

Ph.D. értekezés tézisei

**A *Drosophila melanogaster* Ref(2)P LC3- interakciós
 régió mutációjának hatása az oxidatív stresszre**

Ürmösi Adél

Témavezető:

Dr. Juhász Gábor, D.Sc. tudományos tanácsadó

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai
Intézet



Szeged

2022

Bevezetés

Az autofágia (sejtes önemésztés) egy eukariótákban erősen konzervált sejtes újrahasznosító folyamat, az ubiquitin-proteozóma rendszer mellett a másik fő degradációs útvonal. Fontos szerepe van a sejt túlélésében és fenntartásában, a citoplazmatikus organellumok, fehérjék valamint egyéb makromolekulák lebontásában és ezeknek az újrahasznosításában. Az újrahasznosítás új építőköveket és energiát szolgáltat a sejtnek az újjáépüléshez és a normális homeosztázisához. Az autofágia főbb típusai a makroautofágia, a chaperon-közvetítette autofágia, RN/DNautofágia, mikroautofága és a krinofágia.

A szelektív autofágia a makroautofágia egy típusa, amiben szerepet játszanak autofágia receptor fehérjék. Ezeknek fontos szerepük van, mivel képesek poliubiquitin láncokat kötni a lebontásra ítélt fehérjéken és az Atg8-at, amely fagofór membránján található. Így juttatják be a degradálendő makromolekulákat az autofagoszómába, amik ezután lizoszómával fuzionálva lebontásra kerülnek. A folyamat során az Atg8 és az autofág receptor is degradálódik. A szelektív autofágiának több típusa van, aszerint hogy melyik organellum lebontásáért felelnek.

Az első azonosított szelektív autofágia receptor a p62 volt (sequestosome-1 (SQSTM1)), melynek *Drosophila* homológja a Ref(2)P. Emlősben több ilyen LIR motívummal rendelkező receptort is azonosítottak az évek során, például NBR1, NDP52, optineurin (OPTN),

TAX1BP1, Nix, Stbd1. *Drosophila*-ban a Ref(2)P mellett LIR motívummal rendelkező szelektív autofág receptor a Kenny és az ALFY/blue cheese. A LIR motívumot a Θ -X1-X2- Γ 3 konszenzus szekvencia jellemzi. Ebből a Θ aromás (W/F/Y) és az Γ 3 alifás aminosavak segítségével kötődik a két hidrofób zsebhez LIR kötőhelyen. A motívumon kívüli savas aminosavak stabilizálják a kapcsolatot, ezt a régiót a kiterjesztett LIR résznek is nevezzük. A *Drosophila*-ban az első felfedezett W454-Q-L-I457 LIR motívum szekvenciával rendelkező fehérje a Ref(2)P. Biokémiai elemzésekkel megfigyelték, hogy ebben a motívumban két aminosav cseréje alaninra (W454A, I457A) képes a Ref(2)P-Atg8a közötti kölcsönhatást megakadályozni.

PhD munkám során az általunk létrehozott LIR mutáns állatokban a Ref(2)P^{LIR^m} és Atg8 kapcsolatát, és a mutáció hatását vizsgáltam.

Célkitűzések:

1. CRISPR/Cas9 homológ irányított hibajavítással létrehozni egy Ref(2)P dupla aminosav cserét a LIR motívumban, amely elrontja az Atg8a-hoz való kapcsolódást.
2. A mutáns vonal általános vizsgálata a különböző fiziológiai változásokra, mint például élethossz és negatív geotaxis tesztek az öregedés hatására.
3. Az általános autofágia és a felhalmozódott aggregátumok jelenlétének hatásának vizsgálata a LIR mutáció jelenlétében a lárva és az adult állat különböző szöveteiben.
4. A szelektív autofágia változásának vizsgálata a LIR mutáció jelenlétében.
5. A Ref(2)P szerepének vizsgálata az oxidatív stresszválasz útvonalakban.
6. Az indukált oxidatív stressz hatásának vizsgálata.

Anyagok és módszerek

1. CRISPR/Cas9 közvetítette homológ rekombinációval Ref(2)P génre LIR mutáns létrehozása, amely nem képes az Atg8a-hoz kapcsolódni.
2. Szekvenálással és PCR tesztekkel a Ref(2)^{LIR} mutáns törzs validálása.
3. Ko-immunoprecipitációval és Western blottal a Ref(2)^{LIR}-Atg8a szintjének vizsgálata.
4. Élethossz és paraquat rezisztencia tesztek a Ref(2)^{LIR} mutáns állatokon.
5. Mászási tesztek elvégzése a neurodegeneráció vizsgálatára.
6. Lárvális zsírtestek LysoTracker festése.
7. Transzgénikus riporterek és immunfestések alkalmazása zsírtestekben és adult állatok agyában.
8. Fény-, epifluoreszcens- és elektronmikroszkópia alkalmazása.
9. RT-PCR tesztek elvégzése.
10. Az elektronmikroszkópos minták előkészítése.
11. Lárvális zsírtest és adult agyak MitoSOX festése.

Eredmények

1. CRISPR/Cas9 rendszerrel létrehoztunk egy *Drosophila* knock-in mutánst, amelyben a LIR motívumban egy triptofánt és egy izoleucint kicseréltünk egy-egy alaninra. Ko-immunoprecipitációval vizsgálva az Atg8a-p62 interakciót, megfigyeltük, hogy a *Ref(2)^{P^{LIR}}* mutáns legyekben a p62-Atg8a interakció megszűnt.
2. Az általunk létrehozott több *Ref(2)^{P^{LIR}}* mutánsokban a lárvális zsírtestben, az adult agyban és az indirekt repülő izmokban is szignifikánsan felhalmozódott a Ref(2)P és az ubiquitin. Ezenkívül erős kolokalizációt figyeltünk meg a Ref(2)P és az ubiquitin között az összes általunk vizsgált szövetben. A 3 napos és az idősebb 30 napos állatokban is vizsgáltuk az ubiquitinált fehérje aggregátumok számát. Megfigyeltük, hogy az aggregátumok száma és a kolokalizáció mértéke is növekszik az életkorral.
3. A nem szelektív autofágia jelenlétét LysoTracker festéssel vizsgáltuk. Az általunk vizsgált LIR mutáns legyek zsírtestjeiben nem volt szignifikáns különbség a LysoTracker pozitív struktúrák számában. Ezen kívül az éheztetés a Ref(2)P szintjét sem emelte meg a

zsírszövetben. Ezért úgy gondoljuk, hogy a LIR mutáció jelenléte nem rontotta a nem szelektív autofágia működését.

4. A *Ref(2)^{PLIR}* mutáns legyek proteozómális funkcióinak vizsgálatához összehasonlítottuk a *Drosophila* 26S proteozómális alegységek expresszióját kontroll és a *Ref(2)^{PLIR}* mutáns állatokban, és ezekben nem találtunk különbséget.
5. Az elvégzett élethossz kísérletekben a LIR mutáns állatok élethossza csak minimálisan rövidült a vad típushoz képest. Az éheztetett élethossz kísérletben nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget. A neuromuszkuláris képességek vizsgálatakor a 3 és a 30 napos korban sem volt szignifikáns különbség a kontroll legyekhez képest. Az oxidatív stresszre adott válasz vizsgálatához paraquat kezelést alkalmaztunk. A 3 napos LIR mutáns állatoknál szignifikánsan megnövekedett toleranciát tapasztaltunk a vad típusú legyekhez képest.
6. Ahhoz, hogy kiderítsük az oxidatív stressz rezisztencia okát, először megvizsgáltuk, hogy az ubiquitinált Keap1 együtt szekvesztrálódik-e a Ref(2)P-vel. Ehhez egy pánneurális nSyb driverrel-el meghajtott GFP-Keap1-et használtunk a LIR mutáns legyekben. Megfigyeltük,

hogy az adult LIR mutáns legyek agyában szignifikánsan több GFP-Keap1 volt jelen, mint a vad típusú állatoknál. Ezenkívül ezek struktúrák részben kolokalizáltak a Ref(2)P-vel.

7. Megfigyeltük, hogy a Ref(2)^{LIR} mutáns állatokban megnövekedett az Nrf2 és a tőle downstream található ARE régiót tartalmazó gének transzkripció aktivitása (pl. Keap1, glutation-S-transzferáz (Gst1), kataláz (Cat)). Azonban a Ref(2)P transzkripciója amely szintén Nrf2 target, változatlan maradt a mutáns állatokban. Ezzel együtt, az Nrf2 megnövekedett nukleáris transzlokációját is megfigyeltük. Az Nrf2 szerepének vizsgálatához csendesítettük az Nrf2-öt a LIR mutáns állatokban. Ezeknek az állatoknak 33%-al csökkent az élethossza a paraquattal való kezelés során, mint a Ref(2)^{LIR} mutáns állatoknak. Ezért úgy gondoljuk, hogy a paraquat tolerancia egy nem várt funkciónyerés a szelektív legyekben, amelyekben meghibásodott az ubiquitin-függő autofágia.
8. A legyeknél az öregedés során megfigyelhető a szuperoxidok termelődése a tor repülőizmaiban található mitokondriumokban. A mitokondriális szuperoxid

szintjének meghatározásához MitoSOX festést alkalmaztunk. A mutánsaink esetében, a MitoSOX jel csökkenését figyeltük meg 45 napos LIR mutáns állatok agyának optikus lebenyében a kontroll állatokhoz képest.

9. Az aggregátumok növekedéséhez a Ref(2)P - ubiquitin együttes szekvesztrálása szükséges. A *Ref(2)P^{LIRm}; tub>GFP-Ub* állatok szöveteiben jelentősen kevesebb Ref(2)P aggregátum található, mint a LIR mutáns állatokban. Ezen kívül a Ref(2)P pontok mérete is csökkent mind a lárva zsírtestjeiben, mind az adult agyban. Megfigyeltük a Ref(2)P és az endogén ubiquitin kolokalizációjának csökkenését is. Ez elsősorban azt jelzi, hogy a Ref(2)P - ubiquitin együttes szekvesztrálása szükséges az aggregátumok növekedéséhez. Emellett a *tub>GFP-Ub* expressziója növelte a GFP - ubiquitin pontok számát a LIR mutánsban, de a kontrollban nem. Ezek szerint a felhalmozódott lebontatlan Ref(2)P segíti az ubiquitin klaszterek kialakulását. Megfigyeltük, hogy a *ref(2)P^{LIRm}; tub>GFP-Ub* állatok szöveteiben jelen vannak ubiquitin pozitív Keap1 pontok. Ez arra utal, hogy az UBA domén által vezérelt Keap1 - Ref(2)P

kölcsönhatás nem függ szorosan a Ref(2)P aggregátum képződéstől.

10. A mitofágia vizsgálatához a CCCP-vel kezelt állatokat vizsgáltunk. A Ref(2)P fokozott mitokondriális lokalizációját találtuk a *Ref(2)P^{LIRm}; tub>GFP-Ub* szövetben, míg a *Ref(2)P^{LIR}* mutáns sejtekben a Ref(2)P mitokondriális lokalizációja szignifikánsan alacsonyabb volt.

Összefoglaló

Az autofágia a sejtek evolúciósan konzervált intracelluláris degradációs folyamata. A fő útvonala során a citoplazmatikus anyag lebontása a lizoszómális rendszeren keresztül történik. A szelektív autofágia receptorok képesek felismerni az poliubiquitinálódott aggregátumokat és kötődni az Atg8/LC3 fehérjéhez, hogy biztosítsák az aggregátumok jelenlétét az autofagoszómába. A *Drosophila*-ban a legismertebb autofágia receptor, amihez az ubiquitinált fehérje aggregátumok kapcsolódnak az általunk is vizsgált p62/Ref(2)P. A Ref(2)P-ben található egy C-terminális ubiquitin-kötő domén (UBA), egy N-terminális PB1 domén, amely közvetíti az aggregátumok képződését és egy LIR (LC3- interakciós régió) motívum, egy strukturálatlan régióban, ami felel az LC3/Atg8a-val való kötődésért az autofág membránon.

PhD munkám során a *Ref(2)PLIR* motívumában CRISPR/Cas9 közvetítette homológ rekombinációval létrehoztunk két aminosavcserét, ahol egy triptofánt és egy izoleucint alaninra cseréltünk. Így létrehoztunk egy *Drosophila* törzset, amely hordozza ezt a LIR mutációt, amely megszünteti a Ref(2)P-Atg8a kapcsolatát.

Összefoglalásul elmondhatjuk, hogy sikeresen létrehoztunk egy *Ref(2)^{PLIR}* mutáns törzset. Ezek az állatok nagy számban felhalmozzák a Ref(2)P-t és az ubiquitinált fehérjéket. Az általunk megfigyelt ubiquitin

aggregátumok ubiquitinálódott Keap1-et tartalmaznak, amely az Nrf2 függő oxidatív stressz válasz negatív szabályozója. A Keap1 autofág lebontása a Ref(2)P LIR doménjén keresztül történik, így létrehozva az Atg8a-Ref(2)P-Keap1 komplexet, ami elősegíti a képződő aggregátumok degradálódását. Ezáltal az emlősökhöz hasonlóan a szabad Keap1 szint és az Nrf2 aktivitás a Ref(2)P által szabályozott. A Ref(2)P-Keap1 együttes szekvesztrálásának fontos következménye a LIR mutánsban a tartósan megnövekedett Nrf2 aktivitás, mivel annak proteaszómális lebomlását a mutáns Ref(2)P megakadályozza, ami végső soron megnövekedett PQ toleranciához vezet. Megfigyeltük, hogy a folyamatos Nrf2 aktivitás a *Ref(2)^{LIR}* mutáns állatokban fiziológiai előnyökkel jár a vad típushoz képest. A kísérleti adatainkból létrehozott modell szerint az ubiquitinálódott aggregátumok szekvesztrálódása először megemeli a proteotoxicitást. Azonban ezután az Nrf2 által vezérelt megnövekedett detoxifikáció csökkenti az oxidált, majd ubiquitinálódott fehérjék számát, amelyek oldható formában találhatóak és valószínűleg sokkal toxikusabbak. A szelektív ubiquitinált fehérje-autofágia hibás ecetmuslicák hasonló mennyiségű poliubiquitin aggregátumot halmaznak föl, mint az *Atg* mutánsok, de nem mutatnak jelentősebb fiziológiai hibákat.

Summary

Autophagy is an evolutionarily conserved intracellular degradation process of cellular self-eating and the major pathway for degradation of cytoplasmic material by the lysosomal machinery. Selective autophagy receptors can recognize ubiquitinated aggregates, and bind to Atg8/LC3 proteins to ensure the capture of cargo into autophagosomes. In *Drosophila*, p62/Ref(2)P is the first autophagy receptor. P62 possesses a C-terminal ubiquitin-binding domain, an N-terminal PB1 domain to mediate aggregate formation, and a LIR (LC3-interacting region) motif in an unstructured region, which is responsible for LC3/Atg8a binding on autophagic membranes.

The topic of my PhD work is to investigate the role of p62/Ref(2)P. We replaced two previously characterized key amino acids within the LIR motif: a Tryptophan and an Isoleucine were changed to Alanines by editing the endogenous gene using CRISPR. We generated *Drosophila* lines carrying this p62 LIR mutation, which disrupted the autophagic degradation of p62 and ubiquitinated cargo.

To summarize, we generated a *Ref(2)^{LIR}* mutant stock. These flies accumulated copious amounts of Ref(2)P and poly-ubiquitin. We find that these polyUb aggregates contain ubiquitinated Keap1, a negative regulator of the Nrf2-dependent oxidative stress response. Keap1 autophagic degradation in flies is facilitated by

Ref(2)P through its LIR-mediated interaction with the Atg8a-Keap1 complex, which promotes engulfment of the resulting aggregates. Thus, free Keap1 levels and by extension, Nrf2 activity is regulated by Ref(2)P similar to mammals. An important consequence of the Ref(2)P-Keap1 co-sequestration in the LIR mutant is persistently elevated Nrf2 activity as its proteasomal degradation is prevented, ultimately leading to increased PQ tolerance. We find that persistent Nrf2 activation in our *Ref(2)P^{LIR}* mutants can have physiological benefits even compared to wild-type animals. In our model that is gleaned from the experimental results, sequestration of ubiquitinated cargoes firstly increases their proteotoxicity. However, subsequent Nrf2-mediated increased detoxification likely reduces the burden of ubiquitinated proteins, which may also reduce the levels of soluble, presumably more toxic species. Our selective ubiquitinated protein autophagy defective flies develop just as many poly-Ub aggregates as *Atg* mutants do, but they do not show any major physiological defects.

Nyilatkozat

Alulírott, Dr. Juhász Gábor, nyilatkozom, hogy Ürmösi Adél doktori disszertációjában bemutatott eredmények tükrözik a jelölt „Bhattacharjee A, Ürmösi A, Jipa A, Kovács L, Deák P, Szabó Á, Juhász G. Loss of ubiquitinated protein autophagy is compensated by persistent cnc/NFE2L2/Nrf2 antioxidant responses. Autophagy. 2022 Feb 20:1-12 „ közleményben bemutatott hozzájárulását. A doktori értekezésben bemutatott eredményekben, valamint a további közlemények fokozatszerzéshez felhasznált anyagrészeiben a jelölt munkája meghatározó fontosságú, és más doktori fokozatszerzésben nem kerültek és a jövőben sem kerülnek felhasználásra.

Szeged, 2022. 08. 01.

Témavezető: Dr. Juhász Gábor

Társszerzői nyilatkozat

Alulírott, Dr. Bhattacharjee Arindam, nyilatkozom, hogy Ürmösi Adél doktori disszertációjában bemutatott eredmények tükrözik a jelölt „Bhattacharjee A, Ürmösi A, Jipa A, Kovács L, Deák P, Szabó Á, Juhász G. Loss of ubiquitinated protein autophagy is compensated by persistent cnc/NFE2L2/Nrf2 antioxidant responses. *Autophagy*. 2022 Feb 20:1-12,, közleményben bemutatott hozzájárulását. A doktori értekezésben bemutatott eredményekben a jelölt munkája meghatározó fontosságú, és más doktori fokozatszerzésben nem kerültek és a jövőben sem kerülnek felhasználásra.

Szeged, 2022. 08. 01.

Témavezető: Dr. Juhász Gábor