

Final report for K119842 (consortional project):  
Analyzing the role of Rab19 in autophagy and protein secretion

Overview of the results and the resulting publications:

1. In yeast two-hybrid experiments, we showed that the *Drosophila* Atg16 autophagic protein specifically binds to Rab19 small GTPase (but not to Rab2 and Rab7). Examination of various Atg16 mutant alleles and a Rab19 hypomorphic mutant revealed symptoms characteristic of inflammation in the midgut of the animals (thickening of the intestinal wall and the whole intestine, production of inflammatory cytokines and antimicrobial peptides, etc.). We detected decreased Slit-Robo signaling in these mutants and we have shown that intestinal inflammatory phenotypes also appear in Slit or Robo heterozygous animals. The significance of our experiments is strengthened by the fact that mutations in the human homologs: Atg16L1, Rab19 and Slit2 genes are among the main risk factors for Crohn's disease causing intestinal inflammation. Our article was published in *Development*, one of the most renowned journals in the field of developmental biology (Nagy et al., *Development* 2017 Nov 1; 144 (21): 3990-4001.), which was accompanied by an editorial highlight (In this issue: Atg16 in the intestine: more than autophagy, *Development* (2017) 144 (21): e2103.).

2. To investigate the potential autophagic role of Rab19, we generated deletion null mutants by CRISPR / Cas9 using double gRNAs targeting the beginning and end of the gene. These mutants were examined in larval adipose tissue of genetically mosaic animals (that is, mutant clones are surrounded by control cells) that we routinely study by confocal microscopy using the mCherry-Atg8a reporter labeling all autophagic structures and LysoTracker Red staining for acidic autolysosomes. Contrary to our previous preliminary results based on RNA interference, we found no difference in our mutants compared to wild-type, control animals. Our negative results were not published, and we decided to devote our further resources to the study of gene products that are similar to Rab19.

3. We showed that Rab2, known only for its role in the Golgi apparatus, is a direct binding partner of the HOPS tethering complex that is required for the degradation of autophagosomes and late endosomes. We generated Rab2 null mutants in which the fusion of autophagosomes and endosomes with lysosomes was inhibited in line with the interaction described above. Finally, we demonstrated that the active form of Rab2 localizes to lysosomes and its overproduction stimulates fusion. Our results have been published in one of the most prestigious journals in cell biology (Lőrincz et al., *J Cell Biol.* 2017 Jul 3; 216 (7): 1937-1947.) at the same time with an article by our competitors, a US-Japanese collaboration describing similar roles of human (and *Drosophila*) Rab2 in parallel with us in *Elife*, and well before a third paper (appearing in *Autophagy* in 2018) by a Danish research group describing the similar role of Rab2 in the *Drosophila* nervous system.

4. We wanted to explore the molecular mechanisms of crinophagy (lysosomal degradation of secretory granules, described already in the 1960s) by studying the secretion and degradation of glue granules produced by the larval salivary gland of *Drosophila* at the beginning of metamorphosis. We developed fluorescent reporter systems to examine crinophagy and used these to test the crinophagic role of the autophagosome-lysosome fusion factors that we previously identified. We have found that HOPS, Rab2, Rab7, and the SNAREs SNAP29 and Vamp7 are also required for secretory granule-lysosome fusion, whereas Syntaxin 13 functions in this process instead of autophagosomal Syntaxin 17. Our groundbreaking results were again published in a renowned journal, where the original description of crinophagy was published as early as 1966 (Csizmadia et al., *J Cell Biol.* 2018 Jan 2; 217 (1): 361-374). The significance of our article is indicated by the fact that an editorial interview with us was published in the same issue (Gluing together the pieces of crinophagy, *J Cell Biol* (2018) 217 (1): 05.) and that our paper was independently selected twice for the Faculty of 1,000 collection.

5. As part of our many years of work in the discovery of the autophagosome-lysosome fusion apparatus, we have now described such a role for another SNARE protein, ykt6, in *Drosophila* larval adipocytes in a well-known and excellent journal in the field of genetics (Takáts et al., *PLoS Genet*, 2018 Apr 25; 2018 Apr 25:e1007359). Again, we performed well in a multiplayer international competition:

each of the 3 rivaling publications on the fusion role of ykt6 by one Japanese and two German research groups appeared after our article.

6. Related to this topic is another short study by us, describing the autophagic and endocytotic role of a SNARE protein, Sec20 (Lakatos et al., *Cells*. 2019 Jul 24; 8 (8): 768).

7. As a continuation of our work on early and late endocytotic complexes (miniCORVET, HOPS) that we published in *Elife* in 2016, we now showed that overexpression of the CORVET-specific subunit, Vps8 in *Drosophila* causes HOPS loss-of-function phenotypes: it inhibits autophagic, endocytic and crinophagic vesicle fusions. We were the first to establish a well-functioning HOPS reporter (Vps49-HA) based on the literature, and using this for confocal microscopy and for quantitative western blot analysis together with the common endogenous HOPS / CORVET subunits, we showed that Vps8 indeed inhibits HOPS assembly and proper localization. Based on our results, HOPS is not transformed from CORVET on the target membrane by subunit exchange (this was the accepted model for the function of these tethering complexes), but the complexes are assembled cytoplasmically and then recruited to the appropriate vesicles. Due to the importance of our work, this was again published in the reputable, multidisciplinary journal *Elife* (Lőrincz et al., *Elife*. 2019 Jun 13;8:e45631.).

8. We analyzed another small GTPase, *Drosophila* Arl8, to show that this lysosomal protein is also required for efficient fusion of autophagosomes, secretory granules, and late endosomes with lysosomes (Boda et al., *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2019 Apr; 1866: 533-544.).

9. Examining the role of one more small GTPase, Rab18 and its interacting partner the Rab3GAP complex in *Drosophila*, we showed that this module plays an important role in the maturation of autolysosomes by regulating the activity of the Vps34 lipid kinase complex, via biosynthetic (e.g. lysosomal enzyme) transport (Takáts et al., *FEBS J*, 2021 Jan;288(1):190-211.). The importance of our work is indicated by the fact that mutations in the Rab18, Rab3GAP1, and Rab3GAP2 genes

cause Warburg Micro syndrome in humans, in which a defect in lysosomal degradation may play an important role.

10. Finally, in our most recent experimental paper, we demonstrated new interactions between the endolysosomal tethering factors Rabenosine-5 and CORVET and HOPS complexes in cultured human cells. In detail, we have shown that a well-defined segment of the common CORVET / HOPS subunit, Vps18 (amino acids 773-854), plays a prominent role in the binding of Rabenosine-5 (Simon-Vecsei et al., J Mol Biol. 2021 Mar 27; 433 (13 ): 166965.).

11. In addition to the above 9 senior author experimental articles, we wrote 5 peer-reviewed reviews and 1 book chapter in response to invitations by the editors in all cases.

12. Finally, the leader of the project Gábor Juhász became a member of the international advisory board of the Autophagy, Inflammation, and Metabolism (AIM) Center for Biomedical Research Excellence (Albuquerque, New Mexico, USA), which was established with \$10 million support by the NIH in 2017. This institute was announced by a co-authored Autophagy editorial in 2018 (of course we added no impact factor for this paper).

Az eredmények és az ezekből született publikációk áttekintése:

1. Élesztő két-hibrid kísérletekben kimutattuk, hogy a *Drosophila* Atg16 autofág fehérje specifikusan köti a Rab19 kis GTPáz (de a Rab2-t és Rab7-et nem). Különböző Atg16 mutáns allélok és egy Rab19 hipomorf mutáns vizsgálatával az állatok középbélében gyulladásra jellemző tüneteket tapasztaltunk (a bélfal és az egész bél megvastagodása, gyulladásos citokinek és antimikrobiális peptidok termelődése, stb). Kimutattuk a Slit-Robo jelátviteli rendszer csökkent működését ezekben a mutánsokban, és hogy Slit vagy Robo heterozigóta állatokban szintén bélgyulladásos fenotípusok jelennek meg. Kísérleteink jelentőségét az adja, hogy a humán homológok: az Atg16l1, Rab19 és Slit2 gének mutációi a bélgyulladással járó Crohn betegség fő rizikófaktorai közé tartoznak. Cikkünket a fejlődésbiológia tématerületén a legnevesebb szaklapok közé tartozó *Development*-ben közöltük (Nagy és mtsai, *Development* 2017 Nov 1;144(21):3990-4001.), melyet egy szerkesztői kiemelés kíséretében publikált az újság (In this issue: Atg16 in the intestine: more than autophagy, *Development* (2017) 144 (21): e2103.).

2. A Rab19 potenciális autofág szerepének megvizsgálására CRISPR/Cas9 módszerrel, a gén elejét és végét célzó dupla gRNS-ek segítségével deléciós null mutánsokat hoztunk létre. Ezeket az általunk rutinszerűen használt lárvális zsírszövetben vizsgáltuk mozaik analízis révén konfokális mikroszkóppal a minden autofág struktúrát jelölő mCherry-Atg8a riporter és a savas autolizoszómákat festő LysoTracker Red festés használatával. Korábbi, RNS interferencián alapuló előzetes eredményeinkkel ellentétben nem tapasztaltunk eltérést a vad típusú, kontroll állatokhoz képest. A negatív eredményeket nem közöltük, és úgy döntöttünk, hogy erőforrásainkat a Rab19-hez hasonló géntermékek vizsgálatára fordítjuk.

3. Az eddigi csak Golgi-készülékben betöltött szerepéről ismert Rab2-ről kimutattuk, hogy az autofagoszómák és késői endoszómák lebontásához szükséges HOPS pányvázó komplex közvetlen kötőpartnere. Létrehoztunk Rab2 null mutánsokat, melyekben fentiekkel összhangban az autofagoszómák és az endoszómák lizoszómákkal történő fúziója gátolt. Végül bizonyítottuk, hogy a Rab2 aktív formája lizoszómákra lokalizál, és túltermeltetése serkenti a fúziót. Eredményeinket a sejtbiológia egyik legrangosabb szaklapjában közöltük (Lőrincz és mtsai, *J Cell Biol.*

2017 Jul 3;216(7):1937-1947.), egy konkurens amerikai-japán együttműködés a humán (és *Drosophila*) Rab2 hasonló szerepeit velünk párhuzamosan publikáló Elife cikkel egyidőben, megelőzve a szintén hasonló eredményeket a Rab2 *Drosophila* idegrendszeri szerepéről leíró dán kutatócsoport 2018-as *Autophagy* cikkét.

4. Az 1960-as években leírt krinofágia (szekréciós granulumok lizoszómális lebontása) molekuláris mechanizmusait kívántuk felderíteni a *Drosophila* lárvális nyálmirigy által a metamorfózis kezdetén termelt ragasztógranulumok szekréciójának és lebontásának vizsgálatával. Fluoreszcens riporterrendszereket fejlesztettünk a krinofágia vizsgálatára, és ezekkel leteszteltük az általunk korábban azonosított autofagoszóma-lizoszóma fúziós faktorok krinofág szerepét. Azt találtuk, hogy a HOPS, Rab2, Rab7, és a SNAP29 és Vamp7 SNARE-ek szintén szükségesek a szekréciós granulum-lizoszóma fúzióhoz, míg az autofagoszómális Syntaxin 17 helyett itt a Syntaxin 13 szerepel. Úttörő jelentőségű eredményeinket ismét sikerült neves szaklapban közölni, ahol a krinofágia eredeti leírása is megjelent még 1966-ban (Csizmadia és mtsai, *J Cell Biol.* 2018 Jan 2;217(1):361-374.). Cikkünk jelentőségét jelzi, hogy ennek kapcsán ugyanabban a lapszámban egy szerkesztőségi interjút is megjelentettek velünk (*Gluing together the pieces of crinophagy, J Cell Biol* (2018) 217 (1): 05.), valamint hogy ezt a cikkünket egymástól függetlenül kétszer is beválogatták a Faculty of 1,000 gyűjteményébe.

5. Az autofagoszóma-lizoszóma fúziós apparátus felderítésében végzett sokéves munkánk részeként egy újabb SNARE fehérje, az ykt6 ilyen szerepét írtuk le *Drosophila* lárvális zsírsejtekben a genetika tudományterületének jól ismert, kiváló szaklapjában (Takáts és mtsai, *PLoS Genet*, 2018 Apr 25;14(4):e1007359). Itt ismét egy többszereplős nemzetközi versenyben szerepeltünk jól: a munkánkkal rivalizáló japán és két német kutatócsoport 3 darab ykt6 fúziós szerepéről szóló publikációjának mindegyike a mi cikkünket követően jelent meg.

6. Ehhez a témakörhöz kapcsolódik még egy SNARE fehérje, a Sec20 autofág és endocitotikus szerepét leíró rövid tanulmányunk (Lakatos és mtsai, *Cells.* 2019 Jul 24;8(8):768.).

7. A 2016-ban az *Elife*-ban megjelent, korai és késői endocitotikus komplexeket (miniCORVET, HOPS) vizsgáló munkánk folytatásaként kimutattuk, hogy a CORVET-specifikus alegység, a Vps8 túltermeltetése *Drosophila*-ban HOPS funkcióvesztéses fenotípusokat okoz: gátolja az autofág, endocitotikus és krinofág vezikulafúziókat. A szakirodalom alapján általunk elsőként létrehozott jól működő HOPS riporter (Vps49-HA) konfokális mikroszkópos és a közös endogén HOPS/CORVET alegységek kvantitatív western blot vizsgálatával kimutattuk, hogy a Vps8 valóban gátolja a HOPS összeszerelődését és megfelelő lokalizációját. Eredményeink alapján a HOPS nem a célmembránon alakul át CORVET-ből az alegységek kicserélődésével (ez volt az elfogadott modell ezen pányvázó komplexek működésére), hanem a komplexek citoplazmában szerelődnek össze és utána rekrutálódnak a megfelelő vezikulákra. Munkánk jelentőségének köszönhetően ezt is a jónevű, multidiszciplináris *Elife*-ban közöltük (Lőrincz és mtsai, *Elife*. 2019 Jun 13;8:e45631.).

8. Egy újabb kis GTPáz, a *Drosophila* Arl8 vizsgálatával kimutattuk, hogy ez a lizoszómális fehérje is szükséges az autofagoszómák, szekréciós granulumok és kései endoszómák hatékony lizoszómához történő fúziójához (Boda és mtsai, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2019 Apr;1866(4):533-544.).

9. Még egy kis GTPáz, a Rab18 és a vele kölcsönható Rab3GAP komplex szerepét *Drosophila*-ban vizsgálva kimutattuk, hogy ez a modul a Vps34 lipid kináz komplex aktivitásának szabályozása révén fontos szerepet játszik az autolizoszómák érésében, azaz a lizoszómába irányuló bioszintetikus (pl. lizoszómális enzimeket szállító) anyagtranszportban (Takáts és mtsai, *FEBS J*, 2021 Jan;288(1):190-211.). Munkánk fontosságát jelzi, hogy a Rab18, Rab3GAP1 és Rab3GAP2 gének mutációi Warburg Micro szindrómát okoznak embereknél, melyben a lizoszómális lebontás hibája fontos szerepet játszhat.

10. Végül legutóbbi kísérletes munkánkban új kölcsönhatásokat mutattunk ki endolizoszómális pányvázó faktorok, a Rabnozín-5 és a CORVET és HOPS komplexek között tenyésztett humán sejtekben. Egész pontosan kimutattuk, hogy a közös CORVET/HOPS alegység, a Vps18 egy jól meghatározott szegmense (773-854 aminosavak) kitüntetett szerepet játszik a Rabnozín-5 kötésében (Simon-

Vecsei és mtsai, J Mol Biol. 2021 Mar 27;433(13):166965.).

11. A fenti 9 darab szenior szerzős kísérletes cikk mellett szerkesztői meghívásra 5 db összefoglalót (review) és egy könyvfejezetet írtunk.

12. Végezetül a projekt szakmai vezetője, Juhász Gábor 2017-ben az NIH 10 millió dolláros támogatásával létrehozott Autophagy, Inflammation, and Metabolism (AIM) Center of Biomedical Research Excellence (Albuquerque, New Mexico, USA) nemzetközi tanácsadó testületének tagja lett, amelyet egy 2018-as társszerzős Autophagy szerkesztőségi közlemény jelez (ehhez természetesen impakt faktort nem tüntettünk fel).