

Az öregedési folyamat és idegi funkciók ivarspecifikus szabályozása genetikai modellszervezetekben

Doktori értekezés tézisei

Hotzi Bernadette

Biológia Doktori Iskola,

iskolavezető: Prof. Erdei Anna DSc, egyetemi tanár

Klasszikus és Molekuláris Genetika Doktori Program

Programvezető: Prof. Vellai Tibor DSc, tanszékvezető, egyetemi tanár

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar



Témavezető: Prof. Vellai Tibor

tanszékvezető, egyetemi tanár

ELTE Genetikai Tanszék

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Genetikai Tanszék

Budapest, 2019

Irodalmi áttekintés

Doktori munkám során az öregedési folyamat, valamint különböző idegrendszeri funkciók szabályozását vizsgáltam a fonalféreg *Caenorhabditis elegans* és az ecetmuslica *Drosophila melanogaster* modellszervezetekben. Az öregedés egy komplex biológiai jelenség, mely során csökken a sejtek és szervek funkcionális integritása, az élőlény egyre kevésbé ellenálló a környezeti hatásokkal szemben. Életkorral nő a kockázata számos betegség kialakulásának és ezáltal az élőlény pusztulásának. Az öregedést a sejtes károsodások progresszív halmozódása okozza. Mivel világszerte nő az emberek átlagos élettartama, így jelentős társadalmi és gazdasági következményei vannak az öregedéssel foglalkozó tudománynak. Éppen ezért az öregedési folyamat szabályozásának és mechanizmusának megértése jelenleg az egyik legfontosabb és legintenzívebb kutatási terület a biológiában^{1,2}.

Az öregedési folyamat egyik érdekes aspektusa, hogy szinte minden szexuálisan dimorf állatfajban különbözik a nemek élettartama³. Ez alól az ember sem kivétel, a nők átlagos élettartama kb. 5-7 évvel hosszabb, mint a férfiaké⁴. Nemi különbségek figyelhetők meg az öregedési betegségek kialakulásában és a kezelésekre adott reakciókban is⁵. Az öregedési folyamat és a nemi különbségek tanulmányozásának is kiemelt területe az idegrendszer vizsgálata. A *C. elegans* és *D. melanogaster* modellszervezetek az öregedési és idegrendszeri kutatások kedvelt modelljei, mivel élettartamuk rövid, idegrendszerük viszonylag egyszerű, és a molekuláris szintű változások jól elemezhetők bennük.

A *C. elegans* hermafroditák (rövid spermiumtermelési időszakot leszámítva nőtények) és hímek közt számos különbség figyelhető meg a testfelépítésben, az élettani folyamatokban, a viselkedésben és az élettartamban. *C. elegans*-ban az X kromoszóma és az autoszómák szettjének aránya a nem elsődleges meghatározója, de végsősoron az úgynevezett szex-determinációs genetikai útvonal biztosítja, hogy az állat minden sejtje a megfelelő nemi identitás szerint fejlődjön. Az útvonal terminális transzkripciós faktora a TRA-1/Gli fehérje, amely hermafroditákban aktív, míg hímekben inaktív. A fehérje aktivitásának megváltozása önmagában elegendő ahhoz, hogy az állat ivarspecifikus tulajdonságai megváltozzanak a kariotípustól függetlenül. Közvetve vagy közvetlenül minden nemi jelleget kialakító gén a TRA-1/Gli fehérje szabályozása alatt áll. Mégis viszonylag kevés közvetlen TRA-1 célgén ismert jelenleg⁶. Csoportunk korábban *in silico* módszerrel 42 potenciális célgént azonosított⁷.

A *daf-16/FoXO* a fonalféreg inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonalának transzkripciós faktorát kódoló gén. A DAF-16-nak szerepe van a fejlődés, az öregedés, az anyagcsere, az immunitás és különböző stresszválaszok szabályozásában^{8,9}. A *daf-16*-nak számos izoformája van, de úgy tűnik, hogy ezek közül csak három csoport (*a1/a2*, *b*, *d/f/h*) funkcionális. Ezek szövet- és folyamatspecifikusan szabályozzák célgénjeiket⁸. Két potenciális TRA-1 kötőhelyet találtunk a *daf-16* genomi régióban. Az egyik a *d/f* izoformától 5' irányban helyezkedik el, a másik a *b* izoforma első exonjában van¹⁰. Az előbbi izoformának elsősorban az élettartam, az utóbbinak a dauer lárva fejlődés (alternatív egyedfejlődési útvonal) szabályozásában van szerepe¹¹. Mindkét tulajdonságban figyeltek már meg nemi különbségeket^{12,13}. Doktori disszertációmban a *d/f* izoformára és az élettartamra vonatkozó eredményeket fejtettem ki.

A *goa-1* a *C. elegans* egyetlen G α /o ortológia (heterotrimer G fehérje α alegységének egyik típusa), és számos olyan idegi funkció és viselkedés szabályozásában van szerepe, melyekben ugyancsak nemi különbségeket írtak le^{14,15}. Vizsgálataink során először azt bizonyítottuk, hogy a TRA-1/Gli fehérje a csoportunk által meghatározott kötőhelyen (5. exonban) keresztül felnőtt korban közvetlenül gátolja a *goa-1* transzkripcióját¹⁶. Hermafroditákban szignifikánsan alacsonyabb a *goa-1* szintje, mint hímekben¹⁶. Ez szerepet játszhat több ivarspecifikus viselkedési mintázat kialakításában¹⁶. Bizonyos megfigyelések ugyanakkor arra utaltak, hogy a TRA-1 – *goa-1* szabályozási kapcsolat még jelentősebb lehet embrionális korban, és szerepet játszhat az idegrendszer ivarspecifikus mintázatának kialakításában.

Az öregedés során nő a neurodegeneratív betegségek kialakulásának kockázata. Eme betegségeket alapvetően aberráns fehérjékből álló aggregátumok fokozott képződése jellemez, amely aztán az érintett neuronok pusztulásához vezethet¹⁷. Mind az agyi öregedés késleltetésének, mind a neurodegeneratív betegségek kezelésének egyik leghatékonyabb módja az autofágia fokozása lehetne, mely csökkenthetné a kóros fehérje-aggregátumok mennyiségét^{18,19}. Számos aktuális terápiás megközelítés alapszik az autofágia aktiválásán. Célpontként azonban eddig olyan szabályozó fehérjéket jelöltek ki, amelyek sok más sejttani folyamatot is befolyásolnak, így gátlásuk nem kívánt mellékhatásokat eredményezhet¹⁹. Egy specifikus terápiás célpont lehet a myotubularin-szerű lipid foszfatáz MTMR14, mely az autofágia-specifikus membránképződést gátolja azáltal, hogy csökkenti a PI3P (foszfatidilinozitol-3-foszfát) szintet.²⁰ Egy kismolekula könyvtár két tagjáról (AUTEN-67 és -99) kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy képesek gátolni az MTMR14-et^{21,22}. A *Drosophila* kiváló modellszervezet az agyi öregedési folyamatának és neurodegeneratív betegségek vizsgálatára²³. Mindkét molekula hatását megvizsgáltuk *Drosophila* Huntington-

kór (HD) modellben. Eredményeink alapján fokozzák felnőtt (idősödő) agyban az autofág fluxust, csökkentik a toxikus mutáns fehérjék és fehérje aggregátumok mennyiségét, valamint javítják a neuronális (pl. motoros) funkciókat^{21,24}. Az AUTEN-67 növeli az élettartamot^{21,24}. Doktori disszertációban azt tárgyaltam, hogy az autofágia mely lépéseiben történhet változás eme hatóanyagokkal történő kezelések hatására.

Célkitűzések

- Céлом volt megállapítani, hogy a TRA-1 szabályozza-e a *daf-16d/f* transzkripcióját, és ezt a csoportunk által azonosított kötőhelyen keresztül teszi-e, valamint ez a szabályozási kapcsolat felelős-e az élettartamban megfigyelhető nemi különbségek kialakulásáért *C. elegans*-ban.
- Célul tűztem ki, hogy megvizsgáljam a TRA-1 szabályozó hatását a *goa-1* transzkripciójára embrionális stádiumokban is, illetve azt, hogy ez a hatás a csoportunk által azonosított kötőhelyen át történik-e, és a szabályozási kapcsolat szerepet játszik-e az idegrendszer nemi különbségeinek kialakításában.
- Céлом volt azt is megvizsgálni, hogy az AUTEN-67 és AUTEN-99 hatással van-e az autofágia folyamatára HD modell *Drosophila* felnőtt állatok agyában, és ha igen, az autofágia mely lépését/lépéseit befolyásolják.

Módszerek

Hímek előállítása

Mivel a legtöbb *C. elegans* populációban a hímek aránya igen alacsony, így hősokkot követő keresztezésekkel növeltem meg és tartottam fenn nagyobb számban hím állatokat²⁵.

Élettartam mérés

Az állatok élettartamát FUdR (5-fluoro-2'-dezoxiuridin) tartalmú NGM lemezekon mértem fiatal felnőtt stádiumtól kezdve általában 25°C-on. A hím-hermafrodita összehasonlító vizsgálatoknál 50-60 hermafrodita mellé raktam 10-15 hímeket, a többi mérésnél 60-70 állat volt lemezenként. Naponta számoltam és távolítottam el az öregedési folyamat miatt elpusztult állatokat.

RNS interferencia

A *C. elegans* genetikában széleskörűen elterjedt úgynevezett „etetéses” RNSi kezelést alkalmaztam az L4440 vektort felhasználva²⁶. A RNSi konstrukciók a vizsgált gének összes izoformáját csendesítették.

Klónozás, transzgénikus vonalak létrehozása és expressziós elemzés

Rekombináns DNS technikai módszerekkel állítottuk elő transzkripciós és translációs fúziós GFP riporter konstrukciókat (*daf-16* és *goa-1*), melyek a csoportunk által azonosított konzervált TRA-1 kötőhelyeket is tartalmazták. *In vitro* mutagenézissel a konstrukciók mutáns kötőhelyet tartalmazó változatát is elkészítettük. Transzgénikus állatokat bioliztikus kotranszformációs eljárással állítottam elő. A fluoreszcens mikroszkóppal készített képek kvantifikálását az ImageJ szoftver segítségével végeztem el. A *daf-16* konstrukciók esetében a teljes állatot, a *goa-1* konstrukciók esetén a teljes embriót, a *pkd-2* konstrukció esetén a feji, illetve a farki régiót elemeztem.

Kvantitatív (q) és szemi-quantitatív (sq) PCR

A *daf-16-os* qPCR mérésekhez kb. 30 db L4/ fiatal felnőtt, illetve idős (6 napos) állatból, a *goa-1-es* sq-PCR mérésekhez több lemeznymi embrióból izoláltam a teljes RNS tartalmat, amit ezután cDNS-sé írtam át. A felnőtt állatok esetében a megfelelő genotípusú/nemű állatokat válogattam, míg az embriók esetében csak bizonyos százalékban tartalmazza a minta a kívánt egyedeket. Olvadási görbeelemzéssel megerősítettem a PCR-termék megfelelő méretét és az aspecifikus termékek hiányát. A qPCR eredményeink értékelésekor a relatív génexpressziós értékeket a komparatív CT módszerrel a $2^{-\Delta\Delta CT}$ képlet segítségével határoztuk meg²⁷. A sq-PCR esetén ImageJ-ben értékeltem ki az eredményeket, denzitometriai elemzést használva.

Kromatin-immunoprecipitáció (ChIP)

A ChIP analízist Ratajewski és mtsai. (2012) alapján²⁸ végeztem el kisebb módosításokat alkalmazva. A specifikus DNS mennyiségét qPCR segítségével kvantifikáltam lokusz-specifikus primereket használva, melyeket a BiSearch programmal terveztünk meg²⁹. TRA-1 kötőhelyet tartalmazó *xol-1* volt a pozitív kontroll. TRA-1 kötőhelyet nem tartalmazó *daf-11* gént használtam belső negatív kontrollként a kvantifikálás normalizálásánál.

AUTEN-67 és AUTEN-99 hatóanyag kezelés

Mindkét molekulát DMSO-ban oldottuk fel, majd élesztőszuszpenzióhoz adva etetéses módszerrel történt a *Drosophilák* kezelése. A kontrollban az élesztőszuszpenzióhoz csak DMSO-t kevertünk. Az állatokat minden második nap új, frissen készült hatóanyag csövekbe ráztuk át. A kísérletet 29°C-on végeztük.

Western blot

A *C. elegans* törzsek esetén 200-200 db fiatal felnőtt állatból, míg *Drosophilák* esetén párhuzamosonként 7 db felnőtt állat fejéből izoláltam fehérjéket. A mintákat SDS-PAGE-n

futtattam és nitrocellulóz membránra vittem fel. A megfelelő antitestekkel való inkubáció után NBT-BCIP oldattal történt az előhívás. A kiértékelés ImageJ-ben történt, denzitometriai elemzéssel.

Eredmények, a doktori értekezés tézisei

Az élettartam ivarspecifikus szabályozása *C. elegans*-ban

- Megítélésünk szerint a nagy hermafrodita túlsúllyal rendelkező vegyes populációk adnak lehetőséget az állatok természetes körülményekhez legközelebb álló egyedi és szociális viselkedési mintázatainak elemzésére. Ezen tartási körülmények mellett a (vad-típusú) hermafroditák tovább éltek, mint a hím állatok.
- A DAF-16 aktivitás érzékeny vizsgálatára a *daf-2/IGFR* funkcióvesztéses mutáns genetikai háttér a legalkalmasabb. Az inzulin/IGF-1 jelátvitel-defektív mutánsokban is a hermafroditáknak nagyobb az élettartama, és ez a fenotípus DAF-16-függő.
- Kimutattam, hogy a szex-determinációs útvonal szerepet játszik az élettartam szabályozásában, a hermafroditák nagyobb élettartama szintén TRA-1-függő módon alakul ki.
- A TRA-1 és a DAF-16 azonos genetikai útvonalban hat az élettartamra, a *daf-16* funkcióvesztéses mutációja szuppresszálja a szex-determinációs útvonal élettartamra gyakorolt hatását.
- Bizonyítottam, hogy a TRA-1 fehérje közvetlenül, a csoportunk által azonosított kötőhelyen keresztül specifikusan serkenti az élettartam szabályozásban fontos *daf-16d/f* izoforma transzkripcióját.
 - Kétféle TRA-1 specifikus antitestet használva CHIP kísérlettel kimutattam, hogy a TRA-1 *in vivo* köt a *daf-16* szabályozó régiójában azonosított kötőhelyhez.
 - Részlépésként a csoportunk által létrehozott TRA-1 antitestről is kimutattam *western blot* elemzéssel, hogy jelöli a TRA-1 fehérjét.
 - Kvantitatív-PCR-rel bizonyítottam, hogy a TRA-1 fehérje hermafroditákban közvetlenül serkenti a *daf-16d/f* izoforma expresszióját.
 - Az általunk készített riportter konstrukciók (*eluls300*, *eluls302*) expressziós elemzésével kimutattam, hogy a TRA-1 fehérje a talált kötőhelyen át serkenti a *daf-16d/f* izoforma expresszióját hermafroditákban.

- A funkcionális *daf-16d/f(lpIs14)* riporter transzgén jobban kifejeződik hermafroditákban, és nagyobb mértékben növeli az élettartamot, mint hímekben.
- Konzervált GLI kötőhelyet találtunk *in silico* elemzéssel a humán *FOXO3* génben, ami evolúciós konzerváltságra utal.

Idegrendszeri funkciók ivarspecifikus szabályozása *C. elegans*-ban

- Az általunk készített riporter konstrukciók (*elulIs306*, *elulIs307*) expressziós elemzésével bizonyítottam, hogy a TRA-1 fehérje a csoportunk által azonosított kötőhelyen át gátolja a *goa-1* expresszióját embrionálisan (is).
- Egy hímspecifikus idegrendszeri marker (*pkd-2::gfp(bxIS14)*) expressziós elemzése arra utal, hogy a GOA-1 aktivitás szerepet játszhat az idegrendszer szexuálisan dimorf mintázatainak kifejlődésében.
 - A feji és farki régió egyes hímspecifikus neuronjaiban kifejeződő *pkd-2::gfp* expressziós szintje változik *goa-1* mutáns hímekben.
 - A hímspecifikus viselkedési elemeket mutató *goa-1(gf)* funkciónyeréses mutáns hermafroditákban kis penetranciával ektopikus *pkd-2::gfp* expresszió jelent meg a fejben.

Autofágia aktiváló kismolekulák vizsgálata a Huntington-kór *Drosophila* modelljében

- Az autofágia szubsztrát p62/Ref(2)P fehérje szintje AUTEN-67 és AUTEN-99 kezelés hatására csökkent a HD modell *Drosophilák* agyában, ami arra utal, hogy mindkét molekula fokozza az autofág aktivitást.
- A kezelésekre bekövetkező Atg8a-I és Atg8a-II fehérjeszint változások arra utalnak, hogy mindkét molekula fokozza az autofagoszóma létrejöttét, és az AUTEN-67 az autofagoszóma érését is.

Következtetések

Kimutattam, hogy *C. elegans*-ban a szex-determinációs útvonal közvetlenül, transzkripcionálisan szabályozza az inzulin/IGF-1 útvonal transzkripció faktorát a *daf-16/FOXO* gént (*d/f* izoforma), ami az öregedési folyamat egyik legfontosabb szabályozója. Ez a szabályozási kapcsolat (TRA-1 – *daf-16*) alakíthatja ki a nemi különbséget az élettartamba. A nemi különbség az öregedésben tehát genetikailag meghatározott *C. elegans*-ban. Az inzulin/IGF-1 útvonal számos biológiai folyamatot szabályoz, melyekből több is mutat nemi különbségeket. Lehetséges, hogy az általunk feltárt szabályozási kapcsolat (TRA-1– *daf-16*) áll ezek hátterében is. A TRA-1 általában (egy kivételtől eltekintve) represszor szerepet tölt,

azonban eredményeink szerint aktiválja a *daf-16* transzkripcióját. Ez azt sugallja, hogy a TRA-1 (és a szex-determinációs útvonal) komplexebb módon szabályozza a sejtek nemi identitását, mint korábban gondoltuk.

Munkánk során azt is bizonyítottuk, hogy szex-determinációs útvonal közvetlenül gátolja a *goa-1* transzkripcióját (heterotrimer G fehérje α alegységének egyik típusa)¹⁶. A GOA-1 változatos viselkedési mintázatokat és idegi funkciókat szabályoz. Mivel a TRA-1 gátolja a *goa-1* aktivitását, így nemi különbségeket alakíthat ki ezekben. Ki is mutattuk, hogy pl. hím párzási viselkedésben is szerepe van ennek a szabályozási kapcsolatnak¹⁶. Eredményeim alapján ez a szabályozás embrionális korban még jelentősebb, és szerepe lehet az idegrendszer nemi identitásának kialakításában is a fejlődés során.

In silico vizsgálataink alapján ezen molekuláris szabályozási kapcsolatok (TRA-1 – *daf-16* és TRA-1 – *goa-1*) konzerváltak lehetnek akár emberben is (GLI – *FoXO3* és *GLI*- Gi/o)^{10,16}, és szerepük lehet a nemi különbségek kialakulásában az élettartamban, viselkedésben, idegrendszeri és más folyamatokban is.

Doktori munkám során neurodegeneratív betegségek potenciális terápiás kezelésével is foglalkoztam. Két gyógyszerjelölt kismolekula (AUTEN-67 és AUTEN-99) hatását vizsgáltam *Drosophila* HD modell állatokban. Mindkét kismolekula fokozta az autofág aktivitást, valamint lassította és csökkentette a betegség tüneteit^{21,24}. Úgy tűnik mindkét molekula pozitívan hat az autofagoszóma képződés folyamatára, és az AUTEN-67 emellett az autofagoszóma érését is pozitívan befolyásolja. Eredményeink alapján mindkét molekula potenciális terápiás szer neurodegeneratív betegségek kezelésében.

A doktori értekezés alapjául szolgáló közlemények

Hotzi B*, Kosztelnik M, Hargitai B, Takács-Vellai K, Barna J, Bördén K, Málnási-Csizmadia A, Lippai M, Ortutay Cs, Bacquet C, Pasparaki A, Arányi T, Tavernarakis N, Vellai T (2018): Sex-specific regulation of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 17(3): e12724. ISSN: 1474-9726

IF: 7.627; független hivatkozások száma: 2

Billes V*, Kovacs T, **Hotzi B**, Manzege A, Tagscherer K, Komlos M, Tarnocia A, Padar Zs, Erdos A, Bjelik A, Legradi A, Gulya K, Gulyas B, Vellai T (2016): AUTEN-67 (Autophagy Enhancer-67) Hampers the Progression of Neurodegenerative Symptoms in a *Drosophila* model of Huntington's Disease. *J Huntington's Disease* 5: 133–147.

IF: 1,58; független hivatkozások száma: 4

Kovács T*, Billes V*, Komlós M*, **Hotzi B**, Manzéger A, Veszélka Sz, Walter F, Deli M, Hackler L, Alfoldi R, Borsy A, Welker E, Kovács A, Pádár Zs, Erdős A, Legradi A, Bjelik A, Gulya K, Gulyás B, Vellai T (2017): The small molecule AUTEN-99 prevents the progression of neurodegenerative symptoms. *Sci Rep.* **7**: 42014.

IF: 4,122; független hivatkozások száma: 8

*: első szerző/k

Felhasznált irodalom

1. Kenyon, C. J. The genetics of ageing. *Nature* **464**(7288), 504–12 (2010).
2. Kirkwood, T. B. L. Understanding the odd science of aging. *Cell* **120**, 437–447 (2005).
3. Regan, J. C. & Partridge, L. Gender and longevity: Why do men die earlier than women? Comparative and experimental evidence. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **27**, 467–479 (2013).
4. Austad, S. N. & Fischer, K. E. Sex Differences in Lifespan. *Cell Metab.* **23**, 1022–1033 (2016).
5. Tower, J. Sex-Specific Gene Expression and Life Span Regulation. *Trends Endocrinol. Metab.* **28**, 735–747 (2017).
6. Zarkower. Somatic sex determination. *WormBook* 1–12 (2006).
7. Hargitai, B. *et al.* xol-1, the master sex-switch gene in *C. elegans*, is a transcriptional target of the terminal sex-determining factor TRA-1. *Development* **136**, 3881–7 (2009).
8. Murphy, C. T. & Hu, P. J. Insulin/insulin-like growth factor signaling in *C. elegans*. *WormBook* 1–43 (2013).
9. Martins, R., Lithgow, G. J. & Link, W. Long live FOXO: Unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity. *Aging Cell* **15**, 196–207 (2016).
10. Hotzi, B. *et al.* Sex-specific regulation of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* **17**, e12724 (2018).
11. Kwon, E.-S., Narasimhan, S. D., Yen, K. & Tissenbaum, H. a. A new DAF-16 isoform regulates longevity. *Nature* **466**, 498–502 (2010).
12. Ailion, M. & Thomas, J. H. Dauer formation induced by high temperatures in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **156**, 1047–67 (2000).
13. Gems, D. & Riddle, D. L. Longevity in *Caenorhabditis elegans* reduced by mating but not gamete production. *Nature* **379**, 723–725 (1996).
14. Koelle, M. R. Neurotransmitter signaling through heterotrimeric G proteins: insights from studies in *C. elegans*. *WormBook* 1–78 (2016).
15. Bastiani, C. Heterotrimeric G proteins in *C. elegans*. *WormBook* 1–25 (2006).
16. Kutnyánszky, V. *et al.* Sex-specific regulation of neuronal functions in *Caenorhabditis*

- elegans. *Mol. Genet. genomics* **under rev.**, (2019).
17. Mulakkal, N. C. *et al.* Autophagy in drosophila: From historical studies to current knowledge. *Biomed Res. Int.* **2014**, 273473 (2014).
 18. Menzies, F. M. *et al.* Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron* **93**, 1015–1034 (2017).
 19. Tan, C. C. *et al.* Autophagy in aging and neurodegenerative diseases: Implications for pathogenesis and therapy. *Neurobiol. Aging* **35**, 941–957 (2014).
 20. Vergne, I., Roberts, E., Elmaoued, R. A., Laporte, J. & Deretic, V. Control of autophagy initiation by phosphoinositide 3-phosphatase jumpy. *EMBO J.* **28**, 2244–2258 (2009).
 21. Kovács, T. *et al.* The small molecule AUTEN-99 prevents the progression of neurodegenerative symptoms. *Scientific reports* **7**, 42014 (2017).
 22. Papp, D. *et al.* AUTEN-67, an autophagy-enhancing drug candidate with potent antiaging and neuroprotective effects. *Autophagy* **12**, 273–286 (2016).
 23. Marsh & Thompson, L. M. Drosophila in the Study of Neurodegenerative Disease. *Neuron* **52**, 169–178 (2006).
 24. Billes, V. *et al.* AUTEN-67 (Autophagy Enhancer-67) Hampers the Progression of Neurodegenerative Symptoms in a Drosophila model of Huntington’s Disease. *J. Huntingtons. Dis.* **5**, 133–147 (2016).
 25. Sulston, J. & Hodgkin, J. Methods. In The nematode *C. elegans* *Cold Spring Harbor Laboratory Press* pp v 587-606. (1988)
 26. Ahringer, J. Reverse genetics *. *WormBook* April 6, (2006).
 27. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).
 28. Ratajewski, M. *et al.* ABCC6 Expression Is Regulated by CCAAT/Enhancer-Binding Protein Activating a Primate-Specific Sequence Located in the First Intron of the Gene. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 2709–2717 (2012).
 29. Arányi, T., Váradi, A., Simon, I. & Tusnády, G. E. The BiSearch web server. *BMC Bioinformatics* **7**, 431 (2006).