

OTKA beszámoló, 75843 sz. pályázat, 2009-2012

Részletes rész, bevezetés

A jelenlegi beszámoló tárgyát képező K75843 sz. pályázat a harmadik olyan munka amelyben az OTKA révén lehetővé vált a *Caenorhabditis elegans*-ban zajló autofág folyamatok vizsgálatára koncentrálnó kutató munka a témavezető (Kovács Attila Lajos) irányításával. A korábbi sikeres pályázatokkal együtt (T033047, 2000-2003; K47241, 2004-2006), az OTKA-tól kapott tartós bizalom lehetővé tette, hogy éppen a 2000-es évek elejétől kialakult robbanásszerű fejlődés szakaszában is megtartsuk és megerősítsük azt a jelentős nemzetközi presztizst, amit az autofágia és a lizoszómális lebontó folyamatok vizsgálatában korábban évtizedeken át szereztünk. Ennek fontos jele volt, hogy meghívást kaptunk a *C.elegans*-ban zajló autofágiát leíró cikk megírására az első kizárólag autofágiával foglalkozó kötetben (Kovács et al., 2004) Ezt követően a témavezető tagja lett, és azóta is tagja, az 2005-ben frissen induló *Autophagy* c. folyóirat szerkesztő bizottságának, ahová a jelenlegi pályázat vezető kutatója Vellai Tibor is bekerült. Az OTKA támogatásának köszönhetően rendszeresen részt vehettünk (időnként meghívott előadóként) az autofágiával foglalkozó konferenciákon szimpóziumokon. Ez jelentősen hozzájárult ahhoz, hogy különösen dinamikus fejlődtek a nemzetközi kapcsolataink és együttműködéseink.

A témában a korábbi két pályázat eredményeképpen született és nemzetközi folyóiratokban megjelent és az adatbázisokban megtalálható publikációink száma 8, impakt faktoruk összege 89, a független idézeteik száma 572.

Fontos fejlemény volt, hogy 2009-ben a témavezető felkérést kapott egy kínai kutatócsoporttal való együttműködésre amelynek munkáját annak vezetője Hong Zhang az USA-ban (Harvard University, Albert Einstein College) végzett tanulmányokkal alapozott meg. A K75843-as OTKA pályázat emiatt kiegészülhetett ennek a kooperációnak a feladatival és eredményeivel, amint azt a részjelentésekben jeleztük is. A *C. elegans*-on túl további kooperációk révén a jelen pályázatban végzett vizsgálatok kiterjedhettek *Drosophila*, *Brachydanio* és emlős sejtekre is. A jelelegi 75843-as pályázat beszámolási időszakában védte meg a témavezető Kovács Attila Lajos és a vezető kutató Vellai Tibor MTA doktori értekezését és emellett megszerezték a habilitált doktori címet is.

Részletes szakmai beszámoló

A 2009-12 között a pályázatban végzett munka során kimutattuk, hogy számos autofág gén (Igg-1/ATG8, bec-1/ATG6, atg-18) transzkripcionálisan aktiválódik genotoxikus stressz hatására (Erdelyi et al., 2011). Ezeket az adatokat az általunk előállított gfp- (zöld fluoreszcens protein) fúziós transzlációs és transzkripciós riporter rendszerek segítségével állítottuk elő. Az autofágiát ezidáig sejtvédő mechanizmusként írták le. Mégis érdemesnek tartottuk megvizsgálni, hogy vajon az autofágia hiperaktiválódása a sejt védelmi válasza-e a stressz-hatással szemben, vagy ellenkezőleg, aktívan hozzájárul a sejt pusztulási folyamatához?

Genotoxikus stresszt alapvetően a dUTPáz enzim (deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase) mediálja. Ez az enzim katalizálja a dUTP hidrolízisét dUMP-vé és pirofoszfáttá, a keletkezett dUMP pedig templátul szolgál a dTMP szintézishez, amely a DNS

egyik építőköve, hiányában uracil épül a DNS-be, ami az egyik leggyakoribb DNS károsodás. A hatást RNS interferencián keresztül történő csendesítéssel, valamint kemoterápiában alkalmazott kémiai ágensekkel (pl. 5-fluorouracil, methotrexát) idéztünk elő. Ilyen körülmények között az említett ATG gének erősen fokozott expressziós aktivitása jelentkezett ami autofág struktúrák tömeges megjelenésével, sejtpusztulással kapcsolódott össze. Ezeket a folyamatokat elektronmikroszkópos és fluoreszcens mikroszkópos megfigyelésekkel, valamint egy transzlációs fúziós *plgg-1::GFP::LGG-1* riportert segítségével vizsgáltuk.

Igazoltuk továbbá, hogy az autofág útvonal és az apoptotikus génkaskád redundáns módon szabályozzák a *C. elegans* korai egyedfejlődését: míg az apoptózis és autofágia deficiens egyszeres mutáns embriók életképesek és fertilis felnőtt állatokká fejlődnek, addig az apoptózis-autofágia defektív kettős mutáns állatok elpusztulnak az embrionális fejlődés különböző fázisaiban. Például az *atg-18* és *ced-4* genetikai null-mutációk kombinációja [*atg-18(-); ced-4(-)* kettős mutánsok] életképtelen embriókat eredményezett miközben mindkét egyszeres mutáns fertilis felnőtt állapotba képes fejlődni (Borsos et al., 2011). Ezek az életképtelen kettős mutáns embriók súlyos fejlődési (morfológiai) rendellenességeket mutattak; az embriókban nem történt meg a test megnyúlása (elongáció), számos nagyméretű vakuólum képződött a test különböző pontjain, és sejtek lökődtek ki az embrió testéből, amelyek a peteburkon belül halmozódtak fel. Érdekes módon bizonyos szöveti differenciáció végbement ezekben a kettős mutáns állatokban is: a garat képződménye és a bélsejtekre jellemző autofluoreszcens granulomok könnyen azonosíthatóak voltak. Ezek az eredmények az autofágiának az egyedfejlődésileg szabályozott sejtpusztulásban/túlélésben betöltött esszenciális szerepére utalnak. Feltételezhetően az autofág gének és a kanonikus apoptotikus útvonal redundáns módon (egymást kiegészítve) szabályozza az embriogenezishez szükséges szöveti mintázatképződési folyamatokat.

A két folyamat (autofágia és apoptózis) hasonló egyedfejlődési funkciója hasonló szabályozási faktorokat is sejtetett. Valóban, konzervált ATF-2 potenciális kötőhelyeket határoztunk meg az *lgg-1/Atg8* és *bec-1/Atg6* autofág gének szabályozó régiójában (az ATF-2 egy bZip-szerű transzkripció faktor, amely az apoptotikus génkaskád egyik *upstream* szabályozó eleme). *In vitro* DNS-fehérje kötési (gélretardációs) esszékben kimutattuk, hogy az ATF-2 szekevenca-specifikus módon képes kapcsolódni a meghatározott *lgg-1* és *bec-1* promóter elemekhez. Ezt a fizikai kapcsolatot *in vivo* expressziós analízissel is megerősítettük: *lgg-1::gfp* és *bec-1::gfp* riportert konstrukciókat hoztunk létre, amelyek expressziója jelentősen megváltozott akkor, amikor a potenciális ATF-2 kötőhelyeket mutáltattuk (*MUTlgg-1::gfp* és *MUTbec-1::gfp*). Az autofág és apoptotikus útvonalak tehát transzkripcionálisan koreguláltak.

A továbbiakban létrehoztunk egy új *C. elegans*-specifikus autofág riportert rendszert. Ezidáig az LGG-1/Atg8 fehérje lokális intracelluláris akkumulációja szolgált riporterként az autofág folyamat aktivitásának nyomonkövetésére. A Beth Levine munkacsoportja által létrehozott és általunk, valamint nemzetközileg is általánosan használt GFP::LGG-1 transzlációs fúziós riportert rendszer azonban nagy kópiaszámban integráltan tartalmazza a transzgént, ami pl. meggátolja a csírvonalban történő expressziót. E rendszerről korábban kimutattuk, hogy nem autofág eredetű citoplazmás elemeket is jelöl. A rendszer továbbá számos fiziológiai folyamatban (pl. éhezésre adott sejtválaszban) nem adja az autofág rendszerektől „elvárható” aktivitást. Ezért a Mostic transzpozíciót felhasználva létrehoztunk

egy olyan új LGG-1/Atg8 riporter rendszert, amely egy kópiában a genom egy semleges pozíciójába integrálódott. A konstrukció az mCherry riportert, az *lgg-1* szabályozó régiót és az LGG-1 kódoló régiót (kivéve a stop kodont) tartalmazza, tehát funkcionális elemként működik (*plgg-1::mCherry::LGG-1*).

Eddigi vizsgálataink kiderítették, hogy a riporterre transzgénikus állatokban a bazális autofág aktivitás halovány piros fókuszok formájában detektálható. Egy napos éhezés hatására ez a bazális jel drámai módon felerősödik, aminek legjellemzőbb aspektusa a fehérje mennyiségének növekedése bizonyos szövettípusokban (pl. a feji rész hipodermiszében és a garatizomzatban). Ez a változás az *lgg-1* transzkripciós aktivitásával magyarázható. Jelenleg a transzkripciós upregulációért felelős transzkripciós faktorok meghatározásán dolgozunk. Eddig igazoltuk, hogy a kromatin szerkezet kialakításában központi szerepet játszó NuRD (nucleosome remodelling and histone deacetylase) komplex komponens LET-418 (a humán Mi2 fehérje féreg ortológja) szükséges az éhezési stressz-válasz során megfigyelhető *lgg-1* upregulációért.

Ugyancsak elkészítettünk egy még érzékenyebb *plgg-1::mCherry::GFP::LGG-1* funkcionális rendszert. Tervezzük, hogy szisztematikus vizsgálatokkal feltérképezzük az egyedfejlődésnek azokat a kritikus fázisait, amelyekben feltételezhető, hogy az autofág aktivitás fokozottan és jellegzetes körülmények között jelentkezik (pl. L1 lárva és korai felnőtt stádiumokban történő éheztetés, pre- és poszt-dauer fázisokban zajló drámai morfológiai változások). Reményeink szerint ezek az új riporterrel jelentősen felgyorsítják az autofágiára vonatkozó ultrastrukturális elemzéseinket, amelyek nélkülözhetetlenek a folyamatok végső és definitív jellemzéséhez. Ehhez felhasználjuk a beállítás alatt álló, illetve a már kipróbált új rögzítési eljárásokat (többféle fixálószer, high pressure freezing módszer), valamint a *C. elegans*-ban különös technikai nehézséget jelentő és eddig a *C. elegans* autofágiában lényegében nem alkalmazott ultrastrukturális immuncitokémiai módszereket.

Az autofágiát széles körben hosszú ideig mint egy stressz által indukált folyamatot írták le. Éhezés, magas oxigén koncentráció és patogén fertőzések egyaránt képesek az autofág folyamatot stimulálni. A legújabb eredmények szerint azonban az autofág degradáció fontos szerepet játszik számos egyedfejlődési folyamatban is (*C. elegans*-ban a dauer lárva kialakulása, az apai mitokondriumok eltávolítása, a szóma-csíravonal szétválása, és az embrió korai morfogenezise autofág aktivitást igénylő folyamatok). Ez felveti az autofágia egyedfejlődési faktorok által meghatározott, genetikailag „programozott” szabályozását. Az autofágia szabályozására vonatkozó *C. elegans*-ból nyert egyik legérdekesebb megfigyelésünk szerint masszív autofág aktivitást tapasztalható *ceh-13(-)* mutáns állatok bélszövetében. A *ceh-13* egy HOX fehérjét kódol, amely a *Drosophila* Labial és az emlős HoxB1 fehérjék féreg ortológja (a HOX fehérjék a korai egyedfejlődést szabályozó hélix-kanyar-hélix homeodoménnal rendelkező transzkripciós faktorok). Ezzel összhangban igazoltuk, hogy a *Drosophila* szemdiszkuszban (a szemfejlődés prekursora) az autofág gének differenciált expressziót mutatnak. Az autofág gének szem-specifikus kikapcsolása vagy hiperaktiválása egyaránt retardált szemfejlődéshez vezetett; az érintett felnőtt állatok szeme kisebb volt a vad típusénál. Számos esetben a szemfejlődés teljesen elmaradt (szem nélküli felnőtt állatok keltek ki). A csökevényes szem fenotípust részben megnövekedett apoptózis eredményezte. A *Drosophila* szemfejlődésről ismert, hogy a korai szemdiszkuszban számos HOX kofaktor [pl. az Exd (Extradenticle) és Hth (Homothorax) homeodomén fehérjék] akkumulálódik.

Megvizsgáltuk a *Drosophila Atg8* gén szabályozó régióját, és az első intronban konzervált Lab+Exd kompozit kötőhelyet azonosítottunk. Kimutattuk, hogy az irodalmi adatokkal ellentétben a *Lab* expresszálódik a korai szemtelep oszlopos sejtjeiben (korábban csak a peripodiális membrában írták le). *Lab* hiperaktív és *Lab* deficiens genotípusú szemtelepekben a szemfejlődés elmaradt vagy csökevényes volt: az állatok szeme nem vagy csak alig fejlődött ki. Ez a fenotípus nagyban hasonlított az autofágia defektív legyek csökevényes szem fenotípusára. Saját promoterről vezérelt *Atg8::GFP* konstrukciót létrehozva expressziós elemzéssel bizonyítottuk, hogy a szemben az *Atg8* expressziója *Lab*-függő módon megy végbe. Ezzel összhangban az autofág struktúrák mennyisége a szemtelepben a *Lab* aktivitásának megfelelően változott. A kötőhelyet nem tartalmazó riportter konstrukció nem volt érzékeny a *Lab* deficiens genetikai háttérre. Végül kvantitatív RT-PCR analízissel igazoltuk, hogy az *Atg8* *Lab*-függő módon expresszálódik a zsírtestben és a szemtelepben egyaránt. A konzervált kötőhely *in vivo* funkcionalitását igazoltuk *Exd* mutáns genetikai háttérben is. Az eredményeket összefoglaló kézirat elkészítése folyamatban van (Billes *et al.*, *manuscript in preparation*, 2013). A kézirat egy korábbi, *Lab*-független verzióját a *Science* folyóirat kiküldte bírálatra, és a kritika legfontosabb eleme a molekuláris háttér feltárására vonatkozott.

Korábban kimutattuk, hogy *C. elegans*ban az autofágia szabályozását két sejtnevekedést kontrolláló útvonal, az inzulin/IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) és TGF β (*transforming growth factor-beta*) molekuláris kaszkádok befolyásolják. Egyedfejlődési és orvosi biológiai jelentősége ellenére e két jelátviteli rendszer kapcsolata nagyrészt ismeretlen maradt. Kimutattuk, hogy a HSF-1 (*heat shock factor 1*) transzkripció faktor, amely magas hőmérséklet hatására stimulálja a molekuláris chaperonok (más néven hő sokk faktorok vagy HSF fehérjék) transzkripcióját, közvetlenül gátolja a DAF-7/TGF β ligandum expresszióját. A HSF-1 aktivitását pedig a DAF-2/IGF-1 és guanylate cyclase (cGMP-t termel) receptorok szabályozzák negatívan. Az előbbi útvonalat az éhezés, az utóbbi útvonal aktivitását a nagy populáció sűrűség (*crowding*) gátolja. A HSF-1 tehát összehangolja a három stressz által indukált útvonal hatását az élethossz és egyedfejlődés szabályozásában (Barna *et al.*, 2012). Ezek az eredmények megmagyarázhatják, hogyan tud az autofág folyamat hőmérséklet, tápanyag és feromonok (hormonális) hatásra aktiválódni. E vizsgálatunk egyik jelentős kimenete a HSF-1 transzkripció faktor potenciális célgénjeinek szisztematikus feltárása volt a *C. elegans* genomban (pl. a *daf-7* gén egy konzervált HSF-1 kötőhelyet tartalmaz 230 bázispárra *upstream* a transláció iniciációs ATG start helytől). Jelenleg ezen potenciális HSF-1 célgénnek az egyedi jellemzésén dolgozunk. A célgének közül számos minden bizonnyal az autofágia transzkripció aktivitásában vesz részt (pl. az *Atg4* gén promotéerében is azonosítottunk konzervált HSF-1 kötőhelyet).

A szöveti regeneráció (elveszett, sérült sejtek és szövetek pótlása) során jelentős citoplazma tartalom átrendeződésnek (*cellular remodelling*) kell végbemennie, amely lehetővé teszi a sejtorsók „újraprogramozását” (de- és redifferencióját). A sejt anyagainak átstrukturálása intenzív génexpressziós változást (új komponensek szintézise) és sejtes degradációt (régi komponensek lebontása) igényel. Az utóbbi folyamat alapvetően autofágiával mehet végbe. A feltevés igazolására zebrahalak farok úszóját amputáltuk, és néztük a szövet regenerációját vad és autofágia deficiens genetikai háttérben. Az autofág folyamat „kikapcsolását” *Atg5*-specifikus morfolino (*Atg5-MO*) segítségével és Bafilomycin

A1 kezeléssel (ez a szer meggátolja az autofagoszómák és lizoszómák egyesülését) valósítottuk meg. Eredményeink szerint az autofágia hiánya meggátolta a farokúszó regenerációját, ami normálisan egy hét alatt megy végbe. Ezzel összhangban kimutattuk, hogy a Gfp-Lc3/Atg8 riporter rendszer intenzív autofág struktúra-halmozódást mutat a regenerálódó szövetben (blastema). Ezt az eredményt elektronmikroszkópos analízissel is megerősítettük. A differenciálódó szövetben számos differenciációs marker (*osteocalcin* és *runx2b*) nem expresszáldott az Atg5-MO kezelt állatokban. TUNEL festéssel továbbá jelentős sejtpusztulást tapasztaltunk a morfolino által kezelt szövetekben. A szöveti differenciáció és túlélés tehát autofág gének funkcióját igényli. Igazoltuk továbbá, hogy a MAPK (mitogén-aktivált protein kináz) fehérje esszenciális a farokúszó regenerációs folyamatához. Eredményeink szerint ez az útvonal szabályozza az autofágia aktivitását a regenerálódó szövetben. Hasonló expressziós kapcsolatot tártunk fel humán HeLa sejtvonalban is. Az útvonal *downstream* transzkripció faktorai közé tartozik az ETS-szerű transzkripció faktorok családja. Jelenleg e fehérjék konzervált kötőhelyeit vizsgáljuk autofág gének szabályozó régiójában (Varga *et al.*, *manuscript in preparation*, 2013).

C. elegans végzett genetikai screenek segítségével négy korábban ismeretlen metazoa specifikus autofág gént sikerült azonosítani. A generatív sejtekbe szegregálódó un. PGL-granulumok komponensei, a *C. elegans* p62 homológjához (T12G3.1) hasonlóan autofág úton szelektív módon lebomlanak az embriogenezis során. Egy 30000 genomos screenben választottuk ki azokat a mutánsokat amelyek defektívek voltak a GFP::PGL-1, SEPA-1::GFP, or T12G3.1::GFP szomatikus sejtekben való degradációjában. Ezek közül négy, amelyeket *epg-2*, *-3*, *-4* és *-5*-nek (ektopikus PGL granulum) neveztünk el nem volt lokalizálható ismert autofág gének lókuszára. Ezekben a mutánsokban szomatikus sejtekben GFP::PGL-1-pozitív granulumok képződtek és nagy mennyiségű SEPA-1 (suppressor of ectopic P granule in autophagy mutants) aggregátum is megmaradt és kolokalizált egymással késői embriókban és korai lárvákban. Az endogén PGL-3 protein szintek magasan maradtak a késői *epg-2*, *-3*, *-4*, és *-5* mutáns embrióban, míg a *pgl-3* mRNA szintek nem változtak.

Az emlős homológok (EPG-3/VMP1, EPG-4/EI24, és EPG-5/mEPG5) esszenciálisnak bizonyultak az éhezési autofágiában. A VMP1 regulálja az autofagoszóma képződést az omegaszóma fennmaradásának regulálásával. Az EI24 és az mEPG5 szükségesek a degradatív autofág vakuólák keletkezéséhez. Az EPG-4-hez hasonlóan az EPG5 kiütésének hatására funkcionálisan zavart lizoszómák halmozódnak fel. A GFP-LC3 nagyrészt nincs elhasítva EI24 knockdown sejtekben. Emellett az mEPG5 siRNA sejtek defektust mutatnak a szabad GFP degradációjában. Az autolizoszómák az EI24 knockdown sejtekben elektron-denz anyagot tartalmaznak (Tian *et al.*, 2010).

A továbbiakban részletes vizsgálatnak vetettük alá a WD40 Repeat PtdIns(3)P-Binding Protein EPG-6-ot (Lu *et al.*, 2011). Ez a fehérje direkt módon kölcsönhatásban van az ATG-2-vel. Az *epg-6* és *atg-2* regulálja az autofagoszóma keletkezésében szereplő omegaszóma viselkedését. Az EPG-6/WIPI4 evolúciósan konzervált funkciója az autofagoszóma keletkezésének generálása omegaszóma struktúrák segítségével. Az EPG-6 és ATG-2 kieső funkciója a korai preautofagoszóma autofág struktúrák felhalmozódását idézte elő. Egy másik WD40 repeat PtdIns(3)P effektor, az ATG-18, ettől eltérő szerepet játszik az autofagoszóma képződésben. Valószínűleg a protein aggregátumok, az LGG-1 által jelölt struktúrák és az omegaszóma együttműködését szabályozza.

Eredményeink szerint a különböző autofágiában szereplő PtdIns(3)P-effektorok a PtdIns(3)P-nek az autofágiában játszott differenciális szerepét szabályozzák. Ugyancsak foglalkoztunk az autofágia gének hierarchikus szerepével a protein aggregátumok degradációjában.

Eredményeink szerint az UNC-51/Atg1 komplexum, az EPG-8/Atg14 és a lipidált LGG-1 kötődése a protein aggregátumhoz szükségesek az omegaszóma képződéséhez.

További munkánk során vizsgáltuk a *C. elegans*ban felfedezett metazoa specifikus Epg5/epg-5 szerepét ideg és glia szövetben. Kimutattuk, hogy az Epg5/epg-5 egerek szelektív károsodást mutatnak az 5. kortikális réteg piramidális, és a gerincvelő motoros neuronjaiban. A tünetek között szerepelt az izom atrófia és a késői progresszív hátsó végtag atrófia, drámaian lecsökkent a túlélési ráta. Ezek a jelenségek megfeleltek az amilotropikus laterális szklerózis fő tüneteinek. Az epg5-deficiencia megzavarta az autofág fluxot, blokkolta az autofagoszómák degradatív autolizoszómákká alakulását, p62 és ubikvitin-pozitív aggregátumok és inklúziók felhalmozódását okozta a neuron és glia sejtekben, emelett az endocitózist is megzavarta. Eredményeink szerint az epg5 deficiens egér modell alkalmas az amilotropikus laterális szklerózis patogenezisének tanulmányozására (Zhao et al., 2013).

A fenti kísérleti munkát tartalmazó cikkeken kívül további összefoglaló, ill. kommentár jellegű cikkek is születtek a pályázati témából (Eskelinen and Kovacs, 2011; Eskelinen et al., 2011; Klionsky et al., 2012; Kovacs and Zhang, 2010).

A pályázathoz kapcsolódó publikációk:

Barna, J., Princz, A., Kosztelnik, M., Hargitai, B., Takacs-Vellai, K., Vellai, T., 2012. Heat shock factor-1 intertwines insulin/IGF-1, TGF-beta and cGMP signaling to control development and aging. *BMC Dev Biol.* 12, 32. (A cikkben a hivatkozás történik a 75843 sz. OTKA pályázatra. IF: 2,79)

Borsos, E., Erdelyi, P., Vellai, T., 2011. Autophagy and apoptosis are redundantly required for *C. elegans* embryogenesis. *Autophagy.* 7, 557-9. (A cikkben a hivatkozás történik a 75843 sz. OTKA pályázatra. IF: 6,829)

Erdelyi, P., Borsos, E., Takacs-Vellai, K., Kovacs, T., Kovacs, A. L., Sigmond, T., Hargitai, B., Pasztor, L., Sengupta, T., Dengg, M., Pecsí, I., Toth, J., Nilsen, H., Vertessy, B. G., Vellai, T., 2011. Shared developmental roles and transcriptional control of autophagy and apoptosis in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Sci.* 124, 1510-8. (A cikkben a hivatkozás történik a 75843 sz. OTKA pályázatra. IF: 6,14)

Eskelinen, E. L., Kovacs, A. L., 2011. Double membranes vs. lipid bilayers, and their significance for correct identification of macroautophagic structures. *Autophagy.* 7, 931-2.

Eskelinen, E. L., Reggiori, F., Baba, M., Kovacs, A. L., Seglen, P. O., 2011. Seeing is believing: the impact of electron microscopy on autophagy research. *Autophagy.* 7, 935-56. (A cikkben a hivatkozás történik a 75843 sz. OTKA pályázatra. IF: 6,829)

Klionsky, D. J.,... Kovács, A. L.,... Vellai, T., ...Zhang, H.,... 2012. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 8, 445-544.(IF: 6,829)

Kovács, A. L., Vellai, T., Müller, F., Autophagy in *Caenorhabditis elegans*. In: D. J. Klionsky, (Ed.), *Autophagy*. Eureka.com, Landes Bioscience, Austin, Georgetown, Texas, U.S.A., 2004, pp. 217-23.

Kovacs, A. L., Zhang, H., 2010. Role of autophagy in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett*. 584, 1335-41. (A cikkben a hivatkozás történik a 75843 sz. OTKA pályázatra. IF: 3,541)

Lu, Q., Yang, P., Huang, X., Hu, W., Guo, B., Wu, F., Lin, L., Kovacs, A. L., Yu, L., Zhang, H., 2011. The WD40 repeat PtdIns(3)P-binding protein EPG-6 regulates progression of omegasomes to autophagosomes. *Dev Cell*. 21, 343-57. (A cikkben a hivatkozás történik a 75843 sz. OTKA pályázatra. IF: 13,946)

Tian, Y., Li, Z., Hu, W., Ren, H., Tian, E., Zhao, Y., Lu, Q., Huang, X., Yang, P., Li, X., Wang, X., Kovács, A. L., Yu, L., Zhang, H., 2010. *C. elegans* screen identifies autophagy genes specific to multicellular organisms. *Cell*. 141, 1042-1055. (A cikkben a hivatkozás történik a 75843 sz. OTKA pályázatra. IF: 31,152)

Zhao, H., Zhao, Y.G, Wang, X., Xu, L, Miao, L., Feng, D., Chen, Q., Kovács, A.L., Fan, D., Zhang, H., 2013. Mice deficient in *Epg5* exhibit selective neuronal vulnerability to degeneration. *Jour Cell Biol* (Közlésre elfogadva. A cikkben a hivatkozás történik a 75843 sz. OTKA pályázatra. IF: 12,48)