

Doktori értekezés

A p62 szintjének vizsgálatával meghatározható a Drosophila sejtek alapszintű autofág aktivitása

Készítette:

Pircs Karolina Milena

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológia Doktori Iskola

vezetője: Dr. Erdei Anna, egyetemi tanár

Molekuláris Sejt- és Neurobiológia Doktori Program

Programvezető: Dr. Sass Miklós, egyetemi tanár

Készült az Eötvös Loránd Tudományegyetem

Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszékén

Témavezető: Dr. Juhász Gábor, tudományos főmunkatárs



Budapest

2013.

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
I. BEVEZETÉS.....	8
AZ AUTOFÁGIA FOGALMA ÉS RÖVID JELLEMZÉSE.....	8
AZ AUTOFÁGIA MECHANIZMUSA ÉS MOLEKULÁRIS SZABÁLYOZÁSA	10
AZ AUTOFÁGIA SZABÁLYOZÁSA	15
AZ AUTOFÁGIA VIZSGÁLATI MÓDSZEREI.....	18
A P62 MOLEKULA JELLEMZÉSE ÉS AZ AUTOFÁGIA SZELEKTIVITÁSA	25
A DROSOPHILA MELANOGASTER, MINT KÍSÉRLETI MODELL ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE	28
AZ ECETMUSLICA EGYEDFEJLŐDÉSE	28
A DROSOPHILA FEJLŐDÉSÉNEK SZABÁLYOZÁSA.....	30
AUTOFÁGIA A DROSOPHILA LÁRVÁLIS ZSÍRTESTÉBEN.....	30
AZ RNS INTERFERENCIA FOGALMA ÉS ALKALMAZÁSA DROSOPHILA-BAN	31
II. CÉLKITŰZÉSEK	35
III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	36
A DROSOPHILA TÖRZSEK FENNTARTÁSA	36
A FELHASZNÁLT TÖRZSEK	36
A DROSOPHILA MELANOGASTER GENETIKÁJA	38
1. <i>Az UAS-Gal4 kételemű expressziós rendszer.....</i>	<i>38</i>
2. <i>A mozaikos kifejeződést biztosító Flp/FRT rendszer</i>	<i>39</i>
MOLEKULÁRIS KLÓNOZÁS ÉS EMBRIÓ-INJEKTÁLÁS	41
POLIKLONÁLIS ANTI-P62 ÉS ANTI-GFP ELLENANYAG ELŐÁLLÍTÁSA.....	41
WESTERN-BLOT	41
IMMUNHISZTOKÉMIA	42
LÁRVÁLIS SZÖVEK VIZSGÁLATA, MIKROSZKÓPIA.....	42
ELEKTRONMIKROSKÓPOS VIZSGÁLATOK	43
STATISZTIKA	43
IV. EREDMÉNYEK.....	45
AZ AUTOFÁGIÁBAN SZEREPET JÁTSZÓ GÉNEK AZONOSÍTÁSA IN VIVO TELJES GENOM RNSI SZŰRÉSSEL DROSOPHILÁBAN	45
AZ ÚJ P62 ELLENANYAG TESZTELÉSE.....	53

AZ ENDOGÉN P62 AKKUMULÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA S6K ÉS ATG MUTÁNSOKBAN	55
FUNKCIÓJUK HIÁNYÁBAN KORAI LETALITÁST OKOZÓ GÉNEK BAZÁLIS AUTOFÁGIÁBAN BETÖLTÖTT SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA MOZAIKOS ZSÍRTESTEK BEN, IMMUNCITOKÉMIAI MÓDSZEREKKEL	58
A P62-GFP ALKALMAZÁSA KVANTITATÍV VIZSGÁLATOKRA.....	61
A P62 AKKUMULÁCIÓJA SZEMPONTJÁBÓL ELTÉRŐ FENOTÍPUSÚ ATG16, ATG18A, ÉS PTEN FÜGGETLEN RNSI VONALAK ELTÉRŐ VÁLASZREAKCIÓT MUTATNAK AZ ÉHEZTETÉSSSEL INDUKÁLT AUTOFÁGIÁRA L3 ÉS L2 LÁRVÁKBAN	65
A P62- ÉS AZ ATG8A-RIPORTEREK EXPRESSZIÓJÁNAK HATÁSA AZ AUTOFÁG FENOTÍPUSRA ..	69
AZ ÁLTALUNK ÉLŐÁLLÍTOTT ATG4DN TÖRZS VIZSGÁLATA	72
V. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	75
VI. ÖSSZEFOGLALÁS.....	80
VII. SUMMARY	82
VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	84
IX. MELLÉKLET: A BEMUTATOTT ÁBRÁKHOZ TARTOZÓ STATISZTIKAI TESZTEK EREDMÉNYEI	85
X. REFERENCIÁK.....	91

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AEL: peterakás után (after egg laying)

AKT/PKB: protein kináz B (protein kinase B)

AL: autolizoszóma (autolysosome)

Alfy: autofágiához kapcsolt FYVE fehérje (autophagy-linked FYVE protein)

AMP: adenozin-monofoszfát (adenosine monophosphate)

AMPK: AMP-aktivált protein kináz (AMP-activated protein kinase)

AP: autofagoszóma (autophagosome)

aPKC: atipikus protein kináz C (atypical protein kinase C)

ATF6: transzkripció aktiváló faktor 6 (activating transcription factor 6)

ATG: autofágia-gén (autophagy related gene)

Atms: antimeros

ATP: adenozin-5'-trifoszfát (adenosine-5'-triphosphate)

CG: kiszámított gén (computed gene)

CMA: chaperon-mediált autofágia (chaperone-mediated autophagy)

DEPTOR: mTOR-t kötő DEP-domén (DEP-domain interactor of mTOR)

dsRNS: dupla szálú RNS (double stranded RNA)

eIF2 α : eukarióta translációs iniciációs faktor-2 (eukaryotic translation initiation factor-2)

eIF4E: eukarióta translációs iniciációs faktor 4E (eukaryotic translation initiation factor 4E)

EM: elektronmikroszkópia (electron microscopy)

ER: endoplazmatikus retikulum (endoplasmic reticulum)

ERK1,2: extracelluláris szignál szabályozott kináz 1, 2 (extracellular signal regulated kinase 1, 2)

ESCRT: transzportoz szükséges endoszómális válogató komplexek (endosomal sorting complexes required for transport)

FC: áramlási citometria (flow cytometry)

FIP200: fokális adhéziós kináz családot kötő 200kDa-os fehérje (focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa)

FLP: flip rekombináza (flip recombinase)

FM: fluoreszcens mikroszkópia (fluorescence microscopy)

FRT: flip rekombináza célfehérje (flip recombinase target)

miRNS: mikroRNS (microRNA)

MLST8: LST8 homológ mTOR asszociált fehérje (mTOR associated protein LST8 homolog)

GFP: zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein)

GTP: guanozin-5'-trifoszfát (guanosine-5'-triphosphate)

Hsc70: hősokk fehérjével rokon fehérje 70 (heat shock cognate 70)

Hsp70: hősokk fehérje 70 (heat shock protein 70)

IB: immuno blotolás (immunoblotting)

IM: izoláló membrán (isolation membrane)

IRS1: inzulin receptor szubsztrát 1 (insulin receptor substrate 1)

IV: izotópos vizsgálat (isotope release)

JNK: c-Jun N-terminális kináz (c-Jun N-terminal kinase)

Keap1: Kelch-szerű ECH-val asszociált fehérje 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1)

L1, 2, 3: első, második, harmadik lárvastádium (first, second, third instar larvae)

L3F: táplálkozó lárva (feeding larvae)

L3W: vándorló lárva (wandering larvae)

Lamp-1: lizoszómával asszociált membrán fehérje 1 (lysosomal associated membrane protein-1)

LIR: LC3-at kötő régió (LC3-interacting region)

LTR: Lysotracker Red

MAPK: mitogén aktivált protein kináz (mitogen-activated protein kinase)

(MAP-)LC3: mikrotubulus asszociált könnyű lánc fehérje 3 (microtubule associated protein light chain 3)

mCherry: monomerikus cherry (monomeric cherry)

miRNS: mikroRNS

mTORC1: emlős rapamycin célfehérje komplex 1 (mammalian target of rapamycin complex)

NBR1: BRCA1 génnel szomszédos gén 1 (neighbor of BRCA1 gene 1)

NDP52: magi fehérje 52 (nuclear dot protein 52)

NF- κ B: magi faktor kappa könnyű láncú B-sejt aktiváló enhanszer (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

Nrf2: magi faktorhoz hasonló fehérje 2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2)

PAS: pre-autofagoszómális struktúra (pre-autophagosomal structure)

PB1: Phox/Bem 1p

PE: foszfatidil-etanolamin (phosphatidylethanolamine)

PERK: PKR-szerű ER-ben lokalizált eIF2 α kináz (PKR-like ER-localized eIF2 α kinase)

PI3K: foszfatidil inozitol 3 kináz (phosphatidylinositol 3 kinase)

PI3P: foszfatidil inozitol 3 foszfát (phosphatidylinositol 3-phosphate)

PIP3: foszfatidilinozitol 3, 4, 5-trifoszfát (phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate)

PIP2: foszfatidilinozitol 4, 5-bifoszfát (phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate)

PRAS40: 40kDa-os prolin gazdag Akt szubsztrát (proline-rich Akt substrate of 40kDa)

PROTOR: rictorral érzékelhető fehérje (protein observed with rictor)

PTEN: foszfátáz és tenzin homológ (phosphatase and tensin homolog)

PTGS: poszt-transzkripcionális géncsendesítés (post transcriptional gene silencing)

Rab-7: Ras-hoz hasonló fehérje 7 (Ras-related protein 7)

Raf: gyorsan terjedő fibroszarkóma (rapidly accelerated fibrosarcoma)

RANKL/RANK: nukleáris faktor kappaB ligandum receptor aktivátor (receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand)

Raptor: mTOR asszociált szabályozó fehérje (regulatory associated protein of mTOR)

RAS: patkány szarkóma (rat sarcoma)

Ref(2)P: refractory to sigma P

Rheb: agyban feldúsult Ras homológ (Ras homolog enriched in brain)

Rictor: rapamycinra érzéketlen mTOR társ (rapamycin-insensitive companion of mTOR)

RISC: RNS indukált csendesítő komplex (RNA-induced silencing complex)

RNSi: RNS interferencia (RNA interference)

ROS: reaktív oxigén fajták (reactive oxygen species)

rpS6, 8: riboszómális fehérje S6, 8 (ribosomal protein S6, 8)

SIN1: SAPK interakciós fehérje 1 (SAPK-interacting protein 1)

siRNS: kicsi interferáló RNS (small interfering RNA)

SMER: kis méretű rapamycin enhanszer molekula (small-molecule enhancers of rapamycin)

SQSTM1: sequestosome-1

st: éheztetett (starved)

TNF: tumor nekrozis faktor (tumor necrosis factor)

TRAF6: TNF receptor asszociált faktor 6 (TNF receptor associated factor 6)

TRAPP: transzport fehérjerészecske (transport protein particle)

TSC: tuberous sclerosis complex

UAS: upstream aktiváló szekvencia (upstream activating sequence)

UBA: ubiquitin asszociált (ubiquitin-associated)

ULK1: unc 51-szerű kináz 1 (unc-51-like kinase 1)

UPR: nem megfelelő konformációjú fehérje válasz (unfolded protein response)

UPS: ubiquitin proteaszóma rendszer (ubiquitin proteasome system)

Vha: vakuoláris H^+ ATP-áz (vacuolar H^+ ATPase)

Vps: vakuoláris fehérje válogatás (vacuolar protein sorting)

WIPI1-4: foszfoinozidokat kötő WD-ismétlődést tartalmazó protein 1, 2, 3, 4 (WD-repeat protein interacting with phosphoinositides)

WT: vad típus (wild type)

Xbp1: X-box kötő fehérje (X-box binding protein)

ZZ: cink-ujj (zinc-finger)

I. BEVEZETÉS

Az autofágia fogalma és rövid jellemzése

Az élő szervezetek és a sejt belső környezetének dinamikus stabilitásához, a homeodinamika fenntartásához elengedhetetlen a folyamatos „karbantartás”, melynek előfeltétele az anabolikus és katabolikus folyamatok szabályozott összehangoltsága. A „celluláris renoválás” során ugyanis az új összetevők szintéziséhez szükséges a már meglévő anyagok lebontása és az ebből nyert energia. Sejtjeink intracelluláris komponensei tehát állandóan lebomlanak és újrashasznosulnak, a hibás, elöregedett alkotórészeket így friss, jól működő újak helyettesítik.

Az eukarióta sejtekben két fő lebontó rendszer működik: a lizoszóma és a proteaszóma. A proteaszómális degradáció (UPS, Ubiquitin Proteasome System) rendkívül szelektív, a proteaszóma általában csak az ubiquitinált, nagyrészt rövid életidejű fehérjéket ismeri fel. Ezzel szemben a lizoszóma több folyamatban, az antigének elleni védelemben, az endocitózisban (heterofágia) és az autofágiában is szerepet játszik, mint lebontó organelum.

Az autofágia evolúciósan konzervált, minden eukarióta sejtre jellemző önmészítő folyamat, melynek során a sejt a saját anyagait irányítja a lizoszómákba (Klionsky 2007). Három típusa különböztethető meg (**1. ábra**): a mikroautofágia, a chaperon-mediált autofágia és a makroautofágia (Klionsky 2005, Cuervo 2008, Sahu, Kaushik és mtsai 2011).

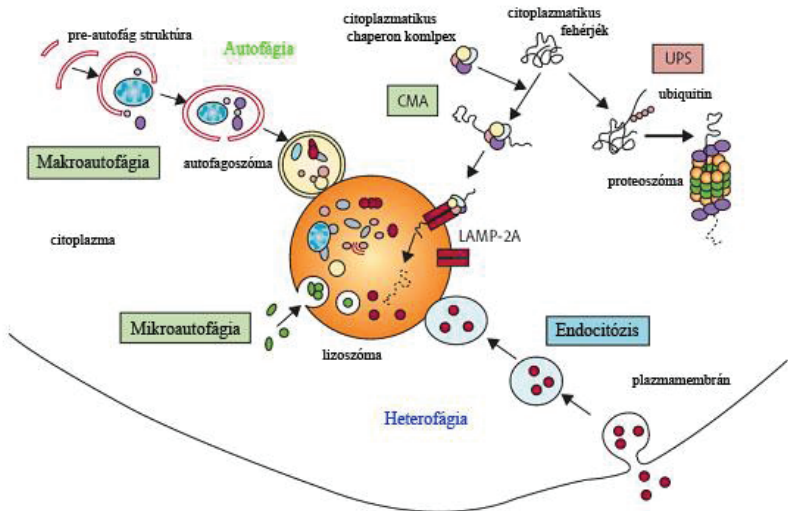
A mikroautofágia során a lizoszóma membránja egyes helyeken a lumenbe tűródik és felveszi a citoplazma bizonyos részeit. A folyamat eredményeképpen sok, kisméretű vezikulát tartalmazó, multivezikuláris testnek nevezett képlet jön létre. A chaperon-mediált autofágia (CMA) feladata a sérült fehérjék felismerése, elkülönítése és eliminálása. A CMA-hoz nincs szükség a membránok átszervezésére, mivel a KFERQ konszenzus szekvenciát tartalmazó szubsztrátok a Hsc70 (heat shock cognate 70) és egyéb kochaperonok közvetítésével képesek a citoplazmából a lizoszómális membránon keresztül átjutni a lizoszómába. Munkám során a harmadik típusba tartozó, legtöbbit kutatott és eddig legjobban jellemzett makroautofág folyamatokra fókuszáltam.

A makroautofágia (a továbbiakban ezt nevezem autofágiának) olyan lebontó mechanizmus, amely alacsony szinten minden sejtben működik (alapszintű vagy bazális

autofágia), és biztosítja a sejtek homeodinamikájának fenntartását, de adott esetben túlélését, differenciálódását és fejlődését is. Feladata a citoplazma-komponensek normális turnoverének biztosítása, a sérült, működésképtelen vagy káros sejtalkotók, akár teljes organelumok eliminálása (Cuervo 2008, Nedelsky, Todd és mtsai 2008).

Az autofágia a sejtalkotók életciklusában betöltött alapvető szerepén kívül számos folyamatban vesz részt. A sejtet ért stresszhatások - éhezés, hipoxia, illetve fizikai és kémiai behatások - kivédése érdekében fontos önvédelmi reakcióként az úgynevezett stressz-indukált autofágia aktiválódik (Glinsmann és Ericsson 1966, Arstila és Trump 1969, de Duve 1969, Rez és Kovacs 1973, Mizushima 2007, Xie és Klionsky 2007). Éhezés során az autofágia indukciója hasznosítható alapanyagokat szolgáltat: egyrészt aminosavak keletkeznek új fehérjék szintéziséhez (Takeshige, Baba és mtsai 1992), másrészt lipidek és glükóz, az éhezés túléléséhez szükséges energia biztosításához (Lum, DeBerardinis és mtsai 2005). Tápanyagban gazdag környezetben az autofágia gátolt, csak alapszinten működik (Egner, Thumm és mtsai 1993).

A folyamat szerepét igazolták az ontogenezis során is, ezt nevezték el fejlődési autofágiának (Clarke 1990, Edinger és Thompson 2004). Az autofágia ezen kívül kapcsolatba hozható olyan alapvető fiziológiás folyamatokkal is, mint például az öregedés, a sejtnövekedés, az adaptív immunitás és a támadó mikroorganizmusokkal szembeni védekezés (Melendez, Tallozy és mtsai 2003, Levine 2005, Scott, Juhasz és mtsai 2007, Vellai 2009, Rubinsztein, Marino és mtsai 2011). Az autofágia hiánya vagy éppen túlműködése miatt különféle patológias elváltozások alakulhatnak ki: neurodegenerációs betegségek (mint például Huntington-, Alzheimer-, Parkinson-kór), tumorok, izomsorvadás (Juhasz, Erdi és mtsai 2007, Mizushima, Levine és mtsai 2008, Simonsen, Cumming és mtsai 2008, Kongara és Karantza 2012) stb. Ez a vázlatos felsorolás is érzékelteti, hogy az autofágia rendkívül sokfajta szerepet játszhat, és folyamatának zavara a szervezet homeosztatis egyensúlyának felbomlásához és betegségekhez vezet. Így molekuláris mechanizmusának és genetikai hátterének pontos feltérképezése és megértése mindenképpen szükséges.



1. ábra A sejtben működő lebontó folyamatok és az autofágia típusai

Az autofágia mechanizmusa és molekuláris szabályozása

A makroautofágia összetett folyamat (2. ábra), amely több, morfológiailag elkülöníthető lépésből áll. Kezdetben egy izoláló membrán (IM) jelenik meg, mely többékevésbé véletlenszerűen körbeveszi a citoplazma egyes komponenseit. Élesztőben – az autofágia folyamatát ebben az organizmusban ismerik a legjobban - az IM az úgynevezett pre-autofagoszómális struktúrából (PAS) jön létre (Suzuki, Kirisako és mtsai 2001). Az IM eredete rendkívül vitatott kérdés (Longatti és Tooze 2009). A kurrens elméletek szerint a durva felszínű endoplazmatikus retikulum (ER) ciszternái, a transz-Golgi (Dunn 1990, Yamamoto, Masaki és mtsai 1990), mitokondriumok (Hailey, Rambold és mtsai 2010), plazma membrán (Moreau, Ravikumar és mtsai 2011) is szolgálhat membránforrásként, vagy lehetséges hogy *de novo* szintetizálódik (Noda, Suzuki és mtsai 2002). Ha körbezárult, elkülöníti az egyes bekerített organellumokat a sejtplazmától, ezt a képletet nevezzük autofagoszómának. A bekebelezett sejtalkotók ekkor még felismerhetőek, és elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján struktúrájuk szinte alig változik. Ezek után az autofagoszóma külső membránja egy késői endoszóma vagy lizoszóma membránjával egyesül, létrehozva az autolizozómát. A fúzió után a belső membrán és a benne tárolt citoplazmarészlet degradálódik, a felszabaduló monomerek pedig a membránon keresztül

visszajutnak a citoplazmába és újrahasznosulnak energiatermelő és szintetikus folyamatokban (Baehrecke 2003). A folyamat végén csak az amorf, emészthetetlen anyagok maradnak vissza, melyek ultrastrukturális vizsgálatokban erős elektronrendzítást mutatnak. Ezt a membránnal körülhatárolt képletet reziduális testnek nevezik.

Az autofágia folyamatának szabályozása evolúciósan konzervált (Melendez és Neufeld 2008, Patingre, Espert és mtsai 2008). Az 1990-es évektől kezdődően élesztő modellen zajló genetikai vizsgálatok alapján eddig 35 autofágia-gént (ATG, Autophagy Related Genes) azonosítottak (Tsukada és Ohsumi 1993, Thumm, Egner és mtsai 1994, Harding, Morano és mtsai 1995, Klionsky, Cregg és mtsai 2003, Nakatogawa, Suzuki és mtsai 2009). Az autofagoszómák kialakulása körülbelül 20 rendkívül konzervált „core” (központi szereppel rendelkező) ATG géntermék által szabályozott folyamat, amelyek a magasabbrendűekben is az élesztőkben leírtakhoz hasonló hierarchikus viszonyt mutatnak (**3. ábra**) (Suzuki, Kubota és mtsai 2007, Itakura és Mizushima 2010).

Az autofág lebontást morfológiailag hat jól elkülöníthető lépésre, molekuláris komponenseit pedig az ezeket a lépéseket szabályozó komplexekre oszthatjuk fel: 1. iniciáció; 2. az izoláló membrán kialakulása (nukleáció); 3. az izoláló membrán érése és az autofagoszóma kialakulása; 4. kapcsolódás és a lizoszómával történő fuzionálás; 5. savasodás és a beltartalom lebontása; és végül 6. reciklizálás.

1. Az autofág folyamatok iniciációja és az autofagoszómák képződése az Atg1 kináz komplex tagjai által szabályozott folyamat. Élesztőkben az Atg1-Atg13-Atg17-Atg29-Atg31 (Cheong, Nair és mtsai 2008), míg emlősökben az ULK1-Atg13-FIP200-Atg101 alkotja a komplexet, ahol az ULK1 (unc-51-like kinase 1) az Atg1 homológja, a FIP200 (focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD) pedig az Atg17-hez hasonló funkciót tölt be (Ichimura, Imamura és mtsai 2004, Hara, Takamura és mtsai 2008, Chan, Longatti és mtsai 2009, Hosokawa, Hara és mtsai 2009, Hosokawa, Sasaki és mtsai 2009).

2. Az izoláló membrán nukleációjában szerepet játszó második komplex központi tagja és névadója az autofágia-specifikus hármastípusú foszfatidil-inozitol 3 kináz (III-as típusú PI3K), amelyet Vps34-nek (Vps, vacuolar protein sorting) neveznek az élesztő-homológ alapján. A Vps34-komplex tagjai: maga a Vps34, az Atg6/Vps30 (emlősökben Beclin 1), az Atg14 és az Vps15 (Suzuki, Kirisako és mtsai 2001, Itakura, Kishi és mtsai 2008, Sun, Fan és mtsai 2008). A pre-autofagoszómális membrán kialakulásához elengedhetetlen a lipid-kináz komplex megfelelő működése. A lipid kináz egyik effektor az Atg18 (emlős homológjai a WIPI1-4 fehérjék, WD-repeat protein interacting with

phosphoinosides (Proikas-Cezanne, Waddell és mtsai 2004)). Az Atg9 az egyetlen transzmembrán Atg fehérje valamennyi autofág géntermék közül. Míg normális körülmények között a transz-Golgi hálózat és a késői endoszómák között közlekedik (Young, Chan és mtsai 2006), éhezés során a Golgi-készülék perifériájára kerül, ahol kolokalizál két autofagoszóma-markerrel: az Atg8-cal (emlős homológja a MAP-LC3 vagy röviden LC3, microtubule associated protein light chain 3) és a Rab7-tel (Ras-related protein 7). Szerepe feltehetőleg a lipidszállítás, illetve a PAS és a különböző membránforrások közötti ciklizáció (Longatti és Tooze 2009).

3. Két, az élesztőktől az emlősökig rendkívül konzervált ubiquitin-szerű konjugációs rendszer biztosítja az autofagoszóma kialakulását és az Atg8-szerű fehérjék C-terminális lipidációját (Ohsumi 2001). Az izoláló membránon kialakuló Atg12-Atg5-Atg16 komplex létrejöttéhez szükséges az Atg7, amely egy E1-szerű aktiváló enzim, valamint az E2-szerű konjugáló enzimmént működő Atg10 (Mizushima, Noda és mtsai 1998, Ichimura, Kirisako és mtsai 2000, Kuma, Mizushima és mtsai 2002). A komplex feladata az autofagoszóma-membrán kialakítása, ezen kívül elősegíti az Atg8 lipidációját.

A citoszolikus Atg8 izoforma egy foszfatidil-etanolamin (PE) horgony kovalens kapcsolódásával lipidálódik (emlősökben ezt LC3-I LC3-II átalakulásnak nevezik). A citoszolikus Atg8-at élesztőben az Atg4 cisztein proteáz egyetlen C-terminális aminosav lehasításával teszi konjugációra alkalmassá. Az Atg8-PE komplex kialakulása során is az Atg7 az E1-szerű aktiváló enzim, és mellette az Atg3 viselkedik E2-szerű konjugáló enzimmént (Tanida, Mizushima és mtsai 1999). Az Atg8-PE lipidhorgonyán keresztül kapcsolódhat az izoláló, továbbá az autofagoszóma membránhoz (Ichimura, Imamura és mtsai 2004, Sou, Tanida és mtsai 2006). Az Atg8-PE/LC3-II az egyetlen olyan ismert fehérje, amelyik membránhoz kötött marad az autofagoszóma kialakulása után is, így kiváló autofagoszóma markerként használható (Nair, Yen és mtsai 2012). Az Atg12-Atg5-Atg16 komplex az autofagoszóma kialakulása után disszociál az izoláló membránról.

4. Mielőtt az autofagoszóma külső membránja fúzionál a lizoszómával, létrehozva ezzel az autolizoszómát, az Atg4 szabadon ereszti a PE horgony eltávolításával az Atg8-at (Ichimura, Kirisako és mtsai 2000). Az Atg8 a külső membránról a citoszolba reciklizálódik, míg a belső membránhoz kapcsolt Atg8 lebomlik a lizoszómával való fúzió után (Xie és Klionsky 2007). Az autofagoszóma és a lizoszóma közötti egybeolvadás a homotipikus membránok esetén megfigyelt fúzióhoz hasonló módon történik. Ehhez a lépéshez a feltételezések szerint szükséges a C-típusú Vps komplex (Vps11, 16, 18, 33, 39)

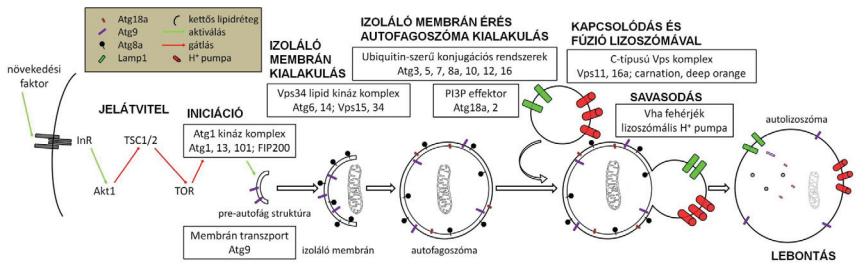
és a Rab7 GTPáz (GTP, Guanosine-5'-triphosphate) aktivitása (Nickerson, Brett és mtsai 2009).

5. Az autolizoszóma savasodását a Vha gének (Vacuolar H⁺ ATPase) biztosítják, amik protonokat pumpálnak a lizozómák belsejébe. Ez az alacsony pH szükséges a degradációt végző lizozómális hidrolázok és különböző emésztőenzimek működéséhez (Wang és Klionsky 2003). Autofágia során a beltartalom enzimatiskus lebontása akkor indul meg, amikor az autofagoszómát határoló belső membránt az enzimeknek sikerül lebontaniuk.

6. A lebontásból felszabaduló monomerek az autolizozómából, transzport útján kerülnek vissza a citoplazmába.

	Élesztő név	Drosophila név	Emlős név
Atg1 kináz komplex	Atg1	Atg1	ULK1,ULK2
	Atg13	Atg13	Atg13
	Atg17?	FIP200	FIP200
	-	Atg101	Atg101
Lipid kináz komplex	Vps34	Vps34	Vps34
	Vps15	Vps15,ird1	p150,Vps15
	Vps30/Atg6	Atg6	Beclin1
	Atg14	Atg14	Atg14,Barkor
	-	EDTP	Jumpy
Membrán forrás	Atg9	Atg9	Atg9
PI3P effektor	Atg2	Atg2	Atg2
	Atg18	Atg18a	WIPI1-4
Ubiquitin-szerű konjugációs rendszerek	Atg12	Atg12	Atg12
	Atg7	Atg7	Atg7
	Atg10	Atg10	Atg10
	Atg5	Atg5	Atg5
	Atg16	Atg17	Atg16L1
	Atg8	Atg8a,b	LC3 (GABARAP)
	Atg4	Atg4a,b	Atg4A-D
	Atg7	Atg7	Atg7
	Atg3	Atg3	Atg3

2. ábra A központi szerepű Atg gének és homológjaik



3. ábra Az autofágia mechanizmusa és molekuláris szabályozása (A folyamatban részt vevő komponensek szerepét lásd a szövegben.)
 (Készítette: Nagy Péter)

Az autofágia szabályozása

Az autofágiában szerepet játszó komplexek mellett a szabályozó szignalizációs útvonalak is rendkívül konzerváltak a többsejtű állatok körében (Melendez and Neufeld 2008, Pattingre, Espert et al. 2008). Normális körülmények között csak kismértékű bazális autofágia zajlik, ezért különösen fontos, hogy megfelelő – akár külső, akár belső - induktív hatásokra a sejtek gyorsan reagáljanak, autofág választ adjanak.

Miután az autofágia a sejtek éhezésre adott elsődleges válaszreakciója, így igen érzékenynek kell lennie a sejt közvetlen környezetében elérhető tápanyagok, elsősorban az aminosavak szintjére. Mind az élesztőkben, mind az emlősökben a Target of Rapamycin (TOR) szerin-threonin protein kináz által közvetített útvonal a legjobban ismert szignalizációs kaszkád. Követi a sejtek tápanyag-ellátottságát és adott esetben képes aktiválni a sejtosztódást, növekedést és párhuzamosan gátolni az autofágiát.

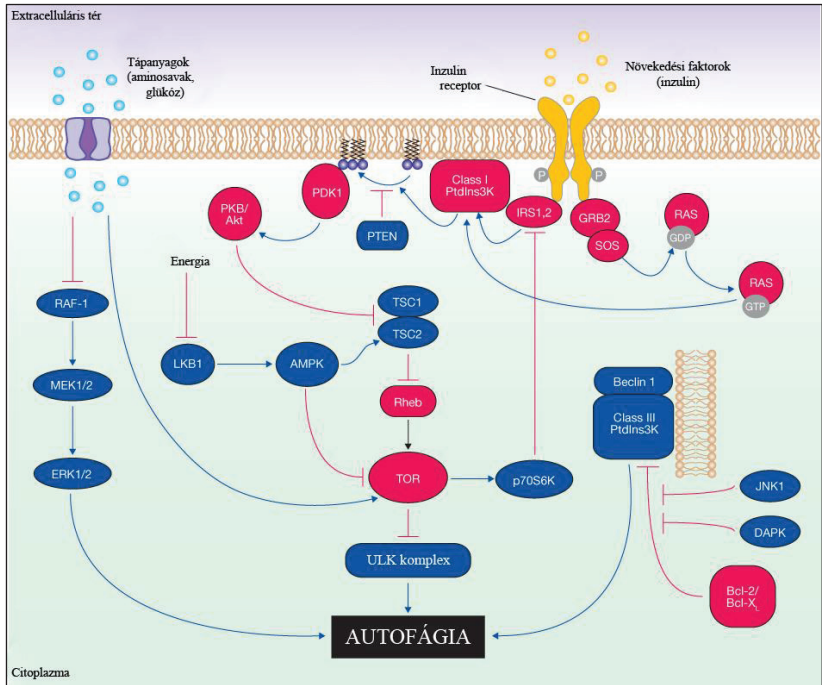
A TOR érzékeli a stresszhatások jeleit, a növekedési faktorok/hormonok jelenlétét illetve hiányát, valamint a sejt rendelkezésére álló energia mennyiségét, és ennek megfelelően szabályozza a sejt metabolizmusát és növekedését. Megfelelő fiziológiai körülmények között elsősorban az I-es típusú PI3K (phosphatidyl inozitol 3 kinase) jelátviteli útvonalon és az elérhető aminosavak által aktiválódik (Zoncu, Bar-Peled és mtsai 2011). Ekkor az autofágia indukciójában résztvevő fehérjéket foszforilált állapotban tartja, ezáltal gátolja meg az autofagoszóma képződésének iniciációjához szükséges lépéseket, például direkt foszforilálással gátolja az Atg1 kinázt (Kamada, Funakoshi és mtsai 2000, Scott, Juhasz és mtsai 2007). Amint lecsökken a tápanyag mennyisége, inaktiválódik a TOR és megszűnik az Atg1 represszált állapota - az autofágia indukálódik. Élesztőben kimutatták, hogy a TOR inaktivációja az Atg13 defoszforilációjához és ezáltal az autofágia indukciós komplex Atg1 és Atg13 összekapcsolódásához vezet (Kamada, Yoshino és mtsai 2010). Ugyanakkor az indukálódó autofág szignalizáció is visszahat és leállíthatja a TOR által serkentett folyamatokat: éhezés során a *Drosophila* Atg1 képes gátolni a TOR-t abban, hogy foszforilálja és ezáltal aktiválja az S6K-t. Az S6K - melynek az első azonosított szubsztrátja a 40S riboszóma komponense, az rps6 (ribosomal protein S6) - a TOR egyik downstream effektora, kináz aktivitása növeli a fehérjeszintézist és a sejtek proliferációját (Lee, Kim és mtsai 2007).

Eukariótákban két TOR kinázt tartalmazó komplex van jelen: a TORC1 és a TORC2 (Zhou és Huang 2010). Mindkét komplexnek szerepe van az autofágia szabályozásában. Az emlősökben a rapamycin-szenzitív mTORC1 5 fehérjét tartalmaz:

katalitikus alegységként magát a mTOR-t, a RAPTOR-t (regulatory associated protein of mTOR), a PRAS40-et (proline-rich Akt substrate of 40kDa), a MLST8 fehérjét (mTOR associated protein LST8 homolog) és a DEPTOR-t (DEP-domain interactor of mTOR) (Suzuki és Inoki 2011, Weber és Gutmann 2012). A kevésbé rapamycin szenzitív mTORC2 komplex tagjai: az mTOR, a RICTOR (rapamycin-insensitive companion of mTOR), az MLST8, a SIN1 (SAPK-interacting protein 1) és a PROTOR (protein observed with rictor) (Oh és Jacinto 2011).

Az anabolikus hormonok (mint például az inzulin vagy a növekedési faktorok) a TOR aktiválásán és az autofágia gátlásán keresztül szabályozzák a sejtnövekedést. A TORC1 felé irányuló szignalizációs útvonalak (4. ábra) legfőbb feladata, hogy tápanyagok és növekedési faktorok jelenlétében serkentsék a translációt és általában a sejtnövekedést (Hietakangas és Cohen 2009). Nem meglepő, hogy sok, mindkét útvonalban kulcsfontosságú molekula evolúciósan konzervált.

Az inzulin és inzulin-szerű növekedési faktorok a kanonikus PI3K-TOR útvonalon keresztül hatnak: ha megfelelő mennyiségben van jelen, tirozin kináz típusú receptora megfelelő célmolekulák (például az IRS1, insulin receptor substrate 1) foszforilálásán keresztül serkenti az I-es típusú PI3K működését, azaz a foszfatidil-inozitol 4,5-bifoszfát (PIP2) foszfatidil-inozitol 3,4,5-trifoszfáttá (PIP3) történő átalakulását. A PIP3 akkumulációját defoszforilálás révén a PTEN (phosphatase and tensin homolog) gátolja, mely a PI3K-TOR útvonal fontos negatív szabályozó eleme. A PIP3 hatására az Akt/PKB kináz (protein Kinase B) aktiválódik, amely többek között a TSC1/TSC2 (tuberous sclerosis complex) gátlásáért felelős. Ez utóbbi heterodimer komplex, aktív állapotban fokozza a Rheb (Ras homolog enriched in brain) kis G-fehérje GTP-áz aktivitását, melynek hatására a Rheb-GTP Rheb-GDP-vé alakul át. A Rheb-GTP a TORC1 kináz komplex aktivátora, míg a Rheb-GDP inaktív. Összefoglalva, a növekedési faktorok által kiváltott jelátvitel a Rheb GTP-kötését, azaz aktiválódását és ezáltal a TORC1 komplex serkentését eredményezi. A sejtnövekedést számos TORC1-effektor molekula is közvetíti: például a riboszomális S6K és az eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E) aktiválódása. Ezek az effektorok rendkívül fontosak a megfelelő riboszómakészlet előállításához, így a translációhoz és a sejtnövekedéshez (Lum, DeBerardinis és mtsai 2005, Wang és Proud 2009).



4. ábra Az autofágia szabályozása

Aminosav-éhezés során az autofágiát a Raf kináz (rapidly accelerated fibrosarcoma) szignalizációs kaszkádja is szabályozhatja sejtenyészeti vizsgálatok alapján. Ebben az esetben a Raf-1 serkenti a MEK1/2 kinázt (MAPK/ERK kinase), amely az ERK1/2-t (extracellular signal regulated kinase 1 and 2) foszforilálja, amelynek aktivitása végül megnövekedett autofág válaszhoz vezet (Ogier-Denis, Pattingre és mtsai 2000, Shaw és Cantley 2006).

Az aminosavak megvonása miatt az autofágia aktiválódhat az ER stressz hatására is (Ron és Walter 2007). Az ER-nek fontos szerepe van a sejt fehérjeszintézisében, valamint a káros anyagok és anyagcseretermékek ártalmatlanításában. Nem megfelelő funkciója esetén aktiválódik az UPR (unfolded protein response), mivel megnő a hibás konformációjú fehérjék mennyisége. Az UPR során több útvonalon is aktiválódhat az autofágia: a PERK (PKR-like ER-localized eIF2 α kinase) foszforilációja által inaktíválja az eIF2 α -t, ami az autofágia aktiválását és a transzláció gátlását okozza (Talloczy, Jiang és

mtsai 2002); a JNK (c-Jun N-terminal kinase) fehérje aktiválásával vagy az ATF6/Xbp1 (activating transcription factor 6/X-box binding protein) útvonalon keresztül. Az ER stressz által kiváltott autofágia segíti a hibás konformációjú fehérjék lebontásával a sejtek túlélését, így csökkentve a stresszhatás mértékét (Schleicher, Moretti és mtsai 2010, Suh, Kim és mtsai 2012, Bristol, Emery és mtsai 2013).

Az aminosavak mellett a sejt állandó ATP-szintjének (adenozin-5'-trifoszfát) biztosítása érdekében elengedhetetlen a megfelelő mennyiségű glükóz, zsírsav és pirosszőlősav is (Lum, DeBerardinis és mtsai 2005). Az AMP-aktivált protein kináz (AMPK) feladata a szervezetben a sejt energia-ellátottságának érzékelése és szabályozása (Hardie 2007). Amikor a sejt ATP formájában tárolt energiája fogyni kezd, és az AMP/ATP aránya megnő a citoplazmában, aktiválódik az AMPK komplex (Hardie, Carling és mtsai 1998), és serkenti a tápanyagok lebontását és gátolja az energiát fogyasztó folyamatokat. Az AMPK számos sejtelettani folyamatban vesz részt. Hatással van a metabolikus enzimek posztttranszlációs módosítására, a génexpresszió szabályozására, a fehérjeszintézisre, valamint a sejtek növekedésére és a sejtciklusra egyaránt. Minden olyan hatás, ami megemeli az AMP/ATP arányát, az AMPK aktivációját idézi elő, amely, ha elér egy bizonyos küszöbértéket a TSC1/2 komplex aktiválásán keresztül, csökkenti a TORC1 működését, ami viszont az autofág folyamatok beindulásához vezet (Meijer és Codogno 2007). Ilyenek lehetnek a stresszorok, mint például az éhezés, hipoxia, hősokk vagy a különböző nehézfém-ionok (Kemp, Stapleton és mtsai 2003).

Az autofágia vizsgálati módszerei

Miután az autofágiának számos fiziológiai és patológiai vonatkozása van, mechanizmusának pontos megértésére, kvantifikálására és manipulálására rendkívül nagy az igény. A vizsgálatok egyik legfontosabb feladata, hogy segítsenek eldönteni: alapszintű, indukált vagy az autofágia gátlása zajlik-e az adott körülmények között. Ennek ismerete szükséges ahhoz, hogy következtetni lehessen arra, milyen módon befolyásolja az autofágia a tanulmányozott folyamatokat.

Mivel az autofagoszómák központi jelentőségű strukturális elemek ebben a dinamikus folyamatban, számuk meghatározása egy adott időpontban információval szolgálhat az autofágia intenzitásáról. Azonban ez a szám egyaránt tükrözheti az autofagoszómák képződésének arányát és autolizoszómákká alakulásuk és lebontásuk mértékét is - azaz az autofagoszómák felhalmozódása jelentheti az autofágia indukcióját

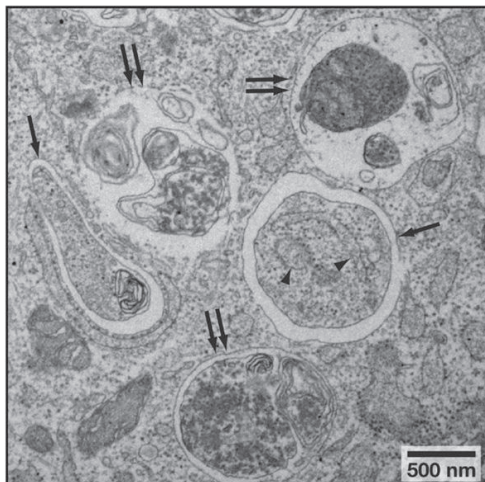
vagy az autofagoszóma képződése után következő lépések gátlását. Ebből kifolyólag kizárólag az autofagoszómák számának meghatározása nem elégséges az autofág aktivitás megállapításához. Az úgynevezett autofág fluxus, vagyis az autofagoszóma-szintézis, a szubsztrátok lizoszómákhoz történő szállítása és a lebontás együttes hatásának vizsgálata sokkal megbízhatóbb információt nyújt az autofág aktivitás meghatározásáról. Valamennyi, általam bemutatott módszert összegzi az **6. ábra** (AP: autofagoszóma, AL: autolizoszóma, EM: elektronmikroszkópia, FC: áramlási citometria, FM: fluoreszcens mikroszkópia, IB: Western blot, IV: izotópos vizsgálat, LC3= Atg8, LC3-I= Atg8a, LC3-II= Atg8b).

Az autofagoszómák számának mérésére három elterjedt detektálási módszert alkalmaznak: az elektronmikroszkópiát, a fénymikroszkópiát és a lipidált Atg8/LC3 mennyiségének meghatározását.

Az elektronmikroszkópia a leghagyományosabban használt autofág vizsgálati módszer. Ultrastrukturális szinten az egyes autofág elemeket megfelelő rutinnal viszonylag jól el lehet különíteni (**5. ábra** és **6. ábra A**). Az autofagoszóma egy kettős membránnal határolt, meg nem emésztett citoplazmarészleteket tartalmazó komponens, amely még nem fuzionált a lizoszómával. Az autolizoszómák azonosítása már kevésbé egyértelmű lehet, mert az autofagoszóma lizoszómával történő egyesülése után már csak egy egyrétegű membránnal határolt képlet keletkezik, a benne levő citoplazmatikus anyagok pedig a lebontás különböző stádiumaiban vannak (Eskelinen és Kovacs 2011).

A fluoreszcens mikroszkópia alkalmas akár, az elsősorban az autofagoszómákat jelölő endogén Atg8 immuncitokémiai módszerekkel történő azonosítására, akár a GFP-riporterrel fuzionált transzgenikus eredetű Atg8/LC3 detektálására (**6. ábra B**). Ez a módszer alkalmazható emlősökben (Mizushima, Yamamoto és mtsai 2004), ecetmuslicában (Scott, Schuldiner és mtsai 2004), férgekben (Melendez, Talloczy és mtsai 2003), növényekben (Yoshimoto, Hanaoka és mtsai 2004) és zebradánióban (He, Bartholomew és mtsai 2009) egyaránt. A leggyakrabban megadott kvantitatív érték ebben az esetben az átlag pöttyszám/sejt, a terület/sejt aránnyal korrigálva ha szükséges.

Az Atg8/LC3 vizsgálata a biokémiai vizsgálati módszerek során is központi szerepet játszik: Western blottal kimutatható az LC3-I vagy a GFP-LC3-I méretbeli változással is járó átalakulása (konverziója) LC3-II-vé illetve GFP-LC3-II-vé, anti-LC3 vagy anti-GFP ellenanyag segítségével (**6. ábra C**). A lipidált LC3-II mennyisége általában korrelál az autofagoszómák számával (Kabeya, Mizushima és mtsai 2000).



5. ábra Az autofagoszóma és az autolizoszóma morfológiája (Mizushima, Yoshimori és mtsai 2010) (szimpla nyilak: autofagoszómák; dupla nyilak: autolizoszómák; nyílfejek: AP belsejében levő ER darabok)

Ahogy fentebb említettem, a legtöbb kísérlet esetében fontos azt tudni, hogy az autofagoszómák felszaporodását az autofágia fokozott indukciója vagy a későbbi lépések gátlódása okozza. Ennek eldöntésében segítenek az autofágia fluxust vizsgáló módszerek.

Ezek közül az egyik az LC3 lipidáltságának mértékén, azaz az LC3-II relatív mennyiségén alapszik. Az LC3-II egy részét az autolizoszómák lebontják (lásd **3. ábra** D). Ugyanezt a jelenséget lehet akkor is tapasztalni, ha a lizoszómába vezető útvonal valamelyik, az autofagoszóma kialakulása utáni lépése gátlódik (Mizushima és Yoshimori 2007, Klionsky, Elazar és mtsai 2008, Juhász 2012).

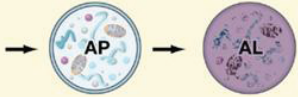
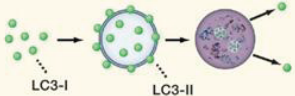
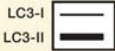

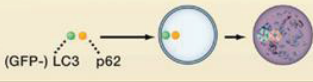
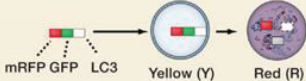


Ehhez hasonlóan az autofágia egyik ismert szelektív szubsztrátja, a p62 lebontása is nyomon követhető, mennyisége Western blottal vagy immunfestéssel meghatározható (**6. ábra** E).

A következő gyakran használt módszer az eltérő hatékonysággal lebomló autofág szubsztrátok detektálásán alapszik. Lényege, hogy kétféle riporterfehérjével, például mCherry-GFP-vel (vagy mRFP-GFP-vel) jelölt transzgénikus LC3 sorsát vizsgálják. Ez a rekombináns fehérje az LC3-on keresztül szelektíven köt az autofagoszómákhoz, majd az

autolizoszómákban a GFP fluoreszcenciája megszűnik a savas pH hatására, míg az mCherry-jé ép marad, így fluoreszcenciája továbbra is detektálható. Az autofagoszómák egyaránt pozitívak lesznek mCherry-re és GFP-re (sárga jel), ezzel szemben az autolizoszómák csak az mCherry által kibocsájtott jelet adják (piros jel) (6. **ábra** F).

Ezen kívül megbízható módszerként alkalmazható a GFP-LC3 lebontása során felszabaduló szabad GFP mennyiségének meghatározása GFP ellenanyag felhasználásával, Western-blot analízissel, mivel a szabad LC3 gyorsabban bomlik le, mint a GFP-LC3 (6. **ábra** G). Az immunoblottolás során így 2 eltérő csíkot látunk majd a konverzió mértéke alapján, ami az LC3 turnover vizsgálatokhoz hasonlóan határozza meg az autofág flux mértékét (6. **ábra** D).

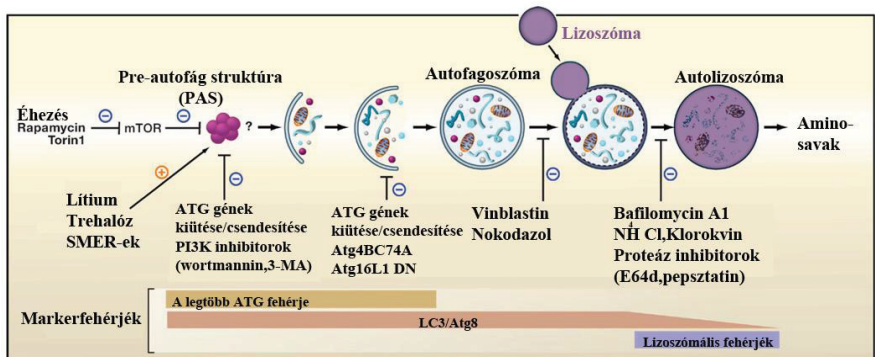
Végül elterjedt még a radioaktívan jelölt hosszú féléletidejű fehérjék mennyiségének meghatározása is. Ezek elsősorban autofágia során bomlanak le, ezért annak gátlódása ezen fehérjék stabilizálódásához vezet (6. **ábra** H).

Vizsgálati módszerek, a detektálás módja		
Konvencionális morfológia	A AP/AL ultrastrukturális vizsgálata 	EM
	B LC3/Atg8 vagy GFP-LC3/Atg8 pöttyszám/sejt 	FM
Autofagoszómák száma	C LC3-II/Atg8-II mennyisége (LC3 konverzió) 	IB
	D LC3/Atg8 turnover vizsgálat Lizoszómális inhibitorok - + LC3-I  LC3-II LC3-II/Atg8a mennyiségi különbség	IB
Autofág flux	E Szelektív szubsztrátok mennyisége 	IB FC FM
	F mRFP-GFP-LC3/Atg8 színátalakulás 	FM
	G GFP-LC3/Atg8 lebontás 	IB
	H Hosszú életű fehérjék lebontása 	IV

6. ábra Az autofágia vizsgálati módszerei (Mizushima, Yoshimori és mtsai 2010)

Ahhoz, hogy többféle módszerrel, megközelítéssel vizsgálhassuk az autofágia folyamatát, feltétlenül meg kell ismernünk azokat az anyagokat, amelyekkel „beleszólhatunk” a mechanizmusba (7. ábra). Ezek közül is kiemelendő a wortmannin és a LY294002, amelyek a farmakológiában leggyakrabban használt, a III. típusú PI3 kináz, ezáltal az autofágiát is gátló szerek. Az autofág folyamat későbbi lépések blokkolásával is megállítható mesterségesen: vinblastinnal és nokodazollal az autofagoszóma-lizoszóma fúziója, bafilomycinnel, ammónium-kloriddal vagy klorokvinnal pedig a lizoszomális proteázok működése akadályozott. Specifikusabb gátlás érhető el különböző ATG gének kiütése vagy RNS interferenciával történő csendesítése által.

Egyre nagyobb igény van (terápiás célokból is) az autofágia aktivátorainak azonosítására, megismerésére is. Fiziológiás autofágiát indukáló hatás az aminosav-éhezés. Serkenthető az autofágia a tápanyag-ellátottságért felelős jelátviteli útvonalak manipulálásával is: erre szolgál a rapamycin és analógjai (például a CCI779 vagy a torin1), amelyek az mTOR gátlásán keresztül vezetnek aktiváláshoz. A lítium, a trehalóz és a SMER- ek (small-molecule enhancers of rapamycin) a pre-autofág struktúra kialakulását segítik elő, egyelőre ismeretlen módon.

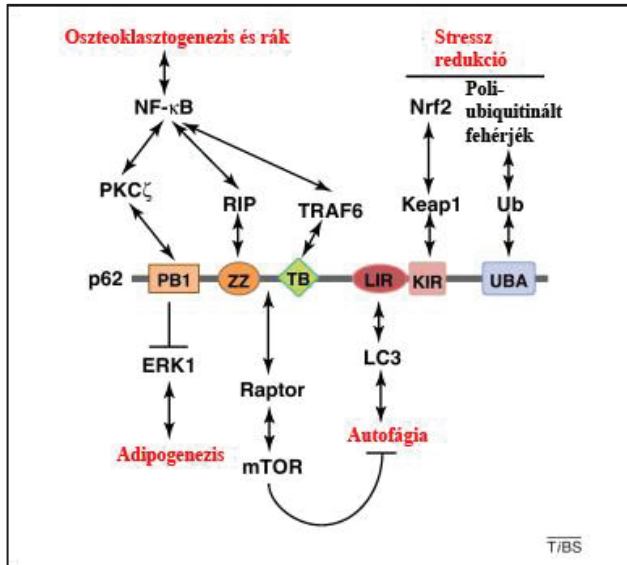


7. ábra Az autofágia ismert inhibitorai és aktivátorai (Mizushima, Yoshimori és mtsai 2010)

A p62 molekula jellemzése és az autofágia szelektivitása

A humán p62/SQSTM1 (sequestosome-1) egy multidomén fehérje, melynek számos jelátviteli útvonalban, az apoptózisban, a stresszválaszban és a sejtnövekedésben is van szerepe (Moscat és Diaz-Meco 2009). Először az atipikus protein kináz C (aPKC) interakciós partnereként azonosították (Puls, Schmidt és mtsai 1997, Sanchez, De Carcer és mtsai 1998). Drosophilában az egyedüli ismert homológja a Ref(2)P (refractory to sigma P), az egyszerűség kedvéért a továbbiakban ezt is p62-nek nevezem. A géntermék a humán p62-vel szinte teljesen megegyező doménstruktúrát mutat (**8. ábra**).

Tartalmaz egy PB1 (Phox/Bem1p) fehérje-fehérje kötő domént, amely révén képes egy másik p62-höz vagy egyéb PB1 domént hordozó fehérjéhez kötődve oligomereket alkotni és ezen keresztül lép kölcsönhatásba a már említett aPKC-vel is. Szintén ezen a doménon keresztül kapcsolódhat és ezáltal gátolhatja az ERK1-et, mely az adipogenezis és a kóros elhízáshoz vezető folyamatok elengedhetetlen negatív szabályozó eleme (Rodriguez, Duran és mtsai 2006). A cink-ujj domén (ZZ, zinc-finger) a RIP (receptor interacting protein) fehérjén keresztül biztosítja az NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) transzkripciós faktor aktiválását a TNF (tumor necrosis factor) útvonalban (Sanz, Diaz-Meco és mtsai 2000, Duran, Linares és mtsai 2008). A TB nevű (TRAF6 binding) doménnal kötődik a TRAF6 molekulához, mely fontos szerepet tölt be a RANK (Receptor Activator of Nuclear factor-KappaB ligand)-indukált oszteoklasztogenezisben és a Ras-indukált tumorgenezisben. A TRAF6 egy lizin 63 (K63) E3 ubiquitin ligáz, ami az NF- κ B aktiválásáért felelős (Moscat, Diaz-Meco és mtsai 2006). A p62 kölcsönható partnerei közé tartozik a RAPTOR is, amely, ahogy erről korábban már szó volt, korlátozza az autofág folyamatok beindulását az mTORC1 komplex alegységeként (Kim, Sarbassov és mtsai 2002, Duran, Amanchy és mtsai 2011). Az autofágia szempontjából igen nagy jelentőségű a p62 LIR (LC3-interacting region) régiója, amely az Atg8/LC3 családdhoz tartozó fehérjékhez való kötődést teszi lehetővé. A Keap1-el (Kelch-like ECH-associated protein 1) való kapcsolat fontos tényező az Nrf2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) és a ROS (reactive oxygen species) szintjének szabályozásában. Végül rendelkezik egy UBA (ubiquitin-associated) doménnal, amely a proteasomális vagy autofág folyamatok révén lebomló poliubiquitinált fehérjékhez való kötődést biztosítja (Nezis, Simonsen és mtsai 2008).



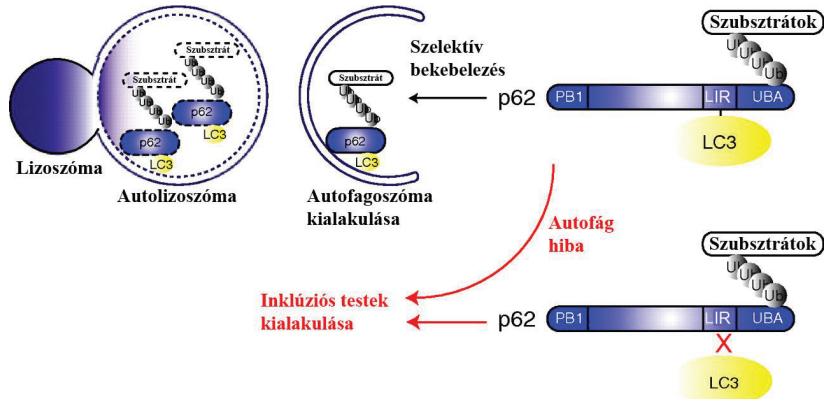
8. ábra A p62 felépítése, interakciós partnerei és funkciói (Moscat és Diaz-Meco 2012)
(A rövidítések magyarázatát és az általuk jelölt fehérjék szerepét lásd a szövegben)

Kapcsolatai révén a p62 élettani feladatai közé sorolható az oszteoklasztogenezis és a csontok újjáépítésének (Duran, Serrano és mtsai 2004), valamint az adipogenezis és az elhízás szabályozása is (Rodriguez, Duran és mtsai 2006). A p62 a tumorigenezis központi regulátora, mivel részt vesz a mitózis szabályozásában, modulálhatja, ugyanakkor szubsztrátja is az autofágiának, és végül, de nem utolsósorban kontrollálja a ROS és a nem megfelelő konformációjú fehérjék mennyiségét (Moscat és Diaz-Meco 2012).

Az autofágia során lebomló anyagok irányított kiválasztásának mechanizmusa, vagyis ezen degradációs folyamat szelektivitásának kérdése széles körben vitatott téma. Mára már ismert néhány bizonyítottan szelektív lebontásra irányító, „kijelölő” fehérje, ilyen például az Alf (autophagy-linked FYVE protein), az NBR1 (neighbor of BRCA1 gene 1), az NDP52 (nuclear dot protein 52) és a p62 is. A p62 két különböző doménje által mind az ubiquitinhez, mind az Atg8/LC3-hoz képes kötni (8. ábra). Az UBA domén biztosítja az ubiquitinált fehérjékkel való kapcsolatot, az Atg8/LC3-interakció pedig az asszociációt az autofagoszómához – így magának a p62-nek és ubiquitinált szubsztrátjainak szelektív lizoszómális lebontását és a hozzájuk történő kapcsolódását is

(9. ábra). Számos neurodegeneratív betegség esetében p62-t és ubiquitinált fehérjéket egyaránt tartalmazó fehérjeaggregátumok (inklúziós testek) felhalmozódása figyelhető meg (Bartlett, Isakson és mtsai 2011). Ehhez hasonló aggregátumok halmozódnak fel kísérletes körülmények között autofágia hiányában is, így elmondható, hogy az autofágia szintje negatívan korrelál a sejtekben megtalálható p62-aggregátumok számával (Hara, Nakamura és mtsai 2006, Komatsu, Waguri és mtsai 2006).

Szelektív autofág lebontás



9. ábra A p62 által szabályozott szelektív autofágia folyamata (Ichimura, Kumanomidou és mtsai 2008)

A különböző kísérleti modellekben különféle, a p62 szintjének meghatározására használt vizsgálat terjedt el, ezek közé tartozik a sejt kultúrák és szövetek immunfestése, a Western blot, illetve GFP-vel jelölt riporterek alkalmazása (Bjorkoy, Lamark és mtsai 2009). A *Drosophila melanogaster*, amely a gének és genetikai interakciók vizsgálatának hagyományos modellállata, kiválóan használható számos sejtbiológiai folyamat, így az autofágia tanulmányozására is. Több cikkben igazolták a p62/ubiquitin-aggregátumok állandó jelenlétét a kifejlett imágók agyában, valamint azt, hogy ezek száma drasztikusan megemelkedett a neurodegeneratív betegségek *Drosophila* modelljeiben, illetve az autofágia gátlásakor (Juhász, Erdi és mtsai 2007, Nezis, Simonsen és mtsai 2008, Simonsen, Cumming és mtsai 2008, Bartlett, Isakson és mtsai 2011). Mindezek alapján a *Drosophila melanogaster* megfelelő eszköz lehet nemcsak az autofágia folyamatának, de ezen belül a p62 szerepének megértéséhez is.

A Drosophila melanogaster, mint kísérleti modell általános jellemzése

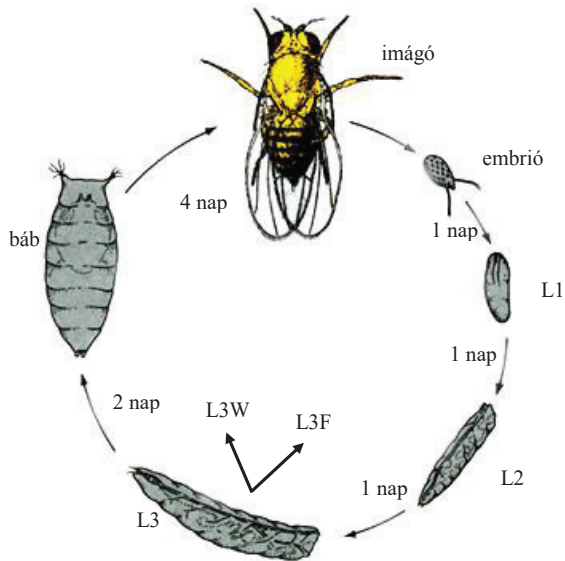
A *Drosophila melanogaster* (ecetmuslica) már több mint száz éve a magasabbrendű élőlények ideális genetikai modellje. Ennek oka többek között rövid életciklusa, nagy utódszáma, olcsó és könnyű fenntarthatósága, kis mérete és alacsony kromoszómaszáma. A muslica genom összesen négy pár kromoszómából áll. Ezek közül az első pár ivari, a többi testi, de a 4. kromoszóma rendkívül kisméretű. Természetesen mára a teljes genom nukleotid-szekvenciája ismert, és genomjában megtalálható az emberi betegségeket okozó gének kétharmadának homológja. A rendelkezésre álló genetikai és sejtbiológiai vizsgálmódszerek széles tárháza különösen alkalmassá teszik ezt az élőlényt alapkutatói célokra. A *Drosophila*-kutatók által használt online adatbázis (flybase.org) pedig kiválóan összegzi ezt az egyre bővülő információhalmazt.

A vad típusú (OregonR) *Drosophila*-ra jellemző a sárgás-barna testszín, az élénkpiros és kerek szem, az egyenes állású, ép szélű szárny és a fekete, testre nem rásimuló kitinszőrzet. Ugyanakkor nagyszámú, az életképességet nem lényegesen befolyásoló és látható fenotípust okozó marker mutáció létezik. A fenotípusos markerként használható eltérés érthető többek között a test és a szem színét vagy alakját, a szárnyak alakjának, szélének épségét vagy akár a kitinszőrök számát is. A marker mutációk egyrészt segíthetnek gének vagy egyéb genetikai elemek pontosabb kromoszómális pozíciójának térképezésében, másrészt a keresztezések során könnyen lehet a vizsgált törzsek által hordozott mutáns allélok öröklődését követni és azokat szelektálni a fenotípusos markerek alapján.

Az ecetmuslica egyedfejlődése

Az ecetmuslica teljes átalakulással fejlődő, azaz holometabola rovar. Egyedfejlődése laboratóriumi körülmények között körülbelül 8 napig tart, és több, jól elkülöníthető szakaszból áll (**10. ábra**). A megtermékenyülést követően a pete burkán belül zajlik le a szobahőmérsékleten körülbelül egy napos embriogenezis. A kísérletes munka során az állatok korát a peterakástól, mint kezdőponttól számított órákban mérjük (AEL, after egg laying). A petéből kikelve az első stádiumú lárvák (L1) szintén körülbelül 24 óra elteltével vedlenek második stádiumúvá (L2), illetve újabb egy nap múlva harmadik stádiumos (L3) lárvákká. A hozzávetőleg 62-72 óra hosszúságú L3 stádium végéig tart a poszt embrionális fejlődés. A harmadik lárvastádiumot két részre különíthetjük el. Első részében a lárvá szinte csak táplálkozik (táplálkozó, feeding időszak, L3F, 72-108h AEL),

ennek megfelelően gyorsan növekszik. A második, vándorló (wandering, L3W, 108-120h AEL) szakasz alatt a lárva elhagyja a nedves tápközeget, egy száraz helyen felkészül a bebábozódásra, és ekkor kezdődik meg lárvális szerveinek fiziológiás, nagyrészt autofágiával történő lebontása. A harmadik lárvastádium végén az állat úgynevezett prepupává alakul át, kültakarója néhány óra leforgása alatt átalakul és szklerotizálódik, így hozva létre a bábbórt (puparium). A metamorfózis folyamata során a bábból körülbelül 110-120 óra után (AEL 144-254/568h) kifejlett imágó alakul ki. A pupariumból való kibújást követően az *acetabularia* kifejleszti szárnyait, szklerotizálja a kutikuláját, röpképesé válik és 3-4 óra elteltével már ivaréretté is alakul. Ezt követően a nőtények az első petéiket 2 nap múlva rakják le, és fiziológiás körülmények között 2-3 héten keresztül intenzíven petéznek. Ez az úgynevezett adult stádium 45-60 napig tart.



10. ábra A *Drosophila* életciklusa

A Drosophila fejlődésének szabályozása

A *Drosophila* egyedfejlődése szigorú hormonális kontroll alatt áll. Az egyes lárvastádiumokat védések választják el, melyeket a neuroendokrin rendszer két hormonja szabályoz: a nyílt szénláncú juvenilis hormon és a szteránvázis ekdizon (20-hidroxiyekdizon). Az ekdizon, mint védési hormon, mindig az újabb lárvastádiumokba való átlépést stimulálja. A hemolimfába szekretált hormont a zsírtestsejtek (trofociták) hidroxilálják és az így keletkezett 20-hidroxiyekdizon (20-OHE) már két nagyságrenddel nagyobb aktivitással bír. Szintézise időszakos és kvantált (Baehrecke 2000). A juvenilis hormon ezzel szemben folyamatosan jelen van, de a fejlődés előrehaladtával koncentrációja egyre csökken. Feladata az aktuális stádium fenntartása. A védést így a juvenilis hormon mennyisége és az ekdizoncsúcsok szabályozzák. A harmadik lárvastádium végén a magas koncentrációban jelen levő ekdizon az ekkorra már alacsony juvenilis hormon szint mellett tudja kiváltani a vándorlást és bábozódást, továbbá a feleslegessé váló lárvális szövetek lebontását is (Sass és Kovacs 1977, Thummel 1996, Baehrecke 2000). A bábállapot végén a juvenilis hormon szintézise leáll, az állat imágóvá alakul.

Autofágia a Drosophila lárvális zsírtestében

A rovarok az autofágia kutatásának klasszikus modelljei. Teljes átalakulásuk során képesek testük nagymértékű átalakítására és újjáépítésére, és az ezzel együtt járó lebontó folyamatok részben autofágia révén valósulnak meg. Az egyedfejlődés során, legfőképpen a L3 lárvastádium végén, úgynevezett imaginális szövetek növekedését figyelhetjük meg. Ezekből alakulnak ki a leendő adult állatok szerveinek és szöveteinek nagy része, mint például a fej, a lábak, a szárnyak, a tor és az ivarszervek. Az imaginális sejtek morfológiailag kisméretűek, diploidak és az egyedfejlődés során is végig növekednek és osztódnak. Ezzel szemben a poliploid sejtek csak méretbeli növekedést mutatnak, sejtsztódás nélkül, feladatuk a biomassa felhalmozása az egyéb, például metabolikus funkciók mellett. A metamorfózis során a lárva bebábozódik, lárvális szöveteinek nagy része felszívódik és az imaginális szövetek számos morfofenetikai változáson keresztül alakítják ki a végleges adult struktúrákat.

A *Drosophila* szervezetében – a többi rovarhoz hasonlóan – a zsírtest tölti be ennek a metabolikus központnak a szerepét. A zsírtest egy mezodermális eredetű, több lebenyből álló szerv, mely a gerincesek májához és zsírszövetéhez hasonlítható. Trofocita sejtek

építik fel, melyek képesek felvenni és raktározni a felszívódott tápanyagokat, melyekből a fiziológias szükségleteknek megfelelően monomerek szabadíthatók fel. További funkciói közé tartozik a méregtelenítés és a hormonok aktiválása és inaktíválása. Fiziológias körülmények között a harmadik lárvastádiumra a zsírtest sejtjei is nagymértékben poliploidizálódnak, sejtméretük egyre növekszik. Később, a metamorfózist megelőzően (108h AEL) a poliploid lárvális sejtek/szövetekben tömeges autofágia jelenik meg, építőanyagot szolgáltatva a bábállapot alatt fejlődő imaginális szervek számára. Autolizozómák sokaságát figyelték meg nemcsak a zsírtest, hanem az epidermisz, a nyálmirigy, a középbél, a protorakális mirigy lebomlása előtt és alatt is (Schin és Clever 1965, Sedlak és Gilbert 1976, Ryerse 1979, Dai és Gilbert 1997). Ugyanakkor stressz hatására, (legegyszerűbben éhezéssel) ennél korábban is bármikor indukálható autofágia a zsírtestben. Összegezve: a *Drosophila melanogaster* zsírtestszöve kiválóan alkalmas mind a fejlődés során normálisan lezajló, mind a stressz hatására bekövetkező autofág folyamatok tanulmányozására.

Az RNS interferencia fogalma és alkalmazása Drosophila-ban

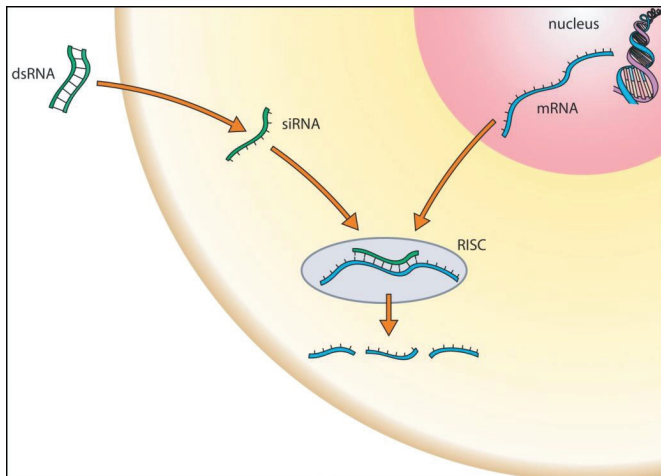
A gének funkciójának vizsgálata során alapvető elvárás az adott géntermék hiányában kialakuló fenotípus elemzése. Muslicákban a funkcióvesztéses (loss of function) mutációk generálására számos kísérleti módszer ismert: régebben általánosan alkalmazták a fizikai vagy kémiai mutagéneket pontmutációk, deléciók vagy nagyobb kromoszóma-átrendeződések indukálására, de a transzpozon-inszercióval megvalósított mutagenézis is klasszikusnak számít.

Egy *Drosophila* transzpozon, az úgynevezett P-elem a genomba beépülve megváltoztathatja egy gén kifejeződését. A beékelődést és a kivágódást a P-elem speciális szerkezete teszi lehetővé. Emellett a P-elem pontatlan kivágódása lehetőséget nyújt többé-kevésbé célzott deléciós mutáns allélok létrehozására is. A P-elem-inszerció mutagenézis nagy előnye, hogy az ismert nukleotid-sorrendű P-elemet tartalmazó szakaszok helye mind citológiai (in situ hibridizáció), mind molekuláris biológiai (például inverz PCR) módszerekkel kimutatható, ily módon az általuk érintett géneket is könnyen lehet azonosítani.

A fentiek hatékonyságát sajnos az befolyásolja, hogy sok mutáció homozigóta formában korai letalitást okoz, tehát hatása a kifejlett állatban nem tanulmányozható. Ezt a problémát küszöbölték ki genetikai mozaikokat generáló rendszerek kidolgozásával. Ekkor

a vizsgált állat testének nagy részét heterozigóta sejtek alkotják, és csak néhol, mesterségesen indukálva alakulnak ki homozigóta sejtklónok (Lee és Luo 1999). A technika azonban viszonylag bonyolult és időigényes, ezért ez sem alkalmazható széles körben. A gondokat csak tetézi, ha az adott génre egyáltalán nem létezik mutáns allél.

Az utóbbi évtized során lehetőség nyílt nagy hatékonyságú, átfogó screenek (adott folyamatot befolyásoló gének izolálására irányuló szűrések) kivitelezésére egy viszonylag gyors és hatékony, funkcióvesztéses fenotípust generáló technika révén. Az RNS interferencia (RNSi) egy olyan molekuláris mechanizmus, melynek során a citoszolba kerülő duplaszálú RNS (dsRNS) az egyik szálával komplementer mRNS degradációját vagy translációjának gátlását eredményezi (11. ábra) Az RNSi tehát egy nagyon hatékony, specifikus géncsendesítéssel járó poszttranszkripciós folyamat (PTGS): hatására nem, vagy csak csökkent mennyiségben képződik funkcionális fehérje az adott génről. Az RNSi jelensége a sejtek normális működésének is része, funkciója a vírusok elleni védelem és a génexpresszió szabályozása.



11. ábra Az RNSi folyamata (Robinson 2004)

Az RNS interferencia folyamatának központi elemei a kétféle RNS molekula: a miRNS (mikroRNS) és az siRNS (small interfering RNS). Az RNSi során a sejtekben megjelenő dsRNS-t kis, 19-21 bázispárnyi darabokra (siRNS-ekre) vágja a Dicer nevű enzim. A képződött rövid, duplaszálú darabok ezután különböző fehérjekomponensekkel

kapcsolódva létrehozzák a RISC (RNA-induced silencing complex)-et. Ezt követően a RISC-ben található helikáz enzim szétválasztja a két RNS szálát, amelyek közül az egyik degradálódik. Az siRNS másik szála a RISC-et a komplementer szekvenciát tartalmazó mRNS-hez „vezeti”, amelyet aztán a RISC endoribonukleáz komponense kettévág. A hasítás hatására az mRNS sebezhetővé válik az exoribonukleázok számára is, és végül degradálódik, ezzel meggátolva, hogy translációs templáttá váljon. Az exogén dsRNS-eket effektor fehérjék kötik meg – a *Caenorhabditis elegans*-ban az RDE-4, a *Drosophilában* az R2D2 – melyek növelik a Dicer enzim aktivitását (Parker, Eckert és mtsai 2006). A mikroRNS-ek olyan nem kódoló RNS-ek, melyek feladata a génexpresszió szabályozása, kiváltképpen az egyedfejlődés alatt (Wang és Li 2007). Az érett miRNS-ek felépítése szinte teljesen megegyezik az exogén dsRNS-ekből keletkező siRNS-ekkel, kivéve, hogy az előbbieket poszt-transzkripcionálisan modifikálódnak. Az miRNS-ek és a siRNS-ek ugyanazon celluláris elemeket használják az RNS interferencia iniciációs lépése után.

Az RNSi rendkívül értékes kísérleti technika mind sejt kultúrák, mind élő organizmusok vizsgálata során, hiszen a szintetikusan előállított és a sejtbe/élőlénybe juttatott vagy ott kifejeztetett dsRNS-ek szelektív és rendkívül intenzív génszuppressziót váltanak ki. A sejt ezt a dsRNS-t – melynek egyik szála a vizsgált gén szekvenciájával komplementer – exogén genetikai anyagnak értelmezi, és aktiválja az RNSi utat. Ezt a mechanizmust kihasználva tehát drasztikus génszuppresszió-csökkenést érhetünk el. A technika egyszerűsége és általános alkalmazhatósága - hiszen így gyakorlatilag bármilyen gén funkcióvesztéses fenotípusa, ezáltal élettani szerepe tanulmányozhatóvá vált - biztosította különféle nagyléptékű screenek kivitelezését. Az eljárást a *Caenorhabditis elegans* fonalféreg (Kamath és Ahringer 2003) és *Drosophila* (Boutros, Kiger és mtsai 2004) esetében alkalmazták elsőként.

Az *ecetmuslica* esetében az RNSi hatását kiváltó dsRNS a genomba integrálódott transzgenről íródik át. Az integráció többféleképpen is kivitelezhető, az egyes *Drosophila* RNSi törzsgyűjteményekben eltérő technikákkal eltérő hatékonyságú vonalakat állítanak elő. A laboratóriumunkban leggyakrabban használt törzsek a VDRC (Vienna *Drosophila* Research Center) és a TRiP (Transgenic RNAi Project, Bloomington, USA) gyűjteményekből származnak. A bécsi VDRC központ 2007 óta 31920 *Drosophila* RNSi vonalat hozott létre. Korábban készült el az úgynevezett GD-könyvtár, melyben 21152 vonal található. A törzsek előállítása során random inszercióval beépülő, P-elem alapú

transzgéneket használtak fel. Azonban ez nem bizonyult ideálisnak, hiszen az inszerció gyakran olyan géneket is inaktívált, amelyek letalitást okoznak, vagy a dsRNS nem expresszált megfelelően. Az újabb, 10740 vonalat tartalmazó KK-könyvtár készítésekor az integráció a fágeregetű phiC31 helyspecifikus rekombinááz felhasználásával már irányított módon, ugyanabba a genomi pozícióba történt (Groth, Fish és mtsai 2004). Ez az újítás kiküszöbölte a random beépülés miatt számottevő mutagén hatást és az expresszió szempontjából megfelelő genomi környezet miatt nagyobb mértékű géncsendesítést biztosított. A GD és KK törzsek összesen 13264 *Drosophila* gént fednek le, ez a genom 93,8%- át jelenti. A bloomingtoni TRiP könyvtárnál is a phiC31 integrációs módszert alkalmazták, és számos, eltérő hatékonyságú vektort állítottak elő (5 különböző hatékonyságú VALIUM vektort alkalmaznak, melyek különböző intenzitással fejeződnek ki szomatikus- és ivari sejtekben). Folyamatosan bővülő RNSi könyvtárak mára több mint 6500 vonallal rendelkeznek. Az RNSi változó mértékű megbízhatóságával azonban mindig számolni kell, amit okozhat a P-elem inszerció törzsek esetében az eltérő genomi környezetből fakadó expressziós különbség, illetve az úgynevezett off-target hatás, amikor az RNSi során nem csak a megcélzott, hanem egyéb mRNS-ek is lebomlanak. Ezért mindig érdemes a vizsgált génre fellelhető összes RNSi vonalat letesztelni, ideális esetben mutánsokat is vizsgálni.

II. CÉLKITŰZÉSEK

- ❖ Az autofágiában szerepet játszó gének azonosítása *in vivo* genom szűréssel genetikai mozaik állatokban, és a pozitív találatok karakterizálása.
- ❖ Az általunk készített anti-p62 ellenanyag tesztelése: mutánsokban és lárvális zsírtestben indukált RNSi klónokban immuncitokémiai vizsgálatokkal, valamint Western-blottal teljes állatmintákon.
- ❖ A különféle p62-esszék előnyeinek és hátrányainak meghatározása kvantitatív vizsgálatokkal.
- ❖ Funkcióvesztéses letális fenotípussal rendelkező gének bazális autofágiában betöltött szerepének kimutatása RNSi-indukált mozaikos zsírtestekben, immuncitokémiai módszerekkel.
- ❖ A TOR kináz szubsztrátjának tekintett S6 kináz autofágiában betöltött, vitatott szerepének vizsgálata.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A Drosophila törzsek fenntartása

A törzseket standard élesztő/kukoricaliszt/agar táptalajon 25°C-on, 50%-os páratartalomban, 12-12 óra sötét-fényperiódus mellett tartottuk vattadugóval lezárt üvegcsövekben. A standard táptalaj elkészítése a következőképpen történik: 12 g agarport feloldunk 1 liter csapvízben, felforraljuk, majd az oldathoz 100 g „szárazkeverék” adunk, amit addig keverünk, amíg csomómentes nem lesz. A „szárazkeverék” összetétele: 120 g glükóz, 36 g szacharóz, 320 g kukoricaliszt és 2,7 g CaCl₂. Ezután hozzáadunk 25 g élesztőkivonatot a csomómentes keverékhez, majd az egészet újra felforraljuk. Kézzel melegre hűlés után 10 ml Nipagin antibiotikumot és 1,7 ml fenil-fenol oldatot adunk az elegyhez, amit így már a csövekbe önthetünk. Hosszú távon a törzseket 18 °C-on tartjuk. A kísérletek jó része 25 °C-on zajlik, a kiszáradás elkerülése érdekében néha a táptalajt vízzel kell locsolni.

A felhasznált törzsek

A doktori munkában felhasznált törzseket a **12. ábra** táblázatában foglaltam össze. Az Atg8a[d4] mutáns egy, az Atg8a génbe inszertálódott P-elem (KG07569 törzs (Scott, Juhasz és mtsai 2007)) imprecíz kivágódásával készült és egy olyan deléciót hordoz, amely az Atg8a első 25 kodonját és a CG1826 gén első 53 kodonját érinti (Piracs, Nagy és mtsai 2012). A deléciót homozigóta formában hordozó mutánsok életképesek és fertilisek, semmilyen nagyobb morfológiai vagy fejlődéstan abnormalitást nem mutatnak. Az UAS-Atg4[C98A] transzgenikus vonal előállítását a későbbiekben ismertetem.

CG szám	törzsnév	referencia	genotípus/törzszonosító
	wt		w[1118]
CG10360	ref(2)P/p62[KK]	Dietzl 2007	KK108193
CG10360	ref(2)P/p62[i1]	TRIP	HMS00551
CG10360	ref(2)P/p62[i2]	TRIP	HMS00938
CG10360	p62-GFP	Chang 2009	UAS-p62-GFP
CG10967	Atg1 -/-	Toda 2008	Atg1[25]
CG5373	Vps34 -/-	Juhasz 2008	Vps34[Δm22]
CG32672	Atg8a -/-	Pircs 2012	Atg8a[Δ4]
CG5489	Atg7 -/-	Juhasz 2007	Atg7[d77]/Atg7[d14]
CG1241	Atg2 -/-	Scott 2004	Atg2[EP3697]/Df(3L)BSC119
CG7331	Atg13 -/-	Chang 2009	Atg13[Δ81]
CG7986	Atg18a -/-	Scott 2004	Atg18a[KG03090]/Df(3L)Exel6112
CG10539	S6K -/-	Montagne 1999	S6K[l-1]
CG10967	Atg1[JF]	TRIP	JF02273
CG32672	Atg8a[KK]	Dietzl 2007	KK109654
CG7986	Atg18a[KK]	Dietzl 2007	KK105366
CG7986	Atg18a[JF]	TRIP	JF02898
CG5373	Vps34KD	Juhasz 2008	
CG3615	Atg9[JF]	TRIP	JF02891
CG11877	Atg14[KK]	Dietzl 2007	KK108559
CG5489	Atg7[JF]	TRIP	JF02787
CG31033	Atg16[KK]	Dietzl 2007	KK105993
CG31033	Atg16[HMS]	TRIP	HMS01347
CG1241	Atg2[JF]	TRIP	JF02786
CG4428	Atg4DN	Pircs 2012	
CG6975	TSC2[KK]	Dietzl 2007	KK103417
CG1081	Rheb	Scott 2004	UAS-Rheb[EP50.084cre(w-)]/TM6B
CG5671	Pten[KK]	Dietzl 2007	KK101475
CG5671	Pten[JF]	TRIP	JF01987
CG7808	RpS8[KK]	Dietzl 2007	KK106835
CG2503	Atms[GD]	Dietzl 2007	GD20876
	>>GFP	Scott 2004	hsFlp; UAS-Dcr2; Act>CD2>Gal4, UAS-GFPnls
	>>GFP, mCh-Atg8a	Chang 2009	hsFlp; UAS-Dcr2; Act>CD2>Gal4, UAS-GFPnls, r4-mCherry-Atg8a
	>>Lamp-GFP	Juhasz 2008	hsFlp; UAS-LampGFP; Act>CD2>Gal4, UAS-Dcr2
	>>GFP-Atg8a	Scott 2007	hsFlp; UAS-GFP-Atg8a; Act>CD2>Gal4, UAS-Dcr2

12. ábra A felhasznált törzsek CG (Computed Gene) szám: génazonosító szám

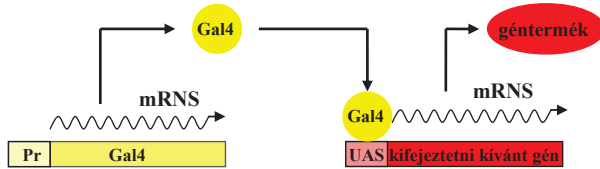
A Drosophila melanogaster genetikája

1. Az UAS-Gal4 kételemű expressziós rendszer

A *Drosophila*-genetikában az egyik legáltalánosabban használt genetikai eszköz az élesztőből származó úgynevezett UAS-GAL4 rendszer, melynek alkalmazása lehetőséget ad egy adott gén vagy más DNS-szakasz szabályozott expressziójára. Az élesztő UAS-Gal4 rendszere eredetileg a galaktóz lebontásához szükséges gének transzkripcióját szabályozza (Laughon és Gesteland 1984). A *Drosophila*-ban eredetileg nem lehetséges fel, de transzgenikus állatokban jól működik ez a mechanizmus (Duffy 2002). A rendszer két komponensből áll (**13. ábra**). Az egyik genetikai elem tartalmazza a Gal4 fehérjét kódoló szekvenciát és az elé beépített specifikus promotert – ez az úgynevezett Gal4-forrás. A második elem az UAS-ből (Upstream Activating Sequence) és a mögé illesztett, kifejeztetni kívánt DNS-szakaszból áll. A specifikus promóter biztosítja a Gal4 kivánt időbeli és/vagy szöveti kifejeztetését. Amikor a promóter aktiválódik, megkezdődik a Gal4 expressziója. A Gal4 fehérje az UAS régióhoz köt, és ezzel aktiválja a kifejeztetni kívánt gén átíródását. Az UAS szekvencia szabályozhatja bármilyen, tőle 3' irányban elhelyezkedő szekvencia, akár fluoreszcens riporterrel kapcsolt gének vagy RNS interferencia kiváltására alkalmas DNS szakaszok expresszióját is.

A rendszer egyik legfontosabb tulajdonsága, hogy miután két elemből áll, nem kell ugyanabban a törzsben fenntartani az UAS-t, illetve a Gal4 gént tartalmazó szakaszokat. Így egyrészt szabadon kombinálható a tér/időbeli specificitást biztosító promóter és a kifejeztetni kívánt gén, másrészt elkerülhető a csökkent életképességet, sterilítást vagy letalitást okozó géntermékek állandó expressziója. A kivánt genetikai elemeket keresztezéssel lehet a vizsgálat idejére egyetlen állatba hozni.

Az elektronmikroszkópia során olyan állatokat vizsgáltunk, amelyek genomjában a Gal4 gén az egész zsírtestben expresszáló kollagén promóter mögött van (cg-Gal4 konstrukció), és - a megfelelő keresztezés után - jelen volt az adott UAS-szabályozott szakasz is. Western blot vizsgálatokhoz konstitutív ubi-Gal4 törzset használtunk.



13. ábra Az UAS-Gal4 rendszer felépítése és működése (*Pr: promóter*)

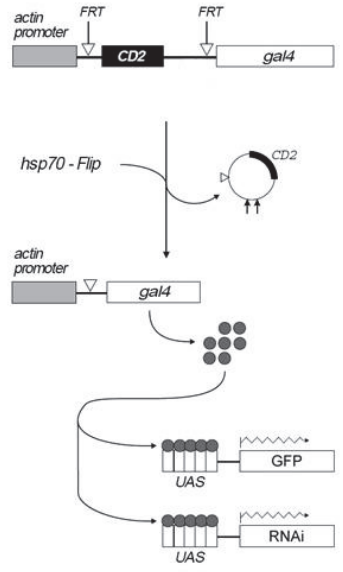
2. A mozaikos kifejeződést biztosító Flp/FRT rendszer

Munkánk során a legtöbb esetben úgynevezett klonális analízist alkalmaztunk. Ez a *Drosophila*-genetikában gyakran használt technika, amely lehetővé teszi, hogy ne egész állatban vagy teljes szervben, hanem csak egyes kisebb sejtcsoportokban fejeződjön ki valamely transzgén. Ráadásul a transzgénikus konstrukciót expresszáló sejteket normális fenotípusú, nem expresszáló sejtek veszik körbe ugyanabban a szövetben. Ennek egyik előnye, hogy ezek a szomszédos sejtek belső kontrollként szolgálhatnak, ami csökkenti a különböző állapotok fenotípusának esetleges variabilitásából adódó hibás értékeléseket. Másrészt ilyen módon az egész állatra nézve letális vagy egyéb módon káros ektopikus génkifejeződések hatását is lehet vizsgálni a különböző szövetekből származó egyedi sejteken.

A klónsejteket zsírtestben generáltuk a szintén élesztőből származó Flp-FRT rendszer felhasználásával. Az Flp egy helyspecifikus rekombináza (flippase), az FRT (Flp recombination target) pedig ennek a rekombináznak a felismerési helye. A rekombináza génjét egy hővel indukálható (*hsp70*, heat shock protein 70) promóter után építették (Golic 1990), így nagyon egyszerűen, magasabb hőmérséklettel ki lehet váltani az Flp expresszióját. Ekkor az Flp valamekkora valószínűséggel a genomban található FRT-helyek között rekombinációt generál.

A genetikai mozaik állatok úgy jönnek létre, hogy az embrionális korban hősök nélkül is alacsony szinten kifejeződő Flp bizonyos hatékonysággal kivágja a két FRT-hely közé eső „távtartó” (úgynevezett CD2 spacer) szekvenciát, és a szabad DNS-végeket rekombinálva az addig szeparált konstitutívan aktív aktin promótert és a Gal4 gént egymás közelébe hozza (**14. ábra**). Az ezek után átíródó Gal4 a genomban található UAS szekvenciákhoz kötve egyrészt beindítja egy GFP-riporter szintézisét (ami a rekombinációs

esemény bekövetkeztét jelzi), másrészt tetszőleges gének, mutáns allélok vagy RNSi-t kiváltó transzgenek transzkripcióját. Ehhez természetesen speciális transzgenikus *Drosophila* törzsekre van szükség, amelyek tartalmazzák mind a szabályozott Flp-gént, mind az FRT-helyekkel elválasztott aktin promotert és Gal4 helyet, valamint az UAS-GFP riportert is (lásd a **12. ábra** *hs-Flp-s* törzseit). A klonálisan kifejezteni kívánt transzgént keresztezéssel lehet a fenti genetikai elemek mellé, ugyanazon utódállat genomjába juttatni.



14. ábra RNSi mozaikos (klonális) indukciója az Flp/FRT rendszer segítségével

Molekuláris klónozás és embrió-injektálás

A 98. pozícióban cisztein/alanin cserét okozó TGC→GCC mutációt tartalmazó, teljes hosszúságú *Drosophila* Atg4[C98A] fehérjét kódoló szekvenciát a Genscript szintetizálta. Utána a mutációt tartalmazó DNS EcoRI és XhoI restrikciós hasítóhelyekre a pUAST vektorba lett klónozva. Ez a *Drosophila* embriók transzformálására általánosan alkalmazott vektor P-elemből származó szakaszokat tartalmaz, ezért képes a genomba inszertálódni, valamint UAS szekvenciák szabályozzák a klónozási helyre beépített DNS kifejeződését, így irányított expresszióra alkalmas. A pUAST-Atg4[C98A] konstrukció *Drosophila* embriókba transzformálását a Bestgene végezte.

Poliklonális anti-p62 és anti-GFP ellenanyag előállítása

A poliklonális anti-p62 ellenanyagot a 297.-311. pozíciójú aminosavakat tartalmazó PRTEDPVTTTPRSTQ peptid antigén injektálásával a Genscript termeltette nyulakban, majd tisztította affinitás-kromatográfiával. A poliklonális anti-GFP ellenanyagot laboratóriumunkban termeltettük patkányokban, a standard protokollnak megfelelően Freund adjuváns segítségével (Sigma). A patkányok a Qiaexpress (Qiagen) expressziós rendszer protokollja szerint, *E. coli*-ban expresszált, 6xHis-toldalék segítségével Ni-affinitás oszlopon tisztított eGFP-vel lettek immunizálva.

Western-blot

Western-blot analízisek esetében a kiválasztott minta - legyen az teljes lárva, preparált zsírtest, izolált imágófej stb. - 10 mg-jához 100 µl PBS-t, 100µl 2x Laemmlis mintafelvívő oldatot és 1:100 arányban proteáz inhibitorot adtunk (Roche). Az elegyet 5 percig 100°C-on forraltuk, homogenizáltuk, újabb 5 percig forraltuk, míg végül lecentrifugáltuk és a fehérjepreparátumot steril Eppendorf csőbe pipettáztuk. Egyenlő mennyiségű fehérjemintákat szeparáltunk 8%-os poliakrilamid gélen elektroforézissel (Myers, Lumelsky és mtsai 1985), majd Immobilon-P PVDF membránra (Millipore) vittük át a megfelelő pufferben (0,025 M Trizma base, 0,2 M Glycin, 10% metanol). A membránokat 1 órán át blokkoltuk 3%-os tej/TBS pufferben (sovány tejpor, 0,1 M Trizma base-ben oldva), majd 3x5 percig mostuk TBST-ben (0,025 M pH7,5 Trizma base, 0,9% NaCl, 0,1% Tween 20). Ezt követően a membránokat egy órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk 1,5%-os tejpor/TBST oldatban az elsődleges ellenanyag jelenlétében (a hígítási arányokat lásd alább), utána pedig 3x10 percig mostuk TBST-ben. Ezután a membránokat újabb egy

órán át inkubáltuk a megfelelő - kecske anti-patkány (Sigma), illetve kecske anti-egér és anti-nyúl (Millipore) - alkalikus foszfatázzal konjugált másodlagos ellenanyagokkal, 1,5%-os tejpor/TBST oldatban, 1:10000 hígításban. A blottokat 3x10 percig mostuk TBST-ben, majd Immobilon Western Chemiluminescent AP szubsztráttal (Millipore) inkubáltuk. A blottokat Super RX filmekkel (Fuji) hívtuk elő. A munkám során felhasznált elsődleges ellenanyagok és hígításaik: poliklonális nyúl anti-p62 1:8000; monoklonális egér anti-tubulin AA4.3 (DSHB) 1:200; poliklonális patkány anti-GFP 1:10000.

Immunhisztokémia

A táplálkozó korú L3F lárvák kutikuláját felnyitottuk, kifordítottuk és a feltárt belső szöveteket 3,7%-os paraformaldehid/PBS oldatban 4°C-on fixáltuk egy éjszakán keresztül. Másnap a mintákat 2 órán át PBS-ben mostuk, majd 15 percig permeabilizáltuk PBTX-DOC (PBS 0,1%, Triton X-100, 0,05% nátrium-dezoxikolat) oldatban, majd 3 órán át blokkoltuk 3%-os kecskeszérumot tartalmazó PBTX-DOC-ban. A blokkolás után a mintákat egy egész éjszakán át inkubáltuk 4°C-on az elsődleges ellenanyagot is tartalmazó (hígításokat lásd alább) 1% kecskeszérum/PBTX-DOC oldatban. A mintákat 3x30 percig mostuk PBTX-DOC-ban, majd szobahőmérsékleten 4 órán át inkubáltuk a másodlagos ellenanyaggal (hígításokat lásd alább) 1% kecskeszérum/PBTX-DOC oldatban. Végül a mintákat 2x20 percig mostuk először PBTX-DOC majd később PBS oldatban. A felhasznált elsődleges és másodlagos ellenanyagok és hígításuk: nyúl anti-p62 1:2000 (Pircs, Nagy és mtsai 2012), csirke anti-GFP 1:1500, Alexa 488-konjugált kecske anti-csirke 1:1500, Alexa 546-konjugált kecske anti-nyúl 1:1500, Alexa 647-konjugált kecske anti-nyúl 1:1500 (valamennyi az Invitrogen-től). A képeket Plan-NeoFluar 20x 0.5 NA és 40x 0.75 NA objektívekkel, AxioCam Mrm kamerával valamint ApoTome2 szemikonfokális griddel felszerelt Zeiss AxioImager M2 mikroszkóppal és AxioVision 4.8.2.0 szoftverrel készítettük a következő alfejezetben leírtak szerint.

Lárvális szövetek vizsgálata, mikroszkópia

A lárvákból kiboncolt zsírtesteket először 100 µM LysoTracker Red (Invitrogen) vitális festékben inkubáltuk 10 percig, utána az elkészített preparátumokat 50% PBS/glicerin 0,2 µM DAPI (Sigma) oldattal fedtük le. A képeket Plan-NeoFluar 20x 0.5 NA és 40x 0.75 NA objektívekkel, AxioCam Mrm kamerával valamint ApoTome2 szemikonfokális griddel felszerelt Zeiss AxioImager M2 mikroszkóppal és AxioVs40 4.8.2.0 szoftverrel

készítettük. Az Axiovision szoftvert MinMax beállítással használtuk. A Lysotrackerrel festett mintákat 20-szoros, minden mást 40-szeres objektívvel fotóztunk. A p62 festések esetében a Z-stack beállítást használtuk 3-4 szelettel, 0,55 µm-es intervallumokkal.

Elektronmikroszkópos vizsgálatok

A hs-Flp; UAS-p62-GFP/+; Act>CD2>Gal4, UAS-Dcr2/+, a hs-Flp; UAS-Dcr2/+; Act>CD2>Gal4, UAS-GFPnls/UAS-Atg4[C98A] illetve a hs-Flp; UAS-Dcr2/+; Act>CD2>Gal4, UAS-GFPnls, r4-mCherry-Atg8a/UAS-Atg4[C98A] genotípusú lárvákat 1 órán keresztül hősokkoltuk 37°C-on, hogy aktiváljuk az Flp kifejeződését, így a CD2-kazetta kivágásával a Gal4 expresszióját minden sejtben. A lárvákat másnap fixáltuk 4°C-on 3,2% paraformaldehid, 1% glutáraldehid, 1% szacharóz, 0,028% CaCl₂ és 0,1N nátrium-kakodilát oldatában (pH=7,4). Ezután 1 órán át fixáltuk a mintákat 0,5%-os ozmium-tetroxid oldatban, majd Durcupan (Fluka) gyantába ágyaztuk be a gyártó által ajánlott protokollt követve. A 70 nm-es metszeteket Reynold-féle ólom-citrát oldattal festettük, és Olympus Morada 11 megapixeles kamerával felszerelt JEOL JEM-1011 mikroszkóppal fotóztuk iTEM szoftver (Olympus) felhasználásával.

Statistika

A Western-blottok beolvasott képét Adobe Photoshop szoftver segítségével invertáltuk, majd ImageJ program segítségével értékeltük ki. A legerősebb intenzitású csíkhöz hasonlítottuk a többi jelet. A p62-re kapott középtértékeket a tubulin átlagértékeihez normalizáltuk, majd a többi expressziós szintet a kontroll mintához hasonlítva ábrázoltuk.

A p62-GFP intenzitásának meghatározása során feljegyeztük a mikroszkópos képek expozíciós idejét ms-ban a GFP csatornán. Majd ezeket az adatokat átlagoltuk és a kontroll lárvák esetében kapott intenzitásra normalizáltuk. A grafikonon az 1/normalizált intenzitásértéket ábrázoltuk és ezeket az adatokat vettük a p62 szintjének.

A többi mikroszkópos kép statisztikai elemzése az ImageJ szoftverrel történt. Először átváltottuk a képeket RGB Color-ról RGB Stack-re. A mutánsok esetében tetszőleges 300x300 dpi-s területet jelöltünk ki a piros csatornával kapott képen, majd megállapítottuk a küszöbértéket a zaj kiszűrésének érdekében, minden esetben külön-külön, az adott jelintenzitásnak megfelelően. Minden területet analizáltunk majd feljegyeztük a területen előforduló pöttyök számát és átlagos méretét (pixel²).

Genotípusonként 4-6 állatból minimum 10 képet értékelünk ki. A szám/méret adatokat Excel táblázatban összegeztük és normalizáltuk a kontroll állatok értékeihez (az átlag szám és méret a kontroll állatok esetében 1).

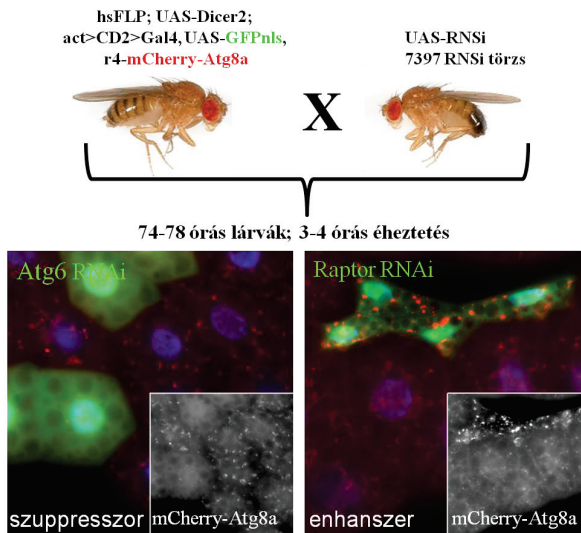
A klonális kísérletek esetében a klónsejteket mindig a szomszédos kontroll sejtekhez hasonlítottuk. Először itt is átállítottuk a képeket RGB Color-ról RGB Stack-re. Majd a megfelelő csatornára állva megállapítottuk a küszöbértéket, és kiértékeljük a zölddel jelölt klónsejteket és a mellette lévő kontroll sejteket. A GFP-pozitív sejteket a Freehand selection nevű alkalmazással rajzoltuk körbe és az információt hordozó csatornán értékeljük ki, meghatározva a pöttyek számát és átlagos méretét (pixel²-ben). A mutánsokhoz hasonlóan itt is 4-6 állatból vett 10 klónsejtet és hozzá tartozó kontroll sejtet analizáltunk minden genotípus esetében. A GFP-pozitív sejtekre jellemző szám/méret értékeket a hozzájuk tartozó kontroll sejtek szám/méret adatsoraihoz hasonlítottuk és normalizáltuk.

Minden esetben Student-féle kétfarkú páros t-próbával számoltuk ki a p-értékeket. Szignifikáns eltérésnek a $p < 0,05$ értékű különbséget tekintettük. Az egy csillag $0,05 > p > 0,01$ érték között, a két csillag $p < 0,01$ esetében fordult elő. A statisztikai elemzések pontos értékeit a Melléklet című fejezet táblázataiban összegeztem.

IV. EREDMÉNYEK

Az autofágiában szerepet játszó gének azonosítása in vivo teljes genom RNSi szűréssel Drosophilában

Munkám során először - két másik kollégámmal együtt - az autofágiában szerepet játszó gének azonosítására és jellemzésére irányuló kísérleteket végeztem. A konzervált genom több mint 90 %-át kitevő 7118 egyedi gén funkcióvesztéses fenotípusát vizsgáltuk meg 7397 különböző törzsből származó genetikai mozaik állat lárvális zsírtestsejtjeiben. A genetikai mozaikok létrehozását (az Flp/FRT rendszer alkalmazásával) az Anyagok és Módszerek fejezet, a keresztezések sémáját a **15. ábra** mutatja be. A kapott eredményeket mindhárman vakon értékeltük ki (nem ismertük az egyes vizsgált törzsek genotípusát) ezzel együtt is az autofág folyamatban szereplő gének megtalálásának valószínűsége 84%-os lett, kevesebb, mint 2%-os fals pozitív és 16 %-os fals negatív ráta mellett (az értékeket egy 50 génből álló előzetes screen alapján határoztuk meg, a fals negatív rátát feltételezett extracelluláris fehérjéket kódoló géneket vizsgálva becsültük). A vizsgálat sorozatot négy lépésben végeztük el.

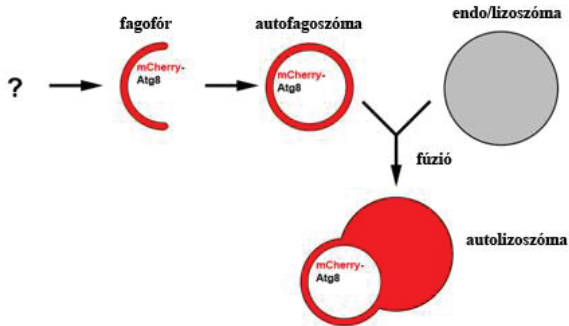


15. ábra Fent: A teljes genom RNSi szűréshez végrehajtott keresztezések sémája. Lent: egy-egy példa szuppresszor és enhanszer hatású RNSi-ra

1. Vizsgálataink első szakaszában genomjukban a klonális rendszer elemeit (hs-Flp, kivágódó CD-kazettával elválasztott aktin promóter és Gal4 gén, az általános r4 promóter mögött kifejeződő mCherry-Atg8a valamint az UAS-szabályozott GFP-marker és Dicer2 gén) tartalmazó szüzeket kereszteztük be a VDRC-s illetve a bloomingtoni TRIP-es RNSi törzsekből válogatott hímekkel (**15. ábra**). Az mCherry-Atg8a fúziós fehérje kiváló riporter, hiszen szinte minden autofág struktúrát jelöl (lásd **16. ábra**: valamennyi pirossal jelölt struktúra mCherry-Atg8a pozitív).

A keresztezésből származó L3 táplálkozó lárvák zsírtestjeit az autofágia indukálása érdekében 3-4 óras éheztetés után vizsgáltuk fluoreszcens fénymikroszkóppal. Az így kapott képeket mindhárman, egymástól függetlenül kiértékeljük. Minden törzs egy -2 és egy +2 közötti egész számot kapott aszerint, hogy a környező kontroll szövethez képest a géncsendesített (zöld) sejtek jóval több (+2), több (+1), megegyező mennyiségű (0), kevesebb (-1) vagy jóval kevesebb (-2) Atg8a-pozitív pöttyet tartalmaztak-e. Számokkal jellemeztük még a sejméretet, valamint a pöttyök fluoreszcens intenzitását és méretét is.

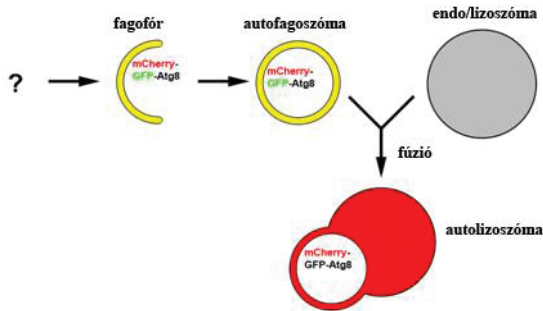
A negatív értékű, tehát a klónokban kevesebb mCherry-pöttyet mutató RNSi vonalak kerültek a szuppresszor csoportba (mint például a legtöbb Atg gén RNSi-t hordozó törzs), míg a pozitív értékű vonalak lettek az enhanszerek (mint például a Raptor RNSi törzs) (**15. ábra**). Összesen 488 autofágia-szuppresszor és 559 autofágia-enhanszer fenotípusú RNSi törzset azonosítottunk. A szuppresszor csoport tagjai által azonosított géneknek szerepe lehet az autofág struktúrák kialakításában (hiszen hiányukban gátlódik az autofágia), míg az enhanszerek fenotípusa arra utalhat, hogy a csendesített gének hiányában az autofágia indukálódik.



16. ábra Az mCherry-Atg8a riporter által jelölt autofág struktúrák (Készítette: Juhász Gábor)

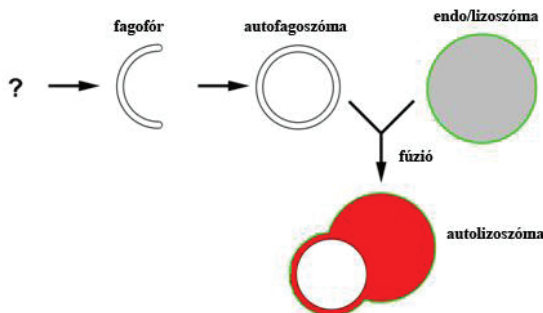
2. Az eddigiekben detektált mCherry-Atg8a jel csak arról adott információt, hogy a sejtekben éhezés hatására kialakultak-e autofág struktúrák. Ezekről a struktúrákról azonban nem lehetett eldönteni, hogy fagofórok, autofagoszómák vagy autolizoszómák. A szűrés első lépése során kapott, 1000-nél is több találat számát ezért egy második vizsgálattal szűkítettük.

Ebben az esetben az általunk használt riporter-konstrukció az autofág fluxus vizsgálatára alkalmas, fluoreszcensen „tandem” jelölt mCherry-GFP-Atg8a fúziós fehérje volt (17. ábra). Az éheztetés hatására normálisan zajló autofágia (normális autofág fluxus) esetében jórészt csak az autolizoszómákra jellemző, mCherry-kibocsátotta piros jelet lehet detektálni, ugyanis az autolizoszómák savas közegében a GFP gyorsabban inaktiválódik. Amikor azonban az autofág fluxus hibás vagy gátolt, és csak autofagoszómák alakulnak ki (vagy az autolizoszómák nem emésztenek megfelelően), sárga jelet kaptunk, mert a fagofórokon és az autofagoszómákon egyaránt jelen van a zöld GFP és a piros mCherry. Ily módon az első vizsgálat során egységesen enhanszernek minősített gének közül ki lehet választani azokat, amelyek hiánya valójában nem vagy nem csak aktiválta az autofág folyamatot, hanem valamelyik lépésnél megakasztotta azt, és ez is okozhatta az autofág struktúrák számának növekedését.



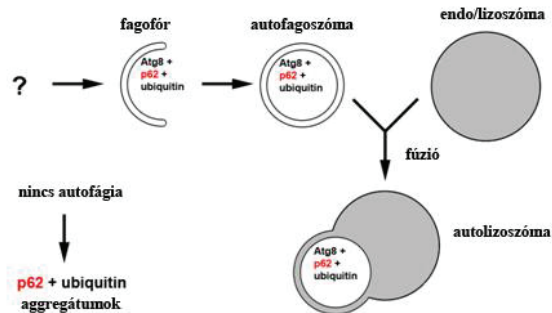
17. ábra Az mCherry-GFP-Atg8a riporter által eltérően jelölt autofág struktúrák (Készítette: Juhász Gábor)

3. Eddig a pontig csak fluoreszcens riportereket alkalmaztunk a szűrés során. A továbbiakban egy széles körben elterjedt vitális festéket, a LysoTracker Red-et (LTR) is felhasználtuk, amely a savas beltartalmú vezikulákat, így éheztetett állatok zsírtestében az emésztő autolizozómákat jelöli. Ennél a vizsgálatnál az RNSi törzsek hímeit egy hs-Flp; UAS-Lamp1-GFP; Act>CD2>Gal4, UAS-Dcr2 genotípusú törzs szüzeivel kereszteztük be, így a klónsejtek Lamp1-GFP pozitivitást mutattak (18. ábra). A Lamp1-GFP egy lizoszóma-specifikus membránprotein, ezért szintén alkalmazható a savas pH-jú autofág kompartmentek jelölésére.



18. ábra Az LTR festékekkel és a Lamp1-GFP jelöléssel megkülönböztethető autofág struktúrák (Készítette: Juhász Gábor)

4. A kísérletsorozat legvégén immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk a szelektív autofágia markerként általánosan elismert poliklonális anti-p62 ellenanyag felhasználásával, amelyet laboratóriumunk megrendelésére a Genscript cég állított elő. A p62 szintjének monitorozása ideális eszköz az alapszintű autofágia folyamatában szabályozó szereppel bíró gének szűrésére. Szintje negatívan korrelál az autofágia mértékével, gátolt alapszintű autofág folyamat esetében mennyisége jelentősen megnő a jól táplált lárvákban (**19. ábra**). Az általunk megrendelt és az RNSi törzsek szűrése során is használt p62 ellenanyag előzetes tesztelését a következő fejezetben mutatom be részletesen.

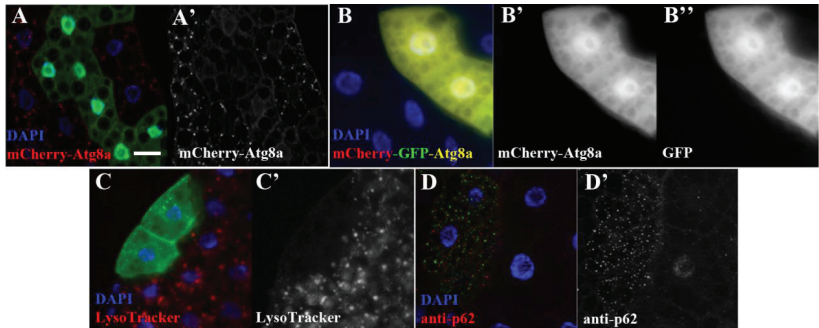


19. ábra Az anti-p62 ellenanyag által jelölt autofág struktúrák (Készítette: Juhász Gábor)

Eredményeink értékelése során az RNSi hatására jelentkező fenotípusos jelek, azaz az autofágiára gyakorolt hatás alapján három jól elkülöníthető csoportra osztottuk fel a géneket.

Az első halmaz 85 génnel alkotja az ATG-szerű gének és az „upstream” pozitív regulátorok csoportját (*ATG-csoport*). Ezeknek a géneknek az esetében az RNSi hatására a p62 immunfestés kivételével (amely ellentétesen korrelál az autofágia mértékével) nem kaptunk egyik módszerrel sem pöttyöket (**20. ábra**). Az ebbe a csoportba sorolt gének tehát szükségesek az Atg8a pre-autofagoszómális jelenlétéhez, hiszen csendesítésük következménye az, hogy éheztetés hatására sem indukálódik autofágia: a kontroll sejtekkel ellentétben semmilyen autofág struktúra nem látható az RNSi klónsejtekben (**20. ábra** A, C). Mivel az autofágia gátolt, nincsenek sem piros, sem sárga jelek a fluxus kísérlet lárváinak zsírtestjében sem (**20. ábra** B). A p62-pozitív struktúrákból viszont rengeteg van

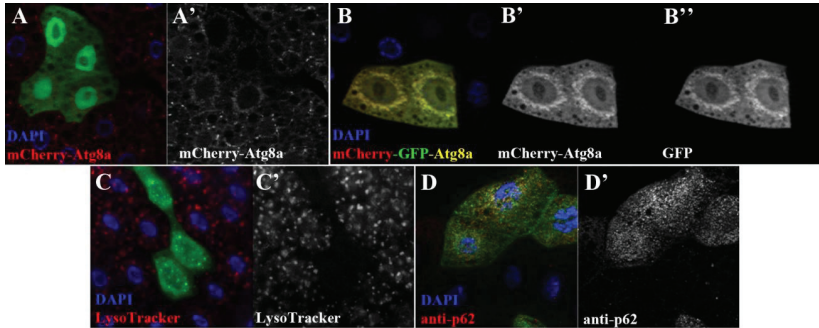
jelen az RNSi klónokban, mert autofágia hiányában sok aggregátum halmozódik fel (**20. ábra D**). Ide soroltunk be sok, az autofágiában már leírt szerepű géneket, köztük a legtöbb központi autofág gént – ezeket vizsgálataink pozitív kontrolljainak is tekinthetjük. Sikerült azonosítunk a bioszintetikus transzportban részt vevő TRAPP-komplex tagjait (Nazarko, Huang és mtsai 2005), dineineket, és számos olyan gént, amelynek humán homológját valamilyen emberi betegséggel már összefüggésbe hozták.



20. ábra Az ATG-csoport (FIP200 RNSi) fenotípusos jellemzői

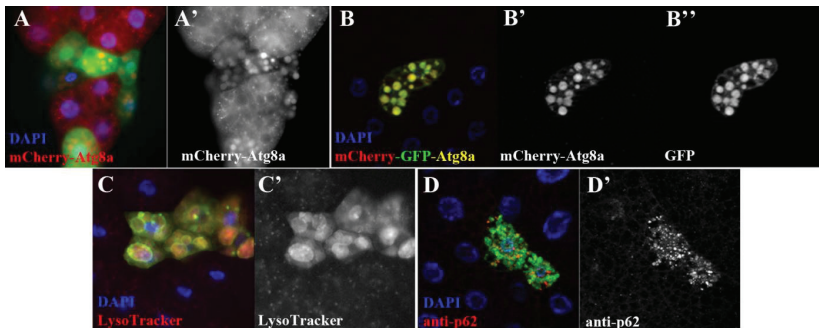
A második és egyben legkisebb az *autofagoszóma (AP)*-csoport, mindössze 19 génnel. Ezeknek a géneknek a hiányában az autofagoszómák érése gátolt, nem képesek az autolizoszómákkal való kapcsolódásra és/vagy fúzióra. Ide soroltuk be az endocitózis mellett az autofágiában is fontos szerepet játszó ESCRT géneket (Hurley 2010) és a C-típusú Vps komplex tagjait (Nickerson, Brett és mtsai 2009). Ezekben az RNSi sejtekben számos apró, perinukleárisan elhelyezkedő mCherry-Atg8a jelet láthatunk (**21. ábra A, B**). A flux-vizsgálat során sok, szintén apró, a teljes mCherry-GFP-Atg8a fúziós fehérje jelenlétére utaló sárga pötty halmozódott fel. Ez azt jelzi, hogy az autofagoszómák kialakulnak, de nem képesek lizoszómákkal fuzionálni és savas autolizoszómákat létrehozni (**21. ábra B**). A savas környezet hiánya miatt nem jelennek meg LTR-pozitív struktúrák (**21. ábra C**). A p62 ebben az esetben is felhalmozódik és aggregálódik, hiszen az autofág folyamat végbemenetele az AP-csoport esetében is gátolt (**21. ábra D**). Nemrégiben publikáltuk a screen során azonosított, az általunk AP csoportba beosztott SNARE fehérjéket kódoló gének, azaz a Syntaxin 17, az ubisnap (SNAP29) és a VAMP7 (CG1599) részletes vizsgálatát (Takats, Nagy és mtsai 2013). A C típusú VPS komplex szerepét leíró adatainkról szóló kézirat jelenleg íródik. Ezekhez a munkákhoz a különböző

immunjelölések elvégzésével és kiértékelésével járultam hozzá. Az eredmények Takáts Szabolcs kollégám doktori disszertációjában lesznek részletesen bemutatva.



21. ábra Az AP-csoport (Vps16a) fenotípusos jellemzői

A harmadik és egyben a legnagyobb az *autolizoszóma (AL)*-csoport, 120 RNSi géncsendesített vonalból áll. Az AL tagjainak hiányában az autolizoszomális lebontás sérült. Ide tartoznak a lizoszomális protonpumpát kódoló Vha gének, amelyek protonokat pumpálnak a lizoszómába és ezzel megteremtik a hidrolázok és különféle emésztőenzimek számára szükséges savas környezetet. A fenotípusos jellegeket tekintve ezekben a sejtekben nagyméretű piros mCherry-Atg8a (22. ábra A, B), LTR (22. ábra C) és nagyméretű sárga mCherry-GFP-Atg8a jelet láthatunk (22. ábra B). A p62 a gátolt alapszintű autofágia miatt ebben az esetben is felhalmozódik (22. ábra D).



22. ábra Az AL-csoport (Vha16-1) fenotípusos jellemzői

Összegezve: a 7397 letesztelt RNSi törzs elsődleges szűrésével kapott 1047 vonalat sikerült 224, fenotípus alapján jól besorolható génre leszűkítenünk, amelyek funkcióját a

labor részletesen tudja majd vizsgálni az elkövetkező években. A kapott találatok nagy részét független RNSi vonalakkal (VDRC törzseket TRIP-pel vagy TRIP-es vonalakat VDRC törzsekkel) is tudtuk verifikálni.

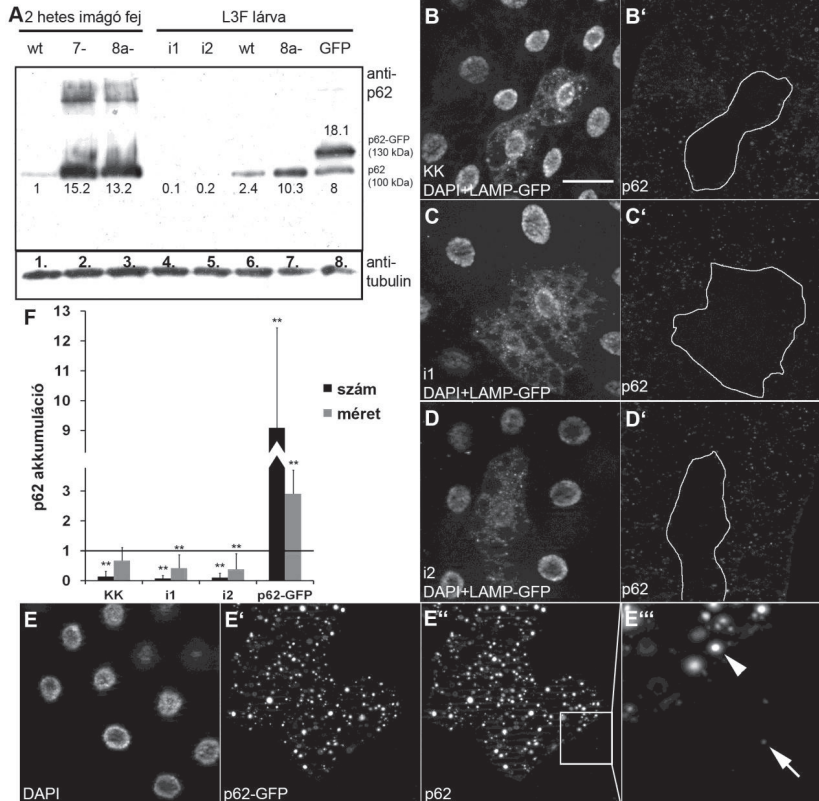
Az új p62 ellenanyag tesztelése

Mára a szelektív autofágia-marker p62 kimutatása a különböző mutáns és RNSi-csendesített autofág fenotípusok karakterizálása során rendkívül elterjedt eszközzé vált. Az előbb említett RNSi screen-ben azonosított fenotípusok teljesebb karakterizálása, valamint szinte minden még folyamatban levő és jövőbeli projektben is rendkívül hasznos egy ilyen reagens. Ezért mi is készítettünk egy nyúlban termeltetett poliklonális ellenanyagot a *Drosophila* p62 fehérje ellen. L3 táplálkozó teljes lárvákból, valamint imágófejekből származó fehérjeminták Western blot vizsgálata során a szérum egyetlen csíkot adott 100 kDa méretnél (**23. ábra A**). Két független p62 RNSi vonal (i1: HMS00551, i2: HMS00938) lárváiból készített minták Western blotjain a 100 kDa-os sáv intenzitása (a tubulin kontrollra normalizálva) több mint 10-ed részére csökkent a vad típusból származó kontroll mintához képest (**23. ábra A** panel 4., 5. és 6. oszlop). Az Atg8 és Atg7 null mutánsok (lárva és/vagy imágófej) mintáinak p62-szintje ezzel szemben az autofágia hiányának következtében lényegesen megnövekedett (**23. ábra A** panel 1., 2., 3., 6., 7. oszlop). A p62-GFP fehérjét expresszáló teljes állatból származó mintákban 2 csíkot kaptunk: egy 100 kDa-os, a „szabad” p62-nek, és egy, a fúzió miatt nagyobb méretű, 130 kDa-os p62-GFP-nek megfelelő jelet (**23. ábra A** panel 8. oszlop). Érdekes eredmény, hogy a p62-GFP mintákban megemelkedett a szabad p62 szintje a vad típushoz képest (**23. ábra A** panel 6., 8. oszlop). Valószínű, hogy a p62-GFP riporter túlexpresszálatása erősen serkenti az aggregátumok kialakulását, ezekbe belekerülhet az endogén p62 is, amely a lebomlást így elkerülve megnöveli a kimutatható 100 kDa p62 mennyiségét. Ezek a kísérletek igazolták, hogy a birtokunkban lévő anti-p62 ellenanyag megfelelően specifikus eredményt szolgáltat Western blot analízis során.

A továbbiakban immunhisztokémiai vizsgálatokkal igazoltuk a p62 ellenanyag specificitását. Az L3 táplálkozó lárvák teljes zsirtestjében a detektált endogén p62 szintje a kontroll szövethez képest jelentősen lecsökkent a csendesített klónsejtben, mindhárom vizsgált p62 RNSi vonalban (**23. ábra B, C, D, F**). A p62-GFP-t expresszáló állatokban nagyméretű aggregátumok jelentek meg, a kontrollhoz viszonyítva 9-szer több és 2,8-szor nagyobb pöttyeket láthatunk (**23. ábra E, F**).

Ezek az eredmények pontosan megfeleltek várakozásainknak. Hiszen amíg a normálisan működő bazális autofágia esetében csak néhány, apró p62 pozitív jelet láthatunk (környező kontroll sejtek), p62-hiányos sejtekben ezek a jelek szinte teljesen

eltűnnek, míg a p62-t túlermelő lárvákban jelentősen megnő a számuk és a méretük is (23. ábra E’’’).



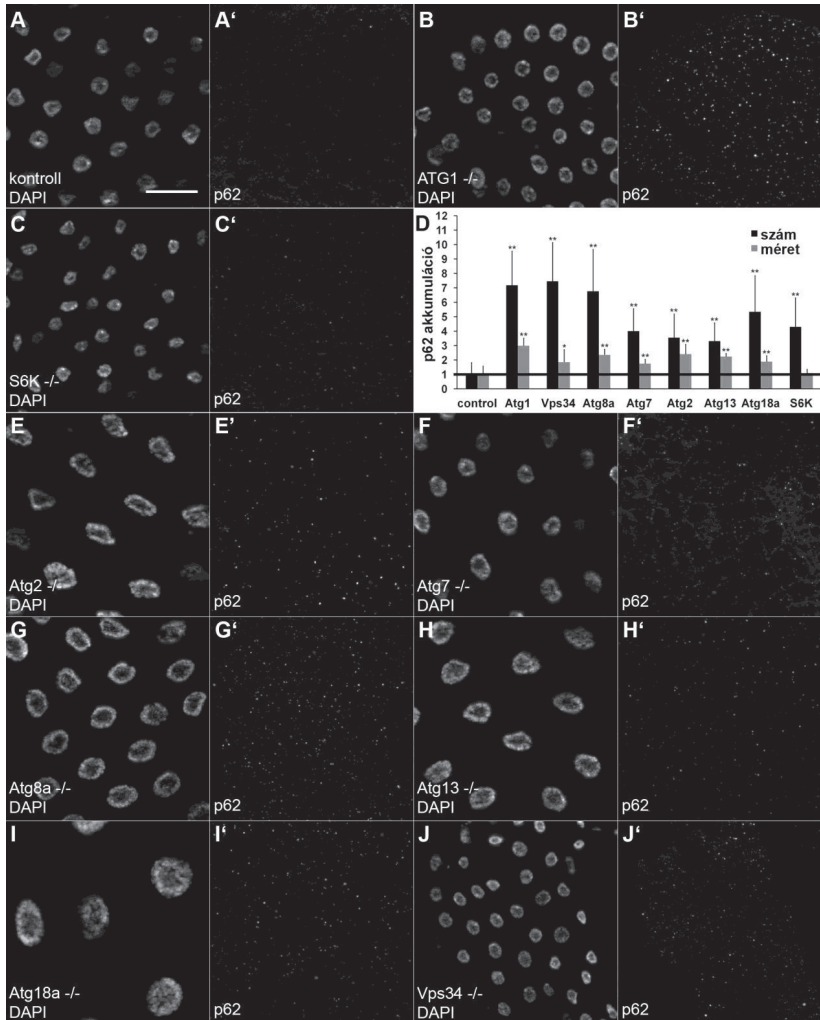
23. ábra A p62 szintjének vizsgálata Atg mutánsokban, p62 RNSi és p62-t túlermelő sejtekben. **A B** képen látható skála 30 μm -nek felel meg a **B, C, D, E** paneleken. **A** genotípusok: **A**: oszlopok: **1**: w [1118], **2**: *Atg7[d77]/Atg7[d14]*, **3**: *Atg8a[d4]*, **4**: *UbiGal4/+*; *p62[HMS00551]/+*, **5**: *UbiGal4/+*; *p62[HMS00938]/+*, **6**: w[1118], **7**: *Atg8a[d4]*, **8**: *cgGal4/UAS-p62-GFP*. Az anti-p62 ellenanyaggal kimutatott csíkok mellett a számok az adott sáv intenzitását jelölik. **B**: *hs-Flp*; *UAS-LampGFP/p62[KK108193]*; *Act.CD2.Gal4*, *UAS-Dcr2/+*; **C**: *hs-Flp*; *UAS-LampGFP/+*; *Act>CD2>Gal4*, *UAS-Dcr2/p62[HMS00551]*; **D**: *hs-Flp*; *UASLampGFP/+*; *Act>CD2 >Gal4*, *UAS-Dcr2/p62[HMS00938]*; **E**: *hsFlp*; *UAS-p62-GFP/+*; *Act>CD2 >Gal4,UAS-Dcr2/+*. **A**

LampGFP riporter a klónsejteket, ezen belül is a *Lamp1*-et tartalmazó autofág struktúrákat jelöli. **F:** **A B, C, D, E** képek eredményeinek statisztikai kiértékelése Student-féle kétfarkú páros *t*-próbával. Szignifikáns eltérésnek a $p < 0,05$ értékű különbséget tekintettük. Az egy csillag $0,05 > p > 0,01$ érték között, a két csillag $p < 0,01$ esetében fordult elő.

Az endogén p62 akkumulációjának vizsgálata S6K és Atg mutánsokban

Emlős adatok és egy *Drosophila* publikáció alapján várható volt, hogy a nem megfelelően működő bazális autofágia miatt megnövekszik a p62 aggregációjának mértéke (Nezis, Simonsen és mtsai 2008, Bjorkoy, Lamark és mtsai 2009), ezért megvizsgáltuk néhány ismert autofág null mutáns immunhisztokémiai fenotípusát (**24. ábra**). Mind a p62-pozitív pöttyek száma, mind méretük szignifikánsan megnövekedett a kontrollhoz képest (**24. ábra** A, D) néhány központi Atg-gén null mutáns L3F lárváinak zsírtestsejtjeiben. Ezek a következők: az Atg1 kináz komplexhez tartozó Atg1 és Atg13 (**24. ábra** B, H) (Scott, Juhasz és mtsai 2007, Chang és Neufeld 2009); a lipid kináz komplexhez tartozó Vps34 (**24. ábra** J) (Juhasz, Hill és mtsai 2008); az Atg2 és Atg18a (**24. ábra** E, I) (Proikas-Cezanne, Waddell és mtsai 2004); valamint az ubiquitinszerű konjugációs rendszerhez tartozó Atg7 és Atg8a (**24. ábra** F, G) (Juhasz, Erdi és mtsai 2007, Scott, Juhasz és mtsai 2007).

Az S6 kináz (S6K) a TOR komplex egyik fiziológiás szubsztrátja, a TOR általi foszforilálás révén aktiválódik, ugyanakkor az aktív TOR gátolja az autofágiát is. Az S6K-t sokáig az autofágia inhibitorai közé sorolták, de később meglepő módon ezzel ellentétes eredmények születtek (Scott, Schuldiner és mtsai 2004, Klionsky, Meijer és mtsai 2005): kiderült, hogy a *Drosophila* S6K szükséges az éhezés-indukálta autofág válaszhoz. Eredményeink ez utóbbi megfigyeléseket igazolják, ugyanis az S6K-mutáns lárvákban megnőtt a p62 aggregátumok száma (bár a méretük nem), ami arra utal, hogy az S6K-nak szerepe van az autofágia indukciójában (**24. ábra** C, D).



24. ábra Az endogén p62 felhalmozódása S6K és különböző Atg-mutánsok zsírtestsejtjeiben. Az *A* képen látható skála 30 μ m-nek felel meg az *A*, *B*, *C*, *E*, *F*, *G*, *H*, *I*, *J* paneleken. A zsírtestek a következő genotípusú állatokból származtak: *A*: *w*[1118]; *B*: *Atg1*[25]; *C*: *S6K*[1-1]; *E*: *Atg2*[EP3697]/*Df*(3L)[*BSC119*]; *F*: *Atg7*[d77]/*Atg7*[d14]; *G*: *Atg8a*[d4]; *H*: *Atg13*[D81]; *I*: *Atg18a*[*KG03090*]/*Df*(3L)[*Exel6112*]; *J*: *Vps34*[*Dm22*]. *A*

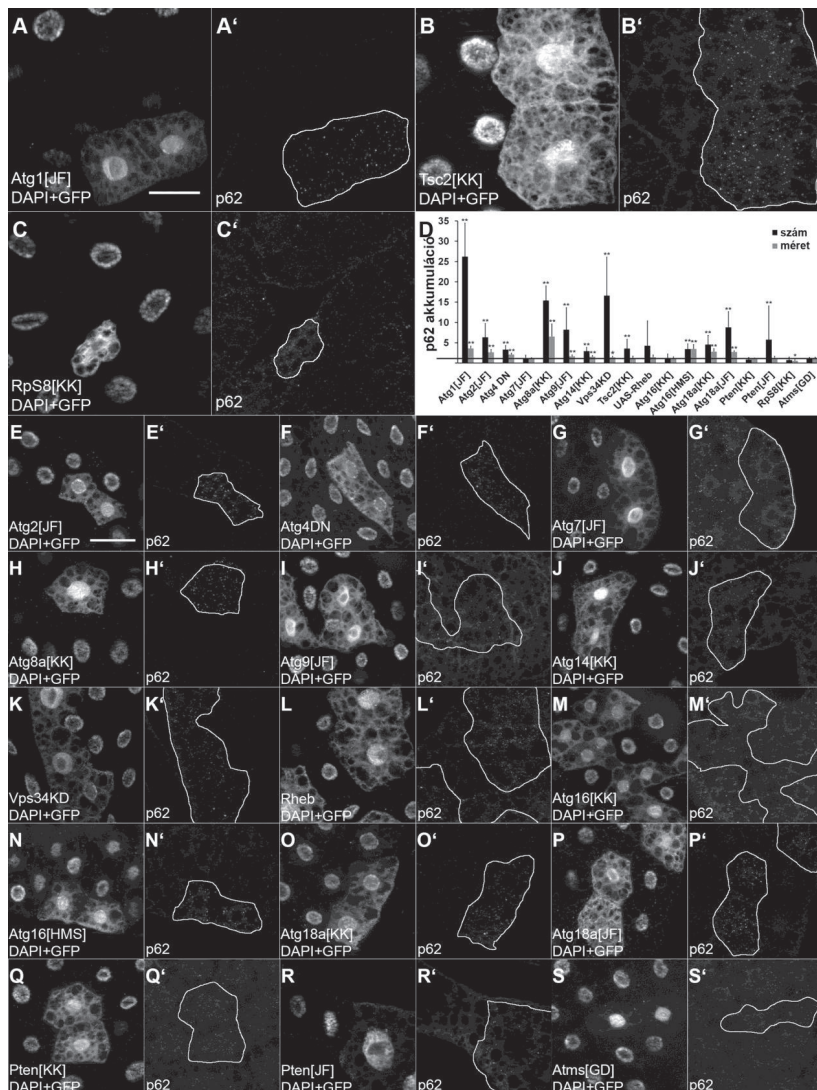
D panelen látható az *A, B, C, E, F, G, H, I, J* képek eredményeinek statisztikai kiértékelése Student-féle kétfarkú páros *t*-próbával. Szignifikáns eltérésnek a $p < 0,05$ értékű különbséget tekintettük. Az egy csillag $0,05 > p > 0,01$ érték között, a két csillag $p < 0,01$ esetben fordult elő.

Funkciójuk hiányában korai letalitást okozó gének bazális autofágiában betöltött szerepének vizsgálata mozaikos zsírtestekben, immuncitokémiai módszerekkel

A mutánsok zsírtestjének vizsgálata után mozaikos állatok zsírtest-klónsejtjeiben tanulmányoztuk immunhisztokémiai módszerrel néhány ismert, autofágiát szabályozó géntermék hatását a p62 szintjére (25. **ábra**). A klónsejtekben történő géncsendesítés lehetővé teszi, hogy akkor is vizsgálhassuk egy géntermék hiányának következményeit, ha az az egész állati szervezetben vagy akár csak a teljes szövetben az állat idő előtti pusztulásához vezetne.

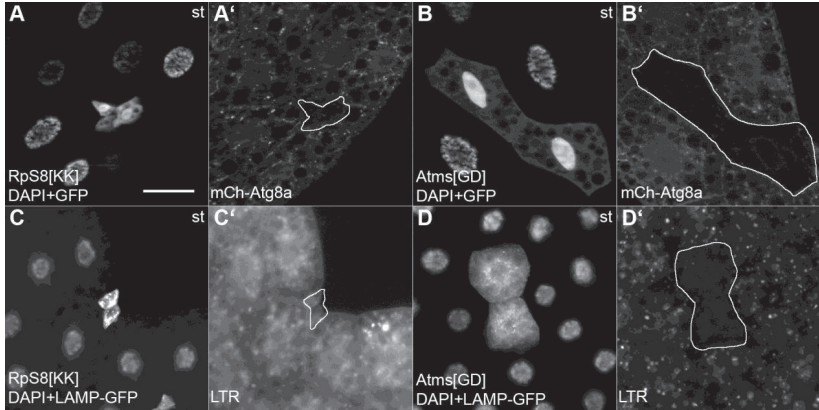
Az Atg1, Atg2, Atg8a, Atg9 vagy Atg14 RNSi-csendesítése (25. **ábra** A, E, H, I és J), vagy a domináns negatív Vps34 allél túltermelése (25. **ábra** K) (Juhász, Hill és mtsai 2008) egyaránt megnövekedett szintű p62-aggregációhoz vezetett. A TOR szignalizációs útvonalat aktiváló Rheb túltermelése (25. **ábra** L) vagy a Rheb inhibitorának, a TSC2-nek csendesítése (25. **ábra** B) is látszólag hasonló fenotípust eredményezett, bár ez a Rheb esetén nem volt statisztikailag szignifikáns. Az Atg7-RNSi hatására nem tapasztaltunk p62-felhalmozódást (25. **ábra** G), de ezt a megfigyelésünket igazolja, hogy ebben a törzsben maga a géncsendesítés is kevésbé hatékony a többi vonalhoz képest LTR és mCherry-Atg8a vizsgálataink alapján.

Számos olyan gént ismerünk, melyeknek olyan alapvető folyamatokban van szerepük, mint a transzkripció vagy a transláció. Nem meglepő, hogy ezek az általános kifejeződésű „háztartási” gének sok genomléptékű RNSi szűrés során találatként jelennek meg, pedig nagyrésük nem közvetlenül kapcsolódik a szűrés célját képező folyamathoz. Sok esetben ezen RNSi vonalak sejtjei annyira kisméretűek, hogy autofág fenotípusuk meghatározása szinte lehetetlenné válik. Ugyanakkor az RNSi-csendesített RNS polimeráz II-es komplex tagja, az antimeros (Atms) vagy a riboszómális kis alegység egyik tagja, az RpS8 erős találatnak számított az *in vivo* teljes genom RNSi szűrésünk eredményei között, mivel egyaránt gátolta az mCherry-Atg8a és az LTR-pöttyök kialakulását (26. **ábra**). Azonban az ezekből a törzsekből származó minták sejtjei nem mutattak p62 felhalmozódást (25. **ábra** C és S). Ezért a p62 vizsgálata (immunhisztokémiai vagy más módszerrel) egy potenciálisan alkalmazható eszköz lehet a nem specifikus, indirekten autofágiát befolyásoló gének kiszűrésére, vagyis a „zaj” és a „találatok” elkülönítésére.



25. ábra Az endogén p62 akkumulálódik autofágiát gátló géntermék (L panel) túlermelgetése, illetve az autofág folyamatban szerepet játszó géntermékek domináns negatív alléljának túlermelgetése (F és K panel) vagy RNSi-csendesítése hatására (összes

többi panel). *A csendesített géneket a feliratokban annak az RNSi-könyvtárnak a betűjelével jelöltem, amelyből az adott törzs származott ([KK], [GD], [JF] illetve [HMS]). Az A képen látható skála 30 µm-nek felel meg a A, B, C paneleken, míg az E képen lévő skála 40 µm-nek felel meg az E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S paneleken. A genotípusok: A: hs-Flp; UAS-Dcr2/+; Act>CD2>Gal4,UAS-GFPnls/Atg1[JF02273]; B: hs-Flp; UAS-Dcr2/ TSC2[KK103417]; Act>CD2>Gal4,UAS-GFPnls/+; C: hs-Flp; UAS-Dcr2/RpS8[KK106835]; Act>CD2>Gal4,UAS-GFPnls/+; E: hs-Flp; UAS-Dcr2/+; Act>CD2>Gal4,UAS-GFPnls/Atg2[JF02786]; F: hs-Flp; UAS-Dcr2/+; Act>CD2>Gal4,UAS-GFPnls/UAS-Atg4[C98A]; G: hs-Flp; UAS-Dcr2/+; Act>CD2>Gal4,UAS-GFPnls/Atg7[JF02787]; H: hs-Flp; UAS-Dcr2/Atg8a[KK109654]; Act>CD2>Gal4,UAS-GFPnls/+; I: hs-Flp; UAS-Dcr2/+; Act>CD2>Gal4,UAS-GFPnls/Atg9[JF02891]; J: hs-Flp; UAS-Dcr2/Atg14[KK108559]; Act>CD2>Gal4,UAS-GFPnls/+; K: hs-Flp; UAS-Dcr2/UAS-Vps34[KD]; Act>CD2>Gal4,UAS-GFPnls/+; L: hs-Flp; UAS-Dcr2/+; Act>CD2>Gal4,UAS-GFPnls/UAS-Rheb[EP50.084cre(w-)]; M: hs-Flp; UAS-Dcr2/Atg16[KK105993]; Act>CD2>Gal4,UAS-GFPnls/+; N: hs-Flp; UAS-Dcr2/+; Act>CD2>Gal4,UAS-GFPnls/Atg16[HMS01347]; O: hs-Flp; UAS-Dcr2/Atg18a[KK105366]; Act>CD2>Gal4,UAS-GFPnls/+; P: hs-Flp; UAS-Dcr2/+; Act>CD2>Gal4,UAS-GFPnls/Atg18a[JF02898]; Q: hs-Flp; UAS-Dcr2/Pten[KK101475]; Act>CD2>Gal4, UAS-GFPnls/+; R: hs-Flp; UAS-Dcr2/+; Act>CD2>Gal4,UAS-GFPnls/Pten[JF01987]; S: hs-Flp; UAS-Dcr2/Atms[GD20876]; Act>CD2>Gal4,UAS-GFPnls/+. A D panelen látható az A, B, C, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S képek eredményeinek statisztikai kiértékelése Student-féle kétfarkú páros t-próbával. Szignifikáns eltérésnek a $p < 0,05$ értékű különbséget tekintettük. Az egy csillag $0,05 > p > 0,01$ érték között, a két csillag $p < 0,01$ esetében fordult elő.*

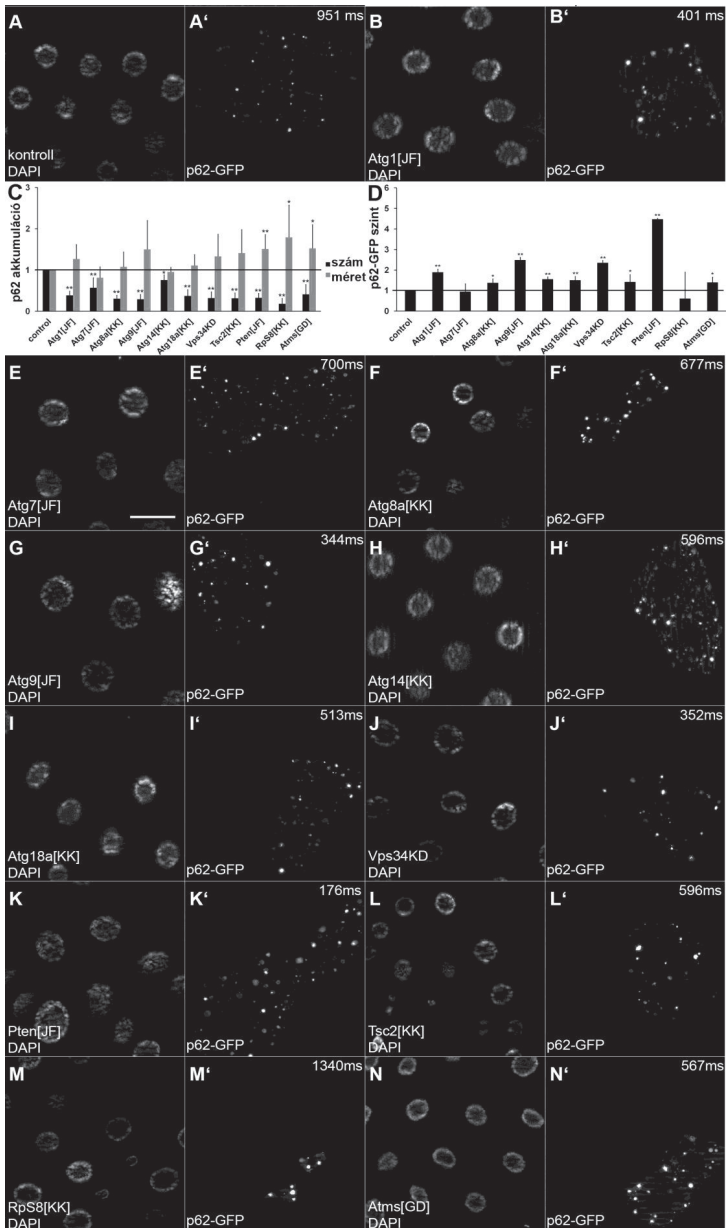


26. ábra RNSi-val csendesített háztartási gének (RpS8, Atms) éheztetés hatására gátolják az mCherry-Atg8a- és a LTR-pöttyök képződését. Az A képen látható skála 30 μm -nek felel az összes panelen. st= starved, éheztetett. A genotípusok: **A:** *hs-Flp; UAS-Dcr2/RpS8[KK106835]; Act>CD2>Gal4,UAS-GFPnls,r4-mCherry-Atg8a/+*; **B:** *hs-Flp; UAS-Dcr2/Atms[GD20876]; Act>CD2>Gal4,UAS-GFPnls,r4-mCherry-Atg8a/+*; **C:** *hs-Flp; UAS-LampGFP/RpS8[KK106835]; Act>CD2>Gal4,UAS-Dcr2*; **D:** *hs-Flp; UAS-LampGFP/Atms[GD20876]; Act>CD2>Gal4,UAS-Dcr2*.

A p62-GFP alkalmazása kvantitatív vizsgálatokra

Egy p62-GFP-t expresszáló transzgént korábban már sikeresen használtak *Drosophila* Atg13-mutáns sejtekben a bazális autofágia defektusának kimutatására (Chang és Neufeld 2009). Ennek hatására döntöttünk úgy, hogy összehasonlítjuk az endogén p62 és a transzgenikus p62-GFP detektálása során kapott különféle fenotípusokat (**27. ábra**). A p62-GFP-t hordozó törzset számos RNSi és domináns negatív allélt túltermelő vonallal kereszteztük, majd megfigyeltük a lárvák zsírtestjében felhalmozódó aggregátumok kontrollhoz (**27. ábra A**) viszonyított méretét és számát. Az Atg1, Atg7, Atg8a, Atg9, Atg14, Atg18a, TSC2 és Pten gén RNSi-csendesítésével vagy a domináns negatív Vps34-allél túltermeltetésével mindenütt csökkent a p62-GFP pettyek száma (**27. ábra B-L**). A Pten és a TSC2 RNSi törzseknel a GFP-pozitív aggregátumok mérete szignifikánsan nőtt a kontrollhoz képest, ellentétben a legtöbb vonalnál tapasztaltaktól (**27. ábra C**). Fontos megjegyezés, hogy a vizsgált RpS8 és Atms háztartási gének csendesítésének hatására (**27. ábra M és L**) is csökkent a pöttyök száma, míg méretük jelentősen nőtt (**27. ábra C**).

Ezekből az eredményekből nem tudunk általános összefüggéseket kimutatni, így másfajta módszertani megközelítéssel próbálkoztunk: számításba vettük a fluoreszcens mikroszkópos képek előállításánál alkalmazott expozíciós időt is (**27. ábra D**). Az így kapott értékek alapján már szignifikánsan megnövekedett a GFP-jel szintje az Atg1, Atg8a, Atg9, Atg14, Atg18a, Pten RNSi-csendesített és a Vps34KD allélt túltermelő vonalak esetében a kontroll lárvák GFP-pozitív zsírtestsejtjeiben mért intenzitáshoz képest, míg az Atg7, TSC2, RpS8 és Atms gének csendesítésének hatására a p62-GFP szintje alig nőtt, vagy csökkent. Ezek az eredmények nagyrészt (a TSC2 kivételével) megegyeztek az endogén p62 ellenanyaggal történt kimutatás során tapasztalt értékekkel (**25. ábra D** és **27. ábra D**). Összegezve elmondhatjuk, hogy a p62 jelenlétének detektálása során a p62-GFP transzgént intenzitásbeli összehasonlításra alkalmazhatjuk megbízhatóbban, de mivel ez a módszer sem ideális, így inkább az endogén p62 immunfestést javasoljuk.



27. ábra A p62-GFP aggregátumok felhalmozódásának és intenziálásának mértéke RNSi géncsendesített és túlexpresszáltatott törzsekben. Az **A** képen látható skála 30 μm - nek felel az összes panelen. Az RNSi-t biztosító szakaszt vagy a mutáns alléleket klonálisan expresszáltuk, de a p62-GFP is UAS szabályozása alatt áll, így maga is csak a klónsejtekben fejeződik ki. Ezért a környező sejtek nem használhatóak ebben a vizsgálatban kontrollként, külön, csak p62-GFP-t kifejező klónális sejteket használtunk erre a célra (**A** panel). A képpárok (**A-A'**, **B-B'**, stb.) ugyanazon sejtekről készültek, az elsőn valamennyi sejt DAPI-festett sejtmagja, a másodikon a klónsejtekben expresszált p62-GFP jel látható. A genotípusok: **A**: *hsFlp; UAS-p62-GFP/+; Act.CD2.Gal4, UAS-Dcr2/+*; **B**: *hsFlp; UAS-p62-GFP/+; Act.CD2.Gal4, UAS-Dcr2/Atg1[JF02273]*; **E**: *hsFlp; UAS-p62-GFP/+; Act.CD2.-Gal4, UAS-Dcr2/Atg7[JF02787]*; **F**: *hsFlp; UAS-p62-GFP/Atg8a[KK109654]; Act.CD2.Gal4, UAS-Dcr2/+*; **G**: *hsFlp; UASp62-GFP/+; Act.CD2.Gal4, UAS-Dcr2/Atg9[JF02891]*; **H**: *hsFlp; UAS-p62-GFP/Atg14[KK108559]; Act.CD2.Gal4, UAS-Dcr2/+*; **I**: *hsFlp; UAS-p62-GFP/Atg18a[KK105366]; Act.CD2.Gal4, UAS-Dcr2/+*; **J**: *hsFlp; UAS-p62-GFP/UAS-Vps34[KD]; Act.CD2.Gal4, UAS-Dcr2/+*; **K**: *hsFlp; UAS-p62-GFP/+; Act.CD2.Gal4, UAS-Dcr2/Pten[JF01987]*; **L**: *hsFlp; UAS-p62-GFP/TSC2[KK103417]; Act.CD2.Gal4, UAS-Dcr2/+*; **M**: *hsFlp; UAS-p62-GFP/RpS8 [KK106835]; Act.CD2.Gal4, UAS-Dcr2/+*; **N**: *hsFlp; UAS-p62-GFP/Atms[GD20876]; Act.CD2.Gal4, UASDcr2/+*. A **C** (szám és méret) és **D** (p62-GFP szint= $1/\text{normalizált intenziálásérték}$) paneleken látható az **A**, **B**, **E**, **F**, **G**, **H**, **I**, **J**, **K**, **L**, **M**, **N** képek eredményeinek statisztikai kiértékelése Student-féle kétfarkú páros t-próbával. Szignifikáns eltérésnek a $p < 0,05$ értékű különbséget tekintettük. Az egy csillag $0,05 > p > 0,01$ érték között, a két csillag $p < 0,01$ esetében fordult elő.

A p62 akkumulációja szempontjából eltérő fenotípusú Atg16, Atg18a, és Pten független RNSi vonalak eltérő válaszreakciót mutatnak az éheztetéssel indukált autofágiára L3 és L2 lárvákban

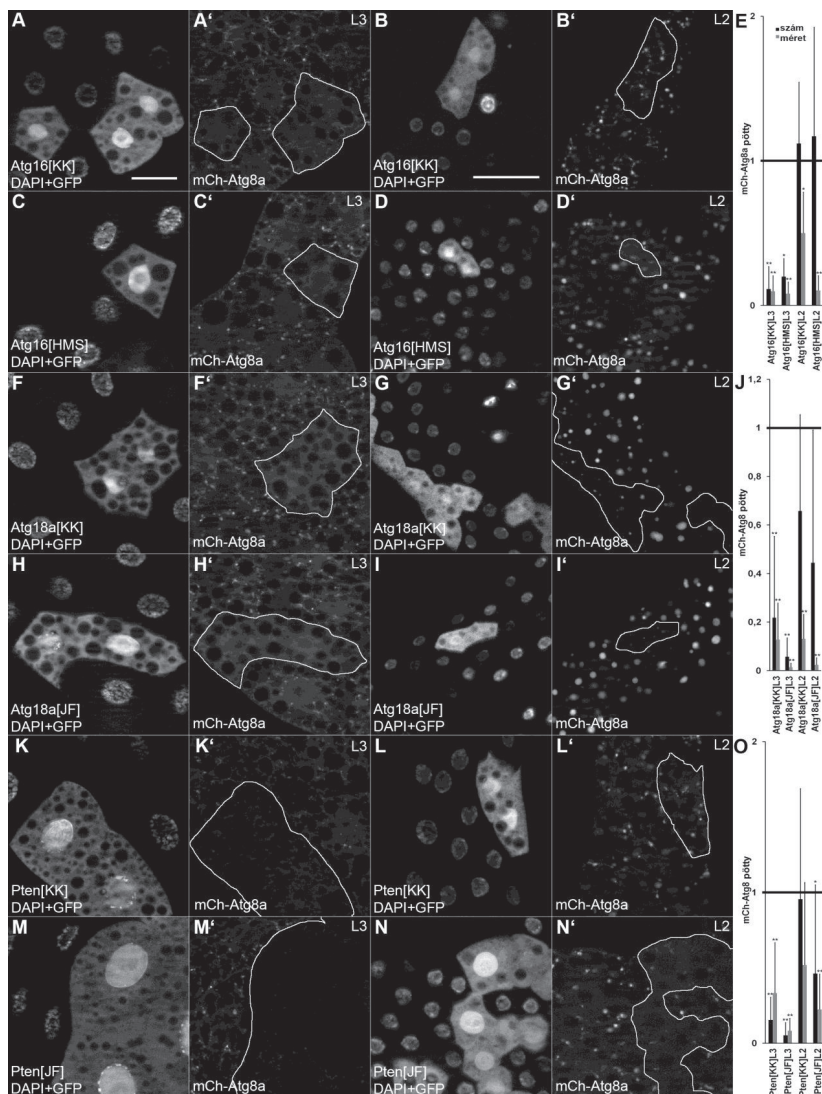
A fentebb részletezett *in vivo* genom RNSi szűrés során észrevettük, hogy számos független eredetű, de azonos gént érintő RNSi vonal a p62 kimutatására irányuló immunhisztokémiai vizsgálatokkal nagyon eltérő fenotípusos választ adott. Például az Atg18a két független RNSi-csendesített vonala esetében számokban kifejezve is különböző szintű p62 felhalmozódást észleltünk (**25. ábra** D, O, P). Ennek oka valószínűleg az eltérő mértékű géncsendesítési hatékonyság. Érdekes az is, hogy az Atg8a lipidációjáért felelős Atg16 csendesítése az egyik Atg16 RNSi törzs (Atg16[KK]) esetében nem mutatott semmilyen mértékű p62 felhalmozódást (**25. ábra** D, M, N). A Pten (mely fiziológiás funkcióját tekintve gátolja az inzulin jelátviteli útvonalat, ezzel gátolja a sejtnevekedést és serkenti az autofág folyamatokat) csendesítésére szintén a p62 akkumulációja lenne az adekvát sejtválasz, de az egyik Pten RNSi vonal, a Pten[KK] fenotípusa ezt nem mutatja (**25. ábra** D, Q, R). Mivel mind a hat fenti törzsből (a két-két Atg18a, Atg16 és Pten RNSi vonalakban) a csendesítés ugyanakkor nagyon hatásosan gátolta az mCherry-Atg8a pöttyök megjelenését az éheztetett L3 lárvák zsírtestjében, úgy döntöttünk, hogy megpróbáljuk kideríteni ezeknek az ellentmondásos eredményeknek az okát (**28. ábra**).

Az mCherry-Atg8a pöttyök kisebb mennyiségben fordultak elő az Atg18a[JF] (**28. ábra** H, I, J) vonalban az Atg18a[KK]-hoz (**28. ábra** F, G, J) képest mind az L3, mind pedig a fiatalabb, L2 stádiumú éheztetett lárvák zsírtest klónsejtjeiben. Azt feltételezzük, hogy ez a fenotípusos eltérés magyarázhatja a p62 detektálásával kapott különböző eredményeket is (**25. ábra** D, O, P): az Atg18a[KK] vonalban kevésbé jól működik az Atg18a-t csendesítő RNSi.

A Pten esetében mindkét RNSi törzs erősen gátolta az mCherry-Atg8a-pozitív struktúrák megjelenését az L3 lárvákban (**28. ábra** K, M, O). Ugyanakkor az L2 korú lárvákban a Pten[JF]-fel szemben (**28. ábra** N, O) a Pten[KK] vonalban (**28. ábra** L, O) a csendesítés nem mutatott szignifikáns eltérést az éheztetéssel indukált autofág válaszban a környező kontroll sejtekhez viszonyítva. Ez a jelenség összhangban van a p62-immunhisztokémia eredményével, mivel a KK-s törzsből nem halmozódtak fel a p62-pozitív struktúrák (**25. ábra** D, Q, R). Ez arra utal, hogy a Pten[KK] vonalban késéssel indukálódik megfelelő hatékonysággal az RNSi.

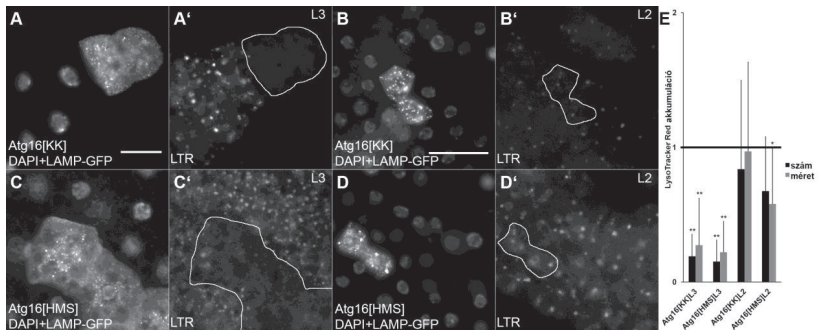
Utolsó példaként: az Atg16 esetében nem láttunk sem szignifikáns számbeli, sem méretbeli különbséget a két független RNSi vonal L3 lárváiban az autofágia indukciója hatására megjelenő mCherry-Atg8a mintázatban (**28. ábra** A, C, E). Ugyanakkor az L2 korú lárvákban számbeli eltérés nem volt jellemző, de az Atg16[HMS] vonalban a detektált mCherry-Atg8a-pozitív pöttyök mérete 8-szor kisebb volt a kontrollhoz képest (**28. ábra** D, E), míg az Atg16[KK] pöttyök csak fele akkoraak voltak (**28. ábra** B, E). A nagyobb méretű mCherry-Atg8a pöttyökről az feltételezhető, hogy az érett autolizoszómákat reprezentálják – ez arra utal, hogy az L2 állatokban az Atg16[HMS] vonalban az RNSi erősebben gátolta ezeknek a struktúráknak a kialakulását. Ez megint csak összhangban van azzal az eltéréssel, amit a két Atg16 RNSi vonal mutatott a p62 akkumulációjának vizsgálata során (**25. ábra** D). Az LTR-festés tovább erősítette hipotézisünket, mivel az L2 lárvákban csak az Atg16[HMS] lárvákban láthattunk statisztikailag is szignifikáns, kisebb méretű LTR-pozitív jelet (**29. ábra**).

Összegezve: eredményeink azt sejtetik, hogy az éhezéssel indukált autofág válasz főleg L2 stádiumban detektálható különbsége az L3 lárvákban is megjelenik, de elsősorban az eltérő p62-felhalmozódásban. Ennek oka valószínűleg az, hogy azok az RNSi vonalak, amelyekben korábban indul be az adott gén csendesítése, hatékonyabbak, és később, L3-ban nagyobb mértékű p62-aggregálódást mutatnak. Tehát a p62 szintje több napig tartó bazális autofág defektusra érzékeny, míg az éhezéssel indukált válasz csak az adott, 3-4 órás időablakot képezi le.



28. ábra Az Atg16, Atg18a és a Pten RNSi vonalaktól származó lárvák éheztetésre adott autofág válasza L3 és L2 stádiumban. Az *A* képen látható skála 30 μ m-nek felel meg az L3-as lárvák zsírtestjeit bemutató *A*, *C*, *F*, *H*, *K*, *M* paneleken, míg a *B* képen lévő

skála szintén 30 μm -nek felel meg az L2-es lárvák zsírtestjeit bemutató **B, D, G, I, L, N** paneleken. A genotípusok: **A, B:** *hs-Flp; UAS-Dcr2/Atg16[KK105993]; Act>CD2>Gal4,UAS-GFPnls,r4-mCherry-Atg8a/+;* **C, D:** *hs-Flp; UAS-Dcr2/+; Act>CD2>Gal4,UAS-GFPnls,r4-mCherry-Atg8a/Atg16[HMS01347];* **F, G:** *hs-Flp; UAS-Dcr2/Atg18a[KK105366]; Act>CD2>Gal4,UAS-GFPnls,r4-mCherry-Atg8a/+;* **H, I:** *hs-Flp; UAS-Dcr2/+; Act>CD2>Gal4,UAS-GFPnls,r4-mCherry-Atg8a/Atg18a[JF02898];* **K, L:** *hs-Flp; UAS-Dcr2/Pten[KK101475]; Act>CD2>Gal4,UAS-GFPnls,r4-mCherry-Atg8a/+;* **M, N:** *hs-Flp;UAS-Dcr2/+; Act>CD2>Gal4,UAS-GFPnls,r4-mCherry-Atg8a/Pten[JF01987].* Az **E, J és O** jelű diagramok rendre két-két független *Atg16, Atg18a* és *Pten* RNSi vonal vizsgálata során szerzett adatokat mutatják be. A képek eredményeinek statisztikai kiértékelése minden esetben Student-féle kétfarkú páros *t*-próbával történt. Szignifikáns eltérésnek a $p < 0,05$ értékű különbséget tekintettük. Az egy csillag $0,05 > p > 0,01$ érték között, a két csillag $p < 0,01$ esetében fordult elő.



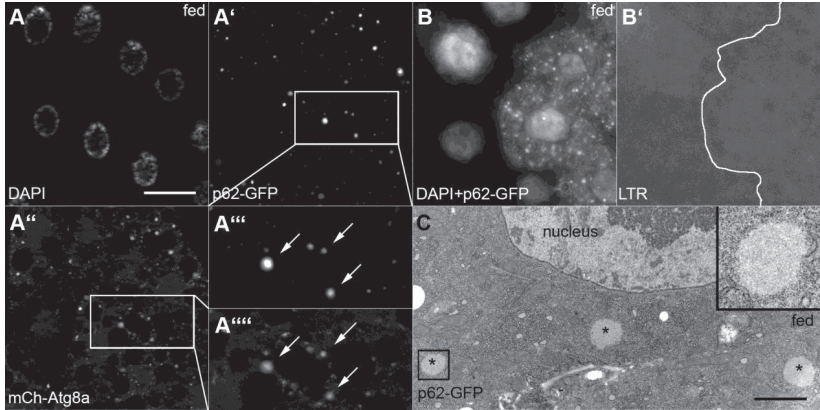
29. ábra Két független *Atg16* RNSi vonalból származó lárvák éheztetésre adott, LTR-festéssel detektált autofág válasza L3 és L2 stádiumban. Az **A** képen látható skála 30 μm -nek felel meg az L3-as zsírtesteket ábrázoló **A, C** paneleken. Az **B, D** képen látható skála szintén 30 μm -nek felel meg az L2-es lárvák sejtjeit bemutató **B, D** paneleken. A genotípusok: **A, B:** *hs-Flp; UAS-LampGFP/Atg16[KK105993]; Act>CD2>Gal4,UAS-Dcr2;* **C, D:** *hs-Flp; UAS-LampGFP/+; Act>CD2>Gal4,UASDcr-2/Atg16[HMS01347].* Az **E** panelen látható az **A, B, C, D** képek eredményeinek statisztikai kiértékelése Student-féle kétfarkú páros *t*-próbával történt. Szignifikáns eltérésnek a $p < 0,05$ értékű különbséget tekintettük. Az egy csillag $0,05 > p > 0,01$ érték között, a két csillag $p < 0,01$ esetében fordult elő.

A p62- és az Atg8a-riporterek expressziójának hatása az autofág fenotípusra

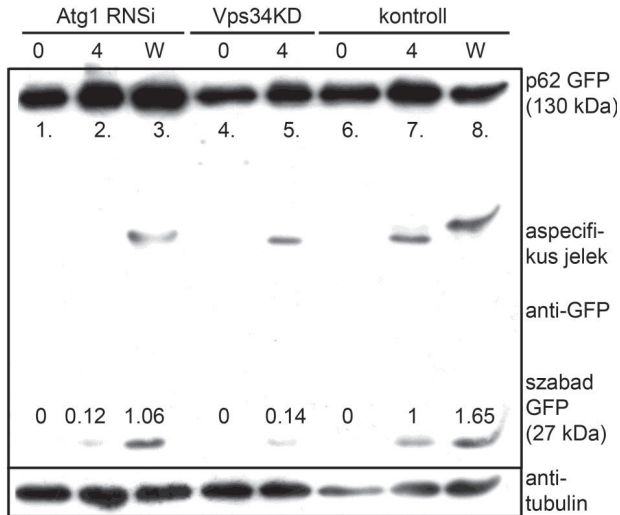
Egy transzgénikus riporter tesztelesekor nagyon fontos azt ellenőrizni, hogy maga a kimutatásra alkalmazott konstrukció kifejeződése nem befolyásolja-e valamilyen módon a vizsgált jelenséget. Ezért megvizsgáltuk, hogy az általunk használt túltermeltetett p62- és Atg8a-riporterek - külön-külön és együttesen alkalmazva is – önmagukban módosítják-e a tanulmányozott autofág fenotípust.

Az Atg8a-riporternél azt tapasztaltuk, hogy menekítette az autofágia hibás fenotípust a funkcióvesztéses mutánsokban (lásd később, **33. ábra** A, B). A p62-GFP-t és az mCherry-Atg8a-t egyszerre termeltetve pedig nagyméretű kolokalizáló GFP- és mCherry-pozitív aggregátumok alakultak ki, még a táplálkozó lárvákban is (**30. ábra** A). Ismert, hogy az Atg8a erősen kötődik a p62 LC3-interakciós régiójához, ezért azt feltételeztük, hogy ezek a pöttyök a két túlexpresszált fehérje közötti specifikus keresztreakció eredményeképpen alakulhattak ki, tehát műtermékek és nem autofág struktúrákat jelölnek. Hogy ezt ellenőrizzük, megvizsgáltuk a mindkét riportert túltermelő lárvákat LTR-festéssel (**30. ábra** B) és elektronmikroszkópiával is (**30. ábra** C), és nem láttuk az autofág struktúrák felhalmozódásának semmilyen jelét. Az elektronmikroszkópos kép jobb felső kinagyított részletén jól látható, hogy a csillaggal jelölt p62 aggregátumokat nem határolja membrán, tehát nem autofág struktúrák.

Feltételezésünket Western blot analízissel is igazoltuk: nem tapasztaltuk a fúziós fehérje lebontásakor jellemző p62-kötött GFP szabad GFP-vé történő konverzióját a mCherry-Atg8a-t és p62-GFP-t ko-expresszáló lárvák zsírtestjében (**31. ábra**). Ez azt jelenti, hogy a két fehérje együttes termeltetése nem serkenti a p62-GFP autofág degradációját a kontroll, jól táplált L3 korú lárvákban (**31. ábra** 1., 4. és a 6. oszlop). Ugyanakkor - a vártaknak megfelelően - kontroll állapotokban a szabad GFP 4 óra éhezés hatására (**31. ábra** 7. oszlop) és a vándorló lárvákban (**31. ábra** 8. oszlop) egyaránt felhalmozódott, ami az éhezéssel indukált és a fejlődési autofágia normális működését jelzi. Tehát a lárvákban expresszált p62-GFP fúziós fehérje nem zavarja meg az autofág folyamatot, és tökéletesen alkalmas az autofágia aktivitásának követésére Western bloton. Ezt támasztja alá az is, hogy az Atg1 RNSi-csendesített vagy a domináns negatív Vps34 allélt expresszáló törzsek esetében erősen csökkent az éhezés-indukálta p62-GFP → szabad GFP konverzió mértéke (**31. ábra** 2. és az 5. oszlop), míg az Atg1-csendesített vándorló állatok ehhez képest kevésbé erős csökkenést mutattak (**31. ábra** 3. oszlop).



30. ábra A p62- és az Atg8a-riporterek együttes kifejeződése által okozott autofág fenotípus. Az *A* képen látható skála 30 μ m-nek felel meg az *A* és *B* paneleken, a *C* képen látható skála 2 μ m-nek felel meg. Az *A'* képen láthatjuk a zöld (GFP), az *A''* képen pedig a piros (mCherry) fluoreszcens csatornát. Az *A'''* képen az *A'*, az *A''''* képen pedig az *A''* kép kinagyított részletét láthatjuk. A nagyított részleteken a nyilak a p62-GFP- és az mCherry-Atg8a-pozitív granulonok kolokalizációját jelzik. A *C* ábrán a csillaggal jelölt struktúrák p62-GFP-pozitív aggregátumokat jelölnek, melyek közül az egyik kinagyítva is látható az ábra jobb felső sarkában. A genotípusok: *A*: *hs-Flp; UAS-p62-GFP/+; Act>CD2>Gal4,UAS-Dcr2/r4-mCherry-Atg8a*; *B*, *C*: *hs-Flp; UAS-p62-GFP/+; Act>CD2>Gal4,UAS-Dcr2/+*. (*fed* = táplálkozó).



31. ábra A p62-GFP → szabad GFP konverzió vizsgálata Western blot analízissel teljes zsírtestjükben Atg1-csendesített, Vps34 domináns negatív allélt expresszáló, illetve kontroll lárvákban. Mindhárom genotípus esetében táplálkozó („0”), négy órán át éheztetett („4”) és vándorló („W”) lárvák zsírtestjéből származó mintákat is vizsgáltunk, az általunk előállított anti-GFP ellenanyag. A szabad GFP-t jelző sávok felett a számok az adott sáv intenzitását jelölik. A lárvák genotípusa: „**Atg1 RNSi**”: *cgGal4-mCherry-Atg8a,UAS-p62-GFP/+*; *Atg1[JF02273]/+*, „**Vps34KD**”: *cgGal4-mCherry-Atg8a, UAS-Vps34[KD]/UAS-p62-GFP*, „**kontroll**”: *cgGal4-mCherry-Atg8a, UAS-p62-GFP/+*.

Az általunk előállított Atg4DN törzs vizsgálata

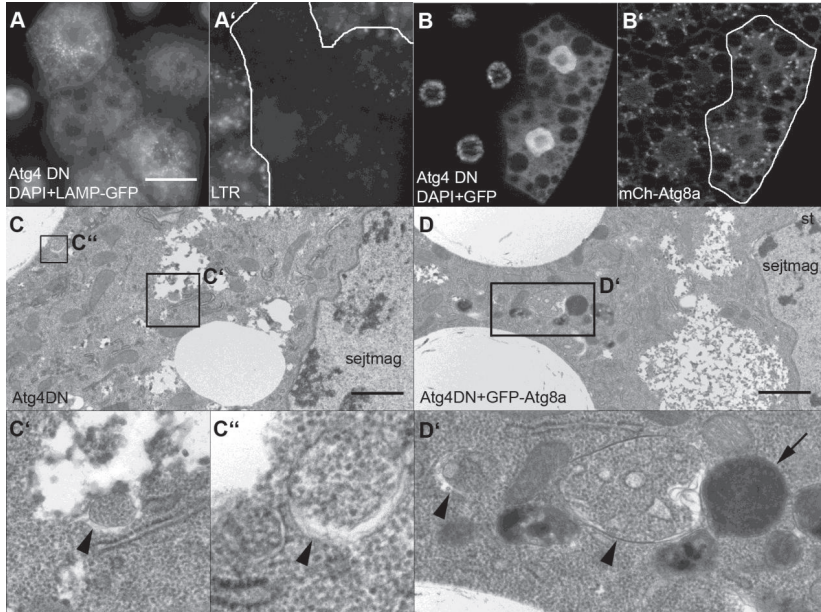
Az Atg4 gén által kódolt fehérje egy cisztein proteáz, melynek feladata az Atg8 C-terminálisán található néhány aminosav lehasítása. Ez a lépés elengedhetetlen az Atg8 további aktiválásához és a membránlipid foszfatidil-etanolaminhoz való kapcsolódásához. Ugyanakkor az Atg4-re szükség van az autofagoszóma képződése után is az Atg8a delipidációjához, ami az Atg8 külső membránról történő leválását eredményezi. A humán Atg4B mutáns formája (egy cisztein-alanin csere a 74. pozícióban) domináns negatív hatású, gátolja a megfelelő autofagoszóma-képződést és a lebontást (Fujita, Hayashi-Nishino és mtsai 2008). Ennek mintájára hoztuk létre a *Drosophila* Atg4-homológ gén (Atg4a) szintén domináns negatív Atg4a^{C98A} allélját (lásd Anyagok és Módszerek), és azt a transzgénikus törzsünket, amelyben indukálható az Atg4a^{C98A} (továbbiakban: Atg4DN) kifejeződése.

Az Atg4DN allél expressziója erősen gátolta az LTR-pozitív struktúrák kialakulását (32. ábra A) és p62-felhalmozódást is okozott az éhezett állatok zsírtestsejtjeiben (25. ábra D, F). Az mCherry-Atg8a riporter túltermeltetése az Atg8a null-mutánsokat a p62 akkumulációjának mértéke alapján képes volt menekíteni (33. ábra A, B), ezért leteszteltük, hogy vajon ugyanezt tapasztaljuk-e az Atg4DN allélt kifejező sejtokban is. Az mCherry-Atg8a riporter és az Atg4DN ko-expresszálatása gátolta az éhezettel indukált autofágiát és a p62 felhalmozódását egyaránt (32. ábra B, 33. ábra C, D). Emellett az Atg4DN-expresszió éhezettel indukált autofágiára gyakorolt erősen gátló hatását ultrastrukturális analízissel is igazoltuk. Autolizoszómák egyáltalán nem alakultak ki a zsírtestsejtben, sőt, kisméretű autofagoszómák is csak elvétve fordultak elő (32. ábra C).

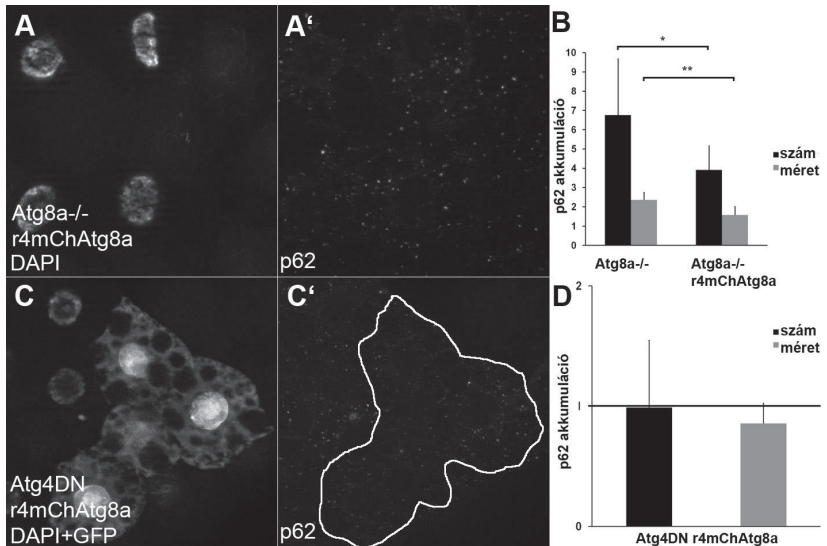
Ugyanakkor a GFP-Atg8a riporter és az Atg4DN együttes termeltetése helyreállította az éhezettel indukált autofágiát: számos autofagoszómát és autolizoszómát figyelhetünk meg a zsírtestsejtben (32. ábra D). Ez a jelenség megegyezik az emlőssejtben látottakkal (Fujita, Hayashi-Nishino és mtsai 2008).

Az Atg4DN allél expressziójával kapcsolatos eredményeket más megközelítésben is igazoltuk. A domináns negatív allél hatásához hasonlóan az Atg4a RNSi-csenedítése az Atg4a[KK] törzsben gátolta az éhezettel indukált autofágiára jellemző LTR-festődés kialakulását, és egyben indukálta a p62 akkumulációját a zsírtestben (nem bemutatott eredmények). Ezzel szemben azonban az Atg4a csenedítése az mCherry-Atg8a-pozitív pöttyök mintázatában nem okozott eltérést a kontrollhoz képest. Ez tovább erősítette azt a

hipotézisünket, hogy az Atg4a részleges funkcióvesztése menekíthető az mCherry- vagy GFP-Atg8a riportert túltermeltetésével.



32. ábra Az Atg4DN kifejeztetésének hatása az éhezéssel indukált autofág válasza Atg8a-riporter hiányában és jelenlétében. Az Atg4DN klonális expressziója gátolta a LTR-pozitív struktúrák kialakulását, azaz autofágiát (A és A'), míg ugyanez a hatás nem mutatható ki mCherry-Atg8a riportert ko-expressziója során (B és B'). Az Atg4DN-t expresszáló sejtekben (C-C'') nem található autolizoszóma, szemben a GFP-Atg8a riportert is kifejező sejtekkel (D-D'). nyílfejek: autofagoszómák, nyilak: autolizoszómák. Az A képen látható skála 30 μm-nek felel meg az A, B paneleken, a C képen látható skála 2 μm-nek felel meg a C, D paneleken. A vizsgált lárvák genotípusa: A, C: *hs-Flp; UAS-Dcr2/+; Act>CD2>Gal4, UAS-GFPnls/UAS-Atg4[C98A]*; B, D: *hs-Flp; UAS-GFP-Atg8a, UAS-Dcr2/+; Act>CD2>Gal4, UAS-Atg4[C98A]*.



33. ábra A p62 felhalmozódásának mértéke alapján az mCherry-Atg8a riportertúltermeltetése részben menekíti mind az Atg8a funkcióvesztéses mutációja, mind az Atg4DN allél expressziója által okozott autofágia-defektust. A p62 mennyiségét a sejtekben anti-p62 ellenanyaggal mutattuk ki. Az A ábrán látható valamennyi zsírtestsejtben Atg8a^{-/-} háttéren fejeztettük ki az mCherry-Atg8a riportert. A C ábrán csak a GFP-pozitív klónokban expresszálódott az Atg4DN allél, és valamennyi sejtben az mCherry-Atg8a riportert. Az A képen látható skála 30 µm-nek felel meg az A, C paneleken. A vizsgált lárvák genotípusa: A: Atg8a[d4]; +/+; r4-mCherry-Atg8a/+; C: hs-Flp; UAS-Der2/+; Act>CD2>Gal4,UAS-GFPnls,r4-mCherry-Atg8a/UAS-Atg4[C98A]. A B ábra az A-hoz, a C a D-hez tartozó statisztikák eredményét ábrázolja. Az A és C képek eredményeinek statisztikai kiértékelése Student-féle kétfarkú páros t-próbával történt. Szignifikáns eltérésnek a p<0,05 értékű különbséget tekintettük. Az egy csillag 0,05>p>0,01 érték között, a két csillag p<0,01 esetében fordult elő.

V. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

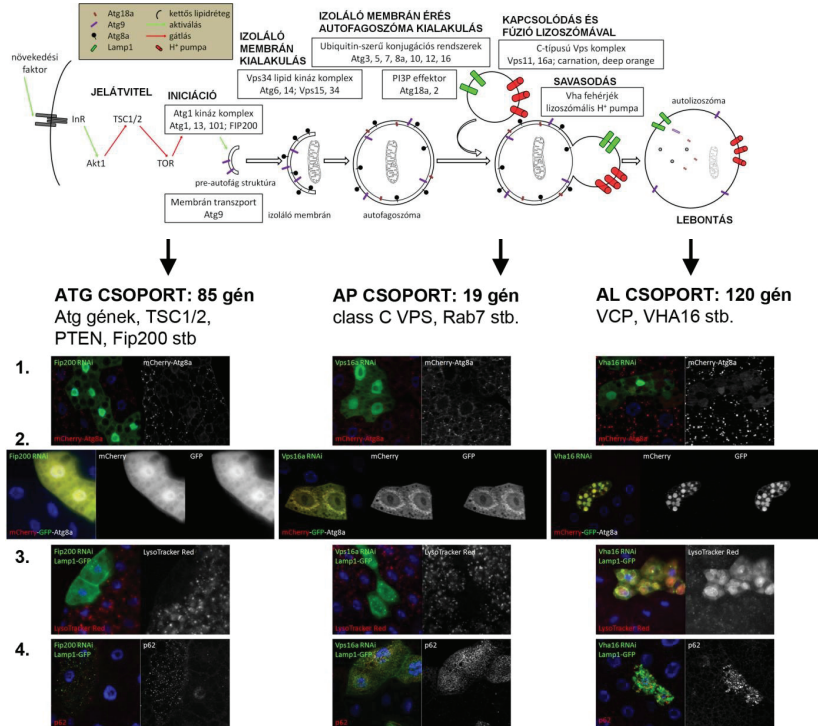
Az autofágia olyan sejten belüli önemésztő folyamat, amely elengedhetetlen a homeodinamika fenntartásához és a differenciálódáshoz: biztosítja a sejtorganelumok és makromolekulák lebontását, segíti a sejtek túlélését stresszhelyzetben, valamint szerepet játszik az egyedfejlődés során feleslegessé vált sejtek és szövetek pusztulásában. Szerepét kimutatták számtalan patológiás folyamatban is, többek között különböző neurodegeneratív betegségekben és a tumorigenezis esetében.

Az autofágia molekuláris mechanizmusa, a gének hierarchikus viszonya és szabályozása élesztőben már viszonylag jól ismert folyamat. Az ebben a modellben azonosított, autofágiában szerepet játszó gének közül többek homológjának funkcióját is igazolták a magasabbrendűekben. A többsejtűekben az autofágia mechanizmusa és irányítása jóval összetettebb, ugyanakkor molekuláris szinten még kevésbé jól ismert - felderítése azonban a folyamat jelentősége miatt elengedhetetlen.

Munkám egyik célja egy többsejtű modellszervezet, a *Drosophila melanogaster* autofág folyamataiban szerepet játszó gének azonosítása volt. Két másik kollégám, Varga Ágnes és Nagy Péter együttműködésével az autofágiában szerepet játszó gének azonosítására és karakterizálására irányuló kísérleteket végeztünk (**34. ábra**). Ennek során a konzervált genom több, mint 90 %-át alkotó mintegy 7200 gén RNS interferenciával generált funkcióvesztéses fenotípusát vizsgáltuk meg mozaikos állatok lárvális zsírtestsejtjeiben. Ezen *in vivo* genomszűrés eredményeként első körben sikerült azonosítanunk a legtöbb, már ismert autofágiában szereplő gént is, ami a módszer relevanciáját igazolta számunkra. A kapott találatok számát másodlagos tesztekkel szűkítettük, míg végül a fenotípusok alapján három jól elkülöníthető csoportot (ATG, AP és AL) hoztunk létre. Az ATG csoportba olyan gének kerültek, melyek az Atg8-pozitív autofagoszómák képződéséhez szükségesek (ide tartoznak például a központi autofág gének). Az autofagoszóma (AP) csoport tagjai szükségesek az autofagoszóma éréséhez és a lizoszómákhoz való kapcsolódásához és a fúzióhoz (ilyenek például a C-típusú Vps komplex tagjai). Végül az AL csoportba tartozó gének csendesítésének hatására feltehetően sérült az autolizoszomális lebontás (ide tartoznak például a lizoszomális proton pumpát kódoló Vha gének).

Összegezve elmondhatjuk, hogy a 7397 letesztelt RNSi törzs első szűrése után kapott 1047 vonal által reprezentált géneket sikerült végül 224, fenotípusosan jól

besorolható génre leszűkítenünk, amelyeket a labor részletesen tud majd vizsgálni az elkövetkező években. Fontosnak tartom még egyszer kiemelni, hogy találatainkban sok, már eddig is leírt és ismert autofág szabályozó elemet azonosítottunk, amely módszerünk használhatóságát támasztotta alá.



34. ábra Összefoglaló ábra az *in vivo* teljes *Drosophila* genom RNSi szűréssel azonosított, autofágiában szerepet játszó génekről. A felső rajzon látható az autofágia mechanizmusának és molekuláris szabályozásának összeggése (lásd még: **3. ábra**); alatta pedig a szűrés során az egyes gének csendesítésével kapott fenotípus alapján jól elkülöníthető három csoport. A számokhoz (1.-4.) tartozó képek a különböző szűrési módszerek eredményét reprezentálják az egyes csoportokban: 1. az RNSi-val csendesített klónsejtek éheztetésre adott válaszreakciója mCherry-Atg8a riportterrel detektálva; 2. az autofág flux vizsgálata mCherry-GFP-Atg8a riportter felhasználásával; 3. LTR festékekkel és

Lamp1-GFP riporterrel jelölt emésztő autolizozómák azonosítása; 4. az autofág defektus kimutatása immunhisztokémiai vizsgálattal, anti-p62 ellenanyag segítségével.

A továbbiakban a laboratóriumunk által készített p62 ellenanyag, és p62-GFP riporter alapú módszerek alkalmazhatóságára végeztünk kísérleteket. Ezek a vizsgálatok 2012-ben befejeződtek, a kapott eredmények megjelentek a PloS One folyóiratban (Pires, Nagy és mtsai 2012).

Az autofágia szintje negatívan korrelál a sejtekben megtalálható p62-aggregátumok mennyiségével, a p62 szintjének meghatározása ezért egyre elterjedtebb vizslati módszer az alapszintű autofágia hatékonyságának mérésében (Bjorkoy, Lamark és mtsai 2009). Az endogén p62 mennyiségének meghatározására jelenleg a legelterjedtebb eszköz a Western blot analízis. Alkalmazásával lehetőség van a szabad és az aggregátumokban kötött p62 detektálására különféle detergensok jelenlétében, ezek a vizsgálatok azonban nem alkalmazhatóak mozaikos állatok vizsgálatakor.

Munkánk során igazoltuk, hogy a Drosophila lárvák zsírtestjében az immunjelölés még a kismértékű p62-szint változások kimutatásában is a Western blothoz hasonlóan hatékony módszer, ráadásul plusz információt is hordoz, hiszen megismerhetjük a képződött p62-aggregátumok pontos számát, méretét és a sejten belüli elhelyezkedését. Eredményeink alapján erősen ajánljuk a p62-specifikus ellenanyag használatát a konstitutívan túltermeltetett p62-GFP riporterrel szemben. Ez utóbbi sok esetben képes önmagával is aggregátumot képezni, valamint expressziója megemeli az endogén p62 fehérjeszintet is, így a p62-pozitív pöttyök méret- és számbeli értéke már nem tükrözi hűen az autofág aktivitást. Ha valamilyen oknál fogva mégis a p62-GFP riportert kell alkalmazni, akkor használatát a GFP-jelek intenzitásának figyelembe vételével ajánljuk. Az így kapott értékek statisztikailag hasonlóak, de a felhalmozódás mértékét tekintve kisebbek voltak a legtöbb (de nem az összes) endogén p62-mennyiséget tükröző adtnál. Hozzá kell tenni, hogy az endogén p62 fehérje szintje az autofág választól független módon is megnövekedhet például transzkripcionális indukció hatására (ld. később), ugyanakkor ez nem okoz problémát egy mesterséges promoterről termeltetett p62-riporter esetében. Emiatt nem árt hangsúlyozni a többféle független módszer alkalmazásának fontosságát az autofágia vizsgálatok során (Klionsky, Abdalla és mtsai 2012).

A p62-GFP-t expresszáló transzgénikus modellek esetében még a fluoreszcencia intenzitásának mérésénél is megbízhatóbb módszer a p62-GFP konverzió követése

Western blot analízissel. Ekkor a szövetspecifikus vagy hősokkal indukált promóter szabályozása alatt álló p62-GFP lizoszomális lebontásával keletkező szabad GFP mennyiségét lehet követni. Egy másik lehetőség, ha mikroszkóposan, pulse-chase analízissel megmérjük a p62-GFP féléletidejét. Ez nagyon hatékony módszernek bizonyult sejt kultúrákban az éhezéssel indukált vagy a bazális autofág flux meghatározására (Bjorkoy, Lamark és mtsai 2009).

A p62 ellenanyaggal végzett kísérleteim alapján azt tételezzük fel, hogy az endogén p62 aggregátumok mennyiségének követése megbízható és jól használható autofág fluxus vizsgálati módszer. Ezt támasztja alá egy előző munkánk eredménye is, amikor az endogén p62 expresszióját vizsgálva azt találtuk, hogy 4 órás éhezétes hatására a p62 transzkripció aktivitása 4,8-szorosára nőtt a lárvális zsírtestsejtekben (Erdi, Nagy és mtsai 2012), - ez majdnem megegyezik a fentebb leírt Western blot vizsgálataink során gyűjtött adatokkal. Éhezétes hatására elsősorban a szabad p62 szintje emelkedik meg és az aggregált forma mennyisége csökken, ahogy ezt más munkák is alátámasztják (Bartlett, Isakson és mtsai 2011).

Az autofágia lezajlásához szükséges fehérjék szintjének az indukció és a teljes folyamat során is döntő szerepe van az autofág válasz intenzitására nézve. A p62 szintje is nagymértékben megemelkedik a bazális autofág aktivitás növekedésének hatására, tehát a többlet p62-aggregátumok kialakulása progresszív, időfüggő folyamat. Emiatt a különböző kezelések vagy az RNSi-csendesítés hatásfoka nagymértékben befolyásolja a p62 szintjének mérésén alapuló vizsgálati módszerekkel kapott adatokat, ahogy az itt bemutatott eredményeink is erre utalnak. Igazoltuk, hogy a p62 szintje nem változik a kontroll sejtekhez képest, ha a *Drosophila* lárvák fejlődése során az adott gén funkcióját csendesítő RNSi-hatás csak késleltetve indul meg. Ezen megfigyelések alapján azt is feltételezzük, hogy az anyai hatás (azaz az anya által a petesejtbe juttatott ép géntermékek tartós jelenléte az egyedfejlődés során) is okozhatja a különböző Atg-mutások eltérő p62-szintjét.

Munkánk során az is kiderült, hogy a p62-GFP alkalmazásával kapcsolatban bemutatottakon kívül további problémák is felmerülhetnek a túltermeltetett riporter transzgének használata során. Egyrészt a túlexpresszált Atg8a-riporter esetében azt tapasztaltuk, hogy a p62-vel aggregátumokat képez, ugyanúgy, mintha megnövekedett volna az autofág aktivitás - ezzel fals pozitív eredményt produkál. Másrészt az Atg8a-riporter túltermeltetése menekíti például a domináns negatív Atg4a részleges

funkcióvesztéses fenotípusát, ezzel tovább nehezítve az amúgy is ellentmondásos eredmények értelmezését. Ezek a példák nem csak ritka, egyedi esetek, mert a teljes genom RNSi szűrés során tucatnyi hasonló problémával talákoztunk. Egy konkrét példa a protoszómális alegységeket kódoló gének csendesítése, ami olyan nagy mértékű p62 felhalmozódást okoz hogy a túltermeltetett Atg8a riporter is inkorporálódik az aggregátumokba. Ezen eredmények Varga Ágnes kollégám doktori értékezésében lesznek részletesen bemutatva.

Bár a dolgozatomban leírt kísérleteket *Drosophila* lárvális zsírtestsejteken végeztük el, azt gondoljuk hogy a kapott eredmények érvényesek az autofág kutatásokban alkalmazott egyéb sejt típusokra és organizmusokra is.

VI. ÖSSZEFOGLALÁS

Az autofágia egy evolúciósan konzervált, minden eukarióta sejtre jellemző önmegsejtő folyamat, mely során a sejt a saját anyagait bontja le a lizoszómák segítségével, biztosítva ezzel a citoplazma és a fehérjék normális turnover-ét, a sérült, működésképtelen vagy káros sejtalkotók és az egyes organellek eliminálását. Az autofágia számos fiziológiás és patológiás folyamatban vesz részt, így molekuláris mechanizmusainak és genetikai hátterének pontos feltérképezése mindenképpen szükséges. Laborunkban ecetmuslicával (*Drosophila melanogaster*) dolgozunk, mely az egyik legjobb modellállat az autofágia tanulmányozására.

Munkám során először - két másik hallgatótársam együttműködésével - az autofágiában szerepet játszó gének azonosítására és karakterizálására irányuló kísérleteket végeztem. Ennek során 7118 konzervált gén funkcióvesztéses fenotípusát vizsgáltuk meg, genetikailag mozaik állatok lárvális zsírtest sejtjeiben. Az elsődleges in vivo genomszűrés során, RNS interferenciával sikerült azonosítanunk a legtöbb már ismert autofágiában szereplő gént. A kapott találatok számát számos másodlagos teszttel szűkítettük le, míg végül fenotípusosan három, jól elkülöníthető csoportot hoztunk létre: AL, AP és ATG. Az AL csoportba tartozó gének hiányában sérült az autolizoszómális lebontás. Az AP csoport tagjai szerepet játszanak az autofagoszómák lizoszómákkal való fúziójában. Végül az ATG csoportba olyan gének kerültek, melyek szükségesek az Atg8-pozitív autofagoszómák kialakulásához.

Az autofágiában lebomló anyagok kijelölése, vagyis a degradáció általános szelektivitásának kérdése széles körben vitatott téma. Mára már ismert néhány bizonyítottan szelektív lebontást kijelölő fehérje, mint például a p62. Egy általunk készített p62 ellenanyag révén zsírtest RNS interferencia klónokban, valamint ismert Atg és a TOR kináz szubsztrát S6 kináz mutánsokban immuncitokémiai vizsgálatokkal és Western-blot teljes állatmintákon igazoltuk, hogy a p62 szint *Drosophilában* is, az eddig leírtakkal megegyezően, fordított arányban áll az autofág aktivitással. Emellett kvantitatív vizsgálatokkal meghatároztuk a különféle p62 vizsgálati módszerek előnyeit és hátrányait. Korai letális fenotípussal rendelkező gének bazális autofágiában betöltött szerepét is sikerült kimutatni mozaikos zsírtestekben immunhisztokémiai módszerekkel. Kimutattuk, hogy a korábban p62 felhalmozódás kimutatására használt p62-GFP riporter csak limitált módon használható az autofágia defektus kimutatására, mert képes önmagával

aggregálódni attól függetlenül, hogy az autofágia megfelelő szinten működik-e vagy sem. A p62-GFP riporter intenzitása viszont a p62 ellenanyaghoz hasonlóan negatív korrelációt mutatott. A p62-GFP-t expresszáló sejtek fluoreszcens intenzitás vizsgálati módszerénél sokkal megbízhatóbb a p62-GFP konverziós kísérlet. Végül igazoltuk, hogy a p62 szintje nem változik ha az érintett géncsendesítés csak késleltetve kapcsol be a *Drosophila* lárvák fejlődése során.

VII. SUMMARY

Autophagy is an evolutionarily conserved pathway in all eukaryotes, and ensures the degradation of cytoplasmic material in lysosomes for subsequent reuse. It is essential for survival, differentiation, development and homeodynamics. It has a significant role in various physiological and pathological conditions such as aging, cancer, immunity and neurodegeneration diseases. In spite of the recent tremendous progress in autophagy, it is necessary to further our understanding of its genetic network and molecular machinery.

We carried out an *in vivo* RNAi screen in mosaic fat bodies of starved *Drosophila* larvae using an mCherry-Atg8a reporter assay. We tested the effect of knocking down 7,118 individual genes, corresponding to 90% of the conserved genome. Importantly, we identified almost all known regulators of autophagy including Atg (autophagy-related) gene homologs in a blind fashion. We next carried out secondary tests, to narrow down our hits and establish three categories with specific autophagy phenotypes: AL, AP, and ATG. The AL group lines cause impaired autolysosomal degradation. In the AP group lines, Atg8-positive structures are generated upon starvation but fail to reach the lysosomal compartment. In the ATG group, silencing of genes inhibits the formation of Atg8-positive structures.

Levels of the selective autophagy substrate p62 have been established in recent years as a specific readout for basal autophagic activity. Here we compared different experimental approaches for using this assay in *Drosophila* larvae. We show that statistical analysis of p62-positive aggregates in immunostained cells and tissues is similarly effective as Western blots for the estimation of basal autophagy levels. Quantifying p62 dots in immunostained fat body cells of L3 stage larvae revealed a strong accumulation of endogenous p62 aggregates in null-mutants for Atg genes and S6K. Next we presented that immunostaining of mosaic fat bodies allows for testing the specific role of genes with lethal phenotypes in basal autophagy. We demonstrated that endogenous p62 provides a much more sensitive measure of autophagy levels than a constitutively overexpressed GFP-tagged reporter in microscopy, which showed self-aggregation and large-scale accumulation even in control cells. We recommend Western blots for following the conversion of overexpressed p62-GFP reporters to estimate autophagic activity if sample collection from mutant larvae or adults is possible. Finally, we showed that the duration of efficient RNAi knockdown is very important for the p62 assay unlike in the case of

induced autophagy, and that overexpressed p62 and Atg8 reporters co-aggregate, and hence may suggest false ''autophagy phenotypes''.

VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet nyilvánítani elsősorban témavezetőmnek, Juhász Gábornak a doktori munkám során nyújtott többéves együttműködéséért, a tudományos kutatómunka megismerése során átnyújtott szakmai tanácsaiért, anyagi, erkölcsi és szellemi támogatásáért.

Köszönettel tartozom Nagy Péternek, aki nagyságával, jókedvével és őszinte barátságával elérte, hogy eljussak a célig. Köszí Pepe!

Szeretném kifejezni őszinte hálámát régi mentoromnak, Lippai Mónikának a lektorálásáért, a szörszálhasogatásáért, végtelen türelméért, soha véget nem érő gondoskodásáért, lelkesedéséért és odafigyeléséért.

Köszönettel tartozom Pálfia Saroltának a labor és a törzsek életben tartásáért, hasznos technikai tanácsaiért és a precizitásáért.

Köszönök mindent a munkában aktívan közreműködő kollégáimnak, a bajtársaimnak, Varga Ágnesnek, Kárpáti Manuélának, Takáts Szabolcsnak, Hegedűs Krisztának és Varga Katának.

Szeretnék köszönetet nyilvánítani az ELTE Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék összes munkatársának kiváltképp Szatmári Zsuzsannának és Széplaki Szilviának.

Szeretnék köszönetet nyilvánítani az ecetmuslica törzseket rendelkezésre bocsátó kollégáknak, ezen kívül a BDSC, VDRC és a TRIP törzsközpontok munkatársainak.

Végül, de nem utolsósorban köszönettel tartozom családomnak, barátaimnak és Szabó Péternek minden egyébért.

IX. MELLÉKLET: a bemutatott ábrához tartozó statisztikai tesztek eredményei

23. ábra A p62 szintjének vizsgálata Atg mutánsokban, p62 RNSi és p62-t túltermelő sejtekben.

PANEL F		normalizált átlag szám	szórás	p	normalizált átlag méret	szórás	p
23. ábra B	KK	0,1368	0,1847	0,0006	0,6724	0,4411	0,0542
23. ábra C	i1	0,0882	0,1178	0,0008	0,4237	0,4466	0,0026
23. ábra D	i2	0,1016	0,1459	0,0041	0,3788	0,5309	0,0065
23. ábra E	p62-GFP	9,0896	3,3496	0,0000	2,9130	0,7943	0,0003

24. ábra Az endogén p62 felhalmozódása S6K és különböző Atg-mutánsok zsírtestsejtjeiben.

PANEL D		átlag szám	szórás	átlag méret	szórás		
24. ábra A	kontroll	15,9000	13,1610	4,5000	2,6352		
		normalizált átlag szám	szórás	p	normalizált átlag méret	szórás	p
24. ábra A	kontroll	1,0000	0,8277		1,0000	0,5856	
24. ábra B	Atg1 -/-	7,1887	2,3624	0,0000	3,0000	0,5250	0,0000
24. ábra C	S6K -/-	4,3019	2,0089	0,0004	1,0889	0,2660	0,6695
24. ábra E	Atg2 -/-	3,5535	1,6481	0,0007	2,4222	0,6744	0,0001
24. ábra F	Atg7 -/-	4,0126	1,5572	0,0001	1,7556	0,3045	0,0029
24. ábra G	Atg8a -/-	6,7610	2,9114	0,0001	2,3556	0,3948	0,0000
24. ábra H	Atg13 -/-	3,3145	1,2673	0,0002	2,2444	0,2210	0,0000
24. ábra I	Atg18a -/-	5,3522	2,4905	0,0003	1,8889	0,4091	0,0012
24. ábra J	Vps34 -/-	7,4591	2,6975	0,0000	1,8611	0,8730	0,0288

25. ábra Az endogén p62 akkumulálódik autofágiát gátló géntermék (L panel) túlermelteése, illetve az autofág folyamatban szerepet játszó géntermékek domináns negatív alléljának túlermelése (F és K panel) vagy RNSi-csendesítése hatására (összes többi panel).

PANEL D		normalizált átlag szám	szórás	p	normalizált átlag méret	szórás	p
25. ábra A	Atg1[JF]	26,2143	8,2641	0,0000	3,6000	0,5657	0,0000
25. ábra B	TSC2[KK]	3,5524	2,2736	0,0062	1,2292	0,4548	0,2543
25. ábra C	RpS8[KK]	0,7505	0,7415	0,4067	0,5682	0,4701	0,0362
25. ábra E	Atg2[JF]	6,3540	3,3690	0,0006	2,6279	0,7358	0,0001
25. ábra F	Atg4 DN	3,3252	0,9668	0,0000	2,1000	0,3375	0,0000
25. ábra G	Atg7[JF]	1,2444	0,6888	0,4216	0,9737	0,3294	0,8478
25. ábra H	Atg8a[KK]	15,3889	3,6104	0,0000	6,5000	3,1103	0,0003
25. ábra I	Atg9[JF]	8,2065	5,4198	0,0022	1,6327	0,4082	0,0032
25. ábra J	Atg14[KK]	2,9440	0,9022	0,0000	1,5625	0,2821	0,0006
25. ábra K	Vps34KD	16,5897	9,5030	0,0006	1,3810	0,2459	0,0411
25. ábra L	UAS-Rheb	4,2444	6,1229	0,1318	1,4348	0,5442	0,0804
25. ábra M	Atg16[KK]	1,2577	0,9665	0,4947	1,0244	0,4985	0,8869
25. ábra N	Atg16[HMS]	3,4350	1,2778	0,0001	3,4667	1,0909	0,0000
25. ábra O	Atg18a[KK]	4,5608	2,2885	0,0008	2,7949	0,7592	0,0000
25. ábra P	Atg18a[JF]	8,8043	3,8598	0,0001	2,7222	0,3154	0,0001
25. ábra Q	Pten[KK]	0,8750	0,5326	0,6013	1,0233	0,2247	0,8061
25. ábra R	Pten[JF]	5,7636	8,3270	0,0013	1,1467	0,5152	0,7567
25. ábra S	Atms[GD]	1,1397	0,2583	0,3847	1,1613	0,2720	0,2961

27. ábra A p62-GFP aggregátumok felhalmozódásának és intenziálásának mértéke RNSi géncsendesített és túlexpresszáltatott törzsekben.

PANEL C

		átlag szám	szórás	átlag méret	szórás		
27. ábra A	kontroll	63,1000	18,9000	58,2000	11,0433		
		normalizált átlag szám	szórás	p	normalizált átlag méret	szórás	p
27. ábra A	kontroll	1,0000	0,2995		1,0000	0,1897	
27. ábra B	Atg1[JF]	0,3867	0,1019	0,0001	1,2680	0,3493	0,0513
27. ábra E	Atg7[JF]	0,5705	0,2417	0,0025	0,8127	0,2632	0,0863
27. ábra F	Atg8a[KK]	0,3074	0,0826	0,0000	1,0773	0,3613	0,5589
27. ábra G	Atg9[JF]	0,2916	0,1155	0,0000	1,5000	0,7022	0,0540
27. ábra H	Atg14[KK]	0,7554	0,1273	0,0250	0,9527	0,1128	0,4435
27. ábra I	Atg18a[KK]	0,3740	0,1493	0,0000	1,1082	0,2636	0,3073
27. ábra J	Vps34KD	0,3217	0,1507	0,0000	1,3299	0,5357	0,0930
27. ábra K	Pten[JF]	0,3265	0,1070	0,0000	1,5103	0,3495	0,0012
27. ábra L	Tsc2[KK]	0,3154	0,1316	0,0000	1,4124	0,5682	0,0522
27. ábra M	RpS8[KK]	0,1823	0,1316	0,0000	1,7938	0,7795	0,0106
27. ábra N	Atms[GD]	0,4120	0,2377	0,0001	1,5241	0,5766	0,0197

27. ábra A p62-GFP aggregátumok felhalmozódásának és intenziálásának mértéke RNSi géncsesditett és túlexpresszáltatott törzsekben.

PANEL D		átlag expozíciós idő	szórás	normalizált expozíciós idő	normalizált átlag intenziálás	szórás	p
27. ábra A	kontroll	805,5454545	251,4455661	1,0000	1,0000		
27. ábra B	Atg1[JF]	425,7273	119,5350	0,4754	1,8922	0,1484	0,0005
27. ábra E	Atg7[JF]	846,0909	306,9624	1,2208	0,9521	0,3811	0,7384
27. ábra F	Atg8a[KK]	582,6364	152,0640	0,6048	1,3826	0,1888	0,0226
27. ábra G	Atg9[JF]	324,1818	110,7672	0,4405	2,4849	0,1375	0,0000
27. ábra H	Atg14[KK]	518,8182	91,7397	0,3648	1,5527	0,1139	0,0037
27. ábra I	Atg18a[KK]	534,6364	150,4528	0,5984	1,5067	0,1868	0,0072
27. ábra J	Vps34KD	342,6364	92,0459	0,3661	2,3510	0,1143	0,0001
27. ábra K	Pten[JF]	180,1818	43,6413	1,1227	4,4707	0,0542	0,0000
27. ábra L	Tsc2[KK]	565,8182	282,3079	0,1736	1,4237	0,3505	0,0485
27. ábra M	RpS8[KK]	1312,1818	1028,7197	4,0912	0,6139	1,2770	0,1404
27. ábra N	Atms[GD]	573,9091	199,7746	0,7945	1,4036	0,2480	0,0272

28. ábra Az Atg16, Atg18a és a Pten RNSi vonalaktól származó lárvák éheztetésre adott autofág válasza L3 és L2 stádiumban.

PANEL E		normalizált átlag szám	szórás	p	normalizált átlag méret	szórás	p
28. ábra A	Atg16[KK]L3	0,1142	0,1552	0,0000	0,0980	0,1078	0,0000
28. ábra C	Atg16[HMS]L3	0,2000	0,1250	0,0267	0,0814	0,0808	0,0027
28. ábra B	Atg16[KK]L2	1,1200	0,4237	0,5569	0,5009	0,2835	0,0151
28. ábra D	Atg16[HMS]L2	1,1698	0,7537	0,5914	0,1031	0,1034	0,0083

PANEL J		normalizált átlag szám	szórás	p	normalizált átlag méret	szórás	p
28. ábra F	Atg18a[KK]L3	0,2179	0,3356	0,0003	0,1283	0,1496	0,0000
28. ábra H	Atg18a[JF]L3	0,0573	0,0778	0,0006	0,0143	0,0167	0,0008
28. ábra G	Atg18a[KK]L2	0,6579	0,3972	0,2949	0,1315	0,0999	0,0041
28. ábra I	Atg18a[JF]L2	0,4444	0,5466	0,0546	0,0242	0,0285	0,0003

PANEL O		normalizált átlag szám	szórás	p	normalizált átlag méret	szórás	p
28. ábra K	Pten[KK]L3	0,1543	0,1507	0,0017	0,3333	0,3339	0,0000
28. ábra M	Pten[JF]L3	0,0523	0,0850	0,0003	0,0826	0,0826	0,0000
28. ábra L	Pten[KK]L2	0,9556	0,7337	0,8874	0,5187	0,5477	0,1432
28. ábra N	Pten[JF]L2	0,4615	0,5889	0,0404	0,2238	0,2350	0,0022

29. ábra Két független Atg16 RNSi vonalból származó lárvák éheztetésre adott, LTR-festéssel detektált autofág válasza L3 és L2 stádiumban.

PANEL E		normalizált átlag szám	szórás	p	normalizált átlag méret	szórás	p
29. ábra A	Atg16[KK]L3	0,1910	0,1637	0,0000	0,2742	0,3488	0,0084
29. ábra C	Atg16[HMS]L3	0,1522	0,1594	0,0003	0,2211	0,2298	0,0018
29. ábra B	Atg16[KK]L2	0,8378	0,6600	0,5101	0,9703	0,6629	0,9030
29. ábra D	Atg16[HMS]L2	0,6754	0,4042	0,2441	0,5793	0,4145	0,0421

33. ábra A p62 felhalmozódásának mértéke alapján az mCherry-Atg8a riportter túltermeltetése részben menekíti mind az Atg8a funkcióvesztéses mutációja, mind az Atg4DN allél expressziója által okozott autofágia-defektust.

PANEL B		normalizált átlag szám	szórás	p	normalizált átlag méret	szórás	p
23. ábra A	kontroll	1,0000	0,8277		1,0000	0,5856	
23. ábra G	Atg8a -/-	6,7610	2,9114	0,0001	2,3556	0,3948	0,0000
33. ábra A	Atg8a-r4mChAtg8a	3,9119	1,2490	0,0000	1,5778	0,4376	0,0232

PANEL B		p szám	p méret
23. ábra G	Atg8a -/-	0,0146	0,0006
33. ábra A	Atg8a-r4mChAtg8a		

PANEL D		normalizált átlag szám	szórás	p	normalizált átlag méret	szórás	p
33. ábra C	Atg4 DN	0,9896	0,5565	0,9620	0,8571	0,1650	0,2780

X. REFERENCIÁK

Arstila, A. U. and B. F. Trump (1969). "Autophagocytosis: origin of membrane and hydrolytic enzymes." Virchows Arch B Cell Pathol **2**(1): 85-90.

Baehrecke, E. H. (2000). "Steroid regulation of programmed cell death during *Drosophila* development." Cell Death Differ **7**(11): 1057-1062.

Baehrecke, E. H. (2003). "Autophagic programmed cell death in *Drosophila*." Cell Death Differ **10**(9): 940-945.

Bartlett, B. J., P. Isakson, J. Lewerenz, H. Sanchez, R. W. Kotzue, R. C. Cumming, G. L. Harris, I. P. Nezis, D. R. Schubert, A. Simonsen and K. D. Finley (2011). "p62, Ref(2)P and ubiquitinated proteins are conserved markers of neuronal aging, aggregate formation and progressive autophagic defects." Autophagy **7**(6): 572-583.

Bjorkoy, G., T. Lamark, S. Pankiv, A. Overvatn, A. Brech and T. Johansen (2009). "Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1." Methods Enzymol **452**: 181-197.

Boutros, M., A. A. Kiger, S. Armknecht, K. Kerr, M. Hild, B. Koch, S. A. Haas, R. Paro, N. Perrimon and C. Heidelberg Fly Array (2004). "Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in *Drosophila* cells." Science **303**(5659): 832-835.

Bristol, M. L., S. M. Emery, P. Maycotte, A. Thorburn, S. Chakradeo and D. A. Gewirtz (2013). "Autophagy inhibition for chemosensitization and radiosensitization in cancer: do the preclinical data support this therapeutic strategy?" J Pharmacol Exp Ther.

Chan, E. Y., A. Longatti, N. C. McKnight and S. A. Tooze (2009). "Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism." Mol Cell Biol **29**(1): 157-171.

Chang, Y. Y. and T. P. Neufeld (2009). "An Atg1/Atg13 complex with multiple roles in TOR-mediated autophagy regulation." Mol Biol Cell **20**(7): 2004-2014.

Cheong, H., U. Nair, J. Geng and D. J. Klionsky (2008). "The Atg1 kinase complex is involved in the regulation of protein recruitment to initiate sequestering vesicle formation for nonspecific autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Biol Cell **19**(2): 668-681.

- Clarke, P. G. (1990). "Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms." Anat Embryol (Berl) **181**(3): 195-213.
- Cuervo, A. M. (2008). "Autophagy and aging: keeping that old broom working." Trends Genet **24**(12): 604-612.
- Dai, J. D. and L. I. Gilbert (1997). "Programmed cell death of the prothoracic glands of *Manduca sexta* during pupal-adult metamorphosis." Insect Biochem Mol Biol **27**(1): 69-78.
- de Duve, D. (1969). "The peroxisome: a new cytoplasmic organelle." Proc R Soc Lond B Biol Sci **173**(30): 71-83.
- Duffy, J. B. (2002). "GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife." Genesis **34**(1-2): 1-15.
- Dunn, W. A., Jr. (1990). "Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole." J Cell Biol **110**(6): 1923-1933.
- Duran, A., R. Amanchy, J. F. Linares, J. Joshi, S. Abu-Baker, A. Porollo, M. Hansen, J. Moscat and M. T. Diaz-Meco (2011). "p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway." Mol Cell **44**(1): 134-146.
- Duran, A., J. F. Linares, A. S. Galvez, K. Wikenheiser, J. M. Flores, M. T. Diaz-Meco and J. Moscat (2008). "The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis." Cancer Cell **13**(4): 343-354.
- Duran, A., M. Serrano, M. Leitges, J. M. Flores, S. Picard, J. P. Brown, J. Moscat and M. T. Diaz-Meco (2004). "The atypical PKC-interacting protein p62 is an important mediator of RANK-activated osteoclastogenesis." Dev Cell **6**(2): 303-309.
- Edinger, A. L. and C. B. Thompson (2004). "Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy." Curr Opin Cell Biol **16**(6): 663-669.
- Egner, R., M. Thumm, M. Straub, A. Simeon, H. J. Schuller and D. H. Wolf (1993). "Tracing intracellular proteolytic pathways. Proteolysis of fatty acid synthase and other cytoplasmic proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **268**(36): 27269-27276.

Erdi, B., P. Nagy, A. Zvara, A. Varga, K. Piracs, D. Menesi, L. G. Puskas and G. Juhasz (2012). "Loss of the starvation-induced gene Rack1 leads to glycogen deficiency and impaired autophagic responses in *Drosophila*." *Autophagy* **8**(7): 1124-1135.

Eskelinen, E. L. and A. L. Kovacs (2011). "Double membranes vs. lipid bilayers, and their significance for correct identification of macroautophagic structures." *Autophagy* **7**(9): 931-932.

Fujita, N., M. Hayashi-Nishino, H. Fukumoto, H. Omori, A. Yamamoto, T. Noda and T. Yoshimori (2008). "An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure." *Mol Biol Cell* **19**(11): 4651-4659.

Glinsmann, W. H. and J. L. Ericsson (1966). "Observations on the subcellular organization of hepatic parenchymal cells. II. Evolution of reversible alterations induced by hypoxia." *Lab Invest* **15**(4): 762-777.

Golic, K. G. (1990). "Examination of a mutable system affecting the components of the segregation distorter meiotic drive system of *Drosophila melanogaster*." *Genetics* **125**(1): 51-76.

Groth, A. C., M. Fish, R. Nusse and M. P. Calos (2004). "Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage phiC31." *Genetics* **166**(4): 1775-1782.

Hailey, D. W., A. S. Rambold, P. Satpute-Krishnan, K. Mitra, R. Sougrat, P. K. Kim and J. Lippincott-Schwartz (2010). "Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation." *Cell* **141**(4): 656-667.

Hara, T., K. Nakamura, M. Matsui, A. Yamamoto, Y. Nakahara, R. Suzuki-Migishima, M. Yokoyama, K. Mishima, I. Saito, H. Okano and N. Mizushima (2006). "Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice." *Nature* **441**(7095): 885-889.

Hara, T., A. Takamura, C. Kishi, S. Iemura, T. Natsume, J. L. Guan and N. Mizushima (2008). "FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells." *J Cell Biol* **181**(3): 497-510.

- Hardie, D. G. (2007). "AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(10): 774-785.
- Hardie, D. G., D. Carling and M. Carlson (1998). "The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell?" Annu Rev Biochem **67**: 821-855.
- Harding, T. M., K. A. Morano, S. V. Scott and D. J. Klionsky (1995). "Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway." J Cell Biol **131**(3): 591-602.
- He, C., C. R. Bartholomew, W. Zhou and D. J. Klionsky (2009). "Assaying autophagic activity in transgenic GFP-Lc3 and GFP-Gabarap zebrafish embryos." Autophagy **5**(4): 520-526.
- Hietakangas, V. and S. M. Cohen (2009). "Regulation of tissue growth through nutrient sensing." Annu Rev Genet **43**: 389-410.
- Hosokawa, N., T. Hara, T. Kaizuka, C. Kishi, A. Takamura, Y. Miura, S. Iemura, T. Natsume, K. Takehana, N. Yamada, J. L. Guan, N. Oshiro and N. Mizushima (2009). "Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy." Mol Biol Cell **20**(7): 1981-1991.
- Hosokawa, N., T. Sasaki, S. Iemura, T. Natsume, T. Hara and N. Mizushima (2009). "Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13." Autophagy **5**(7): 973-979.
- Hurley, J. H. (2010). "The ESCRT complexes." Crit Rev Biochem Mol Biol **45**(6): 463-487.
- Ichimura, Y., Y. Imamura, K. Emoto, M. Umeda, T. Noda and Y. Ohsumi (2004). "In vivo and in vitro reconstitution of Atg8 conjugation essential for autophagy." J Biol Chem **279**(39): 40584-40592.
- Ichimura, Y., T. Kirisako, T. Takao, Y. Satomi, Y. Shimonishi, N. Ishihara, N. Mizushima, I. Tanida, E. Kominami, M. Ohsumi, T. Noda and Y. Ohsumi (2000). "A ubiquitin-like system mediates protein lipidation." Nature **408**(6811): 488-492.

- Ichimura, Y., T. Kumanomidou, Y. S. Sou, T. Mizushima, J. Ezaki, T. Ueno, E. Kominami, T. Yamane, K. Tanaka and M. Komatsu (2008). "Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy." J Biol Chem **283**(33): 22847-22857.
- Itakura, E., C. Kishi, K. Inoue and N. Mizushima (2008). "Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG." Mol Biol Cell **19**(12): 5360-5372.
- Itakura, E. and N. Mizushima (2010). "Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins." Autophagy **6**(6): 764-776.
- Juhasz, G. (2012). "Interpretation of bafilomycin, pH neutralizing or protease inhibitor treatments in autophagic flux experiments: novel considerations." Autophagy **8**(12): 1875-1876.
- Juhasz, G., B. Erdi, M. Sass and T. P. Neufeld (2007). "Atg7-dependent autophagy promotes neuronal health, stress tolerance, and longevity but is dispensable for metamorphosis in Drosophila." Genes Dev **21**(23): 3061-3066.
- Juhasz, G., J. H. Hill, Y. Yan, M. Sass, E. H. Baehrecke, J. M. Backer and T. P. Neufeld (2008). "The class III PI(3)K Vps34 promotes autophagy and endocytosis but not TOR signaling in Drosophila." J Cell Biol **181**(4): 655-666.
- Kabeya, Y., N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi and T. Yoshimori (2000). "LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing." EMBO J **19**(21): 5720-5728.
- Kamada, Y., T. Funakoshi, T. Shintani, K. Nagano, M. Ohsumi and Y. Ohsumi (2000). "Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex." J Cell Biol **150**(6): 1507-1513.
- Kamada, Y., K. Yoshino, C. Kondo, T. Kawamata, N. Oshiro, K. Yonezawa and Y. Ohsumi (2010). "Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy." Mol Cell Biol **30**(4): 1049-1058.
- Kamath, R. S. and J. Ahringer (2003). "Genome-wide RNAi screening in Caenorhabditis elegans." Methods **30**(4): 313-321.

Kemp, B. E., D. Stapleton, D. J. Campbell, Z. P. Chen, S. Murthy, M. Walter, A. Gupta, J. J. Adams, F. Katsis, B. van Denderen, I. G. Jennings, T. Iseli, B. J. Michell and L. A. Witters (2003). "AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator." Biochem Soc Trans **31**(Pt 1): 162-168.

Kim, D. H., D. D. Sarbassov, S. M. Ali, J. E. King, R. R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. M. Sabatini (2002). "mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery." Cell **110**(2): 163-175.

Klionsky, D. J. (2005). "The molecular machinery of autophagy: unanswered questions." J Cell Sci **118**(Pt 1): 7-18.

Klionsky, D. J. (2007). "Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(11): 931-937.

Klionsky, D. J., F. C. Abdalla, H. Abeliovich, R. T. Abraham, A. Acevedo-Arozena, K. Adeli, L. Agholme, M. Agnello, P. Agostinis, J. A. Aguirre-Ghiso, H. J. Ahn, O. Ait-Mohamed, S. Ait-Si-Ali, T. Akematsu, S. Akira, H. M. Al-Younes, M. A. Al-Zeer, M. L. Albert, R. L. Albin, J. Alegre-Abarrategui, M. F. Aleo, M. Alirezaci, A. Almasan, M. Almonte-Becerril, A. Amano, R. Amaravadi, S. Amarnath, A. O. Amer, N. Andrieu-Abadie, V. Anantharam, D. K. Ann, S. Anoopkumar-Dukie, H. Aoki, N. Apostolova, G. Arancia, J. P. Aris, K. Asanuma, N. Y. Asare, H. Ashida, V. Askanas, D. S. Askew, P. Auberger, M. Baba, S. K. Backues, E. H. Baehrecke, B. A. Bahr, X. Y. Bai, Y. Bailly, R. Baiocchi, G. Baldini, W. Balduini, A. Ballabio, B. A. Bamber, E. T. Bampton, G. Banhegyi, C. R. Bartholomew, D. C. Bassham, R. C. Bast, Jr., H. Batoko, B. H. Bay, I. Beau, D. M. Bechet, T. J. Begley, C. Behl, C. Behrends, S. Bekri, B. Bellaire, L. J. Bendall, L. Benetti, L. Berliocchi, H. Bernardi, F. Bernassola, S. Besteiro, I. Bhatia-Kissova, X. Bi, M. Biard-Piechaczyk, J. S. Blum, L. H. Boise, P. Bonaldo, D. L. Boone, B. C. Bornhauser, K. R. Bortoluci, I. Bossis, F. Bost, J. P. Bourquin, P. Boya, M. Boyer-Guittaut, P. V. Bozhkov, N. R. Brady, C. Brancolini, A. Brech, J. E. Brenman, A. Brennand, E. H. Bresnick, P. Brest, D. Bridges, M. L. Bristol, P. S. Brookes, E. J. Brown, J. H. Brumell, N. Brunetti-Pierri, U. T. Brunk, D. E. Bulman, S. J. Bultman, G. Bultynck, L. F. Burbulla, W. Bursch, J. P. Butchar, W. Buzgariu, S. P. Bydlowski, K. Cadwell, M. Cahova, D. Cai, J. Cai, Q. Cai, B. Calabretta, J. Calvo-Garrido, N. Camougrand, M. Campanella, J. Campos-Salinas, E. Candi, L. Cao, A. B. Caplan, S. R. Carding, S. M.

Cardoso, J. S. Carew, C. R. Carlin, V. Carmignac, L. A. Carneiro, S. Carra, R. A. Caruso, G. Casari, C. Casas, R. Castino, E. Cebollero, F. Cecconi, J. Celli, H. Chaachouay, H. J. Chae, C. Y. Chai, D. C. Chan, E. Y. Chan, R. C. Chang, C. M. Che, C. C. Chen, G. C. Chen, G. Q. Chen, M. Chen, Q. Chen, S. S. Chen, W. Chen, X. Chen, X. Chen, X. Chen, Y. G. Chen, Y. Chen, Y. Chen, Y. J. Chen, Z. Chen, A. Cheng, C. H. Cheng, Y. Cheng, H. Cheong, J. H. Cheong, S. Cherry, R. Chess-Williams, Z. H. Cheung, E. Chevet, H. L. Chiang, R. Chiarelli, T. Chiba, L. S. Chin, S. H. Chiou, F. V. Chisari, C. H. Cho, D. H. Cho, A. M. Choi, D. Choi, K. S. Choi, M. E. Choi, S. Chouaib, D. Choubey, V. Choubey, C. T. Chu, T. H. Chuang, S. H. Chueh, T. Chun, Y. J. Chwae, M. L. Chye, R. Ciarcia, M. R. Ciriolo, M. J. Clague, R. S. Clark, P. G. Clarke, R. Clarke, P. Codogno, H. A. Coller, M. I. Colombo, S. Comincini, M. Condello, F. Condorelli, M. R. Cookson, G. H. Coombs, I. Coppens, R. Corbalan, P. Cossart, P. Costelli, S. Costes, A. Coto-Montes, E. Couve, F. P. Coxon, J. M. Cregg, J. L. Crespo, M. J. Cronje, A. M. Cuervo, J. J. Cullen, M. J. Czaja, M. D'Amelio, A. Darfeuille-Michaud, L. M. Davids, F. E. Davies, M. De Felici, J. F. de Groot, C. A. de Haan, L. De Martino, A. De Milito, V. De Tata, J. Debnath, A. Degterev, B. Dehay, L. M. Delbridge, F. Demarchi, Y. Z. Deng, J. Dengjel, P. Dent, D. Denton, V. Deretic, S. D. Desai, R. J. Devenish, M. Di Gioacchino, G. Di Paolo, C. Di Pietro, G. Diaz-Araya, I. Diaz-Laviada, M. T. Diaz-Meco, J. Diaz-Nido, I. Dikic, S. P. Dinesh-Kumar, W. X. Ding, C. W. Distelhorst, A. Diwan, M. Djavaheri-Mergny, S. Dokudovskaya, Z. Dong, F. C. Dorsey, V. Dosenko, J. J. Dowling, S. Doxsey, M. Dreux, M. E. Drew, Q. Duan, M. A. Duchosal, K. Duff, I. Dugail, M. Durbeej, M. Duszenko, C. L. Edelstein, A. L. Edinger, G. Egea, L. Eichinger, N. T. Eissa, S. Ekmekcioglu, W. S. El-Deiry, Z. Elazar, M. Elgendy, L. M. Ellerby, K. E. Eng, A. M. Engelbrecht, S. Engelender, J. Erenpreisa, R. Escalante, A. Esclatine, E. L. Eskelinen, L. Espert, V. Espina, H. Fan, J. Fan, Q. W. Fan, Z. Fan, S. Fang, Y. Fang, M. Fanto, A. Fanzani, T. Farkas, J. C. Farre, M. Faure, M. Fechheimer, C. G. Feng, J. Feng, Q. Feng, Y. Feng, L. Fesus, R. Feuer, M. E. Figueiredo-Pereira, G. M. Fimia, D. C. Fingar, S. Finkbeiner, T. Finkel, K. D. Finley, F. Fiorito, E. A. Fisher, P. B. Fisher, M. Flajolet, M. L. Florez-McClure, S. Florio, E. A. Fon, F. Fornai, F. Fortunato, R. Fotedar, D. H. Fowler, H. S. Fox, R. Franco, L. B. Frankel, M. Fransen, J. M. Fuentes, J. Fueyo, J. Fujii, K. Fujisaki, E. Fujita, M. Fukuda, R. H. Furukawa, M. Gaestel, P. Gailly, M. Gajewska, B. Galliot, V. Galy, S. Ganesh, B. Ganetzky, I. G. Ganley, F. B. Gao, G. F. Gao, J. Gao, L. Garcia, G. Garcia-Manero, M. Garcia-Marcos, M. Garmyn, A. L. Gartel, E. Gatti, M. Gautel, T. R. Gawriluk, M. E. Gegg, J. Geng, M. Germain, J. E.

Gestwicki, D. A. Gewirtz, S. Ghavami, P. Ghosh, A. M. Giammarioli, A. N. Giatromanolaki, S. B. Gibson, R. W. Gilkerson, M. L. Ginger, H. N. Ginsberg, J. Golab, M. S. Goligorsky, P. Golstein, C. Gomez-Manzano, E. Goncu, C. Gongora, C. D. Gonzalez, R. Gonzalez, C. Gonzalez-Estevez, R. A. Gonzalez-Polo, E. Gonzalez-Rey, N. V. Gorbunov, S. Gorski, S. Goruppi, R. A. Gottlieb, D. Gozuacik, G. E. Granato, G. D. Grant, K. N. Green, A. Gregorc, F. Gros, C. Grose, T. W. Grunt, P. Gual, J. L. Guan, K. L. Guan, S. M. Guichard, A. S. Gukovskaya, I. Gukovsky, J. Gunst, A. B. Gustafsson, A. J. Halayko, A. N. Hale, S. K. Halonen, M. Hamasaki, F. Han, T. Han, M. K. Hancock, M. Hansen, H. Harada, M. Harada, S. E. Hardt, J. W. Harper, A. L. Harris, J. Harris, S. D. Harris, M. Hashimoto, J. A. Haspel, S. Hayashi, L. A. Hazelhurst, C. He, Y. W. He, M. J. Hebert, K. A. Heidenreich, M. H. Helfrich, G. V. Helgason, E. P. Henske, B. Herman, P. K. Herman, C. Hetz, S. Hilfiker, J. A. Hill, L. J. Hocking, P. Hofman, T. G. Hofmann, J. Hohfeld, T. L. Holyoake, M. H. Hong, D. A. Hood, G. S. Hotamisliligil, E. J. Houwerzijl, M. Hoyer-Hansen, B. Hu, C. A. Hu, H. M. Hu, Y. Hua, C. Huang, J. Huang, S. Huang, W. P. Huang, T. B. Huber, W. K. Huh, T. H. Hung, T. R. Hupp, G. M. Hur, J. B. Hurley, S. N. Hussain, P. J. Hussey, J. J. Hwang, S. Hwang, A. Ichihara, S. Ilkhanizadeh, K. Inoki, T. Into, V. Iovane, J. L. Iovanna, N. Y. Ip, Y. Isaka, H. Ishida, C. Isidoro, K. Isobe, A. Iwasaki, M. Izquierdo, Y. Izumi, P. M. Jaakkola, M. Jaattela, G. R. Jackson, W. T. Jackson, B. Janji, M. Jendrach, J. H. Jeon, E. B. Jeung, H. Jiang, H. Jiang, J. X. Jiang, M. Jiang, Q. Jiang, X. Jiang, X. Jiang, A. Jimenez, M. Jin, S. Jin, C. O. Joe, T. Johansen, D. E. Johnson, G. V. Johnson, N. L. Jones, B. Joseph, S. K. Joseph, A. M. Joubert, G. Juhasz, L. Juillerat-Jeanneret, C. H. Jung, Y. K. Jung, K. Kaamiranta, A. Kaasik, T. Kabuta, M. Kadowaki, K. Kagedal, Y. Kamada, V. O. Kaminsky, H. H. Kampinga, H. Kanamori, C. Kang, K. B. Kang, K. I. Kang, R. Kang, Y. A. Kang, T. Kanki, T. D. Kanneganti, H. Kanno, A. G. Kanthasamy, A. Kanthasamy, V. Karantza, G. P. Kaushal, S. Kaushik, Y. Kawazoe, P. Y. Ke, J. H. Kehrl, A. Kelekar, C. Kerkhoff, D. H. Kessel, H. Khalil, J. A. Kiel, A. A. Kiger, A. Kihara, D. R. Kim, D. H. Kim, D. H. Kim, E. K. Kim, H. R. Kim, J. S. Kim, J. H. Kim, J. C. Kim, J. K. Kim, P. K. Kim, S. W. Kim, Y. S. Kim, Y. Kim, A. Kimchi, A. C. Kimmelman, J. S. King, T. J. Kinsella, V. Kirkin, L. A. Kirshenbaum, K. Kitamoto, K. Kitazato, L. Klein, W. T. Klimecki, J. Klucken, E. Knecht, B. C. Ko, J. C. Koch, H. Koga, J. Y. Koh, Y. H. Koh, M. Koike, M. Komatsu, E. Kominami, H. J. Kong, W. J. Kong, V. I. Korolchuk, Y. Kotake, M. I. Koukourakis, J. B. Kouri Flores, A. L. Kovacs, C. Kraft, D. Krainc, H. Kramer, C. Kretz-Remy, A. M. Krichevsky, G. Kroemer,

R. Kruger, O. Krut, N. T. Ktistakis, C. Y. Kuan, R. Kucharczyk, A. Kumar, R. Kumar, S. Kumar, M. Kundu, H. J. Kung, T. Kurz, H. J. Kwon, A. R. La Spada, F. Lafont, T. Lamark, J. Landry, J. D. Lane, P. Lapaquette, J. F. Laporte, L. Laszlo, S. Lavandro, J. N. Lavoie, R. Layfield, P. A. Lazo, W. Le, L. Le Cam, D. J. Ledbetter, A. J. Lee, B. W. Lee, G. M. Lee, J. Lee, J. H. Lee, M. Lee, M. S. Lee, S. H. Lee, C. Leeuwenburgh, P. Legembre, R. Legouis, M. Lehmann, H. Y. Lei, Q. Y. Lei, D. A. Leib, J. Leiro, J. J. Lemasters, A. Lemoine, M. S. Lesniak, D. Lev, V. V. Levenson, B. Levine, E. Levy, F. Li, J. L. Li, L. Li, S. Li, W. Li, X. J. Li, Y. B. Li, Y. P. Li, C. Liang, Q. Liang, Y. F. Liao, P. P. Liberski, A. Lieberman, H. J. Lim, K. L. Lim, K. Lim, C. F. Lin, F. C. Lin, J. Lin, J. D. Lin, K. Lin, W. W. Lin, W. C. Lin, Y. L. Lin, R. Linden, P. Lingor, J. Lippincott-Schwartz, M. P. Lisanti, P. B. Liton, B. Liu, C. F. Liu, K. Liu, L. Liu, Q. A. Liu, W. Liu, Y. C. Liu, Y. Liu, R. A. Lockshin, C. N. Lok, S. Lonial, B. Loos, G. Lopez-Berestein, C. Lopez-Otin, L. Lossi, M. T. Lotze, P. Low, B. Lu, B. Lu, B. Lu, Z. Lu, F. Luciano, N. W. Lukacs, A. H. Lund, M. A. Lynch-Day, Y. Ma, F. Macian, J. P. MacKeigan, K. F. Macleod, F. Madeo, L. Maiuri, M. C. Maiuri, D. Malagoli, M. C. Malicdan, W. Malorni, N. Man, E. M. Mandelkow, S. Manon, I. Manov, K. Mao, X. Mao, Z. Mao, P. Marambaud, D. Marazziti, Y. L. Marcel, K. Marchbank, P. Marchetti, S. J. Marciniak, M. Marcondes, M. Mardi, G. Marfe, G. Marino, M. Markaki, M. R. Marten, S. J. Martin, C. Martinand-Mari, W. Martinet, M. Martinez-Vicente, M. Masini, P. Matarrese, S. Matsuo, R. Matteoni, A. Mayer, N. M. Mazure, D. J. McConkey, M. J. McConnell, C. McDermott, C. McDonald, G. M. McInerney, S. L. McKenna, B. McLaughlin, P. J. McLean, C. R. McMaster, G. A. McQuibban, A. J. Meijer, M. H. Meisler, A. Melendez, T. J. Melia, G. Melino, M. A. Mena, J. A. Menendez, R. F. Menna-Barreto, M. B. Menon, F. M. Menzies, C. A. Mercer, A. Merighi, D. E. Merry, S. Meschini, C. G. Meyer, T. F. Meyer, C. Y. Miao, J. Y. Miao, P. A. Michels, C. Michiels, D. Mijaljica, A. Milojkovic, S. Minucci, C. Miracco, C. K. Miranti, I. Mitroulis, K. Miyazawa, N. Mizushima, B. Mograbi, S. Mohseni, X. Molero, B. Mollereau, F. Mollinedo, T. Momoi, I. Monastyrska, M. M. Monick, M. J. Monteiro, M. N. Moore, R. Mora, K. Moreau, P. I. Moreira, Y. Moriyasu, J. Moscat, S. Mostowy, J. C. Mottram, T. Motyl, C. E. Moussa, S. Muller, S. Muller, K. Munger, C. Munz, L. O. Murphy, M. E. Murphy, A. Musaro, I. Mysorekar, E. Nagata, K. Nagata, A. Nahimana, U. Nair, T. Nakagawa, K. Nakahira, H. Nakano, H. Nakatogawa, M. Nanjundan, N. I. Naqvi, D. P. Narendra, M. Narita, M. Navarro, S. T. Nawrocki, T. Y. Nazarko, A. Nemchenko, M. G. Netea, T. P. Neufeld, P. A. Ney, I. P. Nezis, H. P. Nguyen,

D. Nie, I. Nishino, C. Nislow, R. A. Nixon, T. Noda, A. A. Noegel, A. Nogalska, S. Noguchi, L. Notterpek, I. Novak, T. Nozaki, N. Nukina, T. Nurnberger, B. Nyfeler, K. Obara, T. D. Oberley, S. Oddo, M. Ogawa, T. Ohashi, K. Okamoto, N. L. Oleinick, F. J. Oliver, L. J. Olsen, S. Olsson, O. Opota, T. F. Osborne, G. K. Ostrander, K. Otsu, J. H. Ou, M. Ouimet, M. Overholtzer, B. Ozpolat, P. Paganetti, U. Pagnini, N. Pallet, G. E. Palmer, C. Palumbo, T. Pan, T. Panaretakis, U. B. Pandey, Z. Papackova, I. Papassideri, I. Paris, J. Park, O. K. Park, J. B. Parys, K. R. Parzych, S. Patschan, C. Patterson, S. Patingre, J. M. Pawelek, J. Peng, D. H. Perlmutter, I. Perrotta, G. Perry, S. Pervaiz, M. Peter, G. J. Peters, M. Petersen, G. Petrovski, J. M. Phang, M. Piacentini, P. Pierre, V. Pierrefite-Carle, G. Pierron, R. Pinkas-Kramarski, A. Piras, N. Piri, L. C. Platanius, S. Poggeler, M. Poirot, A. Poletti, C. Pous, M. Pozuelo-Rubio, M. Praetorius-Ibba, A. Prasad, M. Prescott, M. Priault, N. Produit-Zengaffinen, A. Progulske-Fox, T. Proikas-Cezanne, S. Przedborski, K. Przyklenk, R. Puertollano, J. Puyal, S. B. Qian, L. Qin, Z. H. Qin, S. E. Quaggin, N. Raben, H. Rabinowich, S. W. Rabkin, I. Rahman, A. Rami, G. Ramm, G. Randall, F. Randow, V. A. Rao, J. C. Rathmell, B. Ravikumar, S. K. Ray, B. H. Reed, J. C. Reed, F. Reggiori, A. Regnier-Vigouroux, A. S. Reichert, J. J. Reiners, Jr., R. J. Reiter, J. Ren, J. L. Revuelta, C. J. Rhodes, K. Ritis, E. Rizzo, J. Robbins, M. Roberge, H. Roca, M. C. Roccheri, S. Rocchi, H. P. Rodemann, S. Rodriguez de Cordoba, B. Rohrer, I. B. Roninson, K. Rosen, M. M. Rost-Roszkowska, M. Rouis, K. M. Rouschop, F. Rovetta, B. P. Rubin, D. C. Rubinsztein, K. Ruckdeschel, E. B. Rucker, 3rd, A. Rudich, E. Rudolf, N. Ruiz-Opazo, R. Russo, T. E. Rusten, K. M. Ryan, S. W. Ryter, D. M. Sabatini, J. Sadoshima, T. Saha, T. Saitoh, H. Sakagami, Y. Sakai, G. H. Salekdeh, P. Salomoni, P. M. Salvaterra, G. Salvesen, R. Salvioli, A. M. Sanchez, J. A. Sanchez-Alcazar, R. Sanchez-Prieto, M. Sandri, U. Sankar, P. Sansanwal, L. Santambrogio, S. Saran, S. Sarkar, M. Sarwal, C. Sasakawa, A. Sasnauskiene, M. Sass, K. Sato, M. Sato, A. H. Schapira, M. Scharl, H. M. Schatzl, W. Scheper, S. Schiaffino, C. Schneider, M. E. Schneider, R. Schneider-Stock, P. V. Schoenlein, D. F. Schorderet, C. Schuller, G. K. Schwartz, L. Scorrano, L. Sealy, P. O. Seglen, J. Segura-Aguilar, I. Seiliez, O. Seleverstov, C. Sell, J. B. Seo, D. Separovic, V. Setaluri, T. Setoguchi, C. Settembre, J. J. Shacka, M. Shanmugam, I. M. Shapiro, E. Shaulian, R. J. Shaw, J. H. Shelhamer, H. M. Shen, W. C. Shen, Z. H. Sheng, Y. Shi, K. Shibuya, Y. Shidoji, J. J. Shieh, C. M. Shih, Y. Shimada, S. Shimizu, T. Shintani, O. S. Shirihai, G. C. Shore, A. A. Sibirny, S. B. Sidhu, B. Sikorska, E. C. Silva-Zacarin, A. Simmons, A. K. Simon, H. U. Simon, C. Simone, A. Simonsen, D. A. Sinclair,

R. Singh, D. Sinha, F. A. Sinicrope, A. Sirko, P. M. Siu, E. Sivridis, V. Skop, V. P. Skulachev, R. S. Slack, S. S. Smaili, D. R. Smith, M. S. Soengas, T. Soldati, X. Song, A. K. Sood, T. W. Soong, F. Sotgia, S. A. Spector, C. D. Spies, W. Springer, S. M. Srinivasula, L. Stefanis, J. S. Steffan, R. Stendel, H. Stenmark, A. Stephanou, S. T. Stern, C. Sternberg, B. Stork, P. Stralfors, C. S. Subauste, X. Sui, D. Sulzer, J. Sun, S. Y. Sun, Z. J. Sun, J. J. Sung, K. Suzuki, T. Suzuki, M. S. Swanson, C. Swanton, S. T. Sweeney, L. K. Sy, G. Szabadkai, I. Tabas, H. Taegtmeier, M. Tafani, K. Takacs-Vellai, Y. Takano, K. Takegawa, G. Takemura, F. Takeshita, N. J. Talbot, K. S. Tan, K. Tanaka, K. Tanaka, D. Tang, D. Tang, I. Tanida, B. A. Tannous, N. Tavernarakis, G. S. Taylor, G. A. Taylor, J. P. Taylor, L. S. Terada, A. Terman, G. Tettamanti, K. Thevissen, C. B. Thompson, A. Thorburn, M. Thumm, F. Tian, Y. Tian, G. Tocchini-Valentini, A. M. Tolkovsky, Y. Tomino, L. Tonges, S. A. Tooze, C. Tournier, J. Tower, R. Towns, V. Trajkovic, L. H. Travassos, T. F. Tsai, M. P. Tschan, T. Tsubata, A. Tsung, B. Turk, L. S. Turner, S. C. Tyagi, Y. Uchiyama, T. Ueno, M. Umekawa, R. Umemiya-Shirafuji, V. K. Unni, M. I. Vaccaro, E. M. Valente, G. Van den Berghe, I. J. van der Klei, W. van Doorn, L. F. van Dyk, M. van Egmond, L. A. van Grunsven, P. Vandenabeele, W. P. Vandenbergh, I. Vanhorebeek, E. C. Vaquero, G. Velasco, T. Vellai, J. M. Vicencio, R. D. Vierstra, M. Vila, C. Vindis, G. Viola, M. T. Viscomi, O. V. Voitsekhovskaja, C. von Haefen, M. Votruba, K. Wada, R. Wade-Martins, C. L. Walker, C. M. Walsh, J. Walter, X. B. Wan, A. Wang, C. Wang, D. Wang, F. Wang, F. Wang, G. Wang, H. Wang, H. G. Wang, H. D. Wang, J. Wang, K. Wang, M. Wang, R. C. Wang, X. Wang, X. Wang, Y. J. Wang, Y. Wang, Z. Wang, Z. C. Wang, Z. Wang, D. G. Wansink, D. M. Ward, H. Watada, S. L. Waters, P. Webster, L. Wei, C. C. Wehl, W. A. Weiss, S. M. Welford, L. P. Wen, C. A. Whitehouse, J. L. Whitton, A. J. Whitworth, T. Wileman, J. W. Wiley, S. Wilkinson, D. Willbold, R. L. Williams, P. R. Williamson, B. G. Wouters, C. Wu, D. C. Wu, W. K. Wu, A. Wytenbach, R. J. Xavier, Z. Xi, P. Xia, G. Xiao, Z. Xie, Z. Xie, D. Z. Xu, J. Xu, L. Xu, X. Xu, A. Yamamoto, A. Yamamoto, S. Yamashina, M. Yamashita, X. Yan, M. Yanagida, D. S. Yang, E. Yang, J. M. Yang, S. Y. Yang, W. Yang, W. Y. Yang, Z. Yang, M. C. Yao, T. P. Yao, B. Yeganeh, W. L. Yen, J. J. Yin, X. M. Yin, O. J. Yoo, G. Yoon, S. Y. Yoon, T. Yorimitsu, Y. Yoshikawa, T. Yoshimori, K. Yoshimoto, H. J. You, R. J. Youle, A. Younes, L. Yu, L. Yu, S. W. Yu, W. H. Yu, Z. M. Yuan, Z. Yue, C. H. Yun, M. Yuzaki, O. Zabirnyk, E. Silva-Zacarin, D. Zacks, E. Zacksenhaus, N. Zaffaroni, Z. Zakeri, H. J. Zeh, 3rd, S. O. Zeitlin, H. Zhang, H. L. Zhang, J. Zhang, J. P. Zhang, L. Zhang, L. Zhang,

- M. Y. Zhang, X. D. Zhang, M. Zhao, Y. F. Zhao, Y. Zhao, Z. J. Zhao, X. Zheng, B. Zhivotovsky, Q. Zhong, C. Z. Zhou, C. Zhu, W. G. Zhu, X. F. Zhu, X. Zhu, Y. Zhu, T. Zoladek, W. X. Zong, A. Zorzano, J. Zschocke and B. Zuckerbraun (2012). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy." Autophagy **8**(4): 445-544.
- Klionsky, D. J., J. M. Cregg, W. A. Dunn, Jr., S. D. Emr, Y. Sakai, I. V. Sandoval, A. Sibirny, S. Subramani, M. Thumm, M. Veenhuis and Y. Ohsumi (2003). "A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes." Dev Cell **5**(4): 539-545.
- Klionsky, D. J., Z. Elazar, P. O. Seglen and D. C. Rubinsztein (2008). "Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes?" Autophagy **4**(7): 849-950.
- Klionsky, D. J., A. J. Meijer and P. Codogno (2005). "Autophagy and p70S6 kinase." Autophagy **1**(1): 59-60; discussion 60-51.
- Komatsu, M., S. Waguri, T. Chiba, S. Murata, J. Iwata, I. Tanida, T. Ueno, M. Koike, Y. Uchiyama, E. Kominami and K. Tanaka (2006). "Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice." Nature **441**(7095): 880-884.
- Kongara, S. and V. Karantza (2012). "The interplay between autophagy and ROS in tumorigenesis." Front Oncol **2**: 171.
- Kuma, A., N. Mizushima, N. Ishihara and Y. Ohsumi (2002). "Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast." J Biol Chem **277**(21): 18619-18625.
- Laughon, A. and R. F. Gesteland (1984). "Primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* GAL4 gene." Mol Cell Biol **4**(2): 260-267.
- Lee, S. B., S. Kim, J. Lee, J. Park, G. Lee, Y. Kim, J. M. Kim and J. Chung (2007). "ATG1, an autophagy regulator, inhibits cell growth by negatively regulating S6 kinase." EMBO Rep **8**(4): 360-365.
- Lee, T. and L. Luo (1999). "Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis." Neuron **22**(3): 451-461.

Levine, B. (2005). "Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense." Cell **120**(2): 159-162.

Longatti, A. and S. A. Tooze (2009). "Vesicular trafficking and autophagosome formation." Cell Death Differ **16**(7): 956-965.

Lum, J. J., R. J. DeBerardinis and C. B. Thompson (2005). "Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(6): 439-448.

Meijer, A. J. and P. Codogno (2007). "AMP-activated protein kinase and autophagy." Autophagy **3**(3): 238-240.

Melendez, A. and T. P. Neufeld (2008). "The cell biology of autophagy in metazoans: a developing story." Development **135**(14): 2347-2360.

Melendez, A., Z. Talloczy, M. Seaman, E. L. Eskelinen, D. H. Hall and B. Levine (2003). "Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*." Science **301**(5638): 1387-1391.

Mizushima, N. (2007). "Autophagy: process and function." Genes Dev **21**(22): 2861-2873.

Mizushima, N., B. Levine, A. M. Cuervo and D. J. Klionsky (2008). "Autophagy fights disease through cellular self-digestion." Nature **451**(7182): 1069-1075.

Mizushima, N., T. Noda, T. Yoshimori, Y. Tanaka, T. Ishii, M. D. George, D. J. Klionsky, M. Ohsumi and Y. Ohsumi (1998). "A protein conjugation system essential for autophagy." Nature **395**(6700): 395-398.

Mizushima, N., A. Yamamoto, M. Matsui, T. Yoshimori and Y. Ohsumi (2004). "In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker." Mol Biol Cell **15**(3): 1101-1111.

Mizushima, N. and T. Yoshimori (2007). "How to interpret LC3 immunoblotting." Autophagy **3**(6): 542-545.

Mizushima, N., T. Yoshimori and B. Levine (2010). "Methods in mammalian autophagy research." Cell **140**(3): 313-326.

- Moreau, K., B. Ravikumar, M. Renna, C. Puri and D. C. Rubinsztein (2011). "Autophagosome precursor maturation requires homotypic fusion." Cell **146**(2): 303-317.
- Moscat, J. and M. T. Diaz-Meco (2009). "p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer." Cell **137**(6): 1001-1004.
- Moscat, J. and M. T. Diaz-Meco (2012). "p62: a versatile multitasker takes on cancer." Trends Biochem Sci **37**(6): 230-236.
- Moscat, J., M. T. Diaz-Meco, A. Albert and S. Campuzano (2006). "Cell signaling and function organized by PB1 domain interactions." Mol Cell **23**(5): 631-640.
- Myers, R. M., N. Lumelsky, L. S. Lerman and T. Maniatis (1985). "Detection of single base substitutions in total genomic DNA." Nature **313**(6002): 495-498.
- Nair, U., W. L. Yen, M. Mari, Y. Cao, Z. Xie, M. Baba, F. Reggiori and D. J. Klionsky (2012). "A role for Atg8-PE deconjugation in autophagosome biogenesis." Autophagy **8**(5): 780-793.
- Nakatogawa, H., K. Suzuki, Y. Kamada and Y. Ohsumi (2009). "Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(7): 458-467.
- Nazarko, T. Y., J. Huang, J. M. Nicaud, D. J. Klionsky and A. A. Sibirny (2005). "Trs85 is required for macroautophagy, pexophagy and cytoplasm to vacuole targeting in *Yarrowia lipolytica* and *Saccharomyces cerevisiae*." Autophagy **1**(1): 37-45.
- Nedelsky, N. B., P. K. Todd and J. P. Taylor (2008). "Autophagy and the ubiquitin-proteasome system: collaborators in neuroprotection." Biochim Biophys Acta **1782**(12): 691-699.
- Nezis, I. P., A. Simonsen, A. P. Sagona, K. Finley, S. Gaumer, D. Contamine, T. E. Rusten, H. Stenmark and A. Brech (2008). "Ref(2)P, the *Drosophila melanogaster* homologue of mammalian p62, is required for the formation of protein aggregates in adult brain." J Cell Biol **180**(6): 1065-1071.
- Nickerson, D. P., C. L. Brett and A. J. Merz (2009). "Vps-C complexes: gatekeepers of endolysosomal traffic." Curr Opin Cell Biol **21**(4): 543-551.

Noda, T., K. Suzuki and Y. Ohsumi (2002). "Yeast autophagosomes: de novo formation of a membrane structure." Trends Cell Biol **12**(5): 231-235.

Ogier-Denis, E., S. Pattingre, J. El Benna and P. Codogno (2000). "Erk1/2-dependent phosphorylation of Galpha-interacting protein stimulates its GTPase accelerating activity and autophagy in human colon cancer cells." J Biol Chem **275**(50): 39090-39095.

Oh, W. J. and E. Jacinto (2011). "mTOR complex 2 signaling and functions." Cell Cycle **10**(14): 2305-2316.

Ohsumi, Y. (2001). "Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(3): 211-216.

Parker, G. S., D. M. Eckert and B. L. Bass (2006). "RDE-4 preferentially binds long dsRNA and its dimerization is necessary for cleavage of dsRNA to siRNA." RNA **12**(5): 807-818.

Pattingre, S., L. Espert, M. Biard-Piechaczyk and P. Codogno (2008). "Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes." Biochimie **90**(2): 313-323.

Pircs, K., P. Nagy, A. Varga, Z. Venkei, B. Erdi, K. Hegedus and G. Juhasz (2012). "Advantages and limitations of different p62-based assays for estimating autophagic activity in *Drosophila*." PLoS One **7**(8): e44214.

Proikas-Cezanne, T., S. Waddell, A. Gaugel, T. Frickey, A. Lupas and A. Nordheim (2004). "WIPI-1alpha (WIPI49), a member of the novel 7-bladed WIPI protein family, is aberrantly expressed in human cancer and is linked to starvation-induced autophagy." Oncogene **23**(58): 9314-9325.

Puls, A., S. Schmidt, F. Grawe and S. Stabel (1997). "Interaction of protein kinase C zeta with ZIP, a novel protein kinase C-binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(12): 6191-6196.

Rez, G. and J. Kovacs (1973). "Prevention of induced autophagocytosis by the protein-synthesis inhibitor emetine. Short communication." Acta Biol Acad Sci Hung **24**(3): 237-239.

Robinson, R. (2004). "RNAi therapeutics: how likely, how soon?" PLoS Biol **2**(1): E28.

- Rodriguez, A., A. Duran, M. Selloum, M. F. Champy, F. J. Diez-Guerra, J. M. Flores, M. Serrano, J. Auwerx, M. T. Diaz-Meco and J. Moscat (2006). "Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62." Cell Metab **3**(3): 211-222.
- Ron, D. and P. Walter (2007). "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(7): 519-529.
- Rubinsztein, D. C., G. Marino and G. Kroemer (2011). "Autophagy and aging." Cell **146**(5): 682-695.
- Ryerse, J. S. (1979). "Developmental changes in Malpighian tubule cell structure." Tissue Cell **11**(3): 533-551.
- Sahu, R., S. Kaushik, C. C. Clement, E. S. Cannizzo, B. Scharf, A. Follenzi, I. Potolicchio, E. Nieves, A. M. Cuervo and L. Santambrogio (2011). "Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes." Dev Cell **20**(1): 131-139.
- Sanchez, P., G. De Carcer, I. V. Sandoval, J. Moscat and M. T. Diaz-Meco (1998). "Localization of atypical protein kinase C isoforms into lysosome-targeted endosomes through interaction with p62." Mol Cell Biol **18**(5): 3069-3080.
- Sanz, L., M. T. Diaz-Meco, H. Nakano and J. Moscat (2000). "The atypical PKC-interacting protein p62 channels NF-kappaB activation by the IL-1-TRAF6 pathway." EMBO J **19**(7): 1576-1586.
- Sass, M. and J. Kovacs (1977). "The effect of ecdysone on the fat body cells of the penultimate larvae of *Mamestra brassicae*." Cell Tissue Res **180**(3): 403-409.
- Schin, K. S. and U. Clever (1965). "Lysosomal and free acid phosphatase in salivary glands of *chironomus tentans*." Science **150**(3699): 1053-1055.
- Schleicher, S. M., L. Moretti, V. Varki and B. Lu (2010). "Progress in the unraveling of the endoplasmic reticulum stress/autophagy pathway and cancer: implications for future therapeutic approaches." Drug Resist Updat **13**(3): 79-86.
- Scott, R. C., G. Juhasz and T. P. Neufeld (2007). "Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death." Curr Biol **17**(1): 1-11.

- Scott, R. C., O. Schuldiner and T. P. Neufeld (2004). "Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body." *Dev Cell* **7**(2): 167-178.
- Sedlak, B. J. and L. I. Gilbert (1976). "Epidermal cell development during the pupal-adult metamorphosis of *Hyalophora cecropia*." *Tissue Cell* **8**(4): 637-648.
- Shaw, R. J. and L. C. Cantley (2006). "Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth." *Nature* **441**(7092): 424-430.
- Simonsen, A., R. C. Cumming, A. Brech, P. Isakson, D. R. Schubert and K. D. Finley (2008). "Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila*." *Autophagy* **4**(2): 176-184.
- Sou, Y. S., I. Tanida, M. Komatsu, T. Ueno and E. Kominami (2006). "Phosphatidylserine in addition to phosphatidylethanolamine is an in vitro target of the mammalian Atg8 modifiers, LC3, GABARAP, and GATE-16." *J Biol Chem* **281**(6): 3017-3024.
- Suh, D. H., M. K. Kim, H. S. Kim, H. H. Chung and Y. S. Song (2012). "Unfolded protein response to autophagy as a promising druggable target for anticancer therapy." *Ann N Y Acad Sci* **1271**: 20-32.
- Sun, Q., W. Fan, K. Chen, X. Ding, S. Chen and Q. Zhong (2008). "Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(49): 19211-19216.
- Suzuki, K., T. Kirisako, Y. Kamada, N. Mizushima, T. Noda and Y. Ohsumi (2001). "The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation." *EMBO J* **20**(21): 5971-5981.
- Suzuki, K., Y. Kubota, T. Sekito and Y. Ohsumi (2007). "Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization." *Genes Cells* **12**(2): 209-218.
- Suzuki, T. and K. Inoki (2011). "Spatial regulation of the mTORC1 system in amino acids sensing pathway." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **43**(9): 671-679.
- Takats, S., P. Nagy, A. Varga, K. Pircs, M. Karpati, K. Varga, A. L. Kovacs, K. Hegedus and G. Juhasz (2013). "Autophagosomal Syntaxin17-dependent lysosomal degradation maintains neuronal function in *Drosophila*." *J Cell Biol* **201**(4): 531-539.

- Takehige, K., M. Baba, S. Tsuboi, T. Noda and Y. Ohsumi (1992). "Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction." J Cell Biol **119**(2): 301-311.
- Taloczy, Z., W. Jiang, H. W. t. Virgin, D. A. Leib, D. Scheuner, R. J. Kaufman, E. L. Eskelinen and B. Levine (2002). "Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 190-195.
- Tanida, I., N. Mizushima, M. Kiyooka, M. Ohsumi, T. Ueno, Y. Ohsumi and E. Kominami (1999). "Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy." Mol Biol Cell **10**(5): 1367-1379.
- Thumm, M., R. Egner, B. Koch, M. Schlumpberger, M. Straub, M. Veenhuis and D. H. Wolf (1994). "Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." FEBS Lett **349**(2): 275-280.
- Thummel, C. S. (1996). "Flies on steroids--*Drosophila* metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action." Trends Genet **12**(8): 306-310.
- Tsukada, M. and Y. Ohsumi (1993). "Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." FEBS Lett **333**(1-2): 169-174.
- Vellai, T. (2009). "Autophagy genes and ageing." Cell Death Differ **16**(1): 94-102.
- Wang, C. W. and D. J. Klionsky (2003). "The molecular mechanism of autophagy." Mol Med **9**(3-4): 65-76.
- Wang, Q. L. and Z. H. Li (2007). "The functions of microRNAs in plants." Front Biosci **12**: 3975-3982.
- Wang, X. and C. G. Proud (2009). "Nutrient control of TORC1, a cell-cycle regulator." Trends Cell Biol **19**(6): 260-267.
- Weber, J. D. and D. H. Gutmann (2012). "Deconvoluting mTOR biology." Cell Cycle **11**(2): 236-248.
- Xie, Z. and D. J. Klionsky (2007). "Autophagosome formation: core machinery and adaptations." Nat Cell Biol **9**(10): 1102-1109.

Yamamoto, A., R. Masaki and Y. Tashiro (1990). "Characterization of the isolation membranes and the limiting membranes of autophagosomes in rat hepatocytes by lectin cytochemistry." J Histochem Cytochem **38**(4): 573-580.

Yoshimoto, K., H. Hanaoka, S. Sato, T. Kato, S. Tabata, T. Noda and Y. Ohsumi (2004). "Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy." Plant Cell **16**(11): 2967-2983.

Young, A. R., E. Y. Chan, X. W. Hu, R. Kochl, S. G. Crawshaw, S. High, D. W. Hailey, J. Lippincott-Schwartz and S. A. Tooze (2006). "Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes." J Cell Sci **119**(Pt 18): 3888-3900.

Zhou, H. and S. Huang (2010). "The complexes of mammalian target of rapamycin." Curr Protein Pept Sci **11**(6): 409-424.

Zoncu, R., L. Bar-Peled, A. Efeyan, S. Wang, Y. Sancak and D. M. Sabatini (2011). "mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase." Science **334**(6056): 678-683.

Internetes referenciák

1. ábra: https://www.mdc-berlin.de/10987285/en/research/research_teams/proteomics_and_molecular_mechanisms_of_neurodegenerative_diseases/research/research2

4. ábra: <http://www.nature.com/ncb/journal/v12/n9/images/ncb0910-814-f2.jpg>