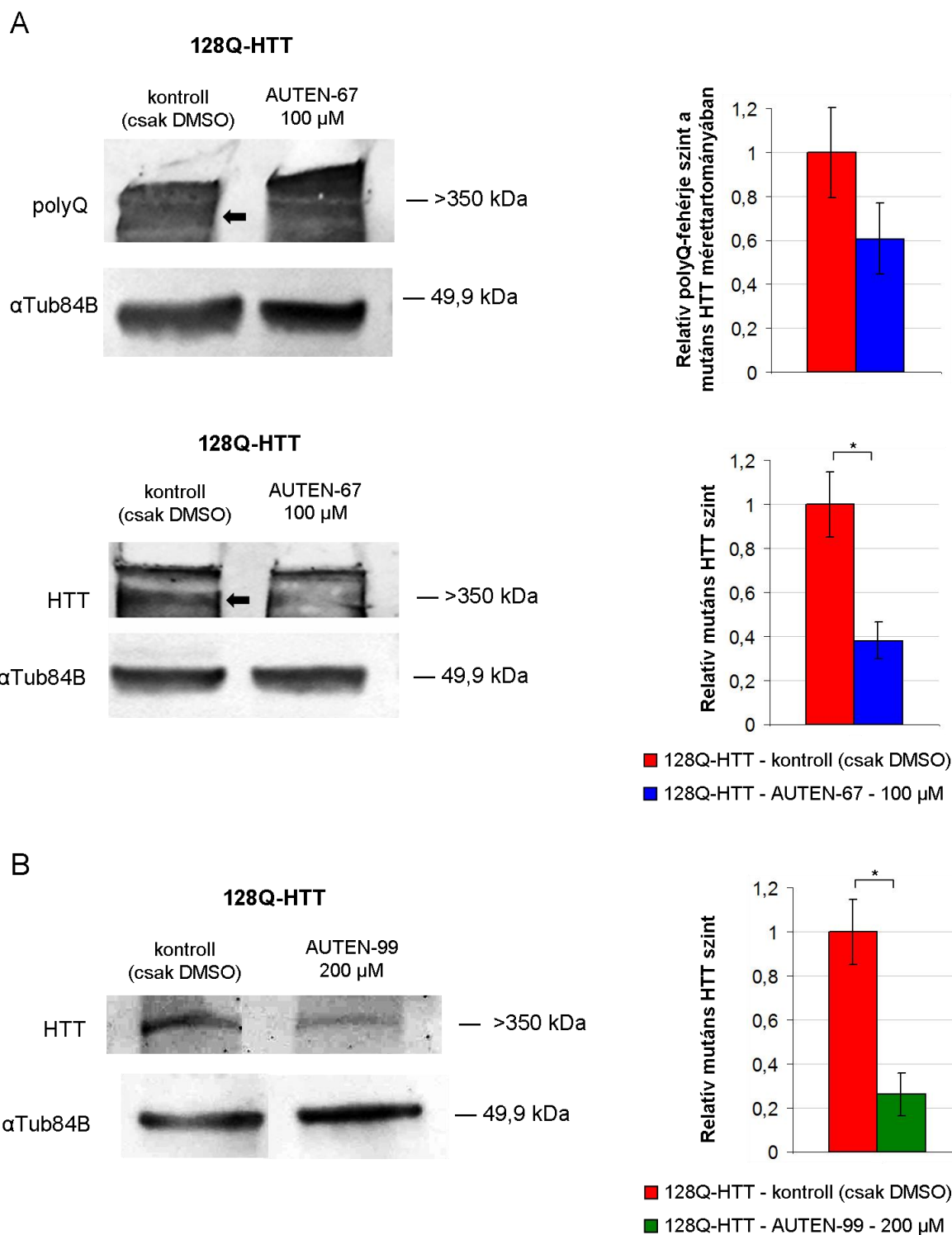
Az anti-polyQ-val és anti-p62-vel végzett kettős immunhisztokémiai jelölés felfedte, hogy a 128Q-HTT is jelentős mértékben része ezeknek a zárványoknak (20. ábra). Ráadásul a p62 több esetben héjszerűen ölelte körbe a 128Q-HTT aggregátumokat (20B ábra). Ezt a jelenséget korábban Geir Björkøy és munkatársai is megfigyelték (Björkøy és mtsai., 2005).

Érdekes módon, az anti-polyQ ellenanyag sejtmagi jelölődést is mutatott bizonyos agyi régiókban (20C ábra). Ezzel szemben a p62-jelek minden esetben citoplazmatikusak voltak. A p62 és a 128Q-HTT nagyon nagyfokú sejt-/régiószintű kolokalizációt mutatott (azok a sejtek/régiók, amelyekben nagymértékben felhalmozódott az oldhatatlan p62, azokban nagymértékben felhalmozódott a 128Q-HTT, és fordítva). E kolokalizációk mértéke nem változott AUTEN-67 kezelés hatására, azonban közel felére csökkentette mind az anti-p62-vel, mind az anti-polyQ-val intenzíven jelölődő sejtek/régiók mennyiségét (20D ábra). Az AUTEN-67 tehát csökkenti az oldhatatlan mutáns HTT mennyiségét is.

Mivel a mutáns HTT fehérje egy autofágia szubsztrát (Ravikumar és mtsai., 2002), kíváncsiak voltunk arra, hogy az AUTEN-67 illetve -99 kezelések hatására fokozódó autofágia hatással van-e a jóval toxikusabb oldott mutáns HTT mennyiségére. Az oldott fehérje szinteket western blot kísérletekben vizsgáltuk. Mind az AUTEN-67, mind az AUTEN-99 jelentősen csökkentette a mutáns HTT fehérje mennyiségét, feltehetően annak lebontását fokozva (21. ábra).



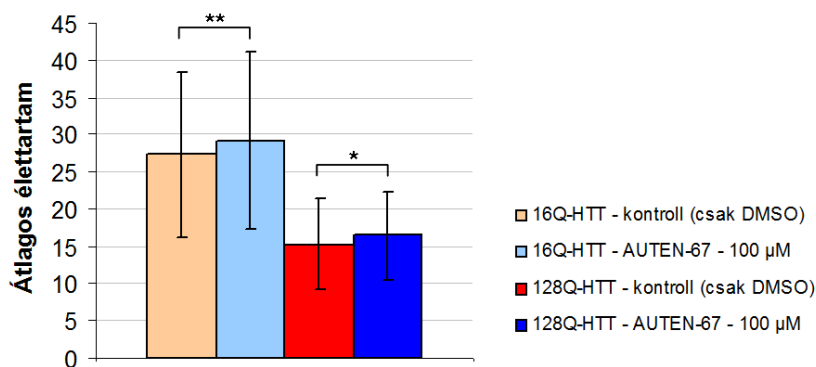
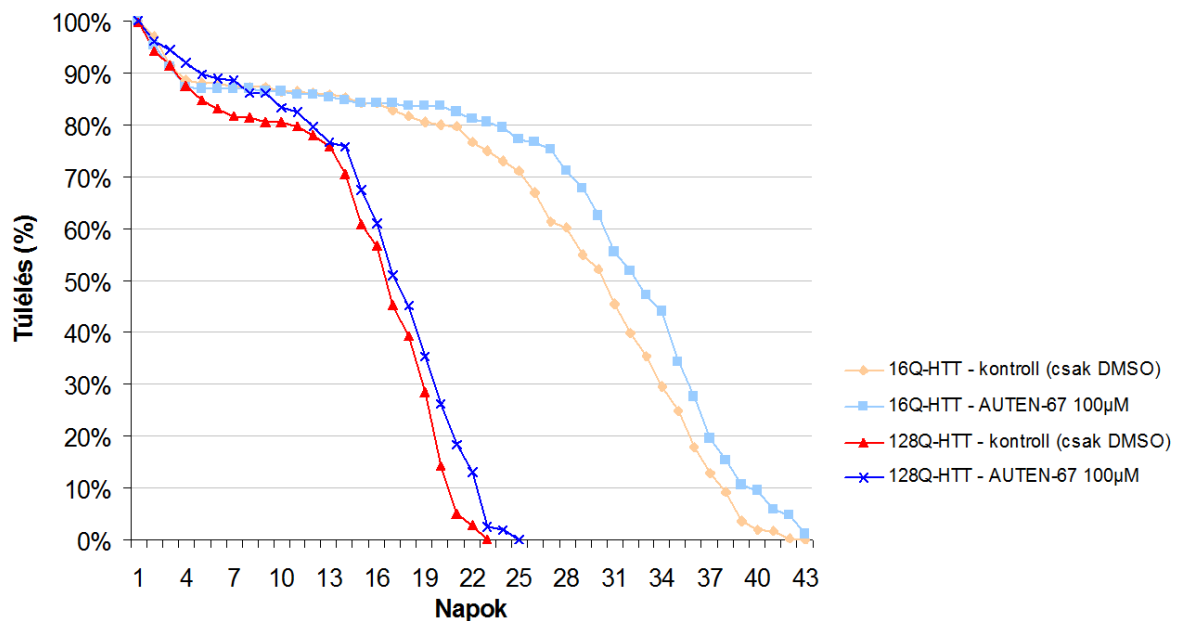
20. ábra. A 128Q-HTT-t kifejező állatok agyának bizonyos sejteiben a mutáns HTT fehérje nagyméretű fehérjeaggregátumokat képez, amelyek nagyfokú egyezést mutatnak az oldhatatlan Ref(2)P/p62-t intenzíven halmozó sejtekkel. (A) Az anti-polyQ-val végzett immunhisztokémiai jelölés felfedi, hogy a mutáns HTT a 21 napos *Appl-Gal4, y¹, w^{*/+}; UAS-128-HTT/+* genotípusú állatok agyában a sejtek egy részében nagyméretű citoplazmatikus zárványokat alkot (piros csatorna). A mérce 50 μm-t jelöl. (B) A Ref(2)P/p62 képes héjszerűen körbevenni a mutáns HTT aggregátumokat (fehér nyilak). A felvétel az A) felső sorának bal szélső ábráján látható agy bekeretezett részletéről készült, 630-szoros nagyítással (a mérce 10 μm-t jelöl). A Hoechst festés a sejtmagokat jelöli (kék csatorna). (C) Az anti-polyQ ellenanyag bizonyos régiókban sejtmagi jelölést is mutat (fehér nyilak). (D) AUTEN-67 hatására nem csak a Ref(2)P aggregátumok mennyisége csökken jelentősen, hanem az oldhatatlan HTT mennyisége is. A mutáns HTT aggregátumok és az oldhatatlan Ref(2)P/p62 aggregátumok jelentős mértékben ugyanazon sejtekben fordulnak elő. Együttes előfordulásukra az AUTEN-67 nincs hatással. A diagramokon az átlag±szórás értékek vannak ábrázolva. Egyik különbség sem szignifikáns ($p > 0,05$). Genotípus: *Appl-Gal4, y¹, w^{*/+}; UAS-128-HTT/+*. 29°C-on nevelt állatok



21. ábra. Az AUTEN-67 és az AUTEN-99 kismolekula csökkenti az oldott mutáns HTT mennyiségét. A fehérjeminták 21 napos állatok fejéből származnak. Belső kontrollként α Tub84B-t használtunk. (A) Az AUTEN-67 csökkenti az oldott mutáns HTT mennyiségét, anti-polyQ ellenanyaggal végzett western blot kísérletek szerint csökkenő trend figyelhető meg a mutáns HTT mérettartományába eső magasságban ($p=0,0592$, $n=3$), míg anti-HTT ellenanyaggal vizsgálva a különbség szignifikáns ($p<0,05$, $n=3$). (B) Az AUTEN-99 szignifikánsan csökkenti az oldott mutáns HTT mennyiségét ($p<0,05$, $n=3$). A HTT fehérjemennyiségekhez tartozó értékek a belső kontroll α Tub84B fehérjemennyiségek értékével korigálva, és a 128Q-HTT kontroll (csak DMSO) mintákat 1-nek véve normalizálva kerültek ábrázolásra. A diagramokon az átlag \pm szórás értékek kerültek feltüntetésre. Genotípus: *Appl-Gal4*, *y^l*, *w^{*}/+*; *UAS-128-HTT*/+. 29°C-on nevelt állatok

Az AUTEN-67 megnöveli a 128Q-HTT *Drosophila* HD modell élettartamát

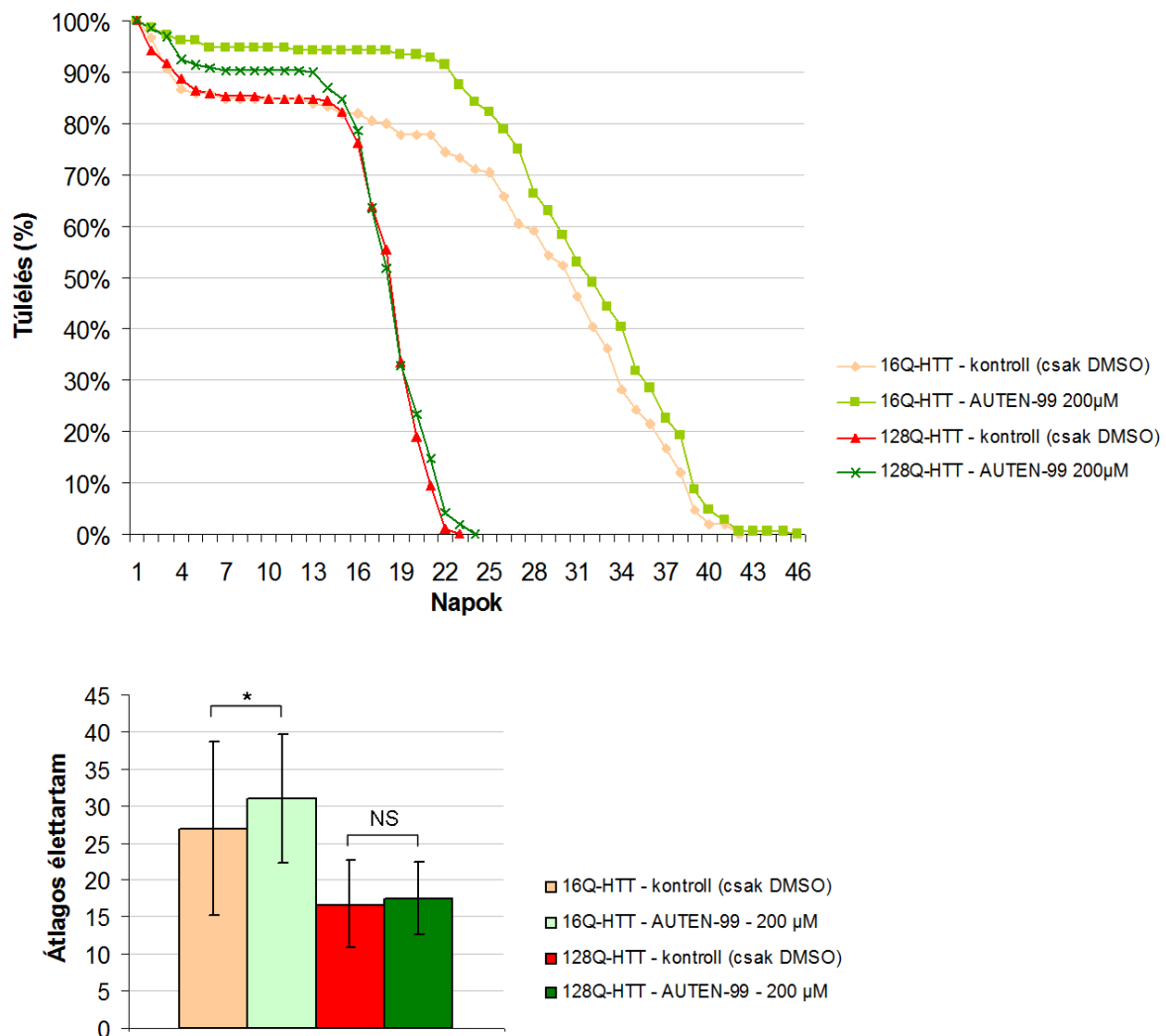
A Huntington-kór egy halálos kimenetelű betegség. Ennek megfelelően a HD modellekre is jellemző a kontroll állatoknál szignifikánsan rövidebb élettartam (Menalled és Chesselet, 2002; Marsh és mtsai., 2003). Kíváncsiak voltunk arra, hogy vajon az AUTEN-67 és -99 kis-molekulák képesek-e megnövelni a 128Q-HTT-t kifejező *Drosophila* HD modell élettartamát, ezért élethossz méréseket végeztünk. A toxikus 128Q-t expresszáló állatok a várakozásoknak megfelelően rövidebb ideig éltek, mint a 16Q-t kifejező állatok (22. és 23. ábra). Az AUTEN-67 hatására a 16Q-HTT-t, és kismértékben a 128Q-HTT-t kifejező állatok is tovább éltek, mint a DMSO-kezelt kontrollcsoport (22. ábra).



22. ábra. Az AUTEN-67 kezelés hatására megnő a 16Q-HTT-t és a 128Q-HTT-t kifejező állatok élettartama. A toxikus 128Q-HTT fehérje jelentősen csökkenti az élettartamot a nem patogén 16Q-HTT kifejeződéséhez képest. Az AUTEN-67 mindkét vizsgált HTT változat esetében növeli az élettartamot. A különbségek mind az élethossz-görbék lefutását ($p < 0,005$), mind az átlagos élettartamok összevetését tekintve szignifikánsak min-

den csoport között (az ábrán az utóbbi van jelölve, az azonos genotípusú állatok között, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$). A diagramon az átlag±szórás értékek vannak ábrázolva. Genotípus: *Appl-Gal4, y^l, w^{*/+}; UAS-16Q-HTT/+* illetve *Appl-Gal4, y^l, w^{*/+}; UAS-128Q-HTT/+*. 29°C-on nevelt állatok

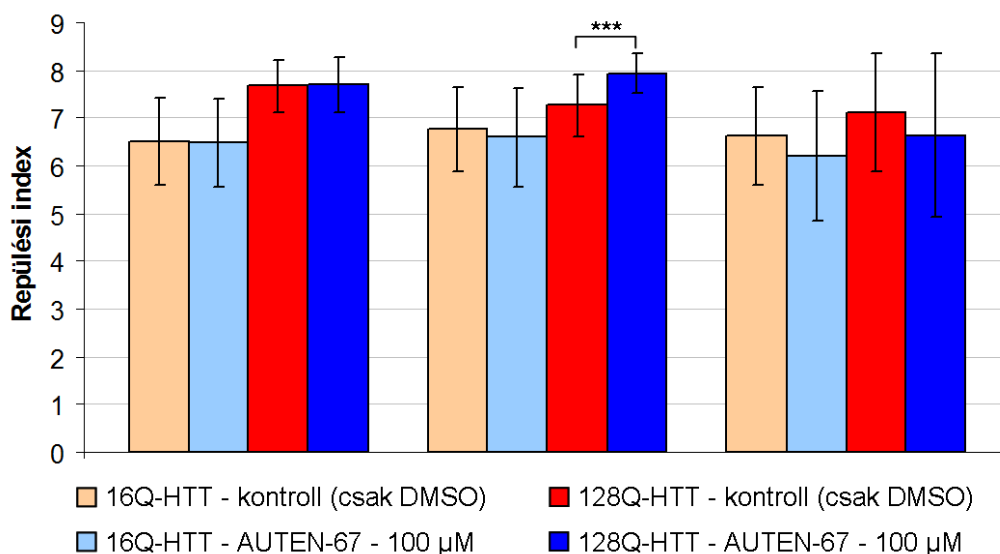
Az AUTEN-99 képes volt növelni a nem patogén 16Q hosszúságú HTT-t kifejező állatok élethosszát, azonban nem növelte a 128Q-HTT-t expresszáló állatok élettartamát (23. ábra).



23. ábra. Az AUTEN-99 kezelés képes növelni a 16Q-HTT-t kifejező állatok élettartamát, míg a 128Q-HTT-t kifejezőkére nincs hatással. A patogén 128Q-HTT jelentősen csökkenti az élettartamot a nem patogén 16Q-HTT kifejeződéséhez képest. Az AUTEN-99 a 16Q-HTT kifejezése esetén növeli az élettartamot, mind az élethossz-görbék lefutását ($p < 0,005$), mind az átlagos élettartamok összevetését tekintve (*: $p < 0,05$ - az ábrán jelölve csak az utóbbi van). A 128Q-HTT fehérje esetében nem vezet szignifikáns változáshoz egyik összevetés t tekintve sem (NS: $p > 0,05$). A diagramon az átlag±szórás értékek vannak ábrázolva. Genotípus: *Appl-Gal4, y^l, w^{*/+}; UAS-16Q-HTT/+* illetve *Appl-Gal4, y^l, w^{*/+}; UAS-128Q-HTT/+*. 29°C-on nevelt állatok

Az AUTEN-67 javítja a *Drosophila* HD modell repülési képességét

A korábban bemutatott mászóképeség vizsgálatok mellett teszteltük az állatok repülési képességét is. Az állatokat az üvegfiolákból kiütve vizsgáltuk, hogy mennyi utat tesznek meg zuhanva, mielőtt szárnyra kapnak. A rövidebb zuhanással töltött táv jobb repülési képességet jelez. A repülési képességet a repülési indexszel jellemeztük: az állatok zuhanással megtett távolságát kivontuk a vizsgált teljes távolságból és 100-zal osztottuk, hogy a kapott érték 0 és 9 közé essen. A repülési indexet ábrázolva tehát a magasabb érték jelenti a jobb repülési képességet. Az *Appl-Gal4* által vezérelt *UAS-16Q-HTT* és *UAS-128Q-HTT* nem bizonyult jó HD modellnek ebben az esetben, ugyanis a repülésvizsgálatban valamilyen okból kifolyólag a 128Q-t expresszáló állatok teljesítettek jobban 7 és 14 napos korban, míg 21 napon nem volt különbség (24. ábra). Egyik állatcsoport esetében sem volt megfigyelhető korfüggő hanyatlás. Ugyanakkor az elmondható, hogy a 128Q-HTT-t expresszáló állatok repülési képessége javult az AUTEN-67 hatására 14 napos korban (24. ábra). (Az AUTEN-99 hatását ebben a tesztben nem vizsgáltuk.)



24. ábra. Az AUTEN-67 javítja a 128Q-HTT-t kifejező állatok repülési képességét 14 napos korban. Az *Appl-Gal4* vezérelt *UAS-16Q-HTT* és *UAS-128Q-HTT* nem bizonyult jó HD modellnek a repülési vizsgálatban, ugyanis a 128Q-HTT-t kifejező állatok jobb motoros funkciókkal bírnak, mint a kontroll egyedek, és nem figyelhető meg korfüggő hanyatlás sem. Ugyanakkor az AUTEN-67 képes javítani a 128Q-HTT-t expresszáló állatok repülési képességét 14 napos korban. Más vizsgált korban, illetve a 16Q-HTT-t kifejező állatokra nincsen hatással. Az ábrán csak az azonos genotípusú minták közti szignifikáns különbség van jelölve (***: $p < 0,005$). A diagramon az átlag±szórás értékek vannak ábrázolva. Genotípus: *Appl-Gal4*, y^l , $w^{*}/+$; *UAS-16Q-HTT*/+ illetve *Appl-Gal4*, y^l , $w^{*}/+$; *UAS-128Q-HTT*/+. 29°C-on nevelt állatok

Eredmények megvitatása

A sejtes lebontó folyamatok - az autofágia és az ubikvitin-proteaszóma rendszer - a károsodott fehérjék és sejtalkotók lebontása révén igen jelentősek a sejt homeosztázisának fenntartásában. Ezen hatásuk különösen fontos a nem osztódó, terminálisan differenciálódott sejtek, mint a neuronok esetében, amelyekben a károsodott komponensek mennyisége osztódással nem csökken (Rabinowitz és White, 2010; Mizushima és Komatsu, 2011; Menzies és mtsai., 2017).

Az aggregációra hajlamos fehérjéket az autofágia sokkal nagyobb hatékonysággal képes lebontani, mint a proteaszóma. A rossz konformációjú mutáns fehérjék aggregálódásával képződő struktúrák megjelenése közös jellemzője számos neurodegeneratív betegségnek, így az Alzheimer- és Parkinson-kórnak, az amiotrófiás laterális szklerózisnak (ALS), a prion- és poliglutanin betegségeknek, az utóbbiak közé tartozik a spinocerebelláris ataxia több formája és a Huntington-kór (HD) (Ravikumar és mtsai., 2002; Sarkar és mtsai., 2009; Menzies és mtsai., 2011; Sweeney és mtsai., 2017).

A Huntington-kór egy domináns, komplex motoros, kognitív és pszichiátriai tünetekkel járó, halálos kimenetelű, gyógyíthatatlan betegség, melynek elsődleges molekuláris oka az, hogy rendellenesen magas számú CAG ismétlődés képződik a Huntingtin (HTT) fehérjét kódoló génben, amely hosszú, aberráns polyQ szakaszhoz vezet a fehérjében. A mutáns HTT pedig számos ponton szól bele a neuronok működésébe, melynek előbb az idegsejtek rendellenes működése, majd tömeges pusztulása lesz a következménye (Ross és Tabrizi, 2011; Dayalu és Albin, 2015; Rüb és mtsai., 2016).

Az autofágia szelektíven képes a mutáns HTT fehérje lebontására, és ez a képesség még inkább jelentőssé válik a proteaszómális lebontás progresszív károsodása miatt (Ravikumar és mtsai., 2002; Bennett és mtsai., 2005; Bennett és mtsai., 2007; Sarkar és Rubinsztein 2008). Ezzel összhangban az autofágia genetikai vagy farmakológiai fokozása jótékony hatású számos HD (és más neurodegeneratív betegség) modellben, mivel a HD során maga az autofágia is sérülést szenved (ahogyan más neurodegeneratív betegségekben is) (Nixon, 2013; Martin és mtsai., 2015; Martinez-Vicente, 2015; Menzies és mtsai., 2017). A mutáns HTT több ponton képes megzavarni az autofág működést. Ennek részben az a magyarázata, hogy a vad típusú

HTT maga is részt vesz az autofágiában, elősegíti a szelektív autofágiát, és az autofagoszómák axonmenti mozágását és érését (Ochaba és mtsai., 2014; Wong és Holzbaur, 2014; Rui és mtsai., 2015). A HD-ban szenvedők heterozigóták, vagyis a HD-ban megfeleződik a vad típusú HTT mennyisége. Ez már önmagában képes a HTT-hez kapcsolódó funkciók csökkenéséhez vezetni (Dragatsis és mtsai., 2000; Saudou és Humbert, 2016). A mutáns HTT fehérje pedig domináns negatív módon hatva tovább rontja - az autofágiánál maradva - a lebontandó struktúrák bekerülését az autofagoszómákba, közel üres autofagoszómákat eredményezve, vagy az autofagoszómák axonmenti szállítását (Martinez-Vicente és mtsai., 2010; Wong és Holzbaur, 2014). A mutáns HTT továbbá képes csökkenteni az autofágia iniciációjának a mértékét is, illetve a lizoszomális aktivitást is (del Toro és mtsai., 2009; Wold és mtsai., 2016). A mutáns HTT negatív hatásai azonban nem egyszerre jelentkeznek, feltehetően függ a sejt típusától illetve a betegség stádiumától (Martin és mtsai., 2015).

Az autofágia legjelentősebb negatív szabályozója az mTOR kináz komplex 1 (mTORC1). A rapamycin ezen komplex gátlásán keresztül aktiválja az autofágiát, és számos HD modellben megállapítást nyert, hogy gátolja a HD-ra jellemző patológiás tulajdonságok megnyilvánulását (Ravikumar és mtsai., 2002; Ravikumar és mtsai., 2004; Sarkar és mtsai., 2009). Az mTORC1 azonban több más lényeges sejtes folyamatot is szabályoz (pl. transzkripció, transzláció, riboszóma képződés, lipid- és mitokondriumszintézis) (Laplante és Sabatini, 2009), amelyekre a rapamycin is hatással van. A rapamycint transzplantációknál immunszuppresszásként is használják, de alkalmazásában ott is hátrányt jelentenek az általa kiváltott mellékhatások (Allison, 2016). Ezért mindenképpen indokolt olyan autofágia aktiváló ágensek azonosítása és tesztelése, amelyek nem az mTOR-on keresztül fejtik ki hatásukat. A sejt energiaszenzoraként működő AMPK is ilyen célpont, és az AMPK aktiválásával lehet is autofágiát fokozni, és enyhíteni, késleltetni a HD-ra jellemző patológiákat (Ma és mtsai., 2007; Vazquez-Manrique és mtsai., 2016; Walter és mtsai., 2016). Ugyanakkor az AMPK is a sejt egyik központi fehérjéje, akárcsak az mTOR (Hardie, 2014; Villanueva-Paz és mtsai., 2016). Az elmúlt évtizedben több olyan molekulát sikerült azonosítani, amelyek mTOR- és AMPK-függetlenül hatnak, részben az FDA által már törzskönyvezett gyógyszerek ilyen irányú vizsgálatával, részben más módon. A rilmenidin, a klonidin, a verapamil, a valproát, a kalpain-inhibitorok és a trehalóz mind mTOR- és AMPK-függetlenül fokozza az autofágiát és csökkenti a mutáns HTT fehérje mennyiségét, illetve javítja a vizsgált HD-ra jellemző patológiai rendellenességeket HD modellekben (Williams és mtsai., 2008; Sarkar és mtsai., 2009;

Menzies és mtsai., 2015). E molekulák mindegyike azonban az autofágiától *upstream* hat pl. közvetlenül a glükóz transzportra, a sejt Ca^{2+} - vagy cAMP szintjére (Sarkar és mtsai., 2009).

Ezek tükrében szükséges olyan megközelítés, amely az autofág apparátust a fentieknél jóval közvetlenebb módon aktiválja. Egy ilyen törekvés eredménye a Tat-Beclin-1 peptid, melynek alkalmazása fokozza az autofágiát, és egér HD modellben csökkenti az aggregátumok képződését (Shoji-Kawata és mtsai., 2013). A Tat-Beclin-1 feltehetően az endocitózist is befolyásolja mivel a Beclin-1 mindkét (az autofágiához és az endocitózishoz kellő) Vps34 komplex tagja (Funderburk és mtsai., 2010). Érdekes olyan szabályozó fehérjéket illetve molekulákat keresni, amely csak az autofág Vps34 komplexre hatnak.

A myotubularinok lipidfoszfatázok, szubsztrátjaik a PI3P és PI3,5P₂ (Robinson és Dixon 2006). Az MTMR14 (Myotubularin related 14, más néven (h)Jumpy vagy MIP) egy alkalmas jelölt lehet, ugyanis a PI - PI3P átalakítást katalizáló Vps34 antagonsztájaként szabályozza az autofágiát (Vergne és mtsai., 2009; Dowling és mtsai., 2010; Hnia és mtsai., 2012; Liu és mtsai., 2014), de az endocitotikus PI3P-készleten nem sikerült kimutatni (Vergne és mtsai., 2009).

Egy kismolekula könyvtár biokémiai szűrésével (foszfatáz esszé) kerestünk MTMR14 inhibitorokat, amelyek potenciális autofágia aktiválók. Közülük kettőről, az AUTEN-67-ről és az AUTEN-99-ről (autophagy enhancer-67 és -99) megállapítottuk, hogy fokozzák az autofág aktivitást HeLa sejtekben, neuronokban és *Drosophila*-ban, valamint gerinces modellállatokban egyaránt (Papp és mtsai., 2016; Kovács és mtsai., 2017). (Erről részletesen Kovács Tibor és Liliom Hanna disszertációjában lehet olvasni.)

Drosophila eredményeink szerint az AUTEN-67 és az AUTEN-99 az MTMR14 *Drosophila* ortológján, az EDTP-n keresztül fokozza az autofágiát, ugyanis e kismolekulák *EDTP* mutáns állatokban nem voltak hatással az autofág folyamatra (Papp és mtsai., 2016; Kovács és mtsai., 2017).

Miután meggyőződünk róla, hogy a táplálékhoz hozzáadva mind a két kismolekula képes fokozni az autofágiát a felnőtt muslicák agyában (9. ábra), vizsgáltuk a hatásukat Huntington- és Parkinson-kór *Drosophila* modellekben. (A Parkinson-kór modellel kapott eredmények Kovács Tibor doktori dolgozatában olvashatóak.) A *Drosophila melanogaster* széleskörűen

használt modellorganizmus a neurodegeneratív betegségek kutatásában a patológiai mechanizmusok és gyógyszerjelölt molekulák vizsgálatára (Ambegaokar és mtsai., 2010; McGurk és mtsai., 2015). A HD modellek rekapitulálják a páciensekben megfigyelhető patológiai elváltozások jelentős részét (Marsh és mtsai., 2003; Xu és mtsai., 2015). Az általunk használt HD modell fő eleme a 128Q hosszúságú poliglumatin szakaszt tartalmazó teljes emberi fehérjét kódoló UAS-vezérelt transzgen, amely a korai patológiai elváltozásokat is jól modellezi (Romero és mtsai., 2008). Kontrollként a normál, 16Q hosszúságú szakaszt tartalmazó HTT-t kódoló állatokat használtunk. A transzgéneket a pánneurális *Appl-Gal*-gyel fejeztettük ki. Azért esett erre a választás a felnőtt állatokban korábban használt motoneuron-specifikus *C164-Gal4*-gyel szemben (Romero és mtsai., 2008), mert a HD patológiája jóval szélesebb, nem korlátozódik a motoros funkciókra (Rüb és mtsai., 2016).

A p62 autofág receptor mennyiségének vizsgálata széleskörűen használt markere az autofág lebontásnak és aktivitásnak (Pankiv és mtsai., 2007; Shvets és mtsai., 2008; Piracs és mtsai., 2012; Nagy és mtsai., 2014b). Az AUTEN-67 és -99 kezelések hatására csökken a p62 mennyisége a 16Q-HTT-t és a 128Q-HTT-t kifejező állatokban is (14. ábra), azaz valószínűsíthetően mind az AUTEN-67, mind az AUTEN-99 fokozza az autofág aktivitást a HD modell állatokban is. Az AUTEN-99 kezelés esetében megfigyeltük, hogy ez a hatás 7 napos felnőttekben még nem jelentkezik, azonban az időben előre haladva egyre hatékonyabban gátolta a p62 akkumulációját feltehetően annak autofág lebontását fokozva (15. ábra). A 16Q-HTT-t kifejező állatok öregedése során is megfigyelhető a p62 felhalmozódása, amely összhangban van azzal, hogy a p62 mennyisége - akár csak az ubikvitinált fehérjéké - nő az agy öregedése során, mind emlősökben, mind *Drosophila*-ban (Gray és mtsai., 2003; Nezis és mtsai., 2008; Simonsen és mtsai., 2008; Braak és mtsai., 2013). Ezzel összhangban az AUTEN-67 és -99 képes csökkenteni nem csak a p62, hanem a lebontásra kijelölt ubikvitinálódott fehérjék mennyiségét is idős, 21 napos HD modellállatokban (16. ábra).

Megállapítottuk azt is, hogy mindkét kismolekulával kezelve jelentősen kevesebb a HD patomechanizmusát előidéző oldott (szolúbilis) mutáns HTT fehérje mennyisége, vélhetően a fokozott autofág lebontás következményeként (20. és 21. ábra). Mindez összhangban van azzal, hogy a mutáns HTT egy autofágia szubsztrát, és az autofág aktivitás fokozása csökkenti a mutáns HTT mennyiségét számos HD modellben (Ravikumar és mtsai., 2002; Sarkar és Rubinsztein 2008). Ugyanakkor meglepő módon a 128Q-tartalmú HTT-t expresszáló állatokban kevesebb volt az oldott p62 és ubikvitinált fehérjék mennyisége a kontrollként szolgáló

16Q-HTT és humán HTT transzgént nem tartalmazó állatokhoz képest is (14-17. ábrák). Ez két okból lehetséges, vagy kevesebb a p62 és az ubikvitinált fehérjék össz mennyisége a 128Q-HTT állatok fejéből származó mintákban, mint a 16Q-HTT kifejező állatokéban, vagy az ubikvitinált fehérjék és a p62 nagyobb része oldhatatlan aggregátumokban, zárványokban található a 128Q-HTT-t expresszáló állatokban. Az előbbi állítás magyarázatául szolgálhatott volna a fokozott autofágia, és bár a HD páciensekben és a modellekben több autofág struktúra van, de ez az autofág folyamat gátlásából adódik (Kim és mtsai., 1999; Kegel és mtsai., 2000; Petersen és mtsai., 2001; Nagata és mtsai., 2004; Martinez-Vicente és mtsai., 2010; Martin és mtsai., 2014; Martin és mtsai., 2015). Az állatok agyán végzett immunhisztokémiai jelölések szerint a 128Q-HTT-t expresszáló állatokban (és csak bennük) a p62 nagyon nagyméretű citoplazmatikus zárványokban található meg (18. és 20. ábra). A p62 körbeveszi a mutáns HTT-t igen hasonlóan ahhoz, amit a 68Q-HTT¹⁻¹⁷¹-t kifejező HeLa sejt modellben is megfigyeltek (Björkøy és mtsai., 2005). Ráadásul az oldhatatlan p62 és ubikvitin jelentős része kolokalizál (19. ábra), így feltehetően legalább részben ubikvitin-tartalmúak is a mutáns HTT alkotta citoplazmatikus zárványok, mások megfigyeléseihez hasonlóan (Björkøy és mtsai., 2005; Iwata és mtsai., 2005; Heng és mtsai., 2010). A fehérjeaggregátumok, zárványok jelenléte azért volt meglepő, mert korábban ezzel a teljes hosszúságú mutáns HTT-t kifejező konstrukcióval nem figyeltek meg sejtmagi vagy citoplazmatikus aggregátumokat, sem lárvális motoneuronokban, sem 20 napos felnőttek hasdúc-lánci interneuronjaiban (Romero és mtsai., 2008). Ráadásul az immunhisztokémiai kísérleteink során bizonyos agyi neuronok sejtmagjai anti-polyQ pozitívak is voltak, ami a mutáns HTT sejtmagi jelenlétére is utalhat (20. ábra). A sejtmagi zárvány gyakori patológiás jelleg a HD neuronokban. Míg a szómabeli zárványokban a mutáns HTT lehet teljes vagy csonkolt, a sejtmagi zárványok csonkolt mutáns HTT-t tartalmaznak (Sieradzan és mtsai., 1999). Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a mutáns humán HTT fehérje hasitódik bizonyos neuronokban *Drosophila*-ban is. A sejtmagi zárványok p62 tartalmúak HD betegekben és egér modellben (Nagaoka és mtsai., 2004; Rue és mtsai., 2013), ezzel szemben mi nem figyeltük meg a Ref(2)P/p62 magi lokalizációját *Drosophila* agyban. A különbség fakadhat az ellenanyag tulajdonságából, hogy az anti-Ref(2)P/p62 nem képes bejutni a sejtmagba, vagy abból, hogy emlősökkel szemben a *Drosophila*-ban másképp képződnek a sejtmagi zárványok. Az is lehetséges, hogy a p62 *Drosophila* ortológja (Ref(2)P) más funkcióval bír a sejtmagi aggregátumok képződésében, de az sem zárható ki, hogy a sejtmagi anti-polyQ-jel nem a mutáns HTT fehérjét jelöli. A kérdés tisztázása végett további vizsgálatok szükségesek. Az mindenesetre egyértelműen elmondható, hogy az AUTEN-67 hatására a ci-

toplazmatikus zárványokból is kevesebb van, tehát AUTEN-67 kezelés hatására csökkent az oldott és az oldhatatlan mutáns HTT mennyisége is (20. és 21. ábra).

A HD-ban számos módon sérülnek a motoros funkciók (a chorea mellett, pl. bradikinézia, ataxia). Ezzel összhangban a *Drosophila* HD modellekben is progresszíven sérülnek e funkciók. (Marsh és mtsai., 2003; Rüb és mtsai., 2016; Wyant és mtsai., 2017). Az általunk vizsgált modellben a 128Q-HTT-t kifejező állatok lassabban másznak, mint a 16Q-HTT-t expresszálók, és az állatok mászási sebessége is folyamatosan csökken, és korral még tovább romlik (10-13. ábra). Ez részlegesen egybeesik azzal, hogy az *UAS-128Q-HTT* transzgén motoneuronbeli kifejeztetése rosszabb mászóképeséghez vezet, mint a kontrollként GFP-t kifejező állatok (Romero és mtsai., 2008). Az AUTEN-67, és kisebb mértékben a -99, képes volt enyhíteni mászóképeségi funkciók csökkenését. Korábban a *Drosophila*-ban vizsgált neuroprotektív molekulák közül a kongóvörös, a cisztamin és a SAHA mászóképeségre gyakorolt hatását vizsgálták. Az egyik tanulmányban a kongóvörös pozitív hatással volt az állatok képességére, míg a cisztamin nem (Apostol és mtsai., 2003). Egy másik HD modellben, másik kísérletes elrendezés szerint a kongóvörös sem tudta javítani az állatok mászóképeségét, ahogyan a cisztamin vagy a SAHA sem önmagában (Agrawal és mtsai., 2005). Ugyanakkor bármelyik kettős- vagy hármas kombinációja e három molekuláknak szignifikáns javulást eredményezett hét napos felnőtt állatokban (Agrawal és mtsai., 2005).

Egy másik motoros tesztben, a repülésvizsgálat esetében az *Appl-Gal4*-vezérelt HD modellünk nem bizonyult abban az értelemben megfelelőnek, hogy a 16Q-HTT-t kifejező állatok repültek kevésbé jól (24. ábra), szemben azzal a korábbi vizsgálattal, amikor a transzgéneket a motoneuronokban fejeztették ki (Romero és mtsai., 2008). Ennek az oka egyelőre nem ismert, azonban több különbséget lehet megnevezni az általuk és az általunk (jelen dolgozat) elvégzett kísérletek között. Ilyen a már említett Gal4-forrás (motoneuronális *C164-Gal4* versus pánneurális *Appl-Gal4*), a hőmérséklet (27°C kontra 29°C), az életkor (25 napos állatok versus 7, 14, és 21 napos állatok). A repülési teszthez használt henger az esetükben átlátszó volt, a mi tesztünkben nem. A továbbiakban ezért indokolt lehet a repülési teszt megismétlése átlátszó henger használatával. Ugyanakkor elmondható, hogy az AUTEN-67 nem csak a mászási, hanem a repülési képességére is pozitív hatással volt a 128Q-HTT-t kifejező állatok vizsgálatában (24. ábra). Más gyógyszeraspiráns molekula repülőképeségre gyakorolt hatását *Drosophila* HD modellben még nem vizsgálták, így ilyen összevetések nem lehetségesek.

A Huntington-kór halálos kimenetelű betegség, a vártnál rövidebb élettartamot eredményez. Ennek megfelelően a *Drosophila* HD modellek is rövidebb ideig élnek a rövid polyQ szakaszt kifejező kontroll állatokhoz képest (Marsh és mtsai., 2003; Lee és mtsai., 2004; Romero és mtsai., 2008). Ezt a megfigyelést a mi modellünk is rekapitulálta (22. és 23. ábra). Az AUTEN-67 és az AUTEN-99 kismolekula megnöveli az élettartamot 16Q-HTT-t kifejező muslicák esetében. Élethossz-növelő hatás *white*¹¹¹⁸ (nem transzgenikus) állatok esetében is megfigyelhető (Papp és mtsai., 2016; Kovács és mtsai., 2017). Ez összhangban van az autofágia élethossz meghatározásában betöltött szerepével, köztük azzal, hogy az autofág aktivitás fokozása élethossz nyújtó hatású (Vellai 2009; Rubinsztein és mtsai., 2011; Pyo és mtsai., 2013; Martinez-Lopez és mtsai., 2015). Az AUTEN-99 kezelés nem volt hatással a 128Q-HTT-t expresszáló állatok élettartamára, azonban az AUTEN-67 kezelés kis mértékben megnövelte az élettartamukat (22. és 23. ábra).

Az általunk vizsgált magasabb koncentrációkban feltehetően a két autofágia aktiváló kismolekula közül az AUTEN-67 a hatékonyabb, mind a motoros funkciók kiterjedtebb javítását tekintve, mind az élettartamra kifejtett pozitív hatást alapul véve. Egy gyógyszerjelölt molekula szignifikáns pozitív hatása a motoros funkciókra és az élettartamra HD modellben igen ritka és értékes megfigyelés.

A korábban vizsgált molekulák közül a rapamycinnek - amely neuroprotektív *Drosophila* HD modellben is -, egy észter analógja (CCI-779 = Temsirolimus) javítja a motoros funkciókat egérben, de az élettartam növekedéséhez nem vezet (Ravikumar és mtsai., 2004), annak ellenére, hogy a rapamycin és az mTOR gátlása az élővilág széles skáláján élethossz növekedést eredményez (vad típusú genetikai háttérben) (Vellai és mtsai., 2003; Harrison és mtsai., 2009; Bjedov és mtsai., 2010; Johnson és mtsai., 2013).

Az AMPK-aktiváló metformin hatását *Drosophila* HD modellben még nem vizsgálták. Egekben érdekes módon nem-függő hatást írtak le: a hím HD modellegerek hátsó végtag összehúzása ellen hat (míg nőstényekben nem), más motoros funkcióra viszont egyik nemből sincsen hatással. A hím állatok élettartamát képes növelni, a nőstényekét viszont nem befolyásolja (Ma és mtsai., 2007).

A kalpainok géncsendesítése *Drosophila* HD modellben neuroprotektív és ez a hatás nem figyelhető meg *Atg8a* mutáns háttérben, az endogén kalpaingátló kalpasztatin túltermeltetése pedig egér HD modellben javítja a motoros funkciókat és nem szignifikánsan ugyan, de fokozza az élettartamot (Menzies és mtsai., 2015).

A *Drosophila* HD modellek eredményeihez hasonlóan a cisztamin egér HD modellben is neuroprotektív (Dedeoglu és mtsai., 2002; Van Raamsdonk és mtsai., 2005a), hatékonyan védi a pusztulástól a striatum neuronjait (Van Raamsdonk és mtsai., 2005a). A *Drosophila* eredményekkel ellentétben a motoros funkciókat javítja, legalábbis abban az esetben, ha olyan HD egérmodellt vizsgáltak, amelyekben a központi idegrendszeren kívül is képződnek aggregátumok. Ezen HD modell egerek élettartamát is növelte a cisztamin (Dedeoglu és mtsai., 2002; Karpuj és mtsai., 2002; Bailey és Johnson 2006). Ezzel szemben nincs hatással a motoros funkcióvesztésre abban az esetben, hogyha a saját szabályozó elemei vezérlik a mutáns emberi HTT kifejeződését - a *Drosophila* megfigyelésekkel összhangban (Van Raamsdonk és mtsai., 2005a). Ez utóbbi esetben még nem vizsgálták a cisztamin élettartamra gyakorolt hatását, ahogyan *Drosophila* modellben sem.

A SAHA *Drosophila* HD modellben önmagában a motoros funkciókat nem javította (Agrawal és mtsai., 2005), míg az élettartamot növelte (Steffan és mtsai., 2001). Egér HD modellben gátolja a hisztondeacetilázok működését az agyban, bizonyos mértékben neuroprotektív és javítja a motoros funkciókat (Hockly és mtsai., 2003). A SAHA elképzelhető, hogy részben az autofágia aktiválásán keresztül fejt ki a hatását, mivel emlőrák sejtekben képes fokozni az autofág gének expresszióját, és elősegíti az LC3 autofág membránra kerülését (Han és mtsai., 2017).

A *Drosophila*-ban tesztelt peptidalapú mutáns HTT gátlók nem csak neuroprotektívnek bizonyultak, hanem az élettartamot is fokozták, viszont a motoros funkciókra gyakorolt hatásukat nem vizsgálták (Kazantsev és mtsai., 2002; Nagai és mtsai., 2003).

A metilénkék, amely neuroprotektív *Drosophila* és egér HD modellben is, javítja a motoros funkciókat HD egérben (muslicákban nem vizsgálták) (Sontag és mtsai., 2012), élettartamra gyakorolt hatást azonban nem vizsgáltak semelyik modellben sem.

A kongóvörös élethosszra gyakorolt hatását nem vizsgálták *Drosophila*-ban, egér HD modellben pedig összességében nem volt pozitív hatással, de az állatok első 50%-nak kicsit fokozta az élettartamát (Wood és mtsai., 2007). Ugyanakkor, míg muslicákban képes javítani a mászó képességet (Apostol és mtsai., 2003), addig egyáltalán nincsen pozitív hatással a motoros vagy a kognitív funkciókra HD egérmodellben, aminek feltehetően az az oka, hogy nem képes átjutni a vér-agy gáton (Wood és mtsai., 2007). A SAHA is csak úgy képes hatni egér HD modellben, ha ciklodextrinnel alkottatnak vele komplexet, mert így már hatékonyan átjut a vér-agy gáton (Hockly és mtsai., 2003). Az AUTEN-99 szintén jó vér-agy gát penetrációs képességgel rendelkezik (Kovács és mtsai., 2017), az AUTEN-67-t viszont egerek agyából nem sikerült kimutatni, ami azt sejteti, hogy nem jut át a vér-agy gáton. Az AUTEN-67 ugyanak-

kor pozitív hatással volt egy egér Alzheimer-kór modell fészekrakási viselkedésére (Papp és mtsai., 2016). Ennek egyik oka lehet az, hogy annak ellenére, hogy nem jut át a vér-agy gáton, jótékony hatást fejthet ki az agyi kapillárisokra vagy az agyi vérnyomásra, ezáltal kedvezve a jó agyi oxigénellátásnak, amely igen fontos faktor az Alzheimer-kórban (Palmer és Love 2011; Wang és mtsai., 2013). Másik ok az lehet, hogy az AUTEN-67 gyorsan metabolizálódik, ötféle metabolit azonosítható. Az, hogy ezek átjutnak-e a vér-agy gáton, eddig nem képezte vizsgálat tárgyát, így lehetséges, hogy egy vagy több metabolit képes bejutni a központi idegrendszerbe, és az(ok) felelős(ek) az Alzheimer-kór modell egerekben megfigyelt jótékony hatásokért. A metabolitok azonosítása és a vér-agy gáton való átjutás képességének tesztelése mindenképpen fontos lenne. Az AUTEN-67 ciklodextrinnel való kapcsolása egy lehetséges megoldás az AUTEN-67 vér-agy gáton való bejuttatására (Hockly és mtsai., 2003; Coisne és mtsai., 2016).

Mind az AUTEN-67, mind az AUTEN-99 esetében figyelembe kell venni, hogy az MTMR14 gátlásán keresztül hatnak az autofág folyamatra. Az MTMR14 a myotubularinok családjába tartozik, melynek névadó tagját, az MTM1-t az X kromoszómához kapcsolt miotubuláris miopátia egyik genetikai okaként azonosították (Laporte és mtsai., 1996). A miotubuláris vagy centronukleáris miopátiák heterogén genetikai hátterű betegségek, melyekre kisméretű izomrostok, és azokban közepesen elhelyezkedő sejtmagok a jellemzőek. Az MTMR14 két variánsát azonosították centronukleáris miopátiában szenvedő betegekben (Tosch és mtsai., 2006). Az MTMR14 mutációi azonban feltehetően nem elsődleges okai, de befolyásoló faktorai lehetnek ennek a betegségnek (Tosch és mtsai., 2006; Hnia és mtsai., 2012; Jungbluth és Gautel, 2014). Ugyanakkor az *Mtmr14* mutáns egerek izmai kisebb erő kifejtésre képesek, hosszabb az elernyedési idejük és nagyobb mértékben fáradnak el (hosszabb a regenerálódáshoz szükséges idejük). Az izomrostjaikban csökkent szarkoplazmatikus, de megnövekedett citoszolikus kalciumszint jellemző (Shen és mtsai., 2009), valamint duzzadt, megnyúlt T-tubulusok figyelhetőek meg (Shen és mtsai., 2009; Hnia és mtsai., 2012). Ezekkel összhangban romlik az *Mtmr14* mutáns állatok motoros teljesítménye, és idős korukra a vad típushoz képest 30%-kal nagyobb vázizomvesztés jellemző rájuk (Shen és mtsai., 2009). Mivel a HD-ban számos motoros rendellenesség jelenik, illetve jelenhet meg a chorea mellett illetve után - merevség, bradikinézia, ataxia, dystonia, csökkent izomtónus (Rüb és mtsai., 2016; Wyant és mtsai., 2017) -, ezért fontos figyelembe venni, hogy az *Mtmr14* csökkent funkciója romló izomműködéshez vezet egérmodellben. Ugyanakkor az *Mtmr14* mutáns egerekben az MTMR14 fehérje folyamatosan és teljes mértékben hiányzik, ami feltehetően jóval súlyosabb hatást eredményezhet,

mint az MTMR14 felnőttkori farmakológiai gátlása. Ezzel egybecseng az, hogy az *mtmr14* géncsendesített zebrahalak mutatnak ugyan az egér *Mtmt14* mutánsokhoz hasonló izomfunkció romlásokat, de ez jóval kisebb mértékű, mint az *mtmr1* hiányában, illetve a vázizmok ultrastruktúrájában sem figyelhető meg elváltozás (Dowling és mtsai., 2010). *Drosophila*-ban az *EDTP* mutációja szintén izomrendellenességhez és az izomműködés fokozatos csökkenéséhez, valamint ingatag, lassú mozgáshoz vezet (Selaya, 2001; Chan, 2003). Ilyen fenotípusokat az AUTEN-67, illetve -99 kezelések nyomán nem figyeltünk meg. Az általunk vizsgált motoros funkciókat az AUTEN-ek vagy javították, vagy nem voltak rájuk hatással, de egyik esetben sem rontottak rajtuk; és a 16Q-HTT-t expresszáló állatok mászóképeségén vagy mászási sebességén sem rontottak. Ez azt sugallja, hogy létezik olyan AUTEN-67, illetve -99 dózis, amely javítja a HD modell muslicák motoros funkcióvesztését, és nem pedig súlyosbítja azokat.

Az *Mtmt14* mutáns egerekre a fentebb írtak mellett fokozott időskori elhízás jellemző, és magasabb a vér glükóz-, koleszterin- és a triglicid szintjük, mint a kontroll állatoknak. Az életkor előrehaladtával gyulladási citokinek szintje is növekszik (Lv és mtsai., 2015; Lv és mtsai., 2017). Ráadásul egér embrionális fibroblasztok osztódási kapacitása is fokozódik az MTMR14 hiányában, és e sejtekben, valamint májban, zsírszövetben és izomban megváltozik az AKT-ERK szignalizáció (Liu és mtsai., 2014; Lv és mtsai., 2015; Lv és mtsai., 2017). Mindezekre érdemes különös tekintettel lenni az AUTEN-ek további vizsgálata során. Ugyanakkor, az életkor előrehaladtával bekövetkező fokozott testsúlygyarapodás még akár jótékony mellékhatás is lehet, hiszen a HD végső stádiumára cachexia (kóros lesoványodás) a jellemző, amely már nagyon meghatározza a betegek túlélési idejét (Rüb és mtsai., 2016).

Az AUTEN-67, és kisebb mértékben az AUTEN-99, képes fokozni az autofág aktivitást egy *Drosophila* HD modellben, és csökkenti a mutáns HTT mennyiségét és toxicitását, feltehetően ezáltal javítva a motoros funkciókat és növelve az állatok élettartamát, így vizsgálatuk folytatása mindenképpen indokolt. Az általunk vizsgált *Drosophila* HD modell a korai patológiai változásokat mutatja. Érdemes vizsgálni a továbbiakban a későbbi állapotot rekapituláló modelleket is, amelyekben nem a teljes fehérje kerül kifejeztetésre, hanem csak a polyQ szakaszt tartalmazó N-terminális fragmentum. Emellett érdemes lenne megnézni, hogy a molekulák képesek-e csökkenteni a mutáns HTT kiváltotta neurodegeneráció mértékét. Mindenképpen ígéretes, hogy egérből származó elsődleges kérgi neuronok esetében az oxidatív stresszel

szemben citoprotektívnek bizonyultak (Papp és mtsai., 2016; Kovács és mtsai., 2017). Az AUTEN-ek előnyei közé tartoznak, hogy az autofágia aktiválásán keresztül hatnak, így csökkentik a HD kialakulásában a legfőbb patogén faktor, a mutáns HTT mennyiségét, és elősegítik a neuronok működését a romló lebontóképességük fokozásával, fenntartásával. Elméletben az autofágia mellett az ubikvitin-proteaszóma rendszer működésének fokozása, javítása is hasznos lehetne a mutáns HTT eltávolításában, de az aggregátumképződés miatt jóval kevésbé bontaná hatékonyan, ráadásul az ubikvitin-proteaszóma rendszer farmakológiai aktiválása nagyobb kihívás, mint az autofág aktivitás növelése (Bennett és mtsai., 2005; Bennett és mtsai., 2007; Ross és Tabrizi, 2011). Ha sikerül elérni azt, hogy az AUTEN-67 is átjusson a vér-agy gáton, akkor további nagy előnyük lehet az AUTEN-eknek, hogy szájon át is alkalmazhatóak, nem kell az agy-gerincvelői folyadékba adni őket - szemben a szintén nagyon hatásos antiszensz oligonukleotidokkal, illetve nem igényelnek virális hordozóvektort sem az RNSi vagy a nagyon ígéretes CRISPR-Cas9 alapú megközelítéssel ellentétben (Aronin és DiFiglia, 2014; Monteys és mtsai., 2017). Remélhetőleg emlős sejtes és egér HD modelleken is mielőbb tovább vizsgálható lesz az AUTEN-67 és az AUTEN-99, és az ott kapott hatásaik is reménykeltőek lesznek. Amennyiben igen, akkor a jövőben lehet kombinálni őket más gyógyszerjelölt molekulákkal, ez a mellékhatásokat is csökkenthetné. Remélhetőleg akár ezen megközelítésekkel, akár bármilyen más módon a Huntington-kór mielőbb gyógyítható lesz.

Összefoglalás

Az autofágia az eukarióta sejtek konzervált, lizoszóma közvetített sejtes önemésztő folyamata. Az alapszintű (bazális) autofágia teszi lehetővé a sejt hosszú életidejű, rosszul feltekereedett fehérjéinek, valamint a károsodott vagy feleslegessé vált sejtalkotóinak a lebontását. A bazális autofág aktivitás különösen fontos a már nem osztódó, terminálisan differenciálódott sejtekben, köztük a neuronokban. Az autofágia hibás működése számos betegség kialakulásához képes vezetni. Idegsejtekben az autofágia zavara különböző neurodegeneratív betegségek kialakulásához járulhat hozzá, mint amilyen az Alzheimer-, a Parkinson- vagy a Huntington-kór. A Huntington-kór (*Huntington's Disease*, HD) egy domináns, komplex motoros-, kognitív és pszichiátriai tünetekkel járó, halálos kimenetelű, jelenleg gyógyíthatatlan betegség, melyet a *Huntingtin* (*HTT*) gén mutációja okoz. Az autofágia ígéretes terápiás célpont a neurodegeneratív betegségekben, köztük a HD-ben is, azonban az eddigi megközelítések olyan autofágia szabályozókat céloznak, amelyek az autofágiától *upstream* hatnak, és/vagy a sejt számos más folyamatára vannak hatással. Az autofágia iniciációjának egyik kulcslépése a foszfatidilinozitol (PI) foszfatidilinozitol 3-foszfáttá (PI3P) történő átalakulása, amelyet a Vps34 kináz komplex katalizál. A folyamat egyik antagonistája a myotubularinok családjába tartozó MTMR14, amely géncsendesítése vagy mutációja fokozott autofág aktivitáshoz vezet. MTMR14-gátló autofágiát fokozó kismolekulákat keresve sikerült azonosítani az AUTEN-67 (*autophagy enhancer-67*) és az AUTEN-99 kismolekulákat. A doktori értekezésemben bemutatott munkában az AUTEN-67 és az AUTEN-99 hatását vizsgáltam *Drosophila melanogaster* HD modellben. Mindkét kismolekula képes a táplálékkal bejutva fokozni az autofág aktivitást mind a HTT-t nem expresszáló, illetve nem patogén HTT-t kifejező kontroll, mind a patogén mutáns HTT-t kifejező HD modell felnőtt muslicák agyában. A mutáns HTT nagy, citoplazmatikus, Ref(2)P/p62- (és feltehetően ubikvitin-) pozitív fehérjeaggregátumokat képez. Mindkét kismolekula képes csökkenteni a toxikus mutáns HTT mennyiségét, valamint az AUTEN-67, és kisebb mértékben az AUTEN-99 képes javítani a mutáns HTT-t kifejező állatok csökkent motoros funkcióit (mászó és repülési képesség). Az AUTEN-67 és az AUTEN-99 növeli a nem patogén HTT-t kifejező állatok élettartamát. Ráadásul az AUTEN-67 képes növelni a mutáns HTT-t kifejező HD modellállatok élettartamát is. Az, hogy egy gyógyszerjelölt molekula a motoros funkciókra és az élettartamra egyaránt képes pozitív hatással lenni HD modellben, igen ritka. Mindezen ígéretes eredmények alapján az AUTEN-67 és az AUTEN-99 további vizsgálata javasolt emlős HD modellekben.

Summary

Autophagy (cellular “self-eating”) is a highly conserved, lysosome-mediated self-degradative pathway of eukaryotic cells. Autophagy is an inducible process, but it also operates selectively at basal levels under normal conditions, removing the long-lived unnecessary and misfolded proteins, as well as damaged or superfluous organelles. Its basal activity is particularly important in non-dividing terminally differentiated cells, including neurons. Several human diseases associated with defective autophagy. Defects in autophagic activity in neurons are associated with the development of various, age-related neurodegenerative conditions such as Alzheimer’s, Parkinson’s or Huntington’s Disease. Huntington’s Disease (HD) is an autosomal dominant, fatal disorder with complex motor, cognitive, and psychiatric disturbances. HD is caused by mutations affecting *Huntingtin (HTT)* gene. Autophagy serves as a potent pharmacological target in neurodegenerative disorders, including HD. However, the existing approaches target upstream regulators or components of autophagy, which function in the signalling network far from the core machinery of autophagic process and/or affect many other cellular processes. A key step in the initiation of autophagy is the conversion of phosphatidylinositol (PI) to phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P), which is catalyzed by the Vps34 kinase complex. An antagonist of this process is MTMR14, which belongs to the family of myotubularin phosphatases. Genetic inactivation of MTMR14 leads to enhanced autophagic activity. In searching for MTMR14 inhibitors we identified two small molecules, AUTEN-67 (autophagy enhancer-67) and AUTEN-99. I investigated the effects of AUTEN-67 and AUTEN-99 on a *Drosophila* HD model during the work presented in my PhD thesis. Both small molecules are able to enhance autophagic activity in the brain of control adult flies, which do not express HTT or express only a non-pathogenic protein form, as well as flies which express the toxic mutant HTT. Mutant HTT forms large, cytoplasmic aggregates, containing Ref(2)P/p62 and ubiquitinated proteins. Both small molecules are able to decrease the level of toxic mutant HTT. AUTEN-67, and in a lesser extent AUTEN-99, improves impaired motor functions in animals expressing mutant HTT. These motor functions include climbing and flying. Both AUTEN-67 and AUTEN-99 extend the life span of flies expressing non-pathogenic HTT. Moreover, AUTEN-67 increases the life span of HD model animals that express the mutant HTT. It is a rather rare phenomenon that a single drug candidate affects positively the life span and motor functions in a HD model. According to these promising results, further examination of AUTEN-67 and AUTEN-99 in mammalian HD models is a rationale strategy and highly recommended.

Irodalomjegyzék

- Abraham RT, Wiederrecht GJ. 1996. Immunopharmacology of rapamycin. *Annual review of immunology* **14**: 483-510.
- Agrawal N, Pallos J, Slepko N, Apostol BL, Bodai L, Chang LW, Chiang AS, Thompson LM, Marsh JL. 2005. Identification of combinatorial drug regimens for treatment of Huntington's disease using *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 3777-3781.
- Al-Qusairi L, Prokic I, Amosii L, Kretz C, Messaddeq N, Mandel JL, Laporte J. 2013. Lack of myotubularin (MTM1) leads to muscle hypotrophy through unbalanced regulation of the autophagy and ubiquitin-proteasome pathways. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **27**: 3384-3394.
- Al Rawi S, Louvet-Vallee S, Djeddi A, Sachse M, Culetto E, Hajjar C, Boyd L, Legouis R, Galy V. 2011. Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science* **334**: 1144-1147.
- Alers S, Loffler AS, Wesselborg S, Stork B. 2012. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Molecular and cellular biology* **32**: 2-11.
- Allison TL. 2016. Immunosuppressive Therapy in Transplantation. *The Nursing clinics of North America* **51**: 107-120.
- Alvarez VE, Kosec G, Sant'Anna C, Turk V, Cazzulo JJ, Turk B. 2008. Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of biological chemistry* **283**: 3454-3464.
- Ambegaokar SS, Roy B, Jackson GR. 2010. Neurodegenerative models in *Drosophila*: polyglutamine disorders, Parkinson disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of disease* **40**: 29-39.
- Anding AL, Baehrecke EH. 2017. Cleaning House: Selective Autophagy of Organelles. *Dev Cell* **41**: 10-22.
- Apostol BL, Kazantsev A, Raffioni S, Illes K, Pallos J, Bodai L, Slepko N, Bear JE, Gertler FB, Hersch S és mtsai. 2003. A cell-based assay for aggregation inhibitors as therapeutics of polyglutamine-repeat disease and validation in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 5950-5955.
- Aronin N, DiFiglia M. 2014. Huntingtin-lowering strategies in Huntington's disease: antisense oligonucleotides, small RNAs, and gene editing. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* **29**: 1455-1461.
- Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S. 2004. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* **431**: 805-810.
- Ashkenazi A, Bento CF, Ricketts T, Vicinanza M, Siddiqi F, Pavel M, Squitieri F, Hardenberg MC, Imarisio S, Menzies FM és mtsai. 2017. Polyglutamine tracts regulate beclin 1-dependent autophagy. *Nature* **545**: 108-111.
- Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, Griffiths G, Ktistakis NT. 2008. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology* **182**: 685-701.
- Babcock DT, Ganetzky B. 2014. An improved method for accurate and rapid measurement of flight performance in *Drosophila*. *Journal of visualized experiments : JoVE*: e51223.

- Bader CA, Shandala T, Ng YS, Johnson IR, Brooks DA. 2015. Atg9 is required for intraluminal vesicles in amphisomes and autolysosomes. *Biology open*.
- Bae BI, Xu H, Igarashi S, Fujimuro M, Agrawal N, Taya Y, Hayward SD, Moran TH, Montell C, Ross CA és mtsai. 2005. p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease. *Neuron* **47**: 29-41.
- Baerga R, Zhang Y, Chen PH, Goldman S, Jin S. 2009. Targeted deletion of autophagy-related 5 (atg5) impairs adipogenesis in a cellular model and in mice. *Autophagy* **5**: 1118-1130.
- Bailey CD, Johnson GV. 2006. The protective effects of cystamine in the R6/2 Huntington's disease mouse involve mechanisms other than the inhibition of tissue transglutaminase. *Neurobiology of aging* **27**: 871-879.
- Bánrétí Á, Lukácsovich T, Csikós G, Erdélyi M, Sass M. 2012. PP2A regulates autophagy in two alternative ways in Drosophila. *Autophagy* **8**: 623-636.
- Barbaro BA, Lukacsovich T, Agrawal N, Burke J, Bornemann DJ, Purcell JM, Worthge SA, Caricasole A, Weiss A, Song W és mtsai. 2015. Comparative study of naturally occurring huntingtin fragments in Drosophila points to exon 1 as the most pathogenic species in Huntington's disease. *Human molecular genetics* **24**: 913-925.
- Beister A, Kraus P, Kuhn W, Dose M, Weindl A, Gerlach M. 2004. The N-methyl-D-aspartate antagonist memantine retards progression of Huntington's disease. *Journal of neural transmission Supplementum*: 117-122.
- Bennett EJ, Bence NF, Jayakumar R, Kopito RR. 2005. Global impairment of the ubiquitin-proteasome system by nuclear or cytoplasmic protein aggregates precedes inclusion body formation. *Molecular cell* **17**: 351-365.
- Bennett EJ, Shaler TA, Woodman B, Ryu KY, Zaitseva TS, Becker CH, Bates GP, Schulman H, Kopito RR. 2007. Global changes to the ubiquitin system in Huntington's disease. *Nature* **448**: 704-708.
- Berger Z, Ravikumar B, Menzies FM, Oroz LG, Underwood BR, Pangalos MN, Schmitt I, Wullner U, Evert BO, O'Kane CJ és mtsai. 2006. Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins. *Human molecular genetics* **15**: 433-442.
- Berry DL, Baehrecke EH. 2007. Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in Drosophila. *Cell* **131**: 1137-1148.
- Bestebroer J, V'Kovski P, Mauthe M, Reggiori F. 2013. Hidden Behind Autophagy: The Unconventional Roles of ATG Proteins. *Traffic* **14**: 1029-1041.
- Besteiro S, Williams RA, Morrison LS, Coombs GH, Mottram JC. 2006. Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of Leishmania major. *The Journal of biological chemistry* **281**: 11384-11396.
- Bjedov I, Toivonen JM, Kerr F, Slack C, Jacobson J, Foley A, Partridge L. 2010. Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly Drosophila melanogaster. *Cell Metab* **11**: 35-46.
- Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H, Johansen T. 2005. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *The Journal of cell biology* **171**: 603-614.
- Blommaert EF, Krause U, Schellens JP, Vreeling-Sindelarova H, Meijer AJ. 1997. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *European journal of biochemistry / FEBS* **243**: 240-246.
- Bodemann BO, Orvedahl A, Cheng T, Ram RR, Ou YH, Formstecher E, Maiti M, Hazelett CC, Wauson EM, Balakireva M és mtsai. 2011. RalB and the exocyst mediate the cellular starvation response by direct activation of autophagosome assembly. *Cell* **144**: 253-267.

- Boland B, Kumar A, Lee S, Platt FM, Wegiel J, Yu WH, Nixon RA. 2008. Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**: 6926-6937.
- Bortvedt SF, McLearn JA, Messer A, Ahern-Rindell AJ, Wolfgang WJ. 2010. Cystamine and intrabody co-treatment confers additional benefits in a fly model of Huntington's disease. *Neurobiology of disease* **40**: 130-134.
- Braak H, Thal DR, Matschke J, Ghebremedhin E, Del Tredici K. 2013. Age-related appearance of dendritic inclusions in catecholaminergic brainstem neurons. *Neurobiology of aging* **34**: 286-297.
- Braden CR, Neufeld TP. 2016. Atg1-independent induction of autophagy by the Drosophila Ulk3 homolog, ADUK. *The FEBS journal*.
- Branco J, Al-Ramahi I, Ukani L, Perez AM, Fernandez-Funez P, Rincon-Limas D, Botas J. 2008. Comparative analysis of genetic modifiers in Drosophila points to common and distinct mechanisms of pathogenesis among polyglutamine diseases. *Human molecular genetics* **17**: 376-390.
- Bronietzki AW, Schuster M, Schmitz I. 2014. Autophagy in T-cell development, activation and differentiation. *Immunology and cell biology*.
- Bunge MB. 1973. Fine structure of nerve fibers and growth cones of isolated sympathetic neurons in culture. *The Journal of cell biology* **56**: 713-735.
- Carlsson SR, Simonsen A. 2015. Membrane dynamics in autophagosome biogenesis. *J Cell Sci* **128**: 193-205.
- Carroll JB, Warby SC, Southwell AL, Doty CN, Greenlee S, Skotte N, Hung G, Bennett CF, Freier SM, Hayden MR. 2011. Potent and selective antisense oligonucleotides targeting single-nucleotide polymorphisms in the Huntington disease gene / allele-specific silencing of mutant huntingtin. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **19**: 2178-2185.
- Cebollero E, Reggiori F, Kraft C. 2012. Reticulophagy and ribophagy: regulated degradation of protein production factories. *International journal of cell biology* **2012**: 182834.
- Chan C. 2003. Evidences for the involvement of the Jumpy gene in muscle function in Drosophila melanogaster. in *Department of Biology*, p. 41. Queen's University.
- Chan EY, Kir S, Tooze SA. 2007. siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *The Journal of biological chemistry* **282**: 25464-25474.
- Chan JH, Lim S, Wong WS. 2006. Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* **33**: 533-540.
- Chang YY, Neufeld TP. 2009. An Atg1/Atg13 complex with multiple roles in TOR-mediated autophagy regulation. *Molecular biology of the cell* **20**: 2004-2014.
- Chang YY, Neufeld TP. 2010. Autophagy takes flight in Drosophila. *FEBS letters* **584**: 1342-1349.
- Chen D, Fan W, Lu Y, Ding X, Chen S, Zhong Q. 2012. A mammalian autophagosome maturation mechanism mediated by TECPR1 and the Atg12-Atg5 conjugate. *Molecular cell* **45**: 629-641.
- Cheng XT, Zhou B, Lin MY, Cai Q, Sheng ZH. 2015. Axonal autophagosomes recruit dynein for retrograde transport through fusion with late endosomes. *The Journal of cell biology* **209**: 377-386.
- Cheung ZH, Ip NY. 2009. The emerging role of autophagy in Parkinson's disease. *Molecular brain* **2**: 29.
- Clark SL, Jr. 1957. Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* **3**: 349-362.

- Coisne C, Tilloy S, Monflier E, Wils D, Fenart L, Gosselet F. 2016. Cyclodextrins as Emerging Therapeutic Tools in the Treatment of Cholesterol-Associated Vascular and Neurodegenerative Diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)* **21**.
- Dayalu P, Albin RL. 2015. Huntington disease: pathogenesis and treatment. *Neurol Clin* **33**: 101-114.
- DeBosch BJ, Heitmeier MR, Mayer AL, Higgins CB, Crowley JR, Kraft TE, Chi M, Newberry EP, Chen Z, Finck BN és mtsai. 2016. Trehalose inhibits solute carrier 2A (SLC2A) proteins to induce autophagy and prevent hepatic steatosis. *Science signaling* **9**: ra21.
- Deckel AW, Gordinier A, Nuttal D, Tang V, Kuwada C, Freitas R, Gary KA. 2001. Reduced activity and protein expression of NOS in R6/2 HD transgenic mice: effects of L-NAME on symptom progression. *Brain research* **919**: 70-81.
- Dedeoglu A, Kubilus JK, Jeitner TM, Matson SA, Bogdanov M, Kowall NW, Matson WR, Cooper AJ, Ratan RR, Beal MF és mtsai. 2002. Therapeutic effects of cystamine in a murine model of Huntington's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**: 8942-8950.
- del Toro D, Alberch J, Lazaro-Dieguez F, Martin-Ibanez R, Xifro X, Egea G, Canals JM. 2009. Mutant huntingtin impairs post-Golgi trafficking to lysosomes by delocalizing optineurin/Rab8 complex from the Golgi apparatus. *Molecular biology of the cell* **20**: 1478-1492.
- Deng YP, Albin RL, Penney JB, Young AB, Anderson KD, Reiner A. 2004. Differential loss of striatal projection systems in Huntington's disease: a quantitative immunohistochemical study. *Journal of chemical neuroanatomy* **27**: 143-164.
- Denton D, Shrivage B, Simin R, Mills K, Berry DL, Baehrecke EH, Kumar S. 2009. Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*. *Current biology : CB* **19**: 1741-1746.
- Di Bartolomeo S, Corazzari M, Nazio F, Oliverio S, Lisi G, Antonioli M, Pagliarini V, Matteoni S, Fuoco C, Giunta L és mtsai. 2010. The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *The Journal of cell biology* **191**: 155-168.
- Dibble CC, Manning BD. 2013. Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. *Nature cell biology* **15**: 555-564.
- DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, Aronin N. 1997. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* **277**: 1990-1993.
- Dixon JS. 1967. "Phagocytic" lysosomes in chromatolytic neurones. *Nature* **215**: 657-658.
- Dooley HC, Razi M, Polson HE, Girardin SE, Wilson MI, Tooze SA. 2014. WIPI2 Links LC3 Conjugation with PI3P, Autophagosome Formation, and Pathogen Clearance by Recruiting Atg12-5-16L1. *Molecular cell*.
- Dowling JJ, Low SE, Busta AS, Feldman EL. 2010. Zebrafish MTMR14 is required for excitation-contraction coupling, developmental motor function and the regulation of autophagy. *Human molecular genetics* **19**: 2668-2681.
- Dragatsis I, Levine MS, Zeitlin S. 2000. Inactivation of *Hdh* in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nature genetics* **26**: 300-306.
- Duffy JB. 2002. GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* **34**: 1-15.
- Dunlop EA, Seifan S, Claessens T, Behrends C, Kamps MA, Rozycka E, Kemp AJ, Nookala RK, Blenis J, Coull BJ és mtsai. 2014. FLCN, a novel autophagy component, interacts with GABARAP and is regulated by ULK1 phosphorylation. *Autophagy* **10**.

- Dupont N, Nascimbeni AC, Morel E, Codogno P. 2017. Molecular Mechanisms of Noncanonical Autophagy. *International review of cell and molecular biology* **328**: 1-23.
- Eberle HB, Serrano RL, Fullekrug J, Schlosser A, Lehmann WD, Lottspeich F, Kaloyanova D, Wieland FT, Helms JB. 2002. Identification and characterization of a novel human plant pathogenesis-related protein that localizes to lipid-enriched microdomains in the Golgi complex. *J Cell Sci* **115**: 827-838.
- Ehrnhoefer DE, Duennwald M, Markovic P, Wacker JL, Engemann S, Roark M, Legleiter J, Marsh JL, Thompson LM, Lindquist S és mtsai. 2006. Green tea (-)-epigallocatechin-gallate modulates early events in huntingtin misfolding and reduces toxicity in Huntington's disease models. *Human molecular genetics* **15**: 2743-2751.
- El-Daher MT, Hangen E, Bruyere J, Poizat G, Al-Ramahi I, Pardo R, Bourg N, Souquere S, Mayet C, Pierron G és mtsai. 2015. Huntingtin proteolysis releases non-polyQ fragments that cause toxicity through dynamin 1 dysregulation. *The EMBO journal* **34**: 2255-2271.
- Erdélyi P, Borsos E, Takács-Vellai K, Kovács T, Kovács AL, Sigmond T, Hargitai B, Pásztor L, Sengupta T, Dengg M és mtsai. 2011. Shared developmental roles and transcriptional control of autophagy and apoptosis in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Sci* **124**: 1510-1518.
- Érdi B, Nagy P, Zvara Á, Varga Á, Pircs K, Ménesi D, Puskás LG, Juhász G. 2012. Loss of the starvation-induced gene Rack1 leads to glycogen deficiency and impaired autophagic responses in *Drosophila*. *Autophagy* **8**: 1124-1135.
- Eskelinen EL. 2005. Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy* **1**: 1-10.
- Fan HC, Ho LI, Chi CS, Chen SJ, Peng GS, Chan TM, Lin SZ, Harn HJ. 2014. Polyglutamine (PolyQ) diseases: genetics to treatments. *Cell transplantation* **23**: 441-458.
- Fantus D, Rogers NM, Grahammer F, Huber TB, Thomson AW. 2016. Roles of mTOR complexes in the kidney: implications for renal disease and transplantation. *Nature reviews Nephrology* **12**: 587-609.
- Feany MB, Bender WW. 2000. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* **404**: 394-398.
- Fernandez-Estevez MA, Casarejos MJ, Lopez Sendon J, Garcia Caldentey J, Ruiz C, Gomez A, Perucho J, de Yébenes JG, Mena MA. 2014. Trehalose reverses cell malfunction in fibroblasts from normal and Huntington's disease patients caused by proteasome inhibition. *PloS one* **9**: e90202.
- Fernandez-Funez P, de Mena L, Rincon-Limas DE. 2015. Modeling the complex pathology of Alzheimer's disease in *Drosophila*. *Experimental neurology*.
- Filimonenko M, Isakson P, Finley KD, Anderson M, Jeong H, Melia TJ, Bartlett BJ, Myers KM, Birkeland HC, Lamark T és mtsai. 2010. The selective macroautophagic degradation of aggregated proteins requires the PI3P-binding protein Alfy. *Molecular cell* **38**: 265-279.
- Frank S, Testa CM, Stamler D, Kayson E, Davis C, Edmondson MC, Kinel S, Leavitt B, Oakes D, O'Neill C és mtsai. 2016. Effect of Deutetrabenazine on Chorea Among Patients With Huntington Disease: A Randomized Clinical Trial. *Jama* **316**: 40-50.
- Franzetti E, Huang ZJ, Shi YX, Xie K, Deng XJ, Li JP, Li QR, Yang WY, Zeng WN, Casartelli M és mtsai. 2012. Autophagy precedes apoptosis during the remodeling of silkworm larval midgut. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **17**: 305-324.

- Fu MM, Nirschl JJ, Holzbaur EL. 2014. LC3 Binding to the Scaffolding Protein JIP1 Regulates Processive Dynein-Driven Transport of Autophagosomes. *Dev Cell* **29**: 577-590.
- Fujita N, Hayashi-Nishino M, Fukumoto H, Omori H, Yamamoto A, Noda T, Yoshimori T. 2008a. An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure. *Molecular biology of the cell* **19**: 4651-4659.
- Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T. 2008b. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Molecular biology of the cell* **19**: 2092-2100.
- Funderburk SF, Wang QJ, Yue Z. 2010. The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends in cell biology* **20**: 355-362.
- Gafni J, Ellerby LM. 2002. Calpain activation in Huntington's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**: 4842-4849.
- Gagnon KT, Pendergraft HM, Deleavey GF, Swayze EE, Potier P, Randolph J, Roesch EB, Chattopadhyaya J, Damha MJ, Bennett CF és mtsai. 2010. Allele-selective inhibition of mutant huntingtin expression with antisense oligonucleotides targeting the expanded CAG repeat. *Biochemistry* **49**: 10166-10178.
- Gammoh N, Florey O, Overholtzer M, Jiang X. 2013. Interaction between FIP200 and ATG16L1 distinguishes ULK1 complex-dependent and -independent autophagy. *Nature structural & molecular biology* **20**: 144-149.
- Ganetzky B, Flanagan JR. 1978. On the relationship between senescence and age-related changes in two wild-type strains of *Drosophila melanogaster*. *Experimental gerontology* **13**: 189-196.
- Ganley IG. 2013. Autophagosome maturation and lysosomal fusion. *Essays in biochemistry* **55**: 65-78.
- Ganley IG, Lam du H, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X. 2009. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *The Journal of biological chemistry* **284**: 12297-12305.
- Garriga-Canut M, Agustin-Pavon C, Herrmann F, Sanchez A, Dierssen M, Fillat C, Isalan M. 2012. Synthetic zinc finger repressors reduce mutant huntingtin expression in the brain of R6/2 mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: E3136-3145.
- Gines S, Ivanova E, Seong IS, Saura CA, MacDonald ME. 2003. Enhanced Akt signaling is an early pro-survival response that reflects N-methyl-D-aspartate receptor activation in Huntington's disease knock-in striatal cells. *The Journal of biological chemistry* **278**: 50514-50522.
- Gonzalez CD, Lee MS, Marchetti P, Pietropaolo M, Towns R, Vaccaro MI, Watada H, Wiley JW. 2011. The emerging role of autophagy in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Autophagy* **7**: 2-11.
- Gray DA, Tsigiotis M, Woulfe J. 2003. Ubiquitin, proteasomes, and the aging brain. *Science of aging knowledge environment : SAGE KE* **2003**: RE6.
- Group - Huntington's Disease Collaborative Research Group. 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* **72**: 971-983.
- Gunawardena S, Her LS, Bruschi RG, Laymon RA, Niesman IR, Gordesky-Gold B, Sintasath L, Bonini NM, Goldstein LS. 2003. Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in *Drosophila*. *Neuron* **40**: 25-40.

- Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK, Lippincott-Schwartz J. 2010. Mitochondria Supply Membranes for Autophagosome Biogenesis during Starvation. *Cell* **141**: 656-667.
- Han H, Li J, Feng X, Zhou H, Guo S, Zhou W. 2017. Autophagy-related genes are induced by histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid via the activation of cathepsin B in human breast cancer cells. *Oncotarget*.
- Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, Inagaki F, Ohsumi Y. 2007. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *The Journal of biological chemistry* **282**: 37298-37302.
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H és mtsai. 2006. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**: 885-889.
- Hara T, Takamura A, Kishi C, Iemura S, Natsume T, Guan JL, Mizushima N. 2008. FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *The Journal of cell biology* **181**: 497-510.
- Hardie DG. 2014. AMPK - sensing energy while talking to other signaling pathways. *Cell Metab* **20**: 939-952.
- Harding TM, Morano KA, Scott SV, Klionsky DJ. 1995. Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *The Journal of cell biology* **131**: 591-602.
- Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, Nadon NL, Wilkinson JE, Frenkel K, Carter CS és mtsai. 2009. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* **460**: 392-395.
- Hárs ES, Qi HY, Ryazanov AG, Jin SK, Cai L, Hu CC, Liu LF. 2007. Autophagy regulates ageing in *C. elegans*. *Autophagy* **3**: 93-95.
- Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A. 2009. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nature cell biology* **11**: 1433-1437.
- Hayden MR, Leavitt BR, Yasothan U, Kirkpatrick P. 2009. Tetrabenazine. *Nature reviews Drug discovery* **8**: 17-18.
- Hegedűs K, Nagy P, Gáspári Z, Juhász G. 2014. The Putative HORMA Domain Protein Atg101 Dimerizes and Is Required for Starvation-Induced and Selective Autophagy in *Drosophila*. *BioMed research international* **2014**: 470482.
- Hegedűs K, Takáts S, Kovács AL, Juhász G. 2013. Evolutionarily conserved role and physiological relevance of a STX17/Syx17 (syntaxin 17)-containing SNARE complex in autophagosome fusion with endosomes and lysosomes. *Autophagy* **9**: 1642-1646.
- Hemelaar J, Lelyveld VS, Kessler BM, Ploegh HL. 2003. A single protease, Apg4B, is specific for the autophagy-related ubiquitin-like proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L. *The Journal of biological chemistry* **278**: 51841-51850.
- Heng MY, Duong DK, Albin RL, Tallaksen-Greene SJ, Hunter JM, Lesort MJ, Osmand A, Paulson HL, Detloff PJ. 2010. Early autophagic response in a novel knock-in model of Huntington disease. *Human molecular genetics* **19**: 3702-3720.
- Hnia K, Kretz C, Amoasii L, Bohm J, Liu X, Messaddeq N, Qu CK, Laporte J. 2012. Primary T-tubule and autophagy defects in the phosphoinositide phosphatase Jumpy/MTMR14 knockout mice muscle. *Advances in biological regulation* **52**: 98-107.
- Hockly E, Richon VM, Woodman B, Smith DL, Zhou X, Rosa E, Sathasivam K, Ghazi-Noori S, Mahal A, Lowden PA és mtsai. 2003. Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's

- disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 2041-2046.
- Hollenbeck PJ. 1993. Products of endocytosis and autophagy are retrieved from axons by regulated retrograde organelle transport. *The Journal of cell biology* **121**: 305-315.
- Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N és mtsai. 2009a. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Molecular biology of the cell* **20**: 1981-1991.
- Hosokawa N, Sasaki T, Iemura S, Natsume T, Hara T, Mizushima N. 2009b. Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy* **5**: 973-979.
- Hu J, Matsui M, Corey DR. 2009. Allele-selective inhibition of mutant huntingtin by peptide nucleic acid-peptide conjugates, locked nucleic acid, and small interfering RNA. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1175**: 24-31.
- Hu Z, Yang B, Mo X, Xiao H. 2014. Mechanism and Regulation of Autophagy and Its Role in Neuronal Diseases. *Molecular neurobiology*.
- Huang Z, Adachi H. 2016. Natural Compounds Preventing Neurodegenerative Diseases Through Autophagic Activation. *Journal of UOEH* **38**: 139-148.
- Hung YH, Chen LM, Yang JY, Yang WY. 2013. Spatiotemporally controlled induction of autophagy-mediated lysosome turnover. *Nature communications* **4**: 2111.
- Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, Mizushima N, Tanida I, Kominami E, Ohsumi M és mtsai. 2000. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408**: 488-492.
- Isakson P, Holland P, Simonsen A. 2013. The role of ALFY in selective autophagy. *Cell death and differentiation* **20**: 12-20.
- Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N. 2008. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Molecular biology of the cell* **19**: 5360-5372.
- Iwata A, Christianson JC, Bucci M, Ellerby LM, Nukina N, Forno LS, Kopito RR. 2005. Increased susceptibility of cytoplasmic over nuclear polyglutamine aggregates to autophagic degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 13135-13140.
- Jackson GR, Salecker I, Dong X, Yao X, Arnheim N, Faber PW, MacDonald ME, Zipursky SL. 1998. Polyglutamine-expanded human huntingtin transgenes induce degeneration of *Drosophila* photoreceptor neurons. *Neuron* **21**: 633-642.
- Jäger S, Bucci C, Tanida I, Ueno T, Kominami E, Saftig P, Eskelinen EL. 2004. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci* **117**: 4837-4848.
- Jahreiss L, Menzies FM, Rubinsztein DC. 2008. The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic* **9**: 574-587.
- Jiang P, Mizushima N. 2014. Autophagy and human diseases. *Cell research* **24**: 69-79.
- Jiang P, Nishimura T, Sakamaki Y, Itakura E, Hatta T, Natsume T, Mizushima N. 2014. The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Molecular biology of the cell* **25**: 1327-1337.
- Jiang W, Wei W, Gaertig MA, Li S, Li XJ. 2015. Therapeutic Effect of Berberine on Huntington's Disease Transgenic Mouse Model. *PloS one* **10**: e0134142.
- Johnson SC, Rabinovitch PS, Kaerberlein M. 2013. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature* **493**: 338-345.
- Juenemann K, Reits EA. 2012. Alternative macroautophagic pathways. *International journal of cell biology* **2012**: 189794.

- Juhász G, Érdi B, Sass M, Neufeld TP. 2007. Atg7-dependent autophagy promotes neuronal health, stress tolerance, and longevity but is dispensable for metamorphosis in *Drosophila*. *Genes Dev* **21**: 3061-3066.
- Juhász G, Hill JH, Yan Y, Sass M, Baehrecke EH, Backer JM, Neufeld TP. 2008. The class III PI(3)K Vps34 promotes autophagy and endocytosis but not TOR signaling in *Drosophila*. *The Journal of cell biology* **181**: 655-666.
- Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH. 2009. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Molecular biology of the cell* **20**: 1992-2003.
- Jungbluth H, Gautel M. 2014. Pathogenic mechanisms in centronuclear myopathies. *Frontiers in aging neuroscience* **6**: 339.
- Kahan BD. 1997. Sirolimus: a new agent for clinical renal transplantation. *Transplantation proceedings* **29**: 48-50.
- Kara NZ, Toker L, Agam G, Anderson GW, Belmaker RH, Einat H. 2013. Trehalose induced antidepressant-like effects and autophagy enhancement in mice. *Psychopharmacology* **229**: 367-375.
- Karanasios E, Stapleton E, Manifava M, Kaizuka T, Mizushima N, Walker SA, Ktistakis NT. 2013. Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction. *J Cell Sci*.
- Karpuj MV, Becher MW, Springer JE, Chabas D, Youssef S, Pedotti R, Mitchell D, Steinman L. 2002. Prolonged survival and decreased abnormal movements in transgenic model of Huntington disease, with administration of the transglutaminase inhibitor cystamine. *Nature medicine* **8**: 143-149.
- Kast DJ, Dominguez R. 2017. The Cytoskeleton-Autophagy Connection. *Current biology : CB* **27**: R318-R326.
- Katheder NS, Khezri R, O'Farrell F, Schultz SW, Jain A, Rahman MM, Schink KO, Theodossiou TA, Johansen T, Juhász G és mtsai. 2017. Microenvironmental autophagy promotes tumour growth. *Nature* **541**: 417-420.
- Kaushik S, Cuervo AM. 2012. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends in cell biology* **22**: 407-417.
- Kaushik S, Singh R, Cuervo AM. 2010. Autophagic pathways and metabolic stress. *Diabetes, obesity & metabolism* **12 Suppl 2**: 4-14.
- Kay C, Skotte NH, Southwell AL, Hayden MR. 2014. Personalized gene silencing therapeutics for Huntington disease. *Clinical genetics* **86**: 29-36.
- Kazantsev A, Walker HA, Slepko N, Bear JE, Preisinger E, Steffan JS, Zhu YZ, Gertler FB, Housman DE, Marsh JL és mtsai. 2002. A bivalent Huntingtin binding peptide suppresses polyglutamine aggregation and pathogenesis in *Drosophila*. *Nature genetics* **30**: 367-376.
- Kegel KB, Kim M, Sapp E, McIntyre C, Castano JG, Aronin N, DiFiglia M. 2000. Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**: 7268-7278.
- Keryer G, Pineda JR, Liot G, Kim J, Dietrich P, Benstaali C, Smith K, Cordelieres FP, Spassky N, Ferrante RJ és mtsai. 2011. Ciliogenesis is regulated by a huntingtin-HAP1-PCMI pathway and is altered in Huntington disease. *The Journal of clinical investigation* **121**: 4372-4382.
- Kihara A, Kabeya Y, Ohsumi Y, Yoshimori T. 2001a. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO reports* **2**: 330-335.

- Kihara A, Noda T, Ishihara N, Ohsumi Y. 2001b. Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology* **152**: 519-530.
- Kim M, Lee HS, LaForet G, McIntyre C, Martin EJ, Chang P, Kim TW, Williams M, Reddy PH, Tagle D és mtsai. 1999. Mutant huntingtin expression in clonal striatal cells: dissociation of inclusion formation and neuronal survival by caspase inhibition. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**: 964-973.
- Kim M, Park HL, Park HW, Ro SH, Nam SG, Reed JM, Guan JL, Lee JH. 2013. *Drosophila* Fip200 is an essential regulator of autophagy that attenuates both growth and aging. *Autophagy* **9**.
- Kimura S, Noda T, Yoshimori T. 2007. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy* **3**: 452-460.
- Kimura S, Noda T, Yoshimori T. 2008. Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell structure and function* **33**: 109-122.
- Kirisako T, Baba M, Ishihara N, Miyazawa K, Ohsumi M, Yoshimori T, Noda T, Ohsumi Y. 1999. Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *The Journal of cell biology* **147**: 435-446.
- Kirkin V, Lamark T, Sou YS, Bjorkoy G, Nunn JL, Bruun JA, Shvets E, McEwan DG, Clausen TH, Wild P és mtsai. 2009. A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Molecular cell* **33**: 505-516.
- Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Jr., Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M és mtsai. 2003. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* **5**: 539-545.
- Koga H, Martinez-Vicente M, Arias E, Kaushik S, Sulzer D, Cuervo AM. 2011. Constitutive upregulation of chaperone-mediated autophagy in Huntington's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**: 18492-18505.
- Komatsu M, Kuma A, Okamoto K. 2013. No ATG is an island--the connection of autophagy with diverse pathways and functions. *EMBO reports* **14**: 219-221.
- Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E és mtsai. 2006. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* **441**: 880-884.
- Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S és mtsai. 2007a. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* **131**: 1149-1163.
- Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y és mtsai. 2005. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *The Journal of cell biology* **169**: 425-434.
- Komatsu M, Wang QJ, Holstein GR, Friedrich VL, Jr., Iwata J, Kominami E, Chait BT, Tanaka K, Yue Z. 2007b. Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 14489-14494.
- Kordasiewicz HB, Stanek LM, Wancewicz EV, Mazur C, McAlonis MM, Pytel KA, Artates JW, Weiss A, Cheng SH, Shihabuddin LS és mtsai. 2012. Sustained therapeutic reversal of Huntington's disease by transient repression of huntingtin synthesis. *Neuron* **74**: 1031-1044.
- Kovács T, Billes V, Komlós M, Hotzi B, Manzóger A, Tarnóci A, Papp D, Szikszai F, Szinyákovics J, Rácz A és mtsai. 2017. The small molecule AUTEN-99 (autophagy

- enhancer-99) prevents the progression of neurodegenerative symptoms. *Scientific reports* **7**: 42014.
- Koyama-Honda I, Itakura E, Fujiwara TK, Mizushima N. 2013. Temporal analysis of recruitment of mammalian ATG proteins to the autophagosome formation site. *Autophagy* **9**.
- Kremer B, Goldberg P, Andrew SE, Theilmann J, Telenius H, Zeisler J, Squitieri F, Lin B, Bassett A, Almqvist E és mtsai. 1994. A worldwide study of the Huntington's disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *The New England journal of medicine* **330**: 1401-1406.
- Krench M, Littleton JT. 2017. Neurotoxicity Pathways in Drosophila Models of the Polyglutamine Disorders. *Current topics in developmental biology* **121**: 201-223.
- Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhisa T, Mizushima N. 2004. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* **432**: 1032-1036.
- Kumar A, Kumar Singh S, Kumar V, Kumar D, Agarwal S, Rana MK. 2015. Huntington's disease: an update of therapeutic strategies. *Gene* **556**: 91-97.
- Kundu M, Lindsten T, Yang CY, Wu J, Zhao F, Zhang J, Selak MA, Ney PA, Thompson CB. 2008. Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. *Blood* **112**: 1493-1502.
- Lamark T, Johansen T. 2012. Aggrephagy: selective disposal of protein aggregates by macroautophagy. *International journal of cell biology* **2012**: 736905.
- Laplante M, Sabatini DM. 2009. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* **122**: 3589-3594.
- Laplante M, Sabatini DM. 2012. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**: 274-293.
- Laporte J, Hu LJ, Kretz C, Mandel JL, Kioschis P, Coy JF, Klauck SM, Poustka A, Dahl N. 1996. A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nature genetics* **13**: 175-182.
- Lee JH, Tecedor L, Chen YH, Monteys AM, Sowada MJ, Thompson LM, Davidson BL. 2015. Reinstating aberrant mTORC1 activity in Huntington's disease mice improves disease phenotypes. *Neuron* **85**: 303-315.
- Lee JM, Ramos EM, Lee JH, Gillis T, Mysore JS, Hayden MR, Warby SC, Morrison P, Nance M, Ross CA és mtsai. 2012. CAG repeat expansion in Huntington disease determines age at onset in a fully dominant fashion. *Neurology* **78**: 690-695.
- Lee S, Sato Y, Nixon RA. 2011. Lysosomal proteolysis inhibition selectively disrupts axonal transport of degradative organelles and causes an Alzheimer's-like axonal dystrophy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**: 7817-7830.
- Lee WC, Yoshihara M, Littleton JT. 2004. Cytoplasmic aggregates trap polyglutamine-containing proteins and block axonal transport in a Drosophila model of Huntington's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 3224-3229.
- Lemasters JJ. 2005. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation research* **8**: 3-5.
- Levine B, Klionsky DJ. 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* **6**: 463-477.
- Levine B, Kroemer G. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**: 27-42.
- Levine B, Mizushima N, Virgin HW. 2011. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* **469**: 323-335.

- Lewis EA, Smith GA. 2015. Using *Drosophila* models of Huntington's disease as a translatable tool. *Journal of neuroscience methods*.
- Li WW, Li J, Bao JK. 2012. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **69**: 1125-1136.
- Liang C, Lee JS, Inn KS, Gack MU, Li Q, Roberts EA, Vergne I, Deretic V, Feng P, Akazawa C és mtsai. 2008. Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nature cell biology* **10**: 776-787.
- Liang CC, Wang C, Peng X, Gan B, Guan JL. 2010. Neural-specific deletion of FIP200 leads to cerebellar degeneration caused by increased neuronal death and axon degeneration. *The Journal of biological chemistry* **285**: 3499-3509.
- Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B. 1999. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* **402**: 672-676.
- Lindmo K, Brech A, Finley KD, Gaumer S, Contamine D, Rusten TE, Stenmark H. 2008. The PI 3-kinase regulator Vps15 is required for autophagic clearance of protein aggregates. *Autophagy* **4**: 500-506.
- Liu J, Lv Y, Liu QH, Qu CK, Shen J. 2014. Deficiency of MTMR14 promotes autophagy and proliferation of mouse embryonic fibroblasts. *Molecular and cellular biochemistry*.
- Liu R, Zhi X, Zhong Q. 2015. ATG14 controls SNARE-mediated autophagosome fusion with a lysosome. *Autophagy*: 0.
- Lőrincz P, Lakatos Z, Maruzs T, Szatmári Z, Kis V, Sass M. 2014. Atg6/UVRAG/Vps34-containing lipid kinase complex is required for receptor downregulation through endolysosomal degradation and epithelial polarity during *Drosophila* wing development. *BioMed research international* **2014**: 851349.
- Lőw P, Varga A, Piracs K, Nagy P, Szatmári Z, Sass M, Juhász G. 2013. Impaired proteasomal degradation enhances autophagy via hypoxia signaling in *Drosophila*. *BMC cell biology* **14**: 29.
- Lu K, Psakhye I, Jentsch S. 2014. Autophagic clearance of polyQ proteins mediated by ubiquitin-Atg8 adaptors of the conserved CUET protein family. *Cell* **158**: 549-563.
- Lu Q, Yang P, Huang X, Hu W, Guo B, Wu F, Lin L, Kovacs AL, Yu L, Zhang H. 2011. The WD40 repeat PtdIns(3)P-binding protein EPG-6 regulates progression of omegasomes to autophagosomes. *Dev Cell* **21**: 343-357.
- Lumkwana D, du Toit A, Kinnear C, Loos B. 2017. Autophagic flux control in neurodegeneration: Progress and precision targeting-Where do we stand? *Progress in neurobiology*.
- Lundin A, Dietrichs E, Haghghi S, Goller ML, Heiberg A, Loutfi G, Widner H, Wiktorin K, Wiklund L, Svenningsson A és mtsai. 2010. Efficacy and safety of the dopaminergic stabilizer Pridopidine (ACR16) in patients with Huntington's disease. *Clinical neuropharmacology* **33**: 260-264.
- Lv Y, Peng Y, Yu M, Chen W, Zhao P, Xue L, L. M, Cai C, Liu Q, Shen J. 2017. Mice lacking myotubularin-related protein 14 show accelerated high-fat diet-induced lipid accumulation and inflammation. *Journal of physiology and biochemistry* **73**: 17-28.
- Lv Y, Xue L, Cai C, Liu QH, Shen J. 2015. Deficiency of myotubularin-related protein 14 influences body weight, metabolism, and inflammation in an age-dependent manner. *Cell & bioscience* **5**: 69.
- Ma B, Savas JN, Yu MS, Culver BP, Chao MV, Tanese N. 2011. Huntingtin mediates dendritic transport of beta-actin mRNA in rat neurons. *Scientific reports* **1**: 140.

- Ma TC, Buescher JL, Oatis B, Funk JA, Nash AJ, Carrier RL, Hoyt KR. 2007. Metformin therapy in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neuroscience letters* **411**: 98-103.
- Mack HI, Zheng B, Asara JM, Thomas SM. 2012. AMPK-dependent phosphorylation of ULK1 regulates ATG9 localization. *Autophagy* **8**: 1197-1214.
- Maday S. 2016. Mechanisms of neuronal homeostasis: autophagy in the axon. *Brain research*.
- Maday S, Holzbaur EL. 2014. Autophagosome biogenesis in primary neurons follows an ordered and spatially regulated pathway. *Dev Cell* **30**: 71-85.
- Maday S, Wallace KE, Holzbaur EL. 2012. Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons. *The Journal of cell biology* **196**: 407-417.
- Maejima I, Takahashi A, Omori H, Kimura T, Takabatake Y, Saitoh T, Yamamoto A, Hamasaki M, Noda T, Isaka Y és mtsai. 2013. Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury. *The EMBO journal* **32**: 2336-2347.
- Marques Sousa C, Humbert S. 2013. Huntingtin: here, there, everywhere! *Journal of Huntington's disease* **2**: 395-403.
- Marsh JL, Pallos J, Thompson LM. 2003. Fly models of Huntington's disease. *Human molecular genetics* **12 Spec No 2**: R187-193.
- Martin DD, Heit RJ, Yap MC, Davidson MW, Hayden MR, Berthiaume LG. 2014. Identification of a post-translationally myristoylated autophagy-inducing domain released by caspase cleavage of huntingtin. *Human molecular genetics* **23**: 3166-3179.
- Martin DD, Ladha S, Ehrnhoefer DE, Hayden MR. 2015. Autophagy in Huntington disease and huntingtin in autophagy. *Trends in neurosciences* **38**: 26-35.
- Martin JB, Gusella JF. 1986. Huntington's disease. Pathogenesis and management. *The New England journal of medicine* **315**: 1267-1276.
- Martinez-Lopez N, Athonvarangkul D, Singh R. 2015. Autophagy and aging. *Advances in experimental medicine and biology* **847**: 73-87.
- Martinez-Vicente M. 2015. Autophagy in neurodegenerative diseases: From pathogenic dysfunction to therapeutic modulation. *Seminars in cell & developmental biology* **40**: 115-126.
- Martinez-Vicente M, Talloczy Z, Wong E, Tang G, Koga H, Kaushik S, de Vries R, Arias E, Harris S, Sulzer D és mtsai. 2010. Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nature neuroscience* **13**: 567-576.
- Matsunaga K, Morita E, Saitoh T, Akira S, Ktistakis NT, Izumi T, Noda T, Yoshimori T. 2010. Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *The Journal of cell biology* **190**: 511-521.
- Matsunaga K, Saitoh T, Tabata K, Omori H, Satoh T, Kurotori N, Maejima I, Shirahama-Noda K, Ichimura T, Isobe T és mtsai. 2009. Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nature cell biology* **11**: 385-396.
- Matsuura A, Tsukada M, Wada Y, Ohsumi Y. 1997. Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **192**: 245-250.
- Matthews MR, Raisman G. 1972. A light and electron microscopic study of the cellular response to axonal injury in the superior cervical ganglion of the rat. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* **181**: 43-79.
- Mauvezin C, Ayala C, Braden CR, Kim J, Neufeld TP. 2014. Assays to monitor autophagy in *Drosophila*. *Methods (San Diego, Calif)*.
- McGurk L, Berson A, Bonini NM. 2015. *Drosophila* as an In Vivo Model for Human Neurodegenerative Disease. *Genetics* **201**: 377-402.

- Meijer WH, van der Klei IJ, Veenhuis M, Kiel JA. 2007. ATG genes involved in non-selective autophagy are conserved from yeast to man, but the selective Cvt and pexophagy pathways also require organism-specific genes. *Autophagy* **3**: 106-116.
- Menalled LB, Chesselet MF. 2002. Mouse models of Huntington's disease. *Trends in pharmacological sciences* **23**: 32-39.
- Menzies FM, Fleming A, Caricasole A, Bento CF, Andrews SP, Ashkenazi A, Fullgrave J, Jackson A, Jimenez Sanchez M, Karabiyik C és mtsai. 2017. Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron* **93**: 1015-1034.
- Menzies FM, Garcia-Arencibia M, Imarisio S, O'Sullivan NC, Ricketts T, Kent BA, Rao MV, Lam W, Green-Thompson ZW, Nixon RA és mtsai. 2015. Calpain inhibition mediates autophagy-dependent protection against polyglutamine toxicity. *Cell death and differentiation* **22**: 433-444.
- Menzies FM, Moreau K, Rubinsztein DC. 2011. Protein misfolding disorders and macroautophagy. *Current opinion in cell biology* **23**: 190-197.
- Mercer CA, Kaliappan A, Dennis PB. 2009. A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy* **5**: 649-662.
- Miller BC, Zhao Z, Stephenson LM, Cadwell K, Pua HH, Lee HK, Mizushima NN, Iwasaki A, He YW, Swat W és mtsai. 2008. The autophagy gene ATG5 plays an essential role in B lymphocyte development. *Autophagy* **4**: 309-314.
- Miller J, Arrasate M, Shaby BA, Mitra S, Masliah E, Finkbeiner S. 2010. Quantitative relationships between huntingtin levels, polyglutamine length, inclusion body formation, and neuronal death provide novel insight into huntington's disease molecular pathogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**: 10541-10550.
- Mizushima N, Komatsu M. 2011. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* **147**: 728-741.
- Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, Natsume T, Ohsumi Y, Yoshimori T. 2003. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci* **116**: 1679-1688.
- Mizushima N, Levine B. 2010. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nature cell biology* **12**: 823-830.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **451**: 1069-1075.
- Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K, Tokuhiya T, Ohsumi Y, Yoshimori T. 2001. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *The Journal of cell biology* **152**: 657-668.
- Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. 2004. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Molecular biology of the cell* **15**: 1101-1111.
- Mochida K, Oikawa Y, Kimura Y, Kirisako H, Hirano H, Ohsumi Y, Nakatogawa H. 2015. Receptor-mediated selective autophagy degrades the endoplasmic reticulum and the nucleus. *Nature* **522**: 359-362.
- Mochizuki H, Toda H, Ando M, Kurusu M, Tomoda T, Furukubo-Tokunaga K. 2011. Unc-51/ATG1 controls axonal and dendritic development via kinesin-mediated vesicle transport in the Drosophila brain. *PLoS one* **6**: e19632.
- Monteys AM, Ebanks SA, Keiser MS, Davidson BL. 2017. CRISPR/Cas9 Editing of the Mutant Huntingtin Allele In Vitro and In Vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **25**: 12-23.

- Mulakkal NC, Nagy P, Takats S, Tusco R, Juhasz G, Nezis IP. 2014. Autophagy in Drosophila: From Historical Studies to Current Knowledge. *BioMed research international* **2014**: 273473.
- Munz C. 2017. The Macroautophagy Machinery in Endo- and Exocytosis. *Journal of molecular biology* **429**: 473-485.
- Nagai Y, Fujikake N, Ohno K, Higashiyama H, Popiel HA, Rahadian J, Yamaguchi M, Strittmatter WJ, Burke JR, Toda T. 2003. Prevention of polyglutamine oligomerization and neurodegeneration by the peptide inhibitor QBP1 in Drosophila. *Human molecular genetics* **12**: 1253-1259.
- Nagaoka U, Kim K, Jana NR, Doi H, Maruyama M, Mitsui K, Oyama F, Nukina N. 2004. Increased expression of p62 in expanded polyglutamine-expressing cells and its association with polyglutamine inclusions. *Journal of neurochemistry* **91**: 57-68.
- Nagata E, Sawa A, Ross CA, Snyder SH. 2004. Autophagosome-like vacuole formation in Huntington's disease lymphoblasts. *Neuroreport* **15**: 1325-1328.
- Nagy P, Hegedűs K, Piracs K, Varga A, Juhász G. 2013. Different effects of Atg2 and Atg18 mutations on Atg8a and Atg9 trafficking during starvation in Drosophila. *FEBS letters*.
- Nagy P, Kárpáti M, Varga Á, Piracs K, Venkei Z, Takáts S, Varga K, Érdi B, Hegedűs K, Juhász G. 2014a. Atg17/FIP200 localizes to perilyosomal Ref(2)P aggregates and promotes autophagy by activation of Atg1 in Drosophila. *Autophagy* **10**.
- Nagy P, Varga A, Kovács AL, Takáts S, Juhász G. 2014b. How and why to study autophagy in Drosophila: It's more than just a garbage chute. *Methods (San Diego, Calif)*.
- Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, Yamamoto A, Yamaguchi H, Kamimoto T, Nara A, Funao J, Nakata M, Tsuda K és mtsai. 2004. Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science* **306**: 1037-1040.
- Nemoto T, Tanida I, Tanida-Miyake E, Minematsu-Ikeguchi N, Yokota M, Ohsumi M, Ueno T, Kominami E. 2003. The mouse APG10 homologue, an E2-like enzyme for Apg12p conjugation, facilitates MAP-LC3 modification. *The Journal of biological chemistry* **278**: 39517-39526.
- Nezis IP, Simonsen A, Sagona AP, Finley K, Gaumer S, Contamine D, Rusten TE, Stenmark H, Brech A. 2008. Ref(2)P, the Drosophila melanogaster homologue of mammalian p62, is required for the formation of protein aggregates in adult brain. *The Journal of cell biology* **180**: 1065-1071.
- Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K, Yamaguchi H, Mizuta T, Kanaseki T, Komatsu M, Otsu K, Tsujimoto Y, Shimizu S. 2009. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* **461**: 654-658.
- Nishiyama J, Miura E, Mizushima N, Watanabe M, Yuzaki M. 2007. Aberrant membranes and double-membrane structures accumulate in the axons of Atg5-null Purkinje cells before neuronal death. *Autophagy* **3**: 591-596.
- Nixon RA. 2013. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nature medicine* **19**: 983-997.
- Novak I, Kirkin V, McEwan DG, Zhang J, Wild P, Rozenknop A, Rogov V, Lohr F, Popovic D, Occhipinti A és mtsai. 2010. Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO reports* **11**: 45-51.
- Novikoff AB. 1959. The proximal tubule cell in experimental hydronephrosis. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* **6**: 136-138.
- Novikoff AB, Essner E. 1962. Cytolysosomes and mitochondrial degeneration. *The Journal of cell biology* **15**: 140-146.

- Obara K, Noda T, Niimi K, Ohsumi Y. 2008. Transport of phosphatidylinositol 3-phosphate into the vacuole via autophagic membranes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **13**: 537-547.
- Ochaba J, Lukacsovich T, Csikos G, Zheng S, Margulis J, Salazar L, Mao K, Lau AL, Yeung SY, Humbert S és mtsai. 2014. Potential function for the Huntingtin protein as a scaffold for selective autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Orsi A, Razi M, Dooley HC, Robinson D, Weston AE, Collinson LM, Tooze SA. 2012. Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Molecular biology of the cell* **23**: 1860-1873.
- Otto GP, Wu MY, Kazgan N, Anderson OR, Kessin RH. 2003. Macroautophagy is required for multicellular development of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *The Journal of biological chemistry* **278**: 17636-17645.
- Palmer J, Love S. 2011. Endothelin receptor antagonists: potential in Alzheimer's disease. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* **63**: 525-531.
- Panaretou C, Domin J, Cockcroft S, Waterfield MD. 1997. Characterization of p150, an adaptor protein for the human phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase. Substrate presentation by phosphatidylinositol transfer protein to the p150.Ptdins 3-kinase complex. *The Journal of biological chemistry* **272**: 2477-2485.
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Overvatn A, Bjørkøy G, Johansen T. 2007. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *The Journal of biological chemistry* **282**: 24131-24145.
- Papp D, Kovács T, Billes V, Varga M, Tarnóci A, Hackler L, Jr., Puskás LG, Liliom H, Tárnok K, Schlett K és mtsai. 2016. AUTEN-67, an autophagy-enhancing drug candidate with potent antiaging and neuroprotective effects. *Autophagy* **12**: 273-286.
- Park YE, Hayashi YK, Bonne G, Arimura T, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I. 2009. Autophagic degradation of nuclear components in mammalian cells. *Autophagy* **5**: 795-804.
- Paulsen JS, Ready RE, Hamilton JM, Mega MS, Cummings JL. 2001. Neuropsychiatric aspects of Huntington's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **71**: 310-314.
- Perucho J, Gomez A, Munoz MP, de Yebenes JG, Mena MA, Casarejos MJ. 2016. Trehalose rescues glial cell dysfunction in striatal cultures from HD R6/1 mice at early postnatal development. *Molecular and cellular neurosciences* **74**: 128-145.
- Petersen A, Larsen KE, Behr GG, Romero N, Przedborski S, Brundin P, Sulzer D. 2001. Expanded CAG repeats in exon 1 of the Huntington's disease gene stimulate dopamine-mediated striatal neuron autophagy and degeneration. *Human molecular genetics* **10**: 1243-1254.
- Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaert EF, Meijer AJ, Codogno P. 2000. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *The Journal of biological chemistry* **275**: 992-998.
- Pircs K, Nagy P, Varga A, Venkei Z, Érdi B, Hegedűs K, Juhász G. 2012. Advantages and limitations of different p62-based assays for estimating autophagic activity in *Drosophila*. *PloS one* **7**: e44214.
- Politi Y, Gal L, Kalifa Y, Ravid L, Elazar Z, Arama E. 2014. Paternal mitochondrial destruction after fertilization is mediated by a common endocytic and autophagic pathway in *Drosophila*. *Dev Cell* **29**: 305-320.

- Pollitt SK, Pallos J, Shao J, Desai UA, Ma AA, Thompson LM, Marsh JL, Diamond MI. 2003. A rapid cellular FRET assay of polyglutamine aggregation identifies a novel inhibitor. *Neuron* **40**: 685-694.
- Polson HE, de Lartigue J, Rigden DJ, Reedijk M, Urbe S, Clague MJ, Tooze SA. 2010. Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy* **6**: 506-522.
- Proikas-Cezanne T, Takacs Z, Donnes P, Kohlbacher O. 2015. WIPI proteins: essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome. *J Cell Sci* **128**: 207-217.
- Proikas-Cezanne T, Waddell S, Gaugel A, Frickey T, Lupas A, Nordheim A. 2004. WIPI-1alpha (WIPI49), a member of the novel 7-bladed WIPI protein family, is aberrantly expressed in human cancer and is linked to starvation-induced autophagy. *Oncogene* **23**: 9314-9325.
- Pryor WM, Biagioli M, Shahani N, Swarnkar S, Huang WC, Page DT, MacDonald ME, Subramaniam S. 2014. Huntingtin promotes mTORC1 signaling in the pathogenesis of Huntington's disease. *Science signaling* **7**: ra103.
- Pua HH, Guo J, Komatsu M, He YW. 2009. Autophagy is essential for mitochondrial clearance in mature T lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **182**: 4046-4055.
- Puri C, Renna M, Bento CF, Moreau K, Rubinsztein DC. 2013. Diverse autophagosome membrane sources coalesce in recycling endosomes. *Cell* **154**: 1285-1299.
- Pyo JO, Yoo SM, Ahn HH, Nah J, Hong SH, Kam TI, Jung S, Jung YK. 2013. Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan. *Nature communications* **4**: 2300.
- Qu X, Zou Z, Sun Q, Luby-Phelps K, Cheng P, Hogan RN, Gilpin C, Levine B. 2007. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell* **128**: 931-946.
- Rabinowitz JD, White E. 2010. Autophagy and metabolism. *Science* **330**: 1344-1348.
- Radoshevich L, Murrow L, Chen N, Fernandez E, Roy S, Fung C, Debnath J. 2010. ATG12 conjugation to ATG3 regulates mitochondrial homeostasis and cell death. *Cell* **142**: 590-600.
- Randall-Demllo S, Chieppa M, Eri R. 2013. Intestinal epithelium and autophagy: partners in gut homeostasis. *Frontiers in immunology* **4**: 301.
- Ravikumar B, Duden R, Rubinsztein DC. 2002. Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Human molecular genetics* **11**: 1107-1117.
- Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C, Rubinsztein DC. 2010. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nature cell biology* **12**: 747-757.
- Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, Scaravilli F, Easton DF, Duden R, O'Kane CJ és mtsai. 2004. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nature genetics* **36**: 585-595.
- Raymond LA. 2017. Striatal synaptic dysfunction and altered calcium regulation in Huntington disease. *Biochemical and biophysical research communications* **483**: 1051-1062.
- Reiner A, Albin RL, Anderson KD, D'Amato CJ, Penney JB, Young AB. 1988. Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 5733-5737.
- Robinson FL, Dixon JE. 2006. Myotubularin phosphatases: policing 3-phosphoinositides. *Trends in cell biology* **16**: 403-412.

- Robinson SW, Herzyk P, Dow JA, Leader DP. 2013. FlyAtlas: database of gene expression in the tissues of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic acids research* **41**: D744-750.
- Romao S, Gasser N, Becker AC, Guhl B, Bajagic M, Vanoaica D, Ziegler U, Roesler J, Dengjel J, Reichenbach J és mtsai. 2013. Autophagy proteins stabilize pathogen-containing phagosomes for prolonged MHC II antigen processing. *The Journal of cell biology* **203**: 757-766.
- Romero E, Cha GH, Verstreken P, Ly CV, Hughes RE, Bellen HJ, Botas J. 2008. Suppression of neurodegeneration and increased neurotransmission caused by expanded full-length huntingtin accumulating in the cytoplasm. *Neuron* **57**: 27-40.
- Rosas HD, Koroshetz WJ, Chen YI, Skeuse C, Vangel M, Cudkovicz ME, Caplan K, Marek K, Seidman LJ, Makris N és mtsai. 2003. Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD: an MRI-based morphometric analysis. *Neurology* **60**: 1615-1620.
- Rosas HD, Salat DH, Lee SY, Zaleta AK, Pappu V, Fischl B, Greve D, Hevelone N, Hersch SM. 2008. Cerebral cortex and the clinical expression of Huntington's disease: complexity and heterogeneity. *Brain : a journal of neurology* **131**: 1057-1068.
- Rose C, Menzies FM, Renna M, Acevedo-Arozena A, Corrochano S, Sadiq O, Brown SD, Rubinsztein DC. 2010. Rilmenidine attenuates toxicity of polyglutamine expansions in a mouse model of Huntington's disease. *Human molecular genetics* **19**: 2144-2153.
- Ross CA, Poirier MA. 2005. Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 891-898.
- Ross CA, Tabrizi SJ. 2011. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *The Lancet Neurology* **10**: 83-98.
- Rubinsztein DC. 2006. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* **443**: 780-786.
- Rubinsztein DC, Marino G, Kroemer G. 2011. Autophagy and aging. *Cell* **146**: 682-695.
- Rue L, Lopez-Soop G, Gelpi E, Martinez-Vicente M, Alberch J, Perez-Navarro E. 2013. Brain region- and age-dependent dysregulation of p62 and NBR1 in a mouse model of Huntington's disease. *Neurobiology of disease* **52**: 219-228.
- Rui YN, Xu Z, Patel B, Chen Z, Chen D, Tito A, David G, Sun Y, Stimming EF, Bellen HJ és mtsai. 2015. Huntingtin functions as a scaffold for selective macroautophagy. *Nature cell biology*.
- Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang YY, Kim J, Kim H, Neufeld TP, Dillin A, Guan KL. 2013. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nature cell biology* **15**: 741-750.
- Rusten TE, Vaccari T, Lindmo K, Rodahl LM, Nezis IP, Sem-Jacobsen C, Wendler F, Vincent JP, Brech A, Bilder D és mtsai. 2007. ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy. *Current biology : CB* **17**: 1817-1825.
- Rüb U, Seidel K, Heinsen H, Vonsattel JP, den Dunnen WF, Korf HW. 2016. Huntington's disease (HD): the neuropathology of a multisystem neurodegenerative disorder of the human brain. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* **26**: 726-740.
- Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH. 1994. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* **78**: 35-43.
- Saftig P, Klumperman J. 2009. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 623-635.
- Sandri M, Coletto L, Grumati P, Bonaldo P. 2013. Misregulation of autophagy and protein degradation systems in myopathies and muscular dystrophies. *J Cell Sci* **126**: 5325-5333.

- Sarkar S, Davies JE, Huang Z, Tunnacliffe A, Rubinsztein DC. 2007a. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *The Journal of biological chemistry* **282**: 5641-5652.
- Sarkar S, Floto RA, Berger Z, Imarisio S, Cordenier A, Pasco M, Cook LJ, Rubinsztein DC. 2005. Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *The Journal of cell biology* **170**: 1101-1111.
- Sarkar S, Korolchuk VI, Renna M, Imarisio S, Fleming A, Williams A, Garcia-Arencibia M, Rose C, Luo S, Underwood BR és mtsai. 2011. Complex inhibitory effects of nitric oxide on autophagy. *Molecular cell* **43**: 19-32.
- Sarkar S, Krishna G, Imarisio S, Saiki S, O'Kane CJ, Rubinsztein DC. 2008. A rational mechanism for combination treatment of Huntington's disease using lithium and rapamycin. *Human molecular genetics* **17**: 170-178.
- Sarkar S, Perlstein EO, Imarisio S, Pineau S, Cordenier A, Maglathlin RL, Webster JA, Lewis TA, O'Kane CJ, Schreiber SL és mtsai. 2007b. Small molecules enhance autophagy and reduce toxicity in Huntington's disease models. *Nature chemical biology* **3**: 331-338.
- Sarkar S, Ravikumar B, Floto RA, Rubinsztein DC. 2009. Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies. *Cell death and differentiation* **16**: 46-56.
- Sarkar S, Rubinsztein DC. 2008. Huntington's disease: degradation of mutant huntingtin by autophagy. *The FEBS journal* **275**: 4263-4270.
- Sato M, Sato K. 2011. Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos. *Science* **334**: 1141-1144.
- Saudou F, Humbert S. 2016. The Biology of Huntingtin. *Neuron* **89**: 910-926.
- Sawa A, Nagata E, Sutcliffe S, Dulloor P, Cascio MB, Ozeki Y, Roy S, Ross CA, Snyder SH. 2005. Huntingtin is cleaved by caspases in the cytoplasm and translocated to the nucleus via perinuclear sites in Huntington's disease patient lymphoblasts. *Neurobiology of disease* **20**: 267-274.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* **9**: 671-675.
- Schweers RL, Zhang J, Randall MS, Loyd MR, Li W, Dorsey FC, Kundu M, Opferman JT, Cleveland JL, Miller JL és mtsai. 2007. NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 19500-19505.
- Scott RC, Juhász G, Neufeld TP. 2007. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Current biology : CB* **17**: 1-11.
- Scott RC, Schuldiner O, Neufeld TP. 2004. Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev Cell* **7**: 167-178.
- Selaya A. 2001. The aging enigma: consulting the fly. *Caltech Undergraduate Res J* **1**: 42-47.
- Shaid S, Brandts CH, Serve H, Dikic I. 2013. Ubiquitination and selective autophagy. *Cell death and differentiation* **20**: 21-30.
- Shen J, Yu WM, Brotto M, Scherman JA, Guo C, Stoddard C, Nosek TM, Valdivia HH, Qu CK. 2009. Deficiency of MIP/MTMR14 phosphatase induces a muscle disorder by disrupting Ca(2+) homeostasis. *Nature cell biology* **11**: 769-776.
- Shibata M, Lu T, Furuya T, Degtarev A, Mizushima N, Yoshimori T, MacDonald M, Yankner B, Yuan J. 2006. Regulation of intracellular accumulation of mutant Huntingtin by Beclin 1. *The Journal of biological chemistry* **281**: 14474-14485.
- Shoji-Kawata S, Sumpter R, Leveno M, Campbell GR, Zou Z, Kinch L, Wilkins AD, Sun Q, Pallauf K, MacDuff D és mtsai. 2013. Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide. *Nature* **494**: 201-206.

- Shravage BV, Hill JH, Powers CM, Wu L, Baehrecke EH. 2013. Atg6 is required for multiple vesicle trafficking pathways and hematopoiesis in *Drosophila*. *Development* **140**: 1321-1329.
- Shvets E, Fass E, Scherz-Shouval R, Elazar Z. 2008. The N-terminus and Phe52 residue of LC3 recruit p62/SQSTM1 into autophagosomes. *J Cell Sci* **121**: 2685-2695.
- Sieradzan KA, Mehan AO, Jones L, Wanker EE, Nukina N, Mann DM. 1999. Huntington's disease intranuclear inclusions contain truncated, ubiquitinated huntingtin protein. *Experimental neurology* **156**: 92-99.
- Simonsen A, Cumming RC, Brech A, Isakson P, Schubert DR, Finley KD. 2008. Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila*. *Autophagy* **4**: 176-184.
- Skotte NH, Southwell AL, Ostergaard ME, Carroll JB, Warby SC, Doty CN, Petoukhov E, Vaid K, Kordasiewicz H, Watt AT és mtsai. 2014. Allele-specific suppression of mutant huntingtin using antisense oligonucleotides: providing a therapeutic option for all Huntington disease patients. *PloS one* **9**: e107434.
- Sontag EM, Lotz GP, Agrawal N, Tran A, Aron R, Yang G, Necula M, Lau A, Finkbeiner S, Glabe C és mtsai. 2012. Methylene blue modulates huntingtin aggregation intermediates and is protective in Huntington's disease models. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **32**: 11109-11119.
- Stack JH, DeWald DB, Takegawa K, Emr SD. 1995. Vesicle-mediated protein transport: regulatory interactions between the Vps15 protein kinase and the Vps34 PtdIns 3-kinase essential for protein sorting to the vacuole in yeast. *The Journal of cell biology* **129**: 321-334.
- Stack JH, Herman PK, Schu PV, Emr SD. 1993. A membrane-associated complex containing the Vps15 protein kinase and the Vps34 PI 3-kinase is essential for protein sorting to the yeast lysosome-like vacuole. *The EMBO journal* **12**: 2195-2204.
- Stanek LM, Sardi SP, Mastis B, Richards AR, Treleaven CM, Taksir T, Misra K, Cheng SH, Shihabuddin LS. 2014. Silencing mutant huntingtin by adeno-associated virus-mediated RNA interference ameliorates disease manifestations in the YAC128 mouse model of Huntington's disease. *Human gene therapy* **25**: 461-474.
- Steffan JS. 2010. Does Huntingtin play a role in selective macroautophagy? *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **9**: 3401-3413.
- Steffan JS, Bodai L, Pallos J, Poelman M, McCampbell A, Apostol BL, Kazantsev A, Schmidt E, Zhu YZ, Greenwald M és mtsai. 2001. Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* **413**: 739-743.
- Sun M, Chen L. 2015. Studying tauopathies in *Drosophila*: A fruitful model. *Experimental neurology*.
- Sun Q, Fan W, Chen K, Ding X, Chen S, Zhong Q. 2008. Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 19211-19216.
- Sun X, Marque LO, Cordner Z, Pruitt JL, Bhat M, Li PP, Kannan G, Ladenheim EE, Moran TH, Margolis RL és mtsai. 2014. Phosphorodiamidate morpholino oligomers suppress mutant huntingtin expression and attenuate neurotoxicity. *Human molecular genetics* **23**: 6302-6317.
- Sweeney P, Park H, Baumann M, Dunlop J, Frydman J, Kopito R, McCampbell A, Leblanc G, Venkateswaran A, Nurmi A és mtsai. 2017. Protein misfolding in neurodegenerative diseases: implications and strategies. *Translational neurodegeneration* **6**: 6.

- Takahashi T, Kikuchi S, Katada S, Nagai Y, Nishizawa M, Onodera O. 2008. Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic. *Human molecular genetics* **17**: 345-356.
- Takeshige K, Baba M, Tsuboi S, Noda T, Ohsumi Y. 1992. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *The Journal of cell biology* **119**: 301-311.
- Tanaka M, Machida Y, Niu S, Ikeda T, Jana NR, Doi H, Kurosawa M, Nekooki M, Nukina N. 2004. Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nature medicine* **10**: 148-154.
- Tang HW, Liao HM, Peng WH, Lin HR, Chen CH, Chen GC. 2013. Atg9 Interacts with dTRAF2/TRAF6 to Regulate Oxidative Stress-Induced JNK Activation and Autophagy Induction. *Dev Cell*.
- Tanida I, Sou YS, Ezaki J, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. 2004. HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates. *The Journal of biological chemistry* **279**: 36268-36276.
- Tanida I, Tanida-Miyake E, Komatsu M, Ueno T, Kominami E. 2002. Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p. *The Journal of biological chemistry* **277**: 13739-13744.
- Tanida I, Tanida-Miyake E, Ueno T, Kominami E. 2001. The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a Protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. *The Journal of biological chemistry* **276**: 1701-1706.
- Tassa A, Roux MP, Attaix D, Bechet DM. 2003. Class III phosphoinositide 3-kinase - Beclin1 complex mediates the amino acid-dependent regulation of autophagy in C2C12 myotubes. *The Biochemical journal* **376**: 577-586.
- Tellez-Nagel I, Johnson AB, Terry RD. 1974. Studies on brain biopsies of patients with Huntington's chorea. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **33**: 308-332.
- Thumm M, Egner R, Koch B, Schlumpberger M, Straub M, Veenhuis M, Wolf DH. 1994. Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters* **349**: 275-280.
- Toda H, Mochizuki H, Flores R, 3rd, Josowitz R, Krasieva TB, Lamorte VJ, Suzuki E, Gindhart JG, Furukubo-Tokunaga K, Tomoda T. 2008. UNC-51/ATG1 kinase regulates axonal transport by mediating motor-cargo assembly. *Genes Dev* **22**: 3292-3307.
- Tomoda T, Kim JH, Zhan C, Hatten ME. 2004. Role of Unc51.1 and its binding partners in CNS axon outgrowth. *Genes Dev* **18**: 541-558.
- Torroja L, Chu H, Kotovsky I, White K. 1999. Neuronal overexpression of APPL, the *Drosophila* homologue of the amyloid precursor protein (APP), disrupts axonal transport. *Current biology : CB* **9**: 489-492.
- Tosch V, Rohde HM, Tronchere H, Zanoteli E, Monroy N, Kretz C, Dondaine N, Payrastre B, Mandel JL, Laporte J. 2006. A novel PtdIns3P and PtdIns(3,5)P2 phosphatase with an inactivating variant in centronuclear myopathy. *Human molecular genetics* **15**: 3098-3106.
- Tóth ML, Sigmond T, Borsos E, Barna J, Erdélyi P, Takács-Vellai K, Orosz L, Kovács AL, Csikós G, Sass M és mtsai. 2008. Longevity pathways converge on autophagy genes to regulate life span in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy* **4**: 330-338.

- Tracy K, Baehrecke EH. 2013. The role of autophagy in *Drosophila* metamorphosis. *Current topics in developmental biology* **103**: 101-125.
- Tsukada M, Ohsumi Y. 1993. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters* **333**: 169-174.
- Tsukamoto S, Kuma A, Murakami M, Kishi C, Yamamoto A, Mizushima N. 2008. Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science* **321**: 117-120.
- Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson A, Kampf C, Sjostedt E, Asplund A és mtsai. 2015. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **347**: 1260419.
- Valor LM. 2015. Transcription, epigenetics and ameliorative strategies in Huntington's Disease: a genome-wide perspective. *Molecular neurobiology* **51**: 406-423.
- Van Raamsdonk JM, Pearson J, Bailey CD, Rogers DA, Johnson GV, Hayden MR, Leavitt BR. 2005a. Cystamine treatment is neuroprotective in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Journal of neurochemistry* **95**: 210-220.
- Van Raamsdonk JM, Pearson J, Rogers DA, Bissada N, Vogl AW, Hayden MR, Leavitt BR. 2005b. Loss of wild-type huntingtin influences motor dysfunction and survival in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Human molecular genetics* **14**: 1379-1392.
- Vazquez-Manrique RP, Farina F, Cambon K, Dolores Sequedo M, Parker AJ, Millan JM, Weiss A, Deglon N, Neri C. 2016. AMPK activation protects from neuronal dysfunction and vulnerability across nematode, cellular and mouse models of Huntington's disease. *Human molecular genetics* **25**: 1043-1058.
- Velikkakath AK, Nishimura T, Oita E, Ishihara N, Mizushima N. 2012. Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. *Molecular biology of the cell* **23**: 896-909.
- Vellai T. 2009. Autophagy genes and ageing. *Cell death and differentiation* **16**: 94-102.
- Vellai T, Takács-Vellai K, Zhang Y, Kovács AL, Orosz L, Muller F. 2003. Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature* **426**: 620.
- Vergne I, Roberts E, Elmaoued RA, Tosch V, Delgado MA, Proikas-Cezanne T, Laporte J, Deretic V. 2009. Control of autophagy initiation by phosphoinositide 3-phosphatase Jumpy. *The EMBO journal* **28**: 2244-2258.
- Villanueva-Paz M, Cotan D, Garrido-Maraver J, Oropesa-Avila M, de la Mata M, Delgado-Pavon A, de Lavera I, Alcocer-Gomez E, Alvarez-Cordoba M, Sanchez-Alcazar JA. 2016. AMPK Regulation of Cell Growth, Apoptosis, Autophagy, and Bioenergetics. *Exs* **107**: 45-71.
- Voigt O, Poggeler S. 2013. Autophagy genes Smatg8 and Smatg4 are required for fruiting-body development, vegetative growth and ascospore germination in the filamentous ascomycete *Sordaria macrospora*. *Autophagy* **9**: 33-49.
- Volinia S, Dhand R, Vanhaesebroeck B, MacDougall LK, Stein R, Zvelebil MJ, Domin J, Panaretou C, Waterfield MD. 1995. A human phosphatidylinositol 3-kinase complex related to the yeast Vps34p-Vps15p protein sorting system. *The EMBO journal* **14**: 3339-3348.
- Walker FO. 2007. Huntington's disease. *Lancet (London, England)* **369**: 218-228.
- Walter C, Clemens LE, Muller AJ, Fallier-Becker P, Proikas-Cezanne T, Riess O, Metzger S, Nguyen HP. 2016. Activation of AMPK-induced autophagy ameliorates Huntington disease pathology in vitro. *Neuropharmacology* **108**: 24-38.
- Wang H, Sun HQ, Zhu X, Zhang L, Albanesi J, Levine B, Yin H. 2015. GABARAPs regulate PI4P-dependent autophagosome:lysosome fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**: 7015-7020.

- Wang Z, Das SR, Xie SX, Arnold SE, Detre JA, Wolk DA. 2013. Arterial spin labeled MRI in prodromal Alzheimer's disease: A multi-site study. *NeuroImage Clinical* **2**: 630-636.
- Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z. 2010. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *The EMBO journal* **29**: 1792-1802.
- Wild EJ, Tabrizi SJ. 2014. Targets for future clinical trials in Huntington's disease: what's in the pipeline? *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* **29**: 1434-1445.
- Williams A, Sarkar S, Cuddon P, Ttofi EK, Saiki S, Siddiqi FH, Jahreiss L, Fleming A, Pask D, Goldsmith P és mtsai. 2008. Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nature chemical biology* **4**: 295-305.
- Wirth M, Joachim J, Tooze SA. 2013. Autophagosome formation - the role of ULK1 and Beclin1-PI3KC3 complexes in setting the stage. *Seminars in cancer biology* **23**: 301-309.
- Wold MS, Lim J, Lachance V, Deng Z, Yue Z. 2016. ULK1-mediated phosphorylation of ATG14 promotes autophagy and is impaired in Huntington's disease models. *Molecular neurodegeneration* **11**: 76.
- Wong YC, Holzbaaur EL. 2014. The regulation of autophagosome dynamics by huntingtin and HAP1 is disrupted by expression of mutant huntingtin, leading to defective cargo degradation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **34**: 1293-1305.
- Wong YC, Holzbaaur EL. 2015. Autophagosome dynamics in neurodegeneration at a glance. *J Cell Sci* **128**, 1259-67.
- Wood NI, Pallier PN, Wanderer J, Morton AJ. 2007. Systemic administration of Congo red does not improve motor or cognitive function in R6/2 mice. *Neurobiology of disease* **25**: 342-353.
- Wu AG, Wong VK, Xu SW, Chan WK, Ng CI, Liu L, Law BY. 2013. Onjisaponin B derived from Radix Polygalae enhances autophagy and accelerates the degradation of mutant alpha-synuclein and huntingtin in PC-12 cells. *International journal of molecular sciences* **14**: 22618-22641.
- Wyant KJ, Ridder AJ, Dayalu P. 2017. Huntington's Disease-Update on Treatments. *Current neurology and neuroscience reports* **17**: 33.
- Xifró X, Anglada-Huguet M, Rue L, Saavedra A, Perez-Navarro E, Alberch J. 2011. Increased 90-kDa ribosomal S6 kinase (Rsk) activity is protective against mutant huntingtin toxicity. *Molecular neurodegeneration* **6**: 74.
- Xu Z, Tito A, Rui YN, Zhang S. 2015. Studying Polyglutamine Diseases in Drosophila. *Experimental neurology*.
- Yamada T, Carson AR, Caniggia I, Umebayashi K, Yoshimori T, Nakabayashi K, Scherer SW. 2005. Endothelial nitric-oxide synthase antisense (NOS3AS) gene encodes an autophagy-related protein (APG9-like2) highly expressed in trophoblast. *The Journal of biological chemistry* **280**: 18283-18290.
- Yen WL, Shintani T, Nair U, Cao Y, Richardson BC, Li Z, Hughson FM, Baba M, Klionsky DJ. 2010. The conserved oligomeric Golgi complex is involved in double-membrane vesicle formation during autophagy. *The Journal of cell biology* **188**: 101-114.
- Yla-Anttila P, Vihinen H, Jokita E, Eskelinen EL. 2009. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* **5**: 1180-1185.
- Youle RJ, Narendra DP. 2011. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 9-14.

- Young AR, Chan EY, Hu XW, Kochl R, Crawshaw SG, High S, Hailey DW, Lippincott-Schwartz J, Tooze SA. 2006. Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci* **119**: 3888-3900.
- Yu L, McPhee CK, Zheng L, Mardones GA, Rong Y, Peng J, Mi N, Zhao Y, Liu Z, Wan F és mtsai. 2010. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* **465**: 942-946.
- Zhang S, Binari R, Zhou R, Perrimon N. 2010. A genomewide RNA interference screen for modifiers of aggregates formation by mutant Huntingtin in *Drosophila*. *Genetics* **184**: 1165-1179.
- Zhang Y, Yan L, Zhou Z, Yang P, Tian E, Zhang K, Zhao Y, Li Z, Song B, Han J és mtsai. 2009. SEPA-1 mediates the specific recognition and degradation of P granule components by autophagy in *C. elegans*. *Cell* **136**: 308-321.
- Zheng S, Clabough EB, Sarkar S, Futter M, Rubinsztein DC, Zeitlin SO. 2010. Deletion of the huntingtin polyglutamine stretch enhances neuronal autophagy and longevity in mice. *PLoS Genet* **6**: e1000838.
- Zhong Y, Wang QJ, Li X, Yan Y, Backer JM, Chait BT, Heintz N, Yue Z. 2009. Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nature cell biology* **11**: 468-476.
- Zientara-Rytter K, Subramani S. 2016. Autophagic degradation of peroxisomes in mammals. *Biochemical Society transactions* **44**: 431-440.
- Zou J, Majerus PW, Wilson DB, Schrade A, Chang SC, Wilson MP. 2012. The role of myotubularin-related phosphatases in the control of autophagy and programmed cell death. *Advances in biological regulation* **52**: 282-289.

Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Vellai Tibornak, mind témavezetéséért, amelyből nagyon sokat tanultam, mind jellemformáló személyiségéért, amely révén sokat alakultam.

Szeretnék köszönetet mondani továbbá Kovács Tibornak és Manzóger Annának, legközvetlenebb munkatársaimnak és barátaimnak a doktori munka során nyújtott sok segítségért, a témérdek közös ténykedésért, közös munkáért, szakmai és nem szakmai beszélgetésekért, és a doktori értekezés írása során nyújtott észrevételekért.

Köszönöm Saskői Évának a dolgozat „utolsó pillanatos lektorálásában” nyújtott segítségét.

Köszönöm az ELTE Genetikai Tanszékén működő Drosophila csoport és az egész tanszék volt és jelenlegi munkatársainak az idők folyamán nyújtott szellemi és lelki támogatását, segítségeket, vitákat, inspiráló gondolatokat és a közösség élményét. Szeretném közülük kiemelni Hotzi Bernadette-t, az ő barátságát és sokrétű támogatását, köztük a nyomtatás során nyújtott életmentő segítségét.

Szeretnék néven nevezni még többeket is, akiket nem tettem meg még fentebb. A felsorolás sajnos biztos nem lesz hiánytalan: Annus Tamás, Ari Eszter, Barna János, Biró János Barnabás, Egyed Balázs, Erdélyi Dániel, Erdélyi Péter, Farkas Zsolt, Fazekas Dávid, Fodor Erika, Földváry-Nagy László, Hargitai Balázs, Jeszenői Norbert, Kadlecik Tamás, Karl Vivien, Komlós Marcell, Korcsmáros Tamás, Kosztelnik Mónika, Kovácsné Sigmond Tímea, Kubisch János, Kurucz Anita, Kutnyánszky Vera, Lengyel Katalin, Maurnyi Csilla, Módos Dezső, Murányi Gábor, Prof. Orosz László, Pálffy Máté, Pápai Nóra, Papp Dia, Pásztor Erzsébet, Radványi Miklós, Regős Ági, Schuller Dóra, Sturm Ádám, Szaker Henrik, Szikszai Fanni, Szincsák Sára, Szinyákovics Janka, Tagscherer Kinga, Tallós Zsófia, Tóth András, Tóth Márton Lóránt, Türei Dénes, Varga Máté, Varga Virgínia, Vellainé Takács Krisztina, Zsigmond Áron.

Az ELTE Anatómiai, Sejt- és fejlődésbiológiai Tanszék munkatársainak is szeretném kifejezni köszönetemet a tőlük kapott segítségekért, reagensekért, törzsekért, beszélgetésekért és a mikroszkóphasználati lehetőségért. Szeretném közülük külön kiemelni Lőrincz Pétert, akit a „legrégebbi bajtársamnak” tekintek. És szeretném még névvel illetni Boda Attilát, Dr. Csikós

Györgyöt, Dr. Juhász Gábort, Dr. Lów Pétert, Maruzs Tamást, Prof. Sass Miklóst, Szatmári Zsuzsannát és Takáts Szabolcsot.

Köszönöm a lehetőséget a Velgene Three Kft. vezetőinek és munkatársainak, hogy kutathattam az AUTEN-67 és -99 kismolekulák hatásait.

Hálás vagyok Dr. Mihály Józsefnek és Dr. Erdélyi Miklósnek, a Szegedi Biológiai Kutatóközpont vezető kutatóinak, akikhez - eredendően nem muslicával foglalkozó kutatóként - bármikor fordulhattam kérdésekkel.

Köszönömöm Dr. Lukácsovich Tamásnak, jelenleg a zürichi Brain Research Institute munkatársának a beszélgetéseket, konzultációs lehetőségeket.

Szeretném megköszönni az évek során nyújtott sok technikai segítségét Komjáti Gáborné Katalinnak, Péntes Imréné Tündének, Preisinger Reginának, Simon Rezsőné Sári néniének, Supauer Beatrixnak, Szabados Ferencné Gabriellának és Takátsné Botond Juditnak.

Köszönöm a különböző munkáink során nyújtott segítségét Harami Gábornak (ELTE Biokémiai Tanszék), Dr. Bóka Károlynak, Dr. Kovács M. Gábornak (mindketten ELTE Növény-szervezettani Tanszék) és Merényi Zsoltnak (ELTE Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék) is.

A kutatómunkától hátrébb lépve: szeretném e sorokkal is kifejezni köszönetemet szüleimnek, Rácz Marianne-nak és Billes Zoltánnak. Köszönöm a támogatásukat, és értelemszerűen mindazt a megnevezhetetlenül sokat, amivel hozzám járultak. Szeretnék köszönetet mondani öcsémnek, Billes Tibornak és nagynénémnek, Billes Zsuzsannának azért a sok-sok jóért, amelyben nekik köszönhetően részesültem és részesülök, valamint a nagyszüleimnek a hasonló javakért, és hogy fájdalommal, de elfogadták, hogy én vagyok a legritkábban látott unoka. Köszönöm még nagybátyámnak, Rácz Gábornak, unokatestvéreimnek, Kocsis Pálnak és Kocsis Tamásnak valamint családjaiknak a tőlük kapott támogatást. Köszönöm továbbá Balogh Imre és Kőhegyi Katalin mellettem állását is.

Köszönöm barátaimnak és mindazoknak, akik hozzám tettek, gazdagítottak az elmúlt sok évben. Szerencsémre, sokan vannak. Szeretném, hogy álljon itt többek neve, de egészen biztos, hogy e felsorolás sem lesz hiánytalan.

Bagó György, Bakos Zsolt, Bartal Miklós, Bereczky Boróka, Csermák Tamás, Fehér Gábor, Fink Nándorné Katalin, Fleischer Zsófia, Godár Bálint, Hojdák Anka, Hojdák Gergő, Jelencsik Mátyás, Jurásek Alexandra - Szaza, Kelemen Kristóf és Berzsenyi Sára, Kiss Ádám, Kuslits Borbála, Lendvay Berci, Márky Ádám, Merényi Zsolt, Novák Zsófia, Palásthy Gergely, Palásthy István, Palásthy János - Govanni, Poór Veronika, Radnai Kinga, Schumicky Pál, Simon Dániel, Stefan Strecker, Szabó András, Szarka Eszter, Szegedi Anikó - Panni, Szűcs Balázs, Ther Péter Pál, Ther Tamás, Ulicska Barbara, Uzsalý Bence András, Uzsalyné Pécsi Rita, Zemlényi Csaba

Nagyon köszönöm, Mindenkinek!

ADATLAP

a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához*

I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: Billes Viktor András

MTMT-azonosító: 10020906

A doktori értekezés címe és alcíme: Két autofágia aktiváló kismolekula, az AUTEN-67 és az AUTEN-99 hatásának vizsgálata *Drosophila melanogaster* Huntington-kór modellben

DOI-azonosító: 10.15476/ELTE.2017.120

A doktori iskola neve: Biológia Doktori Iskola

A doktori iskolán belüli doktori program neve: Klasszikus és Molekuláris Genetika

A témavezető neve és tudományos fokozata: Prof. Vellai Tibor, Dsc

A témavezető munkahelye: ELTE TTK Genetikai Tanszék

II. Nyilatkozatok

1. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi kar Dékáni Hivatali Doktori, Habilitációs és Nemzetközi Ügyek Csoportjának ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

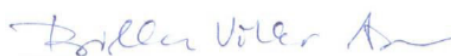
2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudomásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: Budapest, 2017. július 13.



.....
a doktori értekezés szerzőjének aláírása

*ELTE SZMSZ SZMR 12. sz. melléklet