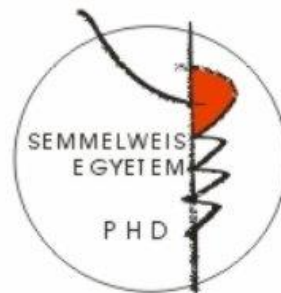


Az autofágia indukciójában szerepet játszó mTORC1 és AMPK szabályozási kapcsolatainak rendszerszintű vizsgálata celluláris stressz esetén

Doktori tézisek

Holczer Marianna

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Mészáros-Kapuy Orsolya Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Törőcsik Beáta Ph.D., egyetemi docens
Dr. Lőw Péter Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Varga Gábor D.Sc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Káldi Krisztina Ph.D., egyetemi docens

Dr. Wunderlich Lívius Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2021

1. Bevezetés

A sejtek homeosztázisát bonyolult szabályozási hálózatok összehangolt működése tartja fent. Ezeket az önfenntartó folyamatokat specializált sejtservecskék működési zavarai is befolyásolhatják, így például az endoplazmás retikulum stressz. A stresszválasz során a sejtek élet és halál közötti döntését az autofágia és az apoptózis folyamatainak összehangolása, azaz az ezeket szabályozó fehérjekomplexek (mTORC1, AMPK) és jelátviteli utak (UPR – nem feltekeredett fehérje válasz) közötti kölcsönhatások határozzák meg.

A homeosztázis fenntartásában kulcsfontosságú a „jóllakottságot” figyelő mTORC1, és az energia hiányt érzékelő AMPK közötti egyensúly. Az mTOR egy szerin/treonin kináz, amely az mTORC1 komplex részeként a sejt metabolizmus legfontosabb szabályozója, irányítja a sejt növekedését, a proliferációt és fontos szerepe van az autofágia szabályozásában is. Az mTORC1 gátlása a felépítő folyamatok és a fehérjeszintézis teljes leállításához vezet. Az AMPK a fő energia-érzékelő kináz, mivel érzékeli az ATP fogyását, valamint az AMP mennyiségének növekedését. Annak érdekében, hogy a sejt ATP felhasználása csökkenjen, az AMPK gátolja a felépítő útvonalakat, úgymint a lipid-, a fehérje- és a szénhidrátszintézis, és fokozza a lebontó folyamatokban résztvevő transzkripciós faktorok aktivitását, hogy elősegítse az ATP termelését.

Az AMPK és az mTORC1 ellentétesen szabályozzák az ULK1-et, amely kináz az ULK komplex részeként nélkülözhetetlen az autofágia inicializálásához.

Az autofágia az eukarióta sejtekben egy evolúciósan konzervált dinamikus folyamat, mely során a citoplazma komponenseit tartalmazó, kettős-membránnal határolt vezikulák, autofagoszómák jönnek létre. Az autofagoszóma a lizoszómával történő fúziót követően autolizoszómává alakul, ahol megtörténhet a körülzárt komponensek lebontása.

Az AMPK az energia-szintnek megfelelően továbbítja a szignálokat az ULK1 és az mTORC1 felé, míg az mTORC1 és az ULK1 ellentétesen működnek a tápanyag-ellátottság függvényében. Megfelelő tápanyag-ellátottság esetén az mTORC1 foszforiláción keresztül gátolja az ULK komplex működését, azonban az energiaszegény körülmények között aktiválódó AMPK indukálja az önemésztő folyamatokat az ULK1 foszforilációjával és az mTORC1 gátlásával (1. ábra).

Az autofágiás válasz „finomhangolását” két, ULK1 függő negatív visszacsatolási hurok segíti. Egyrészt az ULK1 képes negatívan visszahatni az AMPK-ra, vagyis foszforilálja az AMPK mindhárom alegységét és ezzel csökkenti az aktivitását. Másrészt az ULK1 foszforilálja az mTORC1-et, ami az mTORC1 gátlását eredményezi, tartós tápanyaghiány esetén (1. ábra).

A tranziens visszacsatolási mechanizmusok jelenlétének köszönhetően az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási háromszög képes visszaállni az alapértelmezett „beállítási értékekre” a sejt állapotának függvényében. Ezen átfogó szabályozási mechanizmus segítségével a sejt biztosítani próbálja, hogy hosszútávon ne maradjon se aktív, se inaktív sem az mTORC1-, sem az ULK1-útvonalak.

Az endoplazmás retikulum (ER) olyan organelum, amely minden eukarióta sejtben megtalálható. Legfontosabb feladatai közé tartozik a membrán- vagy szekrécióra kerülő fehérjék szintézise, poszttranszlációs módosítása és natív szerkezetük kialakulásának elősegítése. Ha az endoplazmás retikulum lumenében bármilyen ok miatt felhalmozódnak a hibás térszerkezetű fehérjék (például tápanyaghiány, Ca^{2+} metabolizmus egyensúlyának felborulása, vírusfertőzés), az organelum homeosztázisa felborul és a túlélés érdekében számos önvédelmi folyamat indukálódik, amelyet ER-stresszválasznak nevezünk. Az ER-stresszválasz során a „rosszul feltekeredett fehérje” válasz, vagy más néven az UPR (unfolded protein response) jelátviteli útvonal aktiválódik. Az UPR az ER felszínén lévő transzmembrán fehérjéket aktiválja (PERK, IRE1, ATF6), amelyek számos intracelluláris útvonalat indítanak be a sejt túlélésének elősegítése érdekében. Az aktiválódott PERK, IRE1 és ATF6 fehérjék fokozzák a dajka fehérjék szintézisét, növelik a felhalmozódott fehérjék degradációját és csökkentik a fehérjék transzlációjának mértékét.

Az UPR és az mTORC1 között szabályozásbeli keresztkapcsolatok vannak, így fiziológiás és patológiás állapotokban közösen szabályoznak bizonyos folyamatokat, továbbá kapcsolatot teremt közöttük az UPR, PERK ágának részeként aktiválódó GADD34 fehérje is (1. ábra). A GADD34 expressziója számos stressz hatására indukálódik (úgy mint DNS károsodás, UV sugárzás, tápanyag megvonás, vírusfertőzés, ER-stressz), a képződött GADD34 pedig a PP1-gyel (protein phosphatase 1) funkcionális komplexet képezve defoszforilálja az eIF2 α -t, ami a fehérjeszintézis helyreállításához vezet.

Az aktív GADD34 számos körülmény között (pl. éhezés, vírus- és baktériumfertőzések, huntingtin fehérje túltermelés) képes gátolni az mTORC1 működését azáltal (1. ábra), hogy stabil komplexet képez az mTORC1-et gátló TSC1/TSC2-vel. Tehát a GADD34 és az mTORC1 közötti kapcsolat hozzájárulhat a fehérjeszintézis megfelelő szabályozásához a különböző környezeti stresszek során, és így a GADD34 elősegítheti a sejt túlélését az mTORC1 gátlásán keresztül.

2. Célkitűzés

Munkánk során szeretnénk volna megvizsgálni, az AMPK-mTORC1-ULK1 szabályozási háromszögben levő kapcsolatok dinamikai működését. Korábban egy másik kutatócsoport már felépített egy matematikai modellt a hálózat jellemzésére, de viszonylag kevés fenotípust tanulmányoztak, ezért a hálózat működésének jobb megértéséhez az alábbi vizsgálatokat terveztük elvégezni:

- a korábban leírt modell reprodukálása és működésének további tesztelése;
- a modell működésének és a szimulációk eredményeinek ellenőrzése;
- amennyiben az elvégzett szimulációk eredményei nem egyeznek meg az irodalmi adatokkal, akkor az elkészített modell kiegészítése a megfelelő kapcsolatokkal és vagy visszacsatolási hurkokkal;
- a feltételezett új szabályozási kapcsolatok vizsgálata.

Az általunk vizsgált szabályozási hálózatban két negatív visszacsatolási hurok is megtalálható, ami lehetővé teheti a rendszer működésének oszcillációját. Ezért ezeknek a negatív visszacsatolásoknak a működését az alábbi vizsgálatokkal terveztük ellenőrizni:

- az AMPK és az ULK1 közötti negatív visszacsatolási hurok dinamikai működésének vizsgálata;
- az autofágia és a szabályozási hálózat tagjainak vizsgálata mind szimulációk, mind molekuláris biológiai technikák segítségével hosszantartó celluláris stressz esetén;
- amennyiben a szimulációk alapján az AMPK és az ULK1 közötti kapcsolat időben késleltetett, akkor biológiailag releváns késleltetési módok keresése.

Már bizonyított, hogy az UPR és az mTORC1 között szabályozásbeli keresztkapcsolatok vannak és számos celluláris stressz esetén az UPR által aktivált GADD34 képes gátolni az mTORC1 működését. Ezért az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási háromszög ER-stressz folyamatokkal való kapcsolatát is szeretnénk volna vizsgálni:

- a GADD34 szerepének vizsgálata az mTORC1 gátlásában ER-stressz esetén;
- olyan természetben előforduló hatóanyagok keresése, amelyekkel ennek a rendszernek a működése befolyásolható és az autofágiás túlélési folyamatok időben kitolhatók, az ER-stressz pedig késleltethető.

3. Módszerek

Kísérleteink során rendszerbiológiai megközelítést alkalmaztunk, azaz használtunk mind elméleti biológiai módszereket, mind molekuláris biológiai technikákat.

Molekuláris biológiai kísérleteink során humán embrionális vesesejteket (HEK293T) kezeltünk különböző stresszorokkal (rapamycin, Compound C, thapsigargin, guanabenz, resveratrol, EGCG, H-89), valamint éhezettük őket glukózmentes médiumban.

A sejtekben az ULK1, a TSC1 és TSC2 fehérjéket siRNS-sel történő transzfekció segítségével csendesítettük.

A kezelések hatására bekövetkező életképesség változást Cell Titer Blue reagens segítségével és tripánkék festés után Bürker-kamra vagy Luna automata sejtszámoló segítségével követtük nyomon. A Cell Titer Blue resazurint (sötét kék) tartalmaz, melyet az életképes sejtek resorufin-ná (rózsaszín) alakítanak és ez az átalakítás pedig nyomon követhető az abszorbancia fotometriás mérésével.

Az egyes fehérjék mennyiségének, aktivitásának változását Western blot segítségével követtük nyomon. Ehhez a sejtekből fehérjét izoláltunk, majd a lizátumban levő fehérjéket SDS-PAGE-val elválasztottuk. Az elválasztott fehérjéket nedves transzfer segítségével PVDF membránra transzferáltuk. A membránokat a blokkolást követően az elsődleges antitestekkel egy éjszakán át, majd a HRP-konjugált másodlagos antitestekkel egy órán át inkubáltuk. Az autofágia markereként az LC3 II-es formájának mennyiségi növekedését és a p62 fehérje szintjének csökkenését, az apoptózis detektálásához a PARP hasadásának és a prokaspáz-3 fogyásának nyomon követését használtuk. Az AMPK aktivációját a foszforilációján keresztül (AMPK-P), az ULK1 aktivációját szintén foszforiláció segítségével (ULK1-555-P) detektáltuk, az mTORC1 aktivációját pedig szubsztrátjainak foszforilációján keresztül vizsgáltuk (p70S6K-P, 4E-BP1-P). Az ER-stressz folyamatok elindulását az eIF2 α foszforilálódásával és a GADD34 fehérje szintjének növekedésével követtük nyomon. A detektálást megnövelt kemilumineszcenciával végeztük. A detektált fehérjék denzitometriás kiértékeléséhez az ImageJ-t használtuk. A fehérjék denzitásait az adott fehérje összmennyiségével vagy a GAPDH fehérjével normalizáltuk.

A GADD34 csendesítés hatékonyságát PCR-technika segítségével is ellenőriztük. A kezelések végén a sejtek egy részéből RNS-t izoláltunk TRIzol RNS izoláló reagenssel, majd az RNS-eket cDNS-sé írtuk át. Ezután a GADD34 mennyiségét SYBR Green mix-szel és QuantStudio 12K Flex készülékkel mértük meg.

Az autofágiát a p62 és az LC3 fehérje fluoreszcens antitesttel való jelölésével, majd fluoreszcens mikroszkóppal történő detektálásával is nyomon követtük.

Ehhez a sejteket a kezelést követően 4% paraformaldehiddel fixáltuk és 0,25% Triton X – PBS oldatban permeabilizáltuk. A blokkolást követően az elsődleges antitesteket egy éjszakán át hagytuk a sejteken, majd az Alexa Fluor 488-konjugált másodlagos antitesttel egy órán át inkubáltuk őket. Ezután a sejtmagokat DAPI-val festettük, majd a sejteket FluoroSave reagenssel vontuk be.

A kísérletes adatok statisztikai vizsgálatához szórást számoltunk (SD - standard deviation). A szórásokat ANOVA segítségével hasonlítottuk össze. A különbség statisztikailag szignifikáns volt, ha a p érték kisebb, mint 0,05; illetve 0,01.

A hálózat dinamikai viselkedését az egyes tagokra felírt differenciálegyenletek segítségével vizsgáltuk, mely egyenletekhez a paramétereket a molekuláris kísérletek alapján határoztuk meg. A komplexek aktivációjának reakciósebességét, a kémiai reakciókinetikában ismert kinetikai egyenletekkel írtuk le. Az egyes tagok időbeni változására felírtunk egy-egy közönséges differenciálegyenletet, így egy sokparaméteres elsőfokú differenciálegyenlet rendszert kaptunk. Ezen egyenletek paramétereinek meghatározásával a reakciók időbeni lefutását jellemezhetjük. Az egyenletrendszert grafikusan, az XPP-AUT ingyenesen elérhető szoftver segítségével oldottuk meg. A megoldott egyenletrendszer viselkedését pedig összevetettük a kísérletek során tapasztaltakkal, ebből következtethettünk arra, hogy megfelelően viselkedik-e a modellünk és a kísérletes eredmények alapján pontosíthattuk annak működését.

4. Eredmények

Az AMPK-mTORC1-ULK1 szabályozási háromszögben levő kapcsolatok dinamikai működésének vizsgálata

Az utóbbi években több olyan tanulmány készült, amikben a biológiai rendszerek dinamikai viselkedését elméleti módszerekkel próbálták közelíteni. Ezek közül az egyik egyszerű, mechanisztikus matematikai modell az autofágia és a sejtnövekedést szabályozó mechanizmusok működését vizsgálta. Ebben a modellben a kulcsfontosságú tagokat és azok egymásra gyakorolt hatását differenciálegyenletekkel írták le és több kísérletes eredményt is megfelelően szimuláltak, de csak két inputot (éhezés, rapamycin-kezelés) vizsgáltak meg.

Ezért reprodukáltuk a már leírt matematikai modellt az általuk definiált kapcsolatok alapján és vizsgáltuk a működését az irodalomban már leírt stresszválaszok segítségével.

Azt vettük észre, hogy számos, már kísérletekkel bizonyított folyamatot (éhezés, rapamycin-kezelés, ULK1-csendesítés, TSC1/2-csendesítés) nem teljesen pontosan írt le a reprodukált modellünk, ezért azt feltételeztük, hogy a megfelelő működéséhez szükség lehet újabb kapcsolat(ok) beépítésére is az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási hálózatba.

Ahhoz, hogy megtaláljuk a hiányzó kapcsolato(ka)t, kísérletesen is elvégeztük az ULK1 és a TSC1/2 fehérjék csendesítését és megvizsgáltuk az AMPK és az mTORC1 aktivációs profilját. Azt láttuk, hogy mindkét esetben az AMPK inaktív, míg az mTORC1 aktív volt. Ez azt sugallta, hogy bár az AMPK-t ezekben az esetekben az ULK1 nem tudta inaktív állapotban tartani (vagy nincs jelen a rendszerben – ULK1-csendesítés, vagy az mTORC1 gátolja a működését – TSC1/2-csendesítés), valami „más” mégis megakadályozta azt, hogy aktiválódjon. ***Mivel az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási hálózatban egyedül az mTORC1 aktív, arra következtettünk, hogy az mTORC1-nek valamilyen direkt vagy indirekt gátló hatása lehet az AMPK-on (1. ábra, 'a' kapcsolat).*** Mivel az AMPK gátolja az mTORC1 működését, így a hálózatunkban egy dupla negatív visszacsatolási hurkot hoztunk létre a kapcsolat beépítésével (1. ábra: AMPK \dashv mTORC1 \dashv AMPK).

Az ULK1-csendesítés autofágiára gyakorolt hatásának vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy az ULK1 csendesítésekor az autofágia - a nem csendesített kezelésekhez viszonyítva - nem aktiválódott megfelelően. Mivel ULK1 nélkül nem detektáltunk autofágiás aktivitást azt mondhatjuk, hogy ***az autofágia működéséhez az ULK1 jelenléte mindenképpen szükséges.***

Az mTORC1 gátlás hatásának dinamikáját is megvizsgáltuk, amihez az mTORC1 működését gátoltuk több időpontban rapamycinnel. A kezelés hatására az mTORC1 inaktívvá vált, míg ezzel párhuzamosan az AMPK aktiválódott. Az aktív AMPK hatására, időben kissé eltolódva, az ULK1 is aktiválódott. Az AMPK aktivitása a kétórás rapamycin-kezeléskor már csökkenni kezdett, ami az ULK1-általi gátlásnak köszönhető. A kezelés hatására az autofágia is aktiválódott és az aktivitása a kezelés végéig fennmaradt, annak ellenére, hogy az ULK1 gátolta az AMPK működését, vagyis ***az aktív AMPK nem esszenciális az autofágiás folyamatok fenntartásához.*** A modellünkkel készített szimulációk karakterisztikája megegyezett a kísérletes eredményeinkkel.

Mivel azt láttuk, hogy az ULK1 csendesítés esetén az AMPK inaktív maradt, így az ULK1 csendesítését kombináltuk rapamycin-kezeléssel is (mTORC1 gátlás), hogy megvizsgáljuk ebben az esetben képes-e aktiválódni az AMPK. Az ULK1-csendesítéssel kombinált rapamycin-kezelés hatására az mTORC1 gyorsan inaktíválódott, míg az AMPK aktiválódott, és az ULK1 gátló hatásának hiányában a kezelés végéig aktív maradt.

Azonban az autofágiás folyamatok ULK1 nélkül nem indultak el. Számítógépes szimulációnk során is a kísérletekhez hasonló jelenséget figyeltünk meg. ***Tehát abban az esetben, ha mind az ULK1, mind az mTORC1 aktiválódása gátolt, az AMPK képes aktiválódni, de ez önmagában nem elégséges az autofágia aktiválásához.***

Az AMPK autofágia aktiválásában betöltött szerepének vizsgálatához, gátoltuk a működését (Compound C-kezelés) és ezt kombináltuk az mTORC1 gátlásával (rapamycin-kezelés). Ebben az esetben az AMPK aktiválódását nem tudtuk megfigyelni és a rapamycin-kezelés hatására az mTORC1 is inaktiválódott. Aktív AMPK hiányában sem az ULK1, sem az autofágia nem tudott aktiválódni, hiába volt az mTORC1 inaktív állapotban. A modellel végzett szimulációk esetén is hasonló karakterisztikát tudtunk megfigyelni. ***Bár az ULK1-et ebben az esetben nem gátolta az mTORC1, mégsem volt képes aktiválódni, mert aktivációjához az AMPK esszenciálisnak bizonyult.***

Az AMPK és az ULK1 közötti negatív visszacsatolás vizsgálata

A továbbiakban az autofágia időbeni lecsengésében szerepet játszó, az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási hálózatban megtalálható negatív visszacsatolási hurkok működését vizsgáltuk meg. A vizsgált hálózatban (1. ábra) ugyan két negatív visszacsatolási hurok található meg, de ezek közül csak az AMPK-P \rightarrow ULK1-P \dashv AMPK-P visszacsatolás (1. ábra, 'b' kapcsolat) működését vizsgáltuk.

Elsőként a szabályozási hálózatunkban az AMPK és az ULK1 között AMPK-P \rightarrow ULK1-P \dashv AMPK-P módon direkt visszacsatolási hurkot feltételeztünk. Ezzel a modellünkkel időbeni szimulációkat végezve azt tapasztaltuk, hogy fiziológiás körülmények között az mTORC1 aktív, míg az AMPK, az ULK1 és az autofágia inaktív állapotban voltak. Éhezés hatására azonban az AMPK aktiválódott, ami a direkt kapcsolatban egy késleltetést hozott létre. Ennek hatására a rendszer elemeinek oszcillációját tudtuk megfigyelni, amit az AMPK-P \dashv mTORC1 \dashv ULK1-P \dashv AMPK-P visszacsatolás eredményezett. Rapamycin-kezelés hatására az mTORC1 működése gátolt, vagyis a rendszerünkben kiesett az AMPK-P \dashv mTORC1 \dashv ULK1-P \dashv AMPK-P hurok és csak az AMPK-P \rightarrow ULK1-P \dashv AMPK-P visszacsatolás működött. A direkt kapcsolat miatt egy mesterséges homeosztatisz állapot állt be a rendszerben, ahol az AMPK, az ULK1 és az autofágia is inaktív volt. Ez az eredmény azonban ellentmondott a korábbi kísérletek során tapasztaltaknak, miszerint rapamycin kezelés hatására az AMPK és az ULK1 aktiválódik és elősegítik az autofágiás folyamatok indukálódását.

Ahhoz, hogy egy sokkal pontosabb képet kapjunk a rendszer működéséről és precízebb modellt építhessünk fel, kísérletesen is vizsgáltuk a tartós éhezés (24 óra) és a tartós rapamycin kezelés (5 óra) időfüggését.

Ezen kezelések hatására azt tapasztaltuk, hogy az mTORC1 gyorsan gátlódott, **az AMPK és az ULK1 foszforilációja azonban egy periodikus aktivációt és inaktivációt mutatott, ezzel pedig az autofágia oszcillatorikus aktiválódását okozták.**

Az autofágia aktiválódásának oszcillációját a p62 fehérje fluoreszcens antitesttel való jelölése után mikroszkóppal is vizsgáltuk, ahol **a p62 fehérje szintjének periodikus változását figyeltük meg, ami szintén az autofágia oszcillációjára utalt.**

Egy negatív visszacsatolási hurok képes a rendszer oszcillációját okozni akkor, ha a negatív visszacsatolás időben késleltetett. Ebből kifolyólag a rendszerünkbe egy késleltetési mechanizmust építettünk be az AMPK és az ULK1 közé, hogy a modell a kísérletes eredményeknek megfelelően működjön. A kísérleteink során azt láttuk, hogy **az AMPK aktiválódása mindig megelőzte az ULK1 aktiválódását, ezért a késleltetést az AMPK-P → ULK1-P aktiváló ágra építettük be.**

A fehérje – fehérje kölcsönhatások során a késleltetés általában egy új elem rendszerbe való beépítésével történik, ami ebben az esetben egy AMPK-szubsztrátot jelent. Vagyis az ULK1 aktiválódásához ennek az AMPK-szubsztrát fehérjének az AMPK általi aktiválása vagy gátlása lehet szükséges. Lehetséges mind az AMPK-P ⊥ AMPK szubsztrát ⊥ ULK1-P, mind az AMPK-P → AMPK szubsztrát → ULK1-P kapcsolat. Ezért adatbázisok (BioGrid, DIP, MINT, InnateDB, IntAct) segítségével olyan fehérjéket kerestünk, melyek már bizonyítottan kapcsolatban állnak az ULK1 fehérjével, majd ezeken a fehérjéken AMPK foszforilációs helyeket kerestünk (Group-based Prediction System 5.0, NetPhos 3.1). Több olyan ULK1-reható fehérjét is találtunk (mint a PP1CA, a PP2A, a NEDD4L), amit az AMPK képes lehet foszforilálni.

A másik lehetőség a késleltetésre, ha egy többlépcsőben történő folyamatot feltételezünk, vagyis, hogy az AMPK több különböző aminosavon foszforilációval aktiválja az ULK1-et. Ennek eredményeképpen különböző foszforilaltságú ULK1-ek képződnek, melyeknek aktivitása is eltérő. Az ULK1-en a már jól ismert, AMPK függő foszforilációs helyek mellett (úgy mint Ser317, Ser467, Ser555, Thr574 és Ser777), elméleti módszerekkel további lehetséges AMPK foszforilációs helyeket is kerestünk.

A két lehetséges késleltetett negatív visszacsatolási hurok (szubsztrát beépítés, többlépcsős foszforiláció) oszcillációs tulajdonságainak vizsgálatához számítógépes szimulációkat végeztünk.

A köztes szubsztrát beépítésével végzett szimulációk éhezés és rapamycin-kezelés modellezése esetén megerősítették, hogy *a köztes AMPK-szubsztrát egy hosszantartó oszcillációt idéz elő az AMPK az ULK1, valamint az autofágia aktivációjában.*

Hasonló eredményeket kaptunk, *ha az időkéleltetést a többlépcsős foszforiláción keresztül értük el a rendszerben, ahol éhezés és rapamycin-kezelés hatására az mTORC1 inaktiválódott, az AMPK, az ULK1 és az autofágia pedig periodikusan aktiválódott és inaktiválódott.*

Az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási háromszög ER-stressz folyamatokkal való kapcsolatának vizsgálata

Az UPR és az mTORC1 közötti kapcsolat vizsgálatokor először kezeltük a sejteket thapsigargin (TG) ER-stresszorról és ezt kombináltuk a GADD34 gátlásával (guanabenz, GB), majd vizsgáltuk a fehérjék aktivitását és a sejtek túlélését. Mivel a GB-kezelés a GADD34 fehérje katalitikus aktivitását gátolja, ezért a GB-kezelés hatásának ellenőrzéséhez az eIF2 α foszforilációját követtük nyomon. A GB-zel előkezelt sejtek esetében az eIF2 α foszforilációja a kezelés végéig fennmaradt, ami igazolja, hogy a GADD34 gátlása megfelelő volt. A GADD34 gátlása esetén az autofágia nem tudott megfelelően aktiválódni és a PARP hasadása már fél óra után intenzíven megfigyelhető volt, míg aktív GADD34 jelenlétében az autofágia tranziensen aktiválódott és a PARP hasadása másfél óra után vált csak intenzívvé. Ez arra utal, hogy GADD34-függő módon aktiválódó autofágia nélkül az apoptotikus folyamatok hamarabb bekapcsoltak. Az ULK1 fehérje tranziensen aktiválódott, míg az mTORC1 tranziensen inaktiválódott a GADD34 jelenlétében ER-stressz esetén. Amennyiben az ER-stresszt a GADD34 gátlásával is kombináltuk az ULK1 foszforilációja kevésbé volt intenzív és az mTORC1 aktív maradt a kezelés végéig.

Az intenzív ER-stressz hatását időben szimulálva kezdetben az mTORC1 aktivitása lecsökkent, ekkor a GADD34, az ULK1 és az autofágia is aktiválódott. Hosszabb idő után azonban az autofágia aktivitása csökkent le, így az mTORC1 újból aktiválódott és az aktiválódásával párhuzamosan az apoptózis is bekapcsolt. Ha a GADD34 gátlása esetén szimuláltunk intenzív ER-stresszt, akkor az mTORC1 aktivitása fokozódott és az apoptózis is aktiválódott, míg a GADD34, az ULK1 és az autofágia inaktív maradt. TG-kezelés során a sejtek életképessége két óra kezelés után kezdett csökkenni, míg a GADD34 gátlásakor nagyobb mértékben és sokkal hamarabb csökkent az életképesség, tehát ez is alátámasztja, hogy *a GADD34 gátlása képes időben előbbre hozni a sejthalál folyamatok aktiválódását.*

Ebből kifolyólag a GADD34-nek fontos szerepe lehet a sejtek életképességének fenntartásában, az mTORC1 gátlásával ER-stressz esetén (1. ábra, 'c' kapcsolat).

Az autofágiás túlélési folyamatok időbeni kitolása ER-stressz esetén

Ezután olyan hatóanyagokat kerestünk, amelyek segítségével az autofágiás túlélési folyamatok időben meghosszabbíthatók ER-stressz esetén. Több hatóanyag közül a resveratrol és az EGCG működését vizsgáltuk meg alaposabban (1. ábra, 'd').

Az EGCG alacsony koncentrációban aktiválta az AMPK-t és gátolta az mTORC1-et, ami hozzájárult a sejtek életképességének a növekedéséhez. A H-89-cel (PKA-inhibitor) végzett kombinált kezelések megerősítették, hogy az EGCG a rapamycinhez hasonlóan az AMPK-mTORC1 egyensúlyra hatott és nem PKA-függő módon aktiválta az autofágiát. Az ULK1 csendesítésével kombinált EGCG-kezelés során pedig azt láttuk, hogy *az ULK1 szükséges az EGCG-indukált autofágiás folyamatok lezajlásához.*

Mivel az EGCG hatással van az AMPK és az mTORC1 aktivációjára, ezért pozitív hatása lehet a sejtek túlélésére ER-stressz esetén. Ennek kiderítéséhez a sejteket az intenzív ER-stressz kiváltása előtt EGCG-vel kezeltük elő. Az EGCG-előkezelés szignifikánsan növelte a sejtek életképességét ER-stressz esetén. Az AMPK és az ULK1 aktiválódott a kezelés hatására és az aktivitásuk a kezelés végéig fenn is maradt, ezzel párhuzamosan az mTORC1 inaktíválódott. Ennek megfelelően az autofágia a kétórás TG kezelést követően is aktív maradt, miközben az apoptózis aktiválódása nem volt megfigyelhető. A GADD34 szintje gyorsan növekedett EGCG-előkezelés esetén és a kezelés végéig nem is csökkent le. Az EGCG-vel kombinált intenzív ER-stressz szimulációjakor a kezelésekhöz hasonló jelenséget láttunk. Ezen eredmények alapján *az EGCG képes időben késleltetni az apoptotikus sejthalál aktiválódását az autofágia indukálásán keresztül intenzív ER-stressz esetén.*

Az EGCG és a resveratrol autofágia indukcióját a GADD34 hiányában is megvizsgáltuk ER-stressz során.

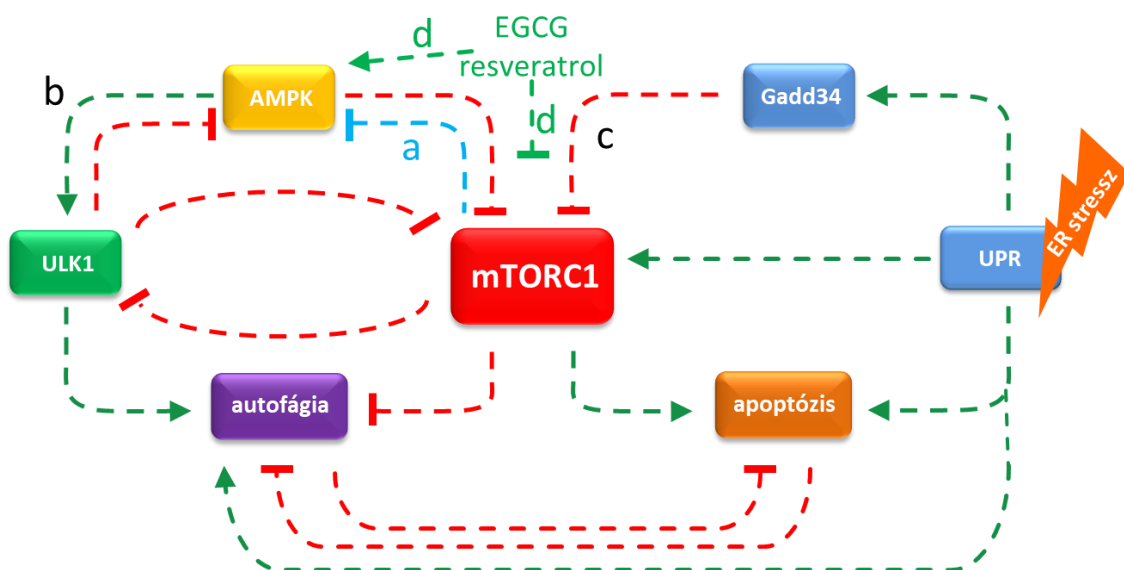
Az EGCG-előkezelés védőhatásának vizsgálatához elvégeztünk vagy egy kombinált kezelést, ahol előkezeltük először a sejteket a GADD34-et gátló guanabenzzel, vagy a GADD34-et siRNS segítségével csendesítettük. Az EGCG-előkezelés képes volt a sejtek életképességét fokozni és az élő sejtek számának csökkenését megakadályozni a GADD34 hiányában. EGCG-előkezelés nélkül a GADD34 gátlásának hatására az autofágia nem aktiválódott megfelelő mértékben. Eközben az apoptózis már a kezelés elején aktív volt.

Ha a sejteket EGCG-vel előkezeltük intenzív autofágiás folyamatok indultak el, ami a kezelés végéig fenn is maradt és ekkor az apoptózis végig inaktív volt.

EGCG-előkezelés esetén az AMPK és az ULK1 aktiválódott, ezzel párhuzamosan az mTORC1 inaktiválódott. A resveratrol-előkezelés hatékonyságát a GADD34 csendesítése esetén vizsgáltuk. A GADD34 csendesítésekor itt is nagyobb mértékben csökkent az élő sejtek száma, mint a nem csendesített sejtek TG-nal történő kezelése esetén. A GADD34-csendesítésének az élő sejtek számára gyakorolt negatív hatása a resveratrol-előkezeléssel kivédhető volt, a sejtek életben maradtak. A GADD34 csendesítésekor TG-indukált ER-stressz esetén az autofágiás válasz nem aktiválódott, az apoptózis viszont hamarabb bekapcsolt. Ezzel ellentétben a resveratrol-előkezelés képes volt GADD34 hiányában is autofágia aktivációt előidézni és az apoptózis aktiválódását késleltetni. A resveratrollal kombinált esetben az ULK1 aktiválódott, az mTORC1 pedig inaktív maradt.

A modellünk segítségével is szimuláltuk az EGCG- vagy a resveratrol- (AMPK aktiválás, mTORC1 gátlás) előkezelés hatását a GADD34 hiányában, intenzív ER-stressz esetén. A szimuláción azt láttuk, hogy az előkezelés hatására az mTORC1 aktivitása lecsökkent, ezt követően pedig az ULK1 és az autofágia képes volt aktiválódni. A szimuláció során az apoptózis végig inaktív volt és mivel a GADD34 aktiválódását gátoltuk, ezért az aktivitása egy nagyon alacsony szinten maradt.

Az eredmények alapján tehát **az EGCG és a resveratrol képes volt az AMPK-mTORC1 egyensúly megborítása révén elősegíteni az autofágia-függő túlélési mechanizmusok aktiválódását és fenntartani a sejtek életképességét ER-stressz esetén még akkor is, ha az mTORC1-et gátló GADD34 működését egy inhibitorral vagy csendesítéssel megakadályoztuk (1. ábra, 'd').**



1. ábra. A munkánk során vizsgált szabályozási hálózat felépítése. A zöld nyilak aktiváló, míg a pirosak gátló kapcsolatot feltételeznek a hálózat tagjai között.

5. Következtetések

Munkánk során egyrészt az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási hálózatban levő kapcsolatok dinamikai működését és a szabályozási hálózat különböző stresszekre adott válaszait, másrészt az AMPK-ULK1-mTORC1- és az UPR-útvonalak közötti keresztkapcsolatokat vizsgáltuk mind elméleti, mind molekuláris biológiai technikák segítségével. Eredményeink alapján az alábbiakat állapítottuk meg:

1. A korábban mások által már leírt modellt reprodukáltuk és a modell működésének tesztelése során arra jutottunk, hogy a rendszer megfelelő működéséhez szükség van egy további kapcsolat beépítésére is, miszerint az mTORC1 is gátolja az AMPK működését. Így a szabályozási hálózatban az AMPK és az mTORC1 között egy dupla negatív visszacsatolási hurkot hoztunk létre, aminek hatására a szimulációink során a stresszválaszok robusztusabbá váltak.
2. Kimutattuk, hogy az AMPK és az ULK1 közötti negatív visszacsatolási hurok időbeni késleltetése szükséges a rendszer megfelelő működéséhez, és ennek a visszacsatolásnak köszönhetően a hálózat tagjai, az AMPK, az ULK1 és az autofágia időben ismétlődve, periodikusan aktiválódhatnak bizonyos stresszek hatására. Biológiaiailag releváns időbeni késleltetést biztosít a rendszer oszcillációjához, ha az AMPK és az ULK1 közé egy további fehérjét építünk be a szabályozási hálózatba, vagy ha az ULK1 több lépcsőben történő foszforilációját feltételezzük az AMPK által.
3. Megállapítottuk, hogy a GADD34 fehérje képes gátolni az mTORC1 működését ER-stressz esetén, míg a GADD34 gátlásakor az mTORC1 és az apoptotikus útvonalak aktiválódása időben előbbre tolódik intenzív ER-stressz során.
4. Eredményeink szerint mind a resveratrol, mind az EGCG – az AMPK és az mTORC1 közötti egyensúlyra hatva – az autofágiás folyamatok aktiválásán keresztül növelte a sejtek túlélését, és kivédte az ER-stressz okozta sejthalált, időben egy későbbi időpontra tolta ki azt. Emellett mind a resveratrol-, mind az EGCG-előkezelés képes volt a GADD34 fehérje gátlásának negatív hatásait kivédeni és a GADD34 gátlása esetén is aktiválni az autofágiás folyamatokat ER-stressz esetén.
5. Az általunk létrehozott komplex matematikai modell jól használható a szabályozási hálózat működését befolyásoló molekulák, és természetes vagy mesterséges hatóanyagok tesztelésére és a különböző celluláris stressz hatások hálózatra kifejtett hatásainak modellezésére.

6. Saját publikációk jegyzéke

A dolgozat témájához kapcsolódó publikációk jegyzéke:

Holczer M, Hajdú B, Lőrincz T, Szarka A, Bánhegyi G, Kapuy O: *Fine-tuning of AMPK-ULK1-mTORC1 regulatory triangle is crucial for autophagy oscillation*, Scientific Reports, 2020 Oct 20;10(1):17803. (2020) IF: 3,998

Holczer M, Hajdú B, Lőrincz T, Szarka A, Bánhegyi G, Kapuy O: *A double negative feedback loop between mTORC1 and AMPK kinases guarantees precise autophagy induction upon cellular stress*, International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(22), 5543, (2019) IF: 4,556

Holczer M, Besze B, Zámbo V, Csala M, Bánhegyi G, Kapuy O: *Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) promotes autophagy-dependent survival via influencing the balance of mTOR-AMPK pathways upon endoplasmic reticulum stress*, Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume 2018, 15 p. (2018) IF: 4,868

Holczer M, Bánhegyi G, Kapuy O: *GADD34 keeps the mTOR pathway inactivated in endoplasmic reticulum stress related autophagy*, PLOS ONE 11:(12), 20 p. (2016) IF: 2,806

A dolgozat témájától független publikációk jegyzéke:

Kapuy O, **Holczer M**, Márton M, Korcsmáros T: *Autophagy-dependent survival is controlled with a unique regulatory network upon various cellular stress events* Cell death and disease, 12 : 4 Paper: 309 , 11 p. (2021) IF: 6,304

Lőrincz T, **Holczer M**, Kapuy O, Szarka A: *The interrelationship of pharmacologic ascorbate induced cell death and ferroptosis*, Pathology & Oncology Research, 2019 Apr;25(2):669-679. (2019) IF: 2,433

Holczer M, Márton M, Kurucz A, Bánhegyi G, Kapuy O: *A comprehensive systems biological study of autophagy-apoptosis crosstalk during endoplasmic reticulum stress*, Biomed Research International 2015;2015:319589., 2015, 12 p. (2015) IF: 2,134