Doktori értekezés

Az autofágia folyamatának vizsgálata rovar modellszervezeteken

Készítette:
Dr. Csikós György

Készült az Eötvös Loránd Tudományegyetem Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszékén
Témavezető: Sass Miklós DSc. Habil., egyetemi tanár

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológia Doktori Iskola
Molekuláris Sejt- és Neurobiológia Doktori Program
A Doktori Iskola vezetője: Prof. Erdei Anna
Programvezető: Prof. Sass Miklós
Budapest
2012.

花鳥風月

Tartalomjegyzék

Bevezetés ... 3
1. Az autofágia, mint komplex sejtélettani folyamat ... 4
1.1. Az autofágia morfológiai típusai ... 5
1.2. A fagofór kialakulását szabályozó mechanizmus ... 6
1.2.1. A TOR-komplexek felépítése ... 7
1.2.2. A TORC1 aktivitásának szabályozása ... 9
1.2.3. A TORC1 által szabályozott folyamatok ... 12
1.2.4. Az autofagoszóma kialakulása ... 16
1.2.4.1 A fagofór képződése (nucleation) ... 19
1.2.4.2. A fagofór növekedése (expansion) ... 20
1.2.4.2.1. Az Atg12 konjugációs rendszer ... 20
1.2.4.2.2. Az Atg8 konjugációs rendszer ... 20
1.2.4.3. A bekebelezés szelektivitása ... 21
1.2.4.4. A fagofór autofagoszómává történő záródása (completion) ... 22
1.2.4.5. Az autolizoszóma kialakulása (maturation) ... 23
1.2.4.6. Az autolizoszóma beltartalmának lebontása (degradation) ... 24
1.3. Az autofágia mechanizmusa a Holometabola rovarokban ... 25
1.3.1. A Holometabola rovarok, mint az autofágia modellszervezetei ... 27
1.3.2. A *Drosophila melanogaster* egyedfejlődése ... 28
1.3.3. Autofágia a *Drosophila* lárvális zsírtestben ... 30
2. Célkitűzések ... 30
2.1. A cAMP szerepe az autofágia szabályozásában ... 30
2.2. A heterofág úton kialakuló protein granulumok enzimtartalmának eredete. ... 30
2.3. Az autofágiában részt vevő gének homológjainak vizsgálata *Drosophila* lárvában ... 30
2.4. Új, az autofágiában részt vevő gének felkutatása P-elem inzerciót hordozó *Drosophila* mutánsparkok segítségével ... 30
2.5. Az *snf4aγ (AMPK)* szerepe az autofág folyamatok szabályozásában ... 33
2.6. Az *lqf* gén jelentősége az auto- és heterofág folyamatokban ... 33
3. Anyagok és módszerek ... 32
4. Eredmények ... 43
4.1. Az auto- és heterofág folyamatok szabályozásának vizsgálata ... 43
4.1.1. A cAMP szint változása az utolsó lárvastádium során a *Mamestra brassicae* zsírtestében jól korrelál a 20-hidroxiekdizon által kiváltott autofág folyamatokkal. ... 43
4.1.2. A savas foszfatáz tartalom és aktivitás alakulása a *Neobellieria bullata* lárvális zsírtestében és hemolimfájában. ... 47
4.1.3. Az *aut1* gén homológja *Drosophilában* nélkülözhetetlen az autofágiához és a posztembrionális fejlődéshez. ... 51
4.2. Új, az auto- és heterofágiában szerepet játszó gének azonosítása ... 53
2.2.1. A P-elem szerkezete és felhasználása molekuláris-genetikai kisérletekben ... 53
4.2.2. Új autofág gének keresésének munkahipotézise ... 54
4.2.3. A p-elemet hordozó mutánsparkok tesztelésének eredménye ... 56
4.3. A *Drosophila* AMPK γ alegysége részt vesz a fejlődési és a stressz-indukált autofágia szabályozásában ... 58
4.3.1. Az 1(3)S005042 vonalból származó homozigóta lárvák zsírtestének morfológiai leírása ... 58

4.3.2. A 20-hidroxiekdizon kezelés hatása az l(3)S005042 homozigóta lárvák zsírtestére 60
4.3.4. Az aminosav-megvonás hatása az l(3)S005042 homozigóta lárvák zsírtestére 60
4.3.5. A P-elem inzerció által érintett gén meghatározása 61
4.3.6. Az *snf4aγ* gén leírása és transzkriptjeinek kapcsolata az autofágiával 62
4.3.7. A transzpozon továbbugratásával a vad fenotípus helyreállítható volt 63
4.3.8. Az autofágia csendesítése UAS-SNF4IR RNAi segítségével 64
4.3.9. Anti-Snf4aγ ellenanyag előállítása és tesztelése 65
4.3.10. Az Snf4aγ fehérje kifejeződése az embrionális- és a posztembrionális fejlődés, valamint a metamorfózis idején 67
4.3.1.1. Az l(3)S5042 vonal homozigóta egyedeiben az Snf4aγ fehérje mennyisége erősen lecsökkent 68
4.3.12. A géncsendesítés is csökkentette az Snf4aγ fehérje mennyiségét 68
4.3.1.3. Snf4aγ fehérje sejten belüli elhelyezkedése 69
4.4. A *liquid facets (lqf)* gén termékének részvétele az auto- és heterofágiában 71
4.4.1. Az l(3)S011027 vonal tesztelésének eredményei 71
4.4.2. Az l(3)S011027 vonal homozigóta egyedei 20-HE kezeléssel nem voltak menekíthetők 74
4.4.3. A P-elem inzerció helyének meghatározása az l(3)S011027 vonalban 75
4.4.4. Mitotikus klónok vizsgálata 76
4.4.5. Az *lqf* génről átíródó mRNS szintjének alakulása vad típusú és mutáns lárvákban 77
4.4.6. Az lqfRNAi hatása a fiziológiás auto- és heterofágiára 78
4.4.7. Az anti-Lqf ellenanyag előállítása és ellenőrzése 79
4.4.8. Az Lqf fehérje eloszlása a trofocitákban az utolsó lárvastádium idején 80
4.4.9. Az *lqf* gén terméke kolokalizációt mutat az autofagoszóma, illetve az autofág vakuólum markereivel. 82
4.4.10. Az lqf^{011027} homozigóta lárvákon *in vivo* végzett rapamicin kezelés hatása 84
4.4.11. Az Lqf fehérje részt vesz a lárvális szérum fehérjék receptor-mediált endocitózisában 85
4.5. Az *aut1*, az *snf4aγ* és az *lqf* gének termékeinek hatása az élethosszra 86
5. Megvitatás 88
6. Rövidítések jegyzéke 98
7. Irodalomjegyzék 100
8. Angol nyelvű összefoglaló 125
Köszönetnyilvánítás 129

1. Bevezetés

Valamennyi élőlény szervezete egy vagy több sejtből épül fel, amelyek mint legkisebb egységek, még mutatják az élő anyag szerkezeti, fiziológiai és szerveződésbeli jellegzetességeit – ez volt a Theodor Schwann, Matthias Jacob Schleiden és Rudolf Virchow kutatásaira épülő klasszikus sejtelmélet egyik legfontosabb megállapítása. A már meglévő sejtekből osztódás útján keletkező újabbak önálló életpályát járnak be: növekednek és fejlődnek, majd önálló lényként, vagy egy soksejtű organizmus részeként funkcionálnak, végül egyedi életüknek a következő sejtosztódás, vagy az elöregedést követő pusztulás vet véget. A nyitott rendszerként viselkedő sejt élete során környezetével állandó anyag-, energia- és információcserét folytat, és ennek függvényében igyekszik fenntartani saját, illetve az őt magát tartalmazó szervezet homeosztázisát. Ez éppúgy magába foglalja a pillanatnyi szükségletnek megfelelő mRNS-ek, fehérjék és más makromolekulák szintézisét, vagy bizonyos sejtorganellumok számának felszaporodását, mint a már feleslegessé vagy használhatatlanná vált komponensek gyors és precíz lebontását. Bár a felépítő, anabolikus folyamatok világa számtalan útvonalon keresztül kapcsolódik a lebontó, katabolikus reakciókhoz, ez nem jelenti azt, hogy a két, eltérő célú biokémiai-sejtbiológiai rendszer összehangolása automatikusan megtörténik, főképpen nem úgy, hogy az az adott sejt vagy a teljes organizmus számára megfelelő legyen. Egyedül a sejt önmaga képes arra, hogy egy rendkívül bonyolult, sokféle külső és belső paramétert összegző mechanizmus segítségével eldöntse, hogy a növekedés és osztódás, vagy a stagnálás, illetve esetleg a degradálódás irányába mozduljon el. Ez a mechanizmus, amely egyaránt figyelemmel kíséri a sejten kívüli és belüli tápanyag-ellátottság mutatóit, érzékeli a sejt pillanatnyi energetikai állapotát és stresszhelyzetben képes mozgósítani a sejt belső forrásait, szemmel tartja az elöregedett vagy sérült sejtorganellumok folyamatos cseréjét, és végső esetben szerepet vállal a sejt fejlődési program szerinti teljes lebontásában – ez a mechanizmus egyetlen központi végrehajtó folyamat, a sejtek önemésztése, vagy autofágiája köré rendeződik.

1. Az autofágia, mint komplex sejtélettani folyamat

Az eukarióta sejtek alapvető sejtbiológiai folyamatai közül az autofágia (a sejtek önemésztő folyamata) elsősorban a hosszú életidejű fehérjék lebontásáért, valamint a sérült, vagy elöregedett sejtorganellumok és a körülöttük lévő citoplazma eltávolításáért felelős *(Teichert, 1989; Takeshige, 1992; Rodriguez-Enriquez és mtsai, 2006; Kim és mtsai, 2007; Farré és mtsai, 2009; Kanki és mtsai, 2009; Kanki és Klionsky, 2010; Tanida 2011).* A sejtek, az őket érő stresszhelyzetekben, mint amilyen az éhezés, a hipoxia vagy szélsőséges hőmérséklet, citoplazmájuk egyes részeinek szintén autofágia útján történő lebontásával biztosítják a túlélésükhöz szükséges monomereket, illetve energiát. Az autofágia ezekben az esetekben tehát a sejt homeosztázisának fennmaradását szolgálja *(Mitchener és mtsai, 1976; Takeshige és mtsai, 1992; Kamada és mtsai, 2004; Zhu és mtsai, 2005; Adhami és mtsai, 2007; Mazure és Pouysségur, 2009).* Érdekes - és némileg ezzel ellentétes - módon, a fejlődő szervezetek eltávolításra ítélt szöveteiben és sejtjeiben a szükséges fejlődési fázisban endogén indukció hatására megjelenő autofág folyamatok az adott struktúra elpusztulásához és lebomlásához vezetnek. Ilyenkor viszont az autofágia - az apoptózis, azaz a programozott sejthalál (PCD) I. típusa mellett - a PCD II típusaként jelenik meg *(Sass és Kovács, 1975, 1977; Sass és mtsai, 1989; Bursch, 2001; Edinger és Thompson, 2004; Lockshin és Zakeri, 2004; Shintani és Klionsky, 2004; Lum és mtsai, 2005; Levine és Yuan, 2005; Mizushima és Klionsky, 2007; Denton és mtsai, 2010; Bialik és Kimchi, 2010).* Valamennyi, az előbbiekben felsorolt esetben a morfológiailag azonosítható és az autofágiához kapcsolható struktúrák megjelenését gének egy jól körülírható csoportjának aktiválódása előzi meg, amelyek által kódolt fehérjék nélkülözhetetlenek ebben a lebontó mechanizmusban. Az autofág folyamatok irányításában részt vevő gének és termékeik ezen túlmenően rész vesznek a tumorok kialakulásában és növekedésében *(Shigemitsu és mtsai, 1999; Liang és mtsai, 1999; Qu és mtsai, 2003; Ogier-Denis és Codogno, 2003; Kondo és mtsai, 2005; Degenhardt és mtsai, 2006; Mathew és mtsai, 2007; Eisenberg-Lerner és Kimchi, 2009; Chen és Debnath, 2010; Giansanti és mtsai, 2011),* a neurodegeneratív betegségek megjelenésében *(Boellaard és mtsai, 1991; Nixon és mtsai, 2000; Ravikumar és mtsai, 2002; Levine és Yuan, 2005; Ventruti és Cuervo, 2007; Cherra és mtsai, 2010; Yamamoto és Simonsen, 2011),* valamint az öregedési folyamatokban és az élethossz szabályozásában *(Meléndez és mtsai, 2003; Bergamini és mtsai, 2004; Donati, 2006; Yen és Klionsky, 2008; Vellai, 2009; Vellai és mtsai, 2009; Bjedov és mtsai, 2010; Partridge és mtsai, 2011).*

Az autofágia fogalmát és jelenségét Sam L. Clark 1957-ben publikált, lizoszómákkal kapcsolatos leírása, valamint saját, emlős sejteken végzett elektronmikroszkópos, vizsgálatai alapján Christian de Duve írta le először *(de Duve és Wattiaux, 1966).*

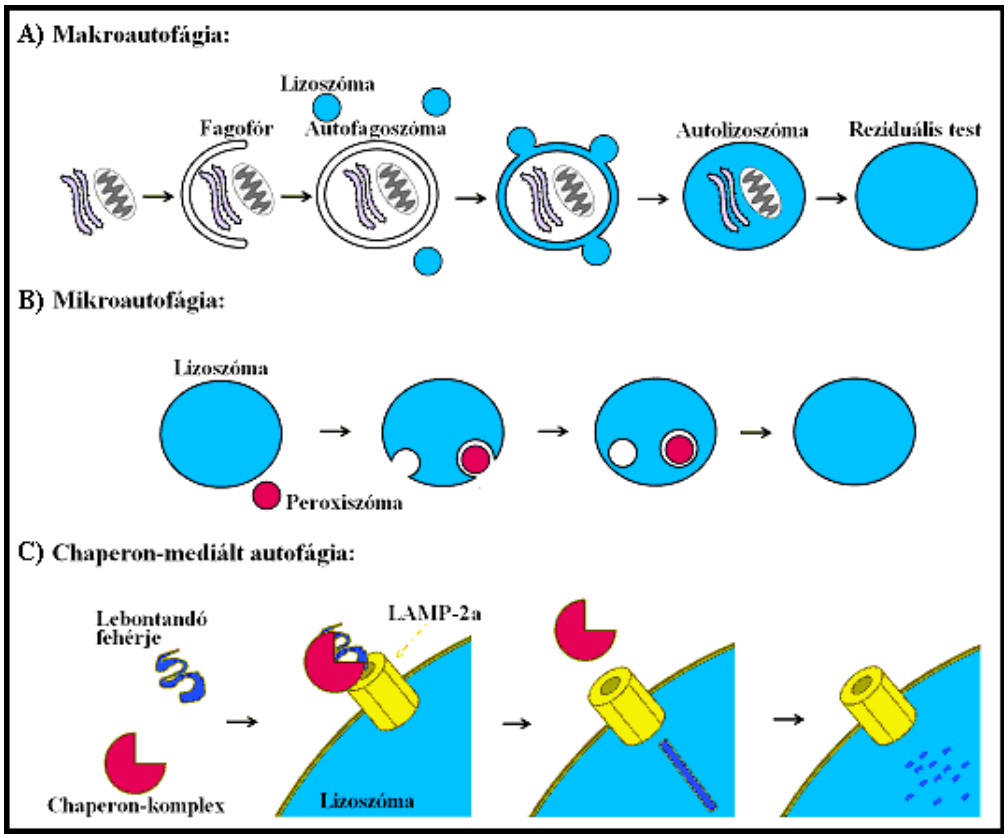
1.1. Az autofágia morfológiai típusai

Annak alapján, hogy a lebontandó citoplazma-komponens hogyan kerül kapcsolatba a lizoszómális (az élesztő esetében a vakuoláris) enzimekkel, az autofágia három – morfológiai szempontból erősen különböző – klasszikus típusát (makroautofágia, mikroautofágia és chaperon-mediált autofágia) szokás megkülönböztetni *(Kelekar, 2005; Klionsky, 2005),* (*1. ábra*). A ***makroautofágia*** során a lebontásra kerülő kompartmentumot elsőként egy – mindmáig vitatott eredetű - zárt, kettős izoláló membrán, vagy fagofór kezdi el körülvenni, majd ez a struktúra bezáródva létrehozza az autofagoszómát *(Seglen és Bohley, 1992; Juhász és Neufeld, 2006; Xie és mtsai, 2008; Yen és mtsai, 2010; Yla-Antilla és mtsai, 2009).* Ez utóbbi – vagy közvetlenül, vagy közvetett úton, előbb endoszóma-vezikulákkal fuzionálva – lizoszómákkal (az élesztő esetében a központi vakuolával) egyesül, és beltartalma enzimatikus úton lebomlik *(Deter, 1975; Yoshimori, 2004; Eskelinen, 2005; Nakatogawa és mtsai, 2009),* (*1. ábra, A*). Bár korábban úgy képzelték, hogy a makroautofágia során véletlenszerűen kerülnek be a citoplazma komponensei az autofagoszómába, ma már bizonyítottnak tekinthetjük, hogy léteznek olyan fehérjekomplexek *(Veidberg és mtsai, 2011)*, amelyek képesek szelektíven a peroxiszómákat *(Dunn és mtsai, 2005; van Zutphen és mtsai, 2008; Manjithaya és mtsai, 2010; Oku és Sakai, 2010),* az endoplazmatikus hálózat egységeit *(Bernales és mtsai, 2006; 2007),* a mitokondriumokat *(Kim és mtsai, 2007; Goldman és mtsai, 2010; Huang és mtsai, 2011)*, a riboszómákat *(Kraft és mtsai, 2008; MacIntosh és Bassham, 2011)* vagy éppen az ubiquitinnel megjelölt, aggregálódó fehérjéket *(Yamamoto és Simonsen, 2011)* a fagofórhoz szállítani. Ezekben az esetekben – az említés sorrendjében – pexofágiáról, retikulofágiáról, mitofágiáról, ribofágiáról és aggrefágiáról (vagy újabban proteinofágiáról) beszélhetünk.

A ***mikroautofágia*** esetében nem képződik autofagoszóma, hanem a lizoszóma membránja betűrődéseket hoz létre, és így veszi fel a citoplazma részleteket és az azokban lévő sejtalkotókat *(Marzella és mtsai, 1981; Uttenweiler és Mayer, 2008; Majaljica és mtsai, 2011),* (*1. ábra, B*).

Bár az előbbiekben említett autofágia-típusok is mutatnak bizonyos szelektivitást abban a tekintetben, hogy képesek az elöregedett, vagy működésképtelen organellumokat tartalmazó

citoplazma-területet izolálni és lebontani, célzott, finom szelektálásra egyedül a ***chaperon-mediált*** autofágia esetén van lehetőség (*1. ábra, C*). Ebben az esetben ugyanis a lizoszóma membránjában található receptorok veszik fel a chaperonok által odaszállított, lebontásra ítélt fehérjéket, melyek direkt transzlokációval jutnak a lizoszóma lumenébe *(Majeski és Dice, 2004; Dice 2007; Kon és Cuervo, 2009; Hubbard és mtsai, 2011).*



1. ábra: Az autofágia főbb morfológiai típusai. (LAMP-2a: Lizoszóma asszociált membrán protein 2a)

Mivel a fent említett típusok közül a makroautofágia a legjelentősebb és a legjobban ismert, valamint munkánk során ez állt a vizsgálataink középpontjában, ezért a továbbiakban az „autofágia" kifejezést ennek megjelölésére fogom használni.

1.2. A fagofór kialakulását szabályozó mechanizmus

Mint az előzőekben láttuk, az autofágia első, morfológiailag detektálható jele a fagofór megjelenése. Természetesen mielőtt a folyamat eljut eddig a pontig, addig számos, különböző jelátviteli útvonalon át érkező információnak kell összegződnie úgy, hogy ezek eredője az autofágia indukciójának irányába mutasson.

Mivel optimális körülmények között a sejtekben az autofágia igen kismértékű (ún. háztartási autofágia), ezért egy rendkívül hatékony mechanizmus szükséges ahhoz, hogy - akár külső, akár belső hatásokra – a sejtek gyors autofág választ adjanak, ilyen módon alkalmazkodva a megváltozott körülményekhez vagy követelményekhez. A folyamat központi regulátora a TOR (target of rapamycin kinase complex 1), amely az autofágia indukciójában részt vevő fehérjéket foszforilált állapotban tartja, és ilyen módon meggátolja a fagofór kialakulásához vezető lépéseket. Ez a sok alegységből álló multiprotein komplex, integrálva a tápanyag-ellátottság és a stresszhatások jeleit, a növekedési faktorok vagy hormonok jelenlétét illetve hiányát, valamint a sejt által felhasználható energia mennyiségét, képes szabályozni a sejt metabolizmusát és növekedését. Amennyiben a sejt az általa hasznosítható tápanyagokban hiányt szenved, vagy éppen komoly stresszválaszra kényszerül, illetve energiakészlete jelentősen megfogyatkozik, akkor a TOR kináz inaktiválódása, majd ezt követően az eddig általa foszforilált állapotban tartott fehérjék defoszforilációja olyan reakciók beindulásához vezet, amelyek beszűkítik az anabolikus folyamatokat, és utat nyitnak a sejt saját anyagainak bontásából származó monomereket és energiát szolgáltató autofágiának *(Noda és Ohsumi, 1998; Schmelzle és Hall, 2000; Raught és mtsai, 2001; Neufeld, 2003; Kamada és mtsai, 2004; Wullschleger és mtsai, 2006; Wang és Proud, 2009; He és Klionsky, 2009; Jung és mtsai, 2010; Tanida 2011).*

Feltétlenül megemlítendő az a fontos tény, hogy az eukariótákban nem egy, hanem kétféle, TOR kinázt tartalmazó komplex (TORC1 és TORC2) található, amelyeknek a citoplazmatikus elhelyezkedése, valamint az általuk foszforilált molekulák köre jelentős különbséget mutat. Az utóbbi kináz aktivitása – nevével ellentétben – csak nagyon korlátozottan változik meg rapamicin jelenlétében *(Rosner és Hengstschläger, 2008).*

1.2.1. A TOR-komplexek felépítése

A TOR-komplex1 nagy, 300 kDa molekulatömegű szerin/treonin kináz, amely egy, a foszfatidilinozitol kinázok rokonsági körébe tartozó kinázcsalád (phosphatidylinositol kinase related kinase (PIKK)) tagja. Felfedezésekor mint az immunszupresszánsként és antibiotikus gyógyszerként használható rapamicin molekula célpontjaként írták le *(Heitman és mtsai, 1991).* A további kutatások azonban hamarosan fényt derítettek a sejtek növekedésének, metabolizmusának és a stresszhelyzetekhez történő alkalmazkodásának szabályozásában betöltött szerepére is.

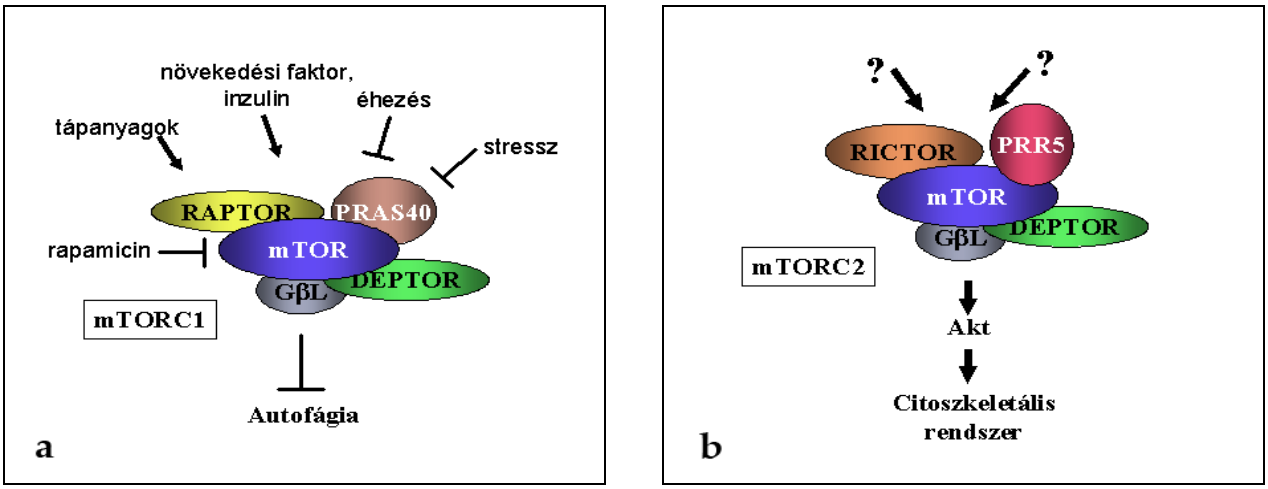
Az emlős TORC1-ben (mTORC1) a kináz mellett négy további fehérje található: a raptor (regulatory associated protein of mTOR), a PRAS40 (proline-rich Akt substrate of 40kDa), a GβL/MLST8 fehérje (mTOR associated protein LST8 homolog) és a DEPTOR (DEP-domain interactor of mTOR). A raptor szerepe kettős: amennyiben lazán kapcsolódik az mTOR-hoz, abban az esetben a kinázt aktiválja, és így az képes a célmolekulák foszforilálására. Ha azonban a két fehérje közötti kapcsolat szoros, abban az esetben a raptor inaktiválja az mTOR-t, ez pedig a korábbi célmolekulák defoszforilálásához és az autofág folyamat megindulásához vezet *(Kim és mtsai, 2002; Lee és mtsai, 2007).*

Abban az esetben, ha a PRAS40 kapcsolódik az mTOR-hoz, akkor képes csökkenteni annak aktivitását, és ezáltal autofágiát indukálni. Meglepő módon azonban maga a PRAS40 is szubsztrátja az mTOR-nak, ami a PRAS40 más folyamatokban is betöltött szerepére enged következtetni (*Wang és mtsai, 2008; Hong-Brownés mtsai, 2010).*

A két utolsó fehérje (a DEPTOR és a GβL/MLST8) mindkét mTOR komplexben jelen van. Az előbbi az mTORC1 negatív regulátora, hiányában a kináz aktivitása megnövekszik *(Lee és mtsai, 2007; Kazi és mtsai, 2011).* Az GβL/MLST8 funkciójáról jelenleg még nincsenek egyértelmű adatok *(Rosner és mtsai, 2009; Jung és mtsai, 2010)*.

Az előbb felsorolt fehérjék közül egyik sem közvetlen célpontja a rapamicinnek. Ez a gátlószer az FKBP12-vel (FK506 binding protein 12) komplexet alkotva képes megakadályozni, hogy a raptor hozzákapcsolódva a TOR kinázhoz, aktiválja azt *(Kim és Chen, 2000; Weisman és Choder, 2001).* Ekkor a TOR inaktiválódik, ami természetszerűen autofágiához vezet (2/a ábra).

A TORC2 szintén nagy molekulatömegű szerin/treonin kináz, amely rapamicinnel egyszerűen nem *(Loewith és mtsai, 2002)*, vagy csak ismételt, erőteljes kezeléssel gátolható *(Sarbassov és mtsai, 2005).* Ebben a komplexben is legalább négy fehérje található: a TOR kináz, a GβL/MLST8 fehérje, a PRR5 (proline-rich protein 5), továbbá a rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR) és a SIN1 (stress-activated protein kinase-interacting protein 1). Az utóbb említett két fehérjének valószínűleg a komplex stabilizálásában van fontos szerepe. *(Woo és mtsai, 2007; Rosner és Hengstschläger, 2008; Cybulski és Hall, 2009).* A TORC2 funkciójáról csak kevés megbízható adat áll rendelkezésre, annyi bizonyos, hogy a sejtváz-aktin dinamikájának szabályozásában vesz részt, továbbá, hogy – a TORC1-hez hasonlóan - képes bizonyos AGC-kinázok aktiválására *(Jacinto és Lorberg, 2008; Cybulski és Hall, 2009; Cameron és mtsai, 2011)(2/b ábra).*



2. ábra. Az emlős TOR-komplexek felépítése. a) Az mTORC1 tagjai és a rajta összegződő hatások. b) Az mTORC2-t alkotó fehérjék, és hatása a sejtvázrendszerre.

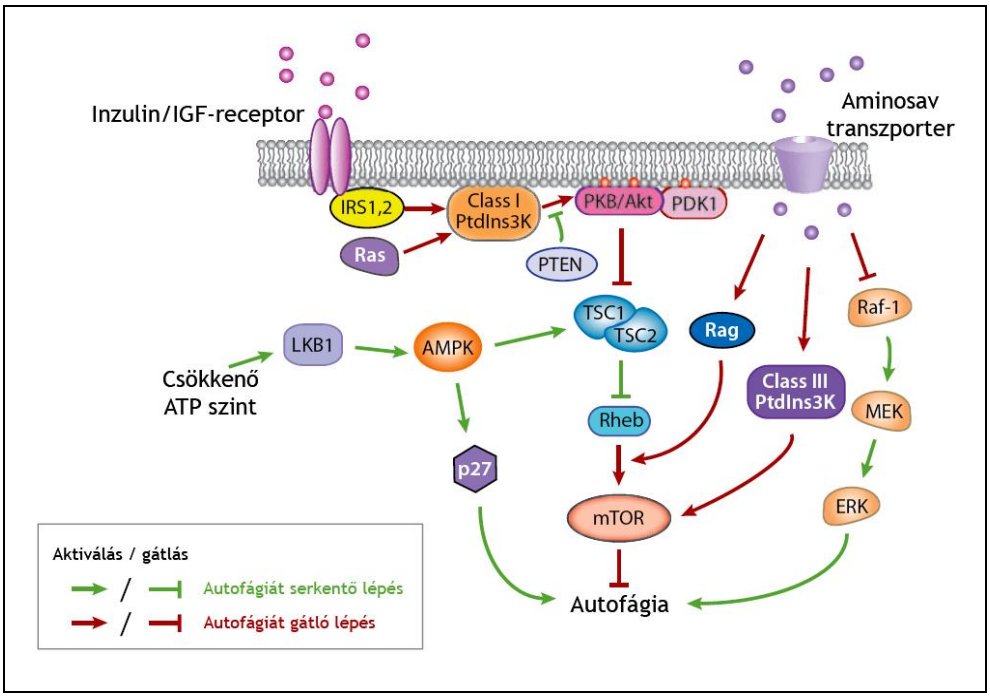
1.2.2. A TORC1 aktivitásának szabályozása

A TORC1 felé vezető szignalizációs utak közül az aminosav-ellátottsággal kapcsolatos-, az inzulin/inzulinszerű növekedési faktor- illetve az LKB1-AMPK jelátviteli útvonal tekinthető a legjelentősebbeknek.

Magasabbrendű eukarióták esetében az aminosavak a sejtek plazmamembránjában lévő SLC1A5 és SLC7A5 (soluble carrier family 1 member 5 és soluble carrier family 7 member 5) transzportereken, vagy ezek homológjain keresztül lépnek be a citoplazmába *(Nicklin és mtsai, 2009).* Emlős sejtvonalakon végzett kísérletek eredményei arra utalnak, hogy megfelelő aminosav-ellátottság esetén a Rheb (Ras homolog enriched in brain) fehérje közvetlenül aktiválja a TOR-t (Long és mtsai, 2005). Az mTORC1 Rheb-en keresztül történő szabályozásának mechanizmusa rendkívül érdekes: megfelelő aminosav szint esetén mindketten a sejtmag körül elhelyezkedő, nagyméretű vezikulumokban találhatóak, viszont aminosav megvonás esetén az mTORC1 áthelyeződik a citoplazmában lévő apró, pontszerű vezikulumokba. Ezáltal kivonja magát a Rheb aktiváló hatása alól, aminek következtében az eddig általa foszforilált formában tartott fehérjék defoszforilálódnak, ami a fehérjeszintézis volumenének beszűküléséhez, és az autofágia indukciójához vezet *(Sancak és mtsai, 2008)*. Léteznek más, a TORC1 aktiválásához vezető

útvonalak is, a Drosophila esetében a Rag (Ras-related small GTPases) fehérjéken keresztül aktiválódik a TORC1 az aminosav szint függvényében *(Kim és mtsai, 208)*.

A növekedési faktorok megvonására a sejtek – a tápanyag-ellátottságtól függetlenül – autofágiával válaszolnak, jelenlétük viszont az extracelluláris térben képes biztosítani a sejtek megfelelő fehérjeszintézisét és növekedését. Az inzulin/növekedési faktor jelátviteli út első lépéseként az inzulin, vagy az inzulinszerű növekedési faktor hozzákapcsolódik a sejtmembránban lévő receptorához. A ligand-kötött receptor autofoszforilálódik, majd ennek következtében aktiválódva foszforilálja az inzulin receptor szubsztrát 1 és 2 (IRS1 és IRS2) fehérjéket. Az ilyen módon aktívvá tett IRS-ek többféle fehérjét, köztük az class 1 foszfoinozitid 3-kinázt (class I PI3K) képesek a plazmamembránhoz gyűjteni és aktiválni *(Sánchez-Margalet és Najib, 1999)*. A kináz aktivitással rendelkező class I PI3K a membránban lévő foszfatidilinozitol 4,5 difoszfátot az inozitolgyűrű 3. pozíciójában is foszforilálni fogja *(Vieria és mtsai, 2001; Lindmo és Stenmark, 2006)*. A kaszkád következő tagja, a protein kináz B/Akt (PKB/Akt), amely PH doménje (pleckstrin homology domain) segítségével odakötődik az előző reakció során keletkező foszfatidilinozitol 3,4,5 trifoszfáthoz, majd a PDK1 (phosphoinositide-dependent protein kinase 1) jelenlétében és hatására aktiválódik *(Alessi és mtsai, 1997; Stokoe és mtsai, 1997)*. A szerin/treonin kináz aktivitással rendelkező PKB/Akt a TSC1/2 (tuberous sclerosis complex) második tagját, a TSC2-t (régebbi nevén a tuberint), - azt 924-es szerinjén és 1518-as treoninján foszforilálva – inaktiválja *(Potter és mtsai, 2002; Huang és Manning, 2008)*. Ennek a lépésnek két fontos következménye lesz: az egyik, hogy a TSC2 a továbbiakban nem képes komplexet képezni a hamartinnal, azaz a TSC1-gyel, a másik, hogy a foszforilált TSC2 elveszíti azt a képességét, hogy a TSC1-gyel képzett komplexben inaktiválni tudja a GTP-ázokat *(Gao és mtsai, 2002; Avruch és mtsai, 2006; Huang és Manning, 2009)*. A TORC1 felé vezető szignalizációs úton ez az utóbbi jár komoly következményekkel, ugyanis ennek következtében a TSC2 nem képes inaktív (GDP-t kötő) formában tartani a Rheb fehérjét, amely az mTORC1 egyik legfontosabb aktivátora *(Zhang és mtsai, 2003; Manning és Cantley, 2003; Avruch és mtsai, 2009)*. Az aktív, GTP-t tartalmazó Rheb viszont képes megkötni és így inaktiválni azt az FKBP38 fehérjét, amelyik egyébként a TORC1 inhibitora, ezért a TORC1-re gyakorolt pozitív hatás tovább erősödik *(Bai és mtsai, 2007)*. Az inzulin szignalizációs útvonal tehát a TORC1-et gátolni képes fehérjék inaktiválásával tartja fent a TORC1 folyamatos működését, és ezen keresztül a sejtek proliferációját (3. ábra).



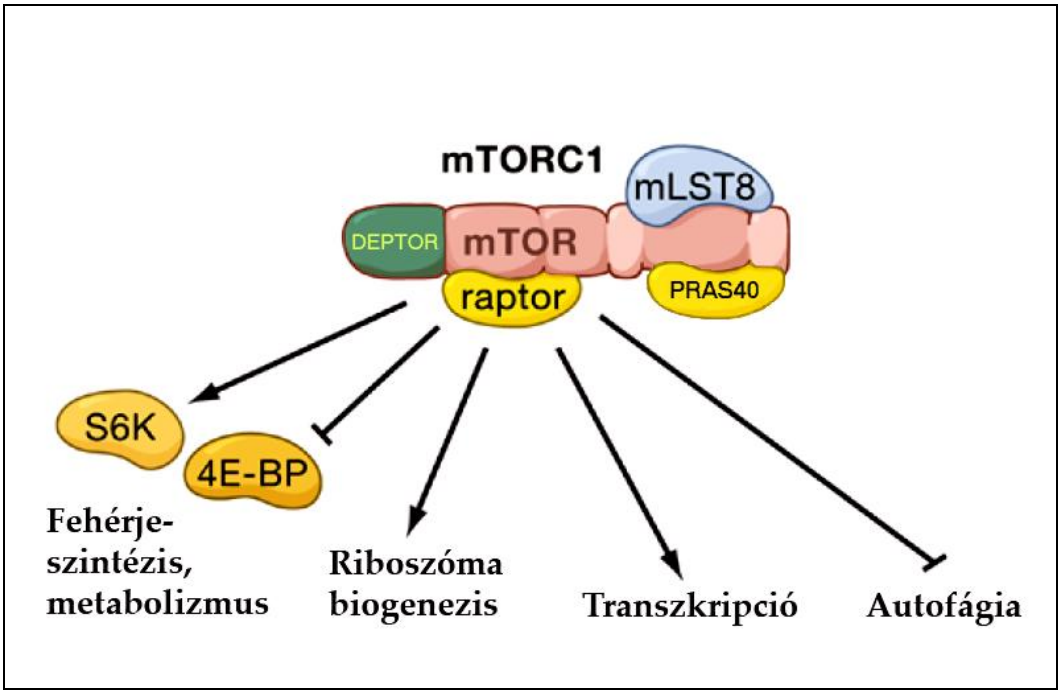
3. ábra. A TORC1-hez kapcsolódó legfontosabb szignalizációs utak. IGF: inzulinszerű növekedési faktor, IRS: inzulin receptor szubsztrát, PI3K: foszfoinozitid 3-kináz, PTEN: tenzin-homológ foszfatáz (A PI3P-ot képes defoszforilálni), PDK1: foszfatidilinozitol-függő kináz1, PKB/Akt: protein kináz B/Akt, TSC1/TSC2: tuberous sclerosis complex 1 és 2, Rag: Ras-related small GTPases, AMPK: AMP által aktivált protein kináz, LKB1: liver kinase B1, Ras: Rat sarcoma small GTPase, Rheb: Ras homologue enriched in brain GTPáz, a mTOR: emlős target of rapamicin, p27: cyclin-dependent kinase inhibitor 1B, Raf-1: proto-oncogene serine/threonine-protein kinase, MEK: mitogen-activated protein kinase kinase, ERK: extracelluláris szignál által regulált protein kináz. A Raf-1 – MEK – ERK útvonal a TOR megkerülésével képes autofágiát indukálni. (He és Klionsky, 2009 alapján, átrajzolva).

Az STK11/LKB1 (serine/threonine 11 kinase/liver kinase B1) - AMPK (adenosine monophosphate-activated kinase) jelátviteli útvonal elsősorban a sejt energetikai állapotának, azaz az ATP/ADP arány változásának függvényében szabályozza a TORC1 aktivitását *(Hardie és mtsai, 2006).* Amennyiben az előbb említett arány az ADP javára tolódik el, abban az esetben az adenilát kináz az általa katalizált 2ADP ⇨ ATP + AMP reakcióval igyekszik az egyensúly közeli ATP/ADP viszonyt fenntartani. A keletkező és felhalmozódó AMP viszont képes aktiválni az AMPK kinázt *(Hardie és mtsai, 1998),* amely, ha elér egy bizonyos küszöbértéket *(Chhippa és mtsai, 2011)* a TSC1/2 komplex aktiválásán keresztül csökkenti a TORC1 működését, ami viszont az autofág folyamatok beindulásához vezet *(Hardie, 2004, 2005; Meijer és Codogno, 2007)*. Ezzel párhuzamosan az AMPK képes aktiválni a p27-et (cyclin-dependent kinase inhibitor) *(Short és*

mtsai, 2010), amely közvetett úton autofágiát indukál *(Chen és mtsai, 2008).* A fentebb vázolt lépések mellett az STK11/LKB1 kináz hatása is szükséges az AMPK aktiválásához *(Hawley és mtsai, 2003; Lizcano és mtsai, 2004; Shaw, 2009)* (3. ábra).

1.2.3. A TORC1 által szabályozott folyamatok

Optimális feltételek, valamint a megfelelő hormonok illetve növekedési faktorok jelenléte esetén a TORC1 aktivitása folyamatosan foszforilált állapotban tartja az S6 kinázt (Ribosomal protein S6 kinase β1) és a 4E-BP-t ((Eukariotic translation initiation factor 4E-binding protein), ezáltal biztosítva a transzlációs apparátus folyamatos működését és a sejt proliferációját *(Hay és Sonenberg, 2004).* Ugyancsak szükséges a komplex aktivitása a transzkripció megfelelő szinten tartásához, valamint a riboszómális RNS-ek képződéséhez és így a riboszóma biogenezishez *(Claypool és mtsai, 2004; Mayer és mtsai, 2004; Wullschleger és mtsai, 2006)* is. Ugyanezen feltételek mellett a TORC1 már korábban ismertetett feladata az autofág folyamatok gátlásának fenntartása (4. ábra).



4. ábra. Az aktív mTORC1 által szabályozott legfontosabb folyamatok.

Mind az élesztő, mind a soksejtű eukarióták esetében a TORC1 által regulált lebontó folyamatokban elsősorban az atg (autophagy-releated) gének – vagy ezek ortológjainak - termékei találhatók. Ezek fontos szerepet játszanak az élesztőben a pre-autofagoszómális struktúra (PAS), illetve a magasabbrendű eukariótákban a fagofór kialakításában, növekedésében és záródásában (azaz autofagoszómává alakulásában), továbbá elősegítik lizoszómákkal való egyesülését *(Noda és Ohsumi, 1998; Ichimura és mtsai, 2000; Stromhaug és Klionsky, 2001; Mizushima és mtsai, 2002; Levine és Klionsky, 2004; Sarbassov és mtsai, 2005; Xie és Klionsky, 2007; Xie és mtsai, 2008; Nakatogawa és mtsai, 2009; Cebollero és Reggiori, 2009; Kamada és mtsai, 2010; Tanida 2011).*

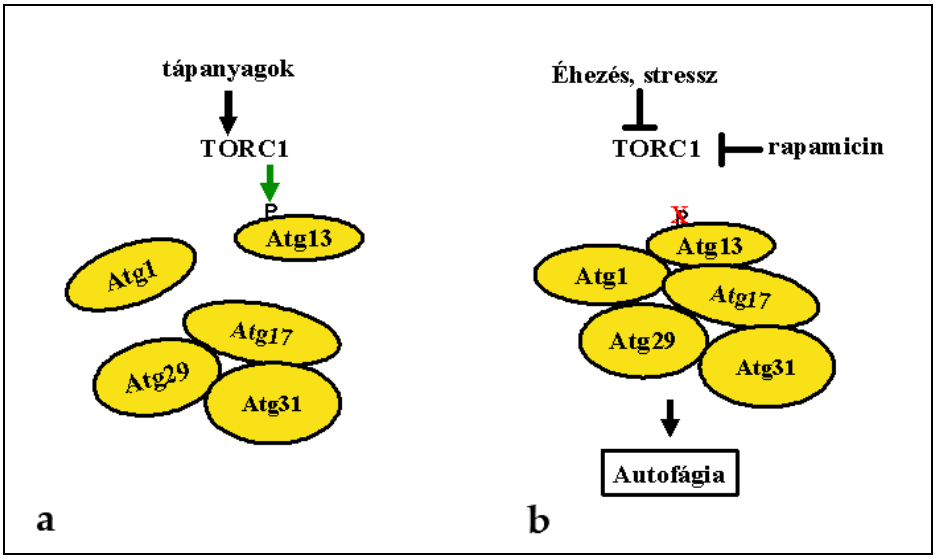
Az eukarióták körében az autofágia molekuláris szintű mechanizmusa – ideértve a folyamat genetikai szabályozását is – evolúciós szempontból erősen konzervált: az élesztőtől a gerincteleneken át az emlősökig ugyanazon, vagy nagyon hasonló lépések sorozatából áll *(Bursch 2001; Reggiori és Klionsky, 2002; Wang és Klionsky 2003; Levine és Klionsky, 2004; He és Klionsky, 2009; Tanida 2011).*

Az eddig leírt 34 atg gén túlnyomó többségét már sikerült azonosítani és jellemezni *(Weidberg és mtsai,2011).* Ezek közül 18 (*atg 1- atg10, atg12 - atg14, atg16 - atg18, atg29* és az *atg31*) nélkülözhetetlen az autofagoszóma kialakulásához *(Ohsumi és Mizushima, 2004; Klionsky 2005; Kabeya és mtsai, 2005 és 2009).* Az ezekről szintetizálódó Atg fehérjéket funkciójuk szerint a következő csoportokba lehet sorolni *(Suzuki és mtsai, 2001; Ohsumi és Mizushima, 2004; Levine és Klionsky, 2004; Klionsky 2005; Kawamata és mtsai, 2008; He és Klionsky, 2009):*

a) Atg1 kináz és a hozzá tartozó szabályozó fehérjék (Atg1, Atg13, Atg17),
b) Atg12 konjugációs rendszer tagjai (Atg5, Atg7, Atg10, Atg12 és Atg16),
c) Atg8 konjugációs rendszer tagjai (Atg3, Atg4, Atg7 és Atg8)
d) a III. osztályba tartozó PI3K komplex elemei (Vps15, Vps34, Atg6/Vps30 és Atg14)
e) Az előbbi csoportokba nem tartozó fehérjék (Atg2, Atg9 és Atg18)

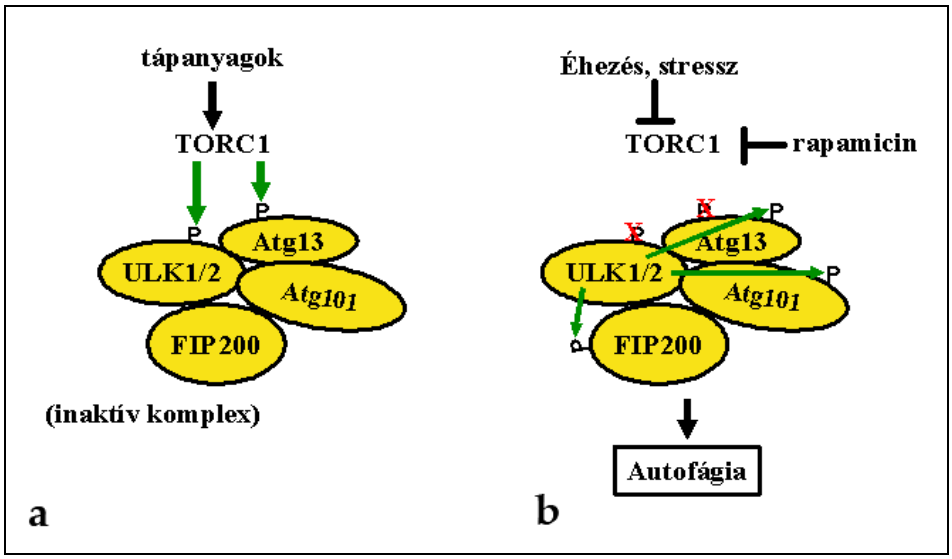
Fontos megjegyezni, hogy az autofágia vizsgálatok egyik legfontosabb alanyában, a *Saccharomices cerevisiae*-ben az Atg fehérjék jelentős hányada a citoplazmából a vakuólum felé történő szállítási útvonalban (cytoplasm to vacuole targeting, Cvt) is részt vállal *(Levine és Klionsky, 2004; Klionsky 2005; He és Klionsky, 2009).*

Ha egy sejt számára a körülmények optimálisak, (illetve a soksejtűekben a szervezet fejlődése szempontjából sem indokolt annak autofágia útján történő eliminálása), akkor ebben a sejtben a TORC1 hiperfoszforilált állapotban tartja az Atg13 fehérjét, amely így nem tud hozzákapcsolódni az Atg1-hez, és ennek következtében nem alakulhat ki az autofág folyamatot iniciáló komplex *(Funakoshi és mtsai, 1997; Wullschleger és mtsai, 2006; Kamada és mtsai, 2010).* Az aktív TORC1 közvetlenül serkenti a riboszóma biogenezist és a fehérjék transzlációját *(Powers és Walter, 1999; Mayer és Grummt, 2006; Hall és mtsai, 2007; Tsang és mtsai, 2010),* és ezeken keresztül a sejt növekedését és proliferációját *(Zhang és mtsai, 2000; De Virgilio és Loewith,. 2006; Wang és Levine, 2010).* A külső vagy a belső környezet megváltozása azonban a korábban ismertetett szignalizációs utakon keresztül képes inaktiválni a TORC1-et, és ez a lépés - foszfatázok közreműködésével - az Atg13 részleges defoszforilációjához, majd az Atg1-hez történő kötődéséhez vezet. *(Kamada és mtsai, 2000; Chang és Neufeld, 2009; Kamada és mtsai, 2010)*. Az Atg13-Atg1 együtteshez az élesztő esetében az Atg17, majd ezt követően az Atg11, az Atg29 és végül az Atg31 kapcsolódik *(Klionsky, 2005; Kabeya és mtsai, 2005; Kawamata és mtsai, 2008; Kabeya és mtsai, 2009; Kamada, 2010; Mizushima és mtsai, 2011).* Az így kialakuló komplex a pre-autofagoszómális struktúra vagy a fagofór összeállási helyén (phagophore assembly site, mindkettő rövidítése: PAS) helyén halmozódik fel, és legalább két eltérő funkciója van: detektálható kináz aktivitás nélkül összetoborozni a fagofór kialakításához szükséges Atg fehérjéket, valamint feltételezett kináz aktivitás közreműködésével elősegíteni az autofagoszóma létrejöttét *(Scott és mtsai, 2000; Kabeya és mtsai, 2005; Cheong és mtsai, 2008; Mizushima és mtsai, 2011)* (5. ábra).



5. ábra. A pre-autofagoszómális struktúra iniciálásáért felelős komplex tagjai és aktiválódása élesztőben.

Emlősök esetében ez a komplex az élesztőből ismert fehérjék közül csak az Atg1 homológjainak, az ULK1 és 2 (Unc-51 like kinase 1 és 2) egyikét, valamint az Atg13-at tartalmazza, viszont két új komponenssel: az Atg17 emlős homológjával, a FIP200-zal (focal adhesion kinase family interacting protein of 200kDa) és az Atg 101-gyel bővül ki *(Hara és mtsai, 2008; Hosokawa és mtsai, 2009; Jung és mtsai, 2009; Mercer és mtsai, 2009).* Az emlősök sejtjeiben az ULK1/2 komplex tagjai folyamatosan össze vannak kapcsolódva, és alaphelyzetben közvetlen interakcióban vannak az ULK1/2 fehérjét foszforiláló mTORC1-gyel. Éhezés vagy stressz hatására ennek az interakciónak a megszűnése vezet az ULK1/2 defoszforilálódásához, aminek következtében ez a fehérje visszanyeri kináz aktivitását, és foszforilálja a komplex többi tagját *(Jung és mtsai, 2009; Ganley és mtsai, 2009).* (6. ábra)



6. ábra. Emlős sejtekben a fagofór kialakulásáért felelős koplex inaktív formában állandóan jelen van, és az mTORC1 gátlása következtében válik csak aktívvá. A zöld nyilak a foszforilációt végző kinázok felől mutatnak a célmolekula felé.

Ellentétben az élesztőnél tapasztaltakkal, a magasabbrendű eukarióták sejtjeinek citoplazmájában számos PAS jöhet létre egyidőben, és ezek mindegyikéből keletkezhet autofagoszóma *(Hara és mtsai, 2008).*

1.2.4. Az autofagoszóma kialakulása

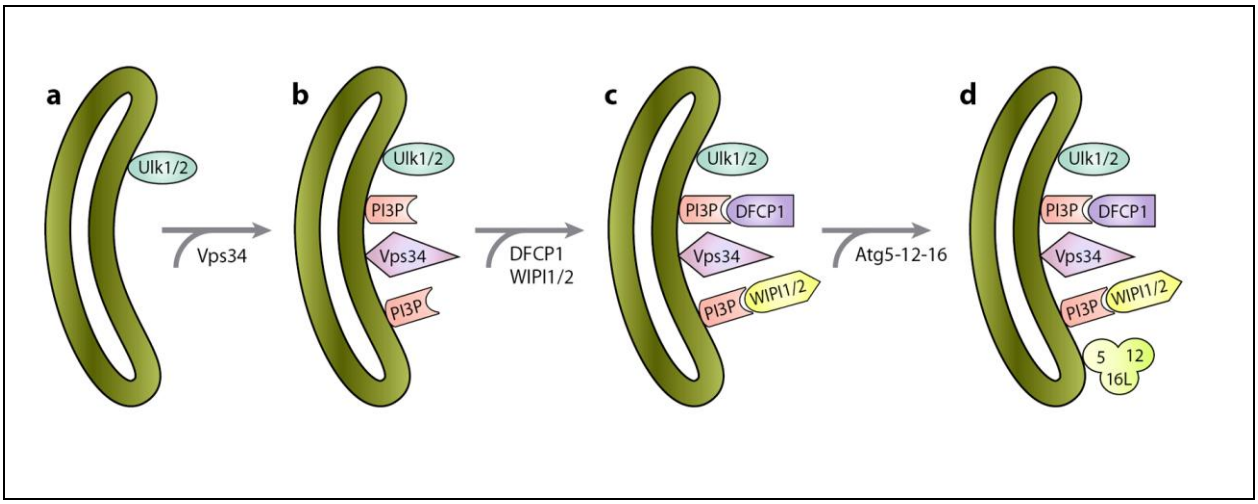
A TORC1 inaktiválódását követően az Atg13-Atg1 fehérjékből kialakuló maghoz és az ahhoz kapcsolódó további molekulákból kialakuló komplex létrejöttéhez szükséges más atg-gének (atg1, atg3, atg4, atg5, atg7, atg8, atg12, atg13 és atg14) expressziójának fokozódása *(Hardwick és mtsai, 1999; Abeliovich és mtsai, 2000; Chan és mtsai, 2001; Natarajan és mtsai, 2001).* Ennek következtében alakulhatnak ki és/vagy aktiválódhatnak azok a komplexek, amelyek részt vesznek az autofágia soron következő lépéseinek – az izoláló membrán vagy fagofór létrejöttét (nucleation) követő növekedési- (expansion) és végül záródási fázisnak (completion) – megvalósításában.

1.2.4.1 A fagofór képződése (nucleation)

A lassan több, mint fél évszázados kutatás ellenére a lebontandó citoplazmaterületet elkülönítő kettős izoláló membrán/fagofór eredete még mindig nem tisztázott *(Juhász és Neufeld, 2006).* Az a tény, hogy az élesztő esetében eddig nem sikerült megfigyelni a kettős izoláló membrán keletkezését a sejtben már meglévő, membránnal határolt organellumokból, a fagofor *de novo* keletkezésére enged következtetni *(Klionsky, 2005).* Az Atg-fehérjékből formálódó PAS környezetében a Vps15 (vacuolar protein sorting 15), Vps34/PI3K, Vps30/Atg6 és Atg14 fehérjékből álló komplex jelenik meg, amelyről egyelőre csak annyit lehet tudni, hogy nélkülözhetetlen szerepe van a membránokban lévő foszfatidilinozitol molekulák foszforilálásában és így az izoláló membrán kialakításában is *(Kametaka és mtsai, 1998; Kihara és mtsai, 2001; Klionsky, 2005; Heenan és mtsai, 2009; Zhong és mtsai, 2009).*

A fagofór iniciálásában a magasabbrendű eukariótáknál is a Vps15/p150 és a Vps34/PI3K kinázokból, az utóbbival komplexet képző Beclin1/Atg6 fehérjéből és a hozzájuk kapcsolódó mAtg14/Atg14L proteinből álló együttes vesz részt *(Liang és mtsai, 2001; Furuya és mtsai, 2005; Zeng és mtsai, 2006; Itakura, 2008)*. Feltételezések szerint valószínűleg ez a komplex egészül ki az UVRAG (ultraviolet irradiation resistance-associated gene) fehérjével, amely már a fagofór növekedéséhez szükséges (*Liang és mtsai, 2007 és 2008)*) (7. ábra a, b).

Az emlős sejtvonalakon végzett legújabb vizsgálatok viszont szoros kapcsolatot mutattak ki az endoplazmatikus hálózat és a képződő fagofór membránja között *(Axe és mtsai, 2008; Ylä-Anttila és mtsai, 2009; Hayashi-Nishino és mtsai, 2009 és 2010).*



7. ábra. Az emlős sejtekben a fagofór kialakításában részt vevő fehérjék (ULK1/2, DFCP1, WIPI1/2, Atg 5, Atg 12 és Atg 16L) és a Vps34 komplex tagjai (Vps34, Vps15/p150, Atg6/Beclin1 mAtg14L) a membránhoz történő kapcsolódásuk sorrendjében (Weidberg és mtsai, 2011 nyomán, átrajzolva)

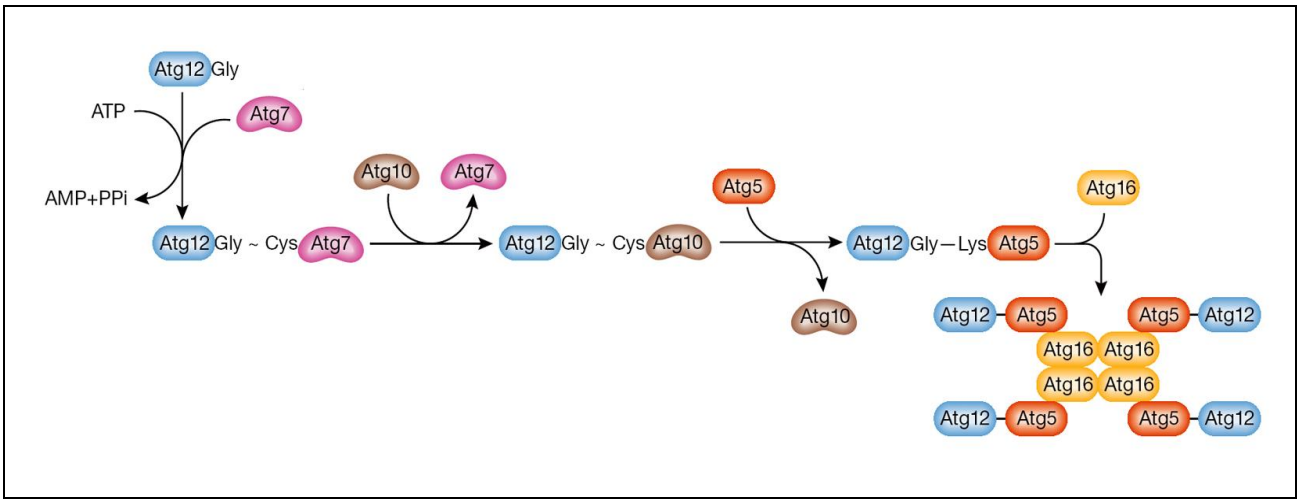
1.2.4.2. A fagofór növekedése (expansion)

Az iniciációt követően még legalább kétféle, egyelőre még tisztázatlan funkciójú fehérje kapcsolódik a fagofór membránjában lévő PI3P-molekulákhoz: a DFCP1(double FYVE domain–containing protein) és az mATG8 ortológ WIPI1 és WIPI2 (WD repeat proteins interacting with phosphoinositides) fehérje *(Axe és mtsai, 2008; Polson és mtsai, 2010).* A legtöbb, az autofágiában betöltött funkcióját illetően is azonosított Atg fehérje (Atg3, Atg4, Atg 5, Atg7, Atg 8, Atg10, Atg12 és Atg16) a fagofór növekedésében játszik nélkülözhetetlen szerepet. Két, egymással is kapcsolatban álló, a ubiquitin-rendszerhez hasonló konjugációs mechanizmust alkotnak: az Atg12-, illetve az Atg8 konjugációs rendszert *(Ohsumi és Mizushima, 2004; Geng és Klionsky, 2008; Mizushima és mtsai, 2011)*(7. ábra c, d).

1.2.4.2.1. Az Atg12 konjugációs rendszer

Az Atg12 konjugációs rendszerben első lépésként az ATP jelenlétében aktiválódó Atg7 egy tioészter kötést létesít az Atg12-vel. Ebben a lépésben az Atg7 amellett, hogy az ubiquitin konjugációs rendszerben jelenlévő E1 (aktiváló) enzimhez hasonló szerepet tölt be, a kulcsfontosságú területeken részleges homológiát is mutat ezzel az enzimmel *(Mizushima és mtsai, 1998; Tanida és mtsai, 1999; Komatsu és mtsai, 2001; Ohsumi és Mizushima, 2004).* Az Atg12

ezután az atg10 gén termékével képez komplexet, amelyben az Atg10 fehérje mint konjugáló (E2) enzim szerepel *(Shintani és mtasai, 1999).* A folyamat utolsó lépésében az Atg12 és az Atg5 között kovalens izopeptid kötés jön létre, és ettől kezdve a két fehérjéből létrejövő képlet egy egységes molekulaként viselkedik *(Mizushima és mtsai, 1998; Ohsumi és Mizushima, 2004).* Az Atg12 konjugációs rendszer működése igen hatékony, a sejtekben gyakorlatilag nem lehet szabad Atg12 és Atg5 fehérjét találni *(Ohsumi és Mizushima, 2004).* A keletkező Atg12-Atg5 komplexek az Atg16 molekulákkal együtt egy multimer komplexet képeznek *(Mizushima és mtsai, 1999)* (8. ábra). Ez a komplex a növekedő fagofórhoz kapcsolódik, annak kiteljesedését segíti egészen az autofagoszómává történő záródásáig *(Mizushima és mtsai, 2001; 2003)*. Ugyanakkor meg kell említeni, hogy az Atg12-Atg5 molekula önmagában is funkcióképes, és E3 (ubiquitin ligase)-szerű aktivitása révén részt vesz az Atg8 konjugációs folyamat utolsó lépésében, vagyis az Atg8 és a foszfatidiletanolamin közötti kötés kialakításában *(Hanada és mtsai, 2007; Fujita és mtsai, 2008)* (9. ábra).

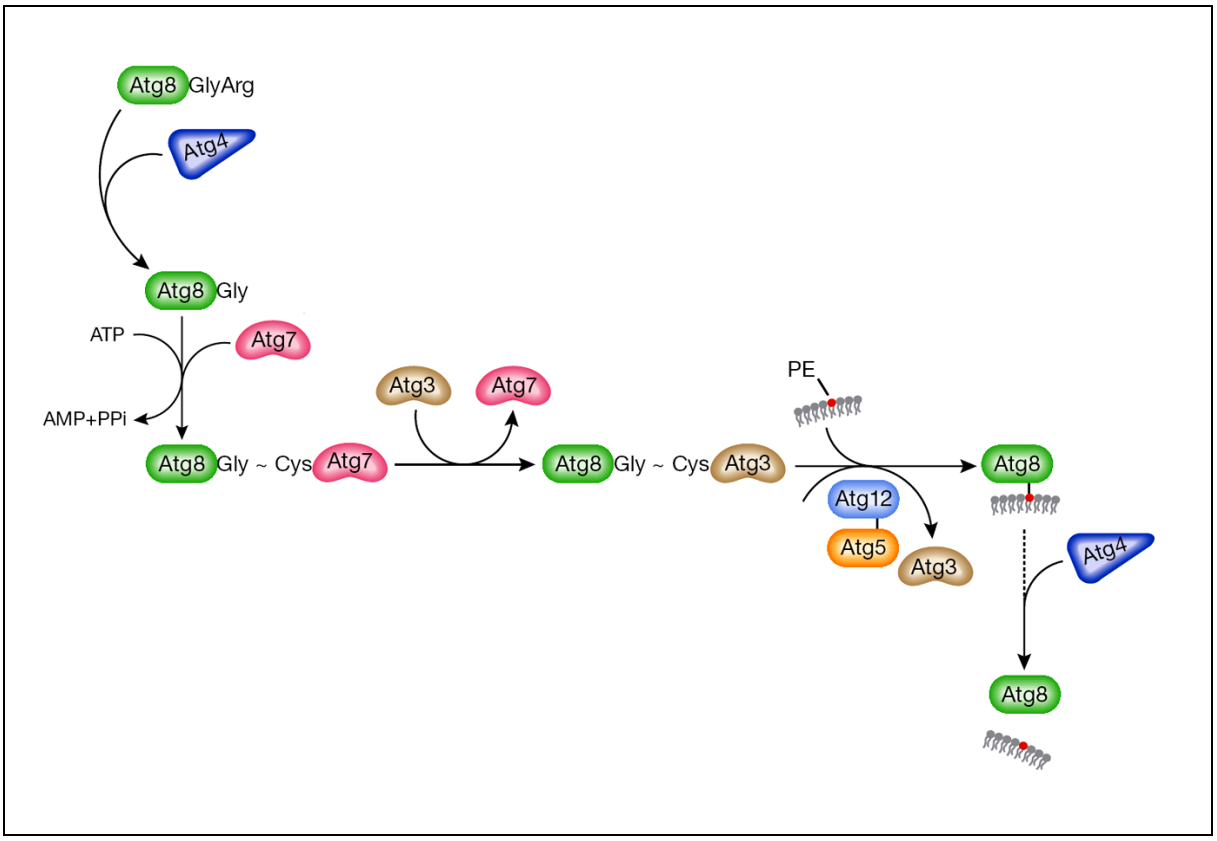


8. ábra. Az Atg12 konjugációs rendszer és az Atg12-Atg5-Atg16 multimer komplex kialakulása (He és Klionsky, 2009 alapján, módosítva)

1.2.4.2.2. Az Atg8 konjugációs rendszer

Ez a rendszer felelős az ubiquitin-szerű fehérjék közé tartozó Atg8 aktiválásáért és annak foszfatidiletanolaminhoz (PE) történő kapcsolásáért. Mivel az Atg8 molekula C-terminálisán egy arginin található, ami blokkolja a mögötte lévő glicint, ezért első lépésként az Atg4 – egy cisztein proteáz – ezt az arginint eltávolítja. Az így terminális helyzetbe kerülő glicinnel már képes az Atg7 (E1 aktiváló enzim) tioészter kötést kialakítani *(Matsuura és mtsai, 1997; Ichimura és mtsai, 2000).* Az aktivált Atg8 ezután átkerül az Atg3 konjugáló enzimre (E2), amely kialakítja az Atg8 és a foszfatidiletanolamin (PE) közötti amidkötést *(Ichimura és mtsai, 2000).* Ennek következtében az eddig szolubilis Atg8 membránkötött fehérjévé válik *(Kirisako és mtsai, 1999; Huang és mtsai, 2000)*, és a továbbiakban mint strukturális alkotóelem, a fagofór membránjának mindkét oldalához kötődve részt vesz annak növekedésében *(Kirisako és mtsai, 1999)* (5. ábra). Az Atg8-PE kialakulása reverzibilis folyamat, ugyanis a konjugációs kaszkád első tagja – az Atg4 fehérje – képes a PE-t eltávolítani az Atg8 fehérjéről *(Kirisako és mtsai, 2000).* Az Atg8, illetve az Atg8-PE hiányában csupán rendellenesen kis méretű autofagoszómák kialakulását lehet megfigyelni *(Abeliovich és mtsai, 2000)* (9. ábra).

Emlősökben a kezdetben csésze alakú, kettős membránnal határolt fagofór növekedésében és záródásában a foszfatidiletanolaminhoz kötődni képes Atg8 fehérje ortológja az LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3), illetve ennek aktiválásában részt vevő enzimek (Atg4, Atg7 és Atg3) jutnak nélkülözhetetlen szerephez *(Kirisako és mtsai, 1999; Kabeya és mtsai, 2000; Tanida és mtsai, 2003; Tanida és mtsai, 2004; Nakatogawa és mtsai, 2007; Xie és mtsai, 2008b).* A további Atg-fehérjék (Atg3, Atg4, Atg5, Atg7, Atg8, Atg10 és Atg12) mind az emlős sejtvonalakban, mind a *Drosophilaban* különböző komplexek- illetve konjugációs rendszerek tagjaiként részt vesznek a fagofór expanziójában és záródásában *(Liang és mtsai, 1999; Thumm és Kadowaki, 2001; Mizushima és mtsai, 2002; Juhász és mtsai, 2003; Scott és mtsai, 2004; Yang és Klionsky, 2009; Hosokawa és mtsai, 2009, Jung és mtsai, 2009; Chang és Neufeld, 2010),* bár ezeknek az adott folyamatban betöltött pontos szerepe sok esetben még egyáltalán nem tisztázott.



9. ábra. Az Atg8 konjugációs rendszer működése és a membránkötött Atg8 kialakulása (He és Klionsky, 2009 nyomán, módosítva)

1.2.4.3. A bekebelezés szelektivitása

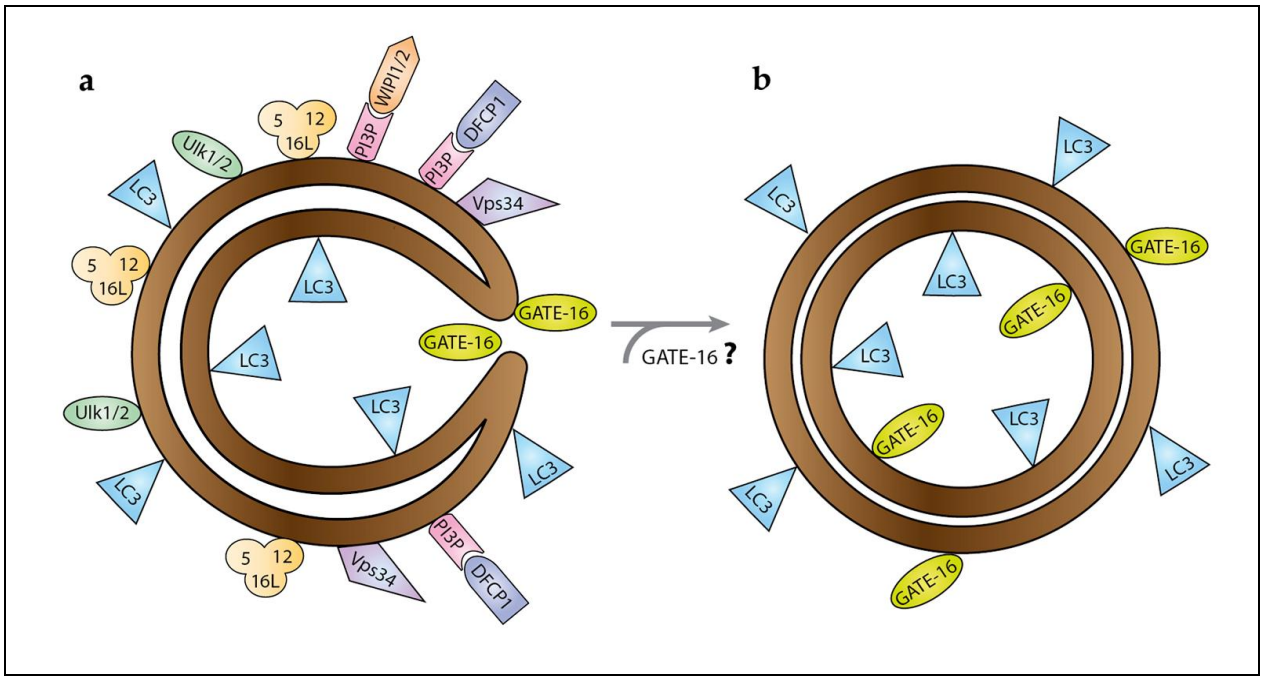
Bár az autofágiára hosszú ideig mint nem-szelektív lebontó folyamatra tekintettek, ma már tudjuk, hogy sejtorganellumok szintjén van válogatás – ez felel meg a bevezetőben említett pexofágiának, retikulofágiának, mitofágiának és ribofágiának. Az utóbbi években azonban arra is fény derült, hogy léteznek olyan molekuláris felismerő- és szállító rendszerek, amelyek szelektíven juttatnak ubiquitinált fehérjéket a fagofór területére, mintegy konkurálva a proteaszóma rendszerrel. A p62/SQSTM1 (sequestosome 1) fehérje nemcsak az ubiquitinnel megjelölt fehérjékkel, hanem a fagofór membránjához kötődni képes Atg8s-sel (az Atg8 egyik változatával) is képes kapcsolatot létesíteni, és ilyen módon az ubiquitinált fehérjéket a fagofórhoz eljuttatni *(Bjorkoy és mtsai, 2005; Moscat és mtsai, 2007).* Az újabb eredmények tükrében azonban úgy tűnik, hogy a p62/SQSTM1 nem kizárólagosan csak a citoplazmában szabadon lévő, ubiquitinnel megjelölt fehérjéket képes a fagofórhoz irányítani, hanem a belső membránokban levőket is, az

őket hordozó sejtorganellummal, vagy baktériummal együtt *(Kim és mtsai, 2008; Ding és mtsai, 2010; Zheng és mtsai, 2009)*.

Két további fehérje is részt vállal az ubiquitin-jellel ellátott proteinek fagofór membránjához való rögzítésében: az Alfy (autophagy-linked FYVE protein) és a DFCP1 (double FYVE-containing protein 1). Ezek a p62/SQSTM1-tól eltérően nem az Atg8 fehérjén keresztül, hanem közvetlenül képesek kapcsolódni a PI3P-hoz *(Clausen és mtsai, 2010; Filimonenko és mtsai, 2010)*

1.2.4.4. A fagofór autofagoszómává történő záródása (completion)

A fagofór záródása – éppúgy, mint a kialakulásához szükséges membrán eredete – nehezen vizsgálható, és ezért eddig ez viszonylag kevés adekvát kísérletes eredménnyel dokumentált lépése az autofágia folyamatának. Az előzőkben vázolt két konjugációs folyamat eredményeképpen létrejövő Atg12-Atg5-Atg16 multimer komplex valamint az Atg8-PE jelenléte, illetve kapcsolódásuk a fagofór membránjához nélkülözhetetlen annak növekedéséhez, leválásuk viszont ennek az elongációs folyamatnak a végét jelenti *(Kabeya és mtsai, 2000; Mizushima és mtsai, 2001; Mizushima és mtsai, 2003; Suzuki és Ohsumi, 2007).* Mivel az Atg8 a hozzá kovalensen kötött foszfatidiletanolaminon keresztül kötődik a fagofór membránjához, ezért az előbbi leválásához az Atg4 cisztein-proteáz aktivitása szükséges *(Kirisako és mtsai, 2000; Xie és mtsai, 2008).* A fagofór záródásában és a többi fehérje membránról történő leválasztásában az Atg8 egyik ortológjának, a GATE16-nak (Golgi-associatedATPase enhancer of 16 kDa) van fontos szerepe *(Weidberg és mtsai, 2010)* (10. ábra a és b).



10. ábra. A fagofór növekedéséhez (a) további fehérjék, így az Atg8-PE/LC3-PE, valamint a GATE16 membránhoz való kötődése szükséges. A fagofór záródásakor (b) a korábban membrán-kötött fehérjék leválnak, az Atg8-PE/LC3-PE és a GATE16 kivételével (Weidberg és mtsai, 2011 nyomán, átrajzolva)

1.2.4.5. Az autolizoszóma kialakulása (maturation)

A fagofór záródásával kialakuló autofagoszóma még csupán az eltávolítandó sejtorganellumokat és a citoplazmából származó molekulákat tartalmazza, a lebontásukhoz szükséges enzimeket még nem. A fagofór, bár kialakulásának pillanatától kezdve folyamatosan növekszik és formálódik, nem képes a helyét a citoplazmán belül megváltoztatni. Csak az autofagoszómává történő záródását követően lesz képes motor fehérjéken keresztül a mikrotubuláris hálózathoz kapcsolódva a sejten belül transzportálódni *(Köchl és mtsai, 2006;* Kimura és mtsai, 2008*; Geeraert és mtsai, 2010).* Az autofagoszómák a magasabb rendű eukariótákban rendszerint először a korai és/vagy késői endoszómákkal fúzionálnak *(Liou és mtsai, 1997; Berg és mtsai, 1998),* ez a lépés teremti meg az auto- és a heterofág útvonalak közötti kapcsolatot. Ezt követően kerül sor a lizoszómákkal (élesztő esetében a vakuólummal) történő egyesülésre, vagyis az autolizoszóma (a régebbi morfológiai nomenklatúra szerint az autofág vakuólum) kialakulására. Fúziókor a kettős határolómembránnal rendelkező autofagoszómának csak a külső membránja vesz részt az összeolvadásban, a belső membránját majd a lizoszómális enzimek fogják lebontani. *(Dunn, 1990; Gordon és mtsai, 1992)*. Az autofagoszóma és a lizoszóma közötti egybeolvadás a homotipikus membránok esetén megfigyelt fúzióhoz hasonló módon

történik. Élesztőben ebben a mechanizmusban szerepet kap az Ypt7 (a Rab7 fehérjecsaládba tartozó GTPáz), az Sec18 (NSF homológ) és a SNARE családba tartozó Vam3, Vam7 Vti1 és Ykt6 fehérje *(Klionsky, 2005).* Emlős sejtekben a LAMP2 (lysosomal assiciated membrane protein2) és a Rab7 GTPáz jelenléte nélkülözhetetlen a fúzióhoz *(Tanaka és mtsai, 2000; Jager és mtsai, 2004).*

1.2.4.6. Az autolizoszóma beltartalmának lebontása (degradation)

A fúzió révén létrejövő autolizoszóma rendelkezik a lebontáshoz szükséges összes komponenssel: az alacsony pH-t biztosító protonpumpákkal, a degradációt végző lizoszómális hidrolázokkal és ezek szubsztrátjaival (*Deter és mtsai, 1967; Marzella és mtsai, 1981; Glaumann és mtsai, 1981; Dunn, 1990; Bloomart és mtsai, 1997; Wang és Klionsky, 2003).* A beltartalom enzimatikus lebontása akkor indul meg, amikor az ezt határoló belső membránt az enzimeknek sikerül lebontaniuk. A felszabaduló monomerek az autolizoszómából transzport útján kerülnek vissza a citoplazmába.

1.3. Az autofágia mechanizmusa a Holometabola rovarokban

Az előzőekben vázolt eredmények elsősorban a sörélesztő *(Saccharomyces cerevisiae)* törzsein és emlős sejtvonalakon végzett kutatásokból származnak, de az autofág mechanizmus erősen konzervált jellege miatt az eddig vizsgált eukarióták esetében a rendszer számos ortológját sikerült már azonosítani, illetve pontos funkciójukat meghatározni *(Meléndez és Neufeld, 2008)*.

1.3.1. A Holometabola rovarok, mint az autofágia modellszervezetei

A teljes átalakulással fejlődő (holometabola) rovarok ideális alanyai az autofágia kutatásának *(Sass, 2008)*. Egyfelől, mivel a posztembrionális fejlődésük során gyakorlatilag folyamatosan táplálkoznak és növekszenek, ezért az aminosavak megvonására igen gyors és erőteljes autofág-választ produkálnak. Másfelől viszont, a metamorfózist közvetlenül megelőző időszakban - hormonális hatásra - a lebontandó lárválís szerveikben fiziológiásan is autofágia indukálódik, amely végül, a bábállapot során ezen szervek elpusztulásához és lebomlásához vezet *(Sass és Kovács, 1975; Larsen, 1976; Sass és Kovács, 1977; Butterworth és mtsai, 1988; Sass és mtsai, 1989; Lee és Baehrecke, 2001; Thummel, 2001; Lee és mtsai, 2002; Rusten és mtsai, 2004; Scott és mtsai, 2004; Yin és Thummel, 2005; Hennig és mtsai, 2006; Neufeld, 2008; McPhee és Baehrecke, 2009; Chang és Neufeld, 2010).* A fiziológiás autofágia beindulását követően a lárválís zsírtestben – amely a gerincesek májához hasonlóan a fejlődő állat metabolizmusának központi szerve – nagyszámú endocitotikus (heterofág) vakuólum is keletkezik. Ezek segítségével veszik fel a zsírtest sejtjei a hemolimfatikus fehérjéket, amelyeket átmenetileg protein granulumokban raktároznak. *(Locke és Collins, 1966; 1968; Larsen, 1976; Lepesant és mtsai, 1982; Levenbook és Bauer, 1984; Schenkel és Scheller, 1986; Burmeister és Scheller, 1992)*. Mindezek alapján tehát a teljes átalakulással fejlődő rovarok, mint modellszervezetek, egyaránt alkalmasak az indukált és a fejlődési autofágia, és a vele számos ponton szoros kapcsolódást mutató endocitózis (heterofágia) tanulmányozására.

Közülük is kiemelkedik a *Drosophila melanogaster*, rövid életciklusával, könnyű tenyészthetőségével, a közel egy évszázada tartó genetikai vizsgálatának eredményeivel, hatalmas, és állandóan bővülő mutánsparkjaival, valamint azzal a hihetetlenül széles spektrumú molekuláris-genetikai eszköztárral, amely sikerrel alkalmazható ezen a modellszervezeten.

Az előzőekben vázolt, az autofág folyamatokat irányító gének ortológjait – kevés kivétellel – már megtalálták a *Drosophilában* is (1. táblázat).

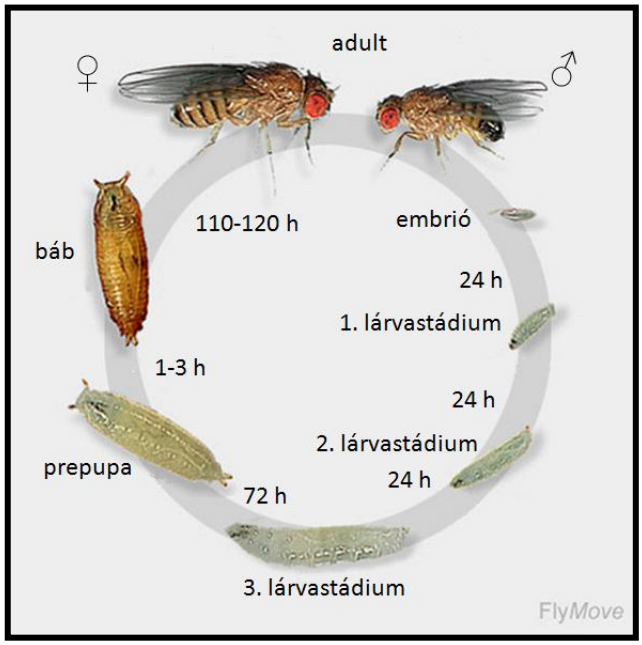
Az autofág gének ortológjai Drosophilában	Igazolt szerep a Drosophila autofágiában
InR (inzulin-szerű receptor)	igen
PI3K (I. osztályba tartozó Foszfoinozitol 3 kináz)	igen
Rheb (Ras kis GTP-ázok családjába tartozó fehérje)	igen
TSC1/TSC2 (GTPázokat aktiváló fehérje komplex)	igen
TOR (PIK családba tartozó szerin-treonin kináz)	igen
Atg1 (szerin-treonin protein kináz)	igen
Atg2 (Az Atg2-Atg9 komplex tagja)	igen
Atg3 (Ubq E2-szerű konjugáló enzim)	igen
Atg4 (cisztein proteáz)	igen
Atg5 (Atg5-Atg12-Atg16 komplex tagja)	igen
Atg6 (Vps34 komplex tagja)	igen
Atg7 (Ubq E1-szerű aktiváló enzim)	igen
Atg8a/Atg8b (Foszfatidiletanolamint kötő fehérje)	igen
Atg9 (Az Atg2-Atg9 komplex tagja)	?
Atg10 (Ubq E2-szerű konjugáló enzim)	?
Atg12 (Atg5-Atg12-Atg16 komplex tagja)	igen
Atg13 (Az Atg1 komplex tagja)	igen
Atg14 (Vps34 komplex tagja)	?
Atg16 (Atg5-Atg12-Atg16 komplex tagja)	?
Atg18 (PI3K kötése)	igen
Vps34 (Vps34 komplex tagja)	igen
Vps15 (Vps34 komplex tagja)	igen
UVRAG (Vps34 komplex tagja)	?
FIP200 (Az Atg1 komplex tagja)	?
Atg101 (Az Atg1 komplex tagja)	?

1. táblázat. Az autofág gének eddig azonosított ortológjai *Drosophila melanogasterben.*

1.3.2. A *Drosophila melanogaster* egyedfejlődése

Modellállatunk, a *Drosophila melanogaster* egyedfejlődése több szakaszra osztható (9. ábra): Az *embrionális fejlődés* a megtermékenyítéstől a peteburokból való kibújásig tart, időtartama szobahőmérsékleten hozzávetőlegesen 24 óra. A kísérletes munka során az állatok korát a peterakástól, mint kezdőponttól számított órákban mérjük (AEL, after egg laying). A kikelést a *posztembrionális fejlődés* követi, amely a bábbőr (puparium) kialakulásáig tart és három, egymástól vedlésekkel elválasztott fejlődési szakaszból áll: az *első lárvastádiumból (L1,* időtartama mintegy 24 óra), amelyet a *második lárvastádium (L2,* ennek időtartama szintén 24 óra), majd végül a bebábozódást megelőző, leghosszabb, kb. 62 -72 óra időtartamú *harmadik*

lárvastádium (L3) követ. A harmadik stádium két további szakaszra osztható: első felében, az úgynevezett *táplálkozó periódusban* (72-108h AEL), az állat továbbra is folyamatosan táplálkozik. Ennek megfelelően posztembrionális fejődés során, csaknem annak végéig, a lárvális szövetek és -szervek folyamatosan és intenzíven proliferálnak. Mivel bennük azonban a DNS duplikációt nem követi citokinézis, ezért sejtjeikben a kromoszómaszám minden ciklusban megduplázódik, és a periódus végére a ploidiaszint akár a 2048n-et is elérheti *(Rudkin, 1972).* A táplálkozó szakaszt a *vándorló periódus* követi (108-144h AEL), melynek során a lárva elhagyja a táplálékát tartalmazó nedves helyet, és bábozódásra alkalmas száraz területet keres. Ebben az időszakban kezdődik meg a lárvális szövetek tömeges autofágiával való lebontása. A harmadik lárvastádium végén az állat prepupává alakul át, kültakarója néhány óra leforgása alatt átalakul és szklerotizálódik, így hozva létre a bábbőrt (puparium). A *metamorfózis* 110-120 órán át zajlik (AEL 144-254/568), ezalatt a poliploid lárvális szövetek lebomlanak, tápanyagot és monomereket biztosítva a diploid hisztoblasztok számára, melyekből ezalatt a kifejlett imágó szervei fejlődnek ki (3. ábra). Az *imágó vagy adult stádium* a bábbőr levedlésével kezdődik, majd az állatok egy óra alatt kifeszítik a szárnyukat, ezt követően pedig kutikulájuk megkeményedik, szklerotizálódik. 3-4 óra múlva ivaréretté válnak, majd párosodnak. Ezt követően a nőstények az első petéiket 2 nap múlva rakják le, és fiziológiás körülmények között 2-3 héten keresztül intenzíven petéznek. Teljes élethosszuk – laboratóriumi körülmények között – 65-80 nap *(Ashburner, 2006).*



9. ábra: A Drosophila melanogaster életciklusa (www.flymove.org, módosítva)

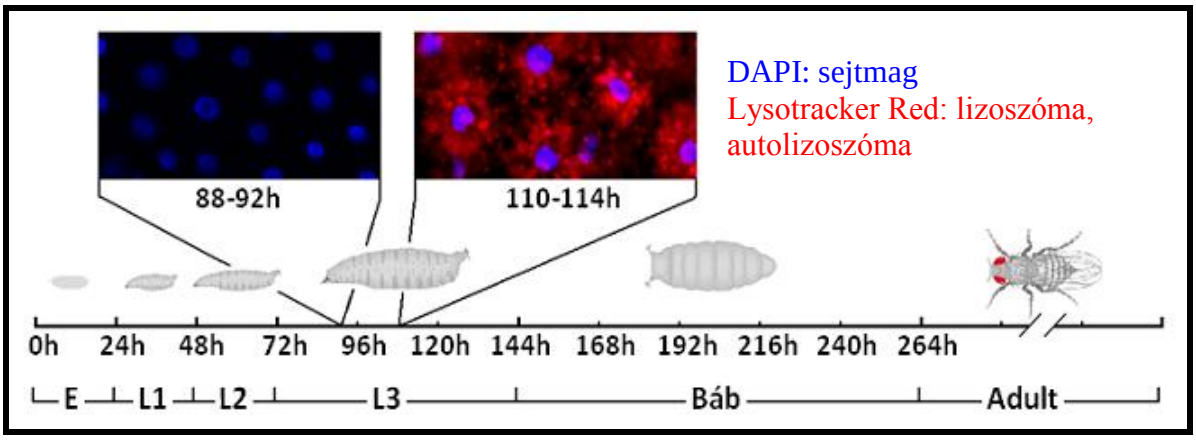
1.3.3. Autofágia a *Drosophila* lárvális zsírtestben

A *Drosophila* szervezetében – éppúgy, mint a rovarok többségénél – a zsírtest tölti be a metabolikus központ szerepét. Ebből a szempontból - bármelyik fejlődési stádiumot is vizsgáljuk – jelentősége és feladatai a gerincesek májához teszi hasonlatossá: a szervezet szükségleteinek megfelelően tápanyagokat raktároz vagy monomereket bocsát ki a keringési rendszerbe; hemolimfa-, raktározó-, immun- és szikfehérjéket szintetizál, megfelelő szinten tartja a hemolimfa glukóz/trehalóz szintjét, valamint képes hormonokat aktiválni és inaktiválni *(Wigglesworth, 1949; Butterworth és mtsai, 1965; Price, 1973; Lepesant és mtsai,1982; Poeting és mtsai, 1982; Powell és mtsai; 1984).*

A lárvális szövetek többségéhez hasonlóan, a lárvális zsírtest proliferáló sejtjei – vagyis a trofociták – sorozatos endomitózist végeznek az embrionális fejlődés utolsó harmadától (16h AEL) kezdve *(Smith és Orr-Weaver, 1991)* az utolsó lárvastádium táplálkozó szakaszának végéig (108h AEL). Ennek eredményeképpen a metamorfózist megelőző időszakra a hatalmas méretű zsírtest-sejtek 256n kromoszóma készlettel rendelkeznek *(Richards, 1980; Butterworth és Rasch, 1986).*

A fiziológiás körülmények között tartott, vad típusú muslica lárvális zsírtestének sejtjeiben az utolsó lárvastádium harmadik napján figyelhető meg először a tömeges autofágia megjelenése. Ez hozzávetőlegesen az állatok egyedfejlődésének peterakástól számított 108. órája körül (108h AEL) következik be (10. ábra) *(Butterworth és mtsai, 1988)*. Éhezés következményeként viszont ennél korábban - akár a 75-90h AEL korú állatban is - autofágia indukálódik zsírtestben, hogy a többi szövet tápanyag-ellátottsága megfelelő maradjon *(Zinke és mtsai, 2002; Rusten és mtsai, 2004; Scott és mtsai, 2004).*

A metamorfózis első időszakában a lárvális zsírtest erős autofágiát mutató sejtjei izolálódnak *(Butterworth és mtsai, 1988),* majd a sejtmagjukban lévő DNS az apoptózisra jellemző módon fragmentálódik *(saját, még nem közölt megfigyelés).* Ezt követően a trofociták elpusztulnak, és anyaguk szabadon felhasználhatóvá válik az imaginális sejtek és szövetek felépüléséhez.



10. ábra: A 108 óránál (AEL) fiatalabb, teljes értékű táptalajon tartott, vad típusú lárvák zsírtest-sejtjeiben nem mutathatók ki az ennél idősebb állatok trofocitáiban fiziológiásan megjelenő autofág struktúrák.

Az autofágia fiziológiás aktiválásának hátterét a juvenilis hormon (JH) jelenléte által szabályozott génaktivitás-mintázat adja. Amikor a JH szintje lecsökken, és ezzel párhuzamosan megemelkedik a 20-HE koncentrációja a hemolimfában, akkor a lárvális szövetek genetikai programja megváltozik, és a proliferáció helyett az autofágia irányába válnak elkötelezetté *(Postlethwait és Jones, 1978; Butterwort és mtsai, 1988).* Mivel a megfelelő időpontban alkalmazott 20-HE kezeléssel a lárvális szövetekben kiváltható az autofágia, ezért a folyamat közvetlen induktorának a vedlési hormon szintemelkedését tekintik *(Lee és Baehrecke, 2001; Thummel, 2001; Rusten és mtsai, 2004).* Viszont az ekdizon-kezeléssel kiváltott autofágia során a megváltozó transzkripciós mintázatok elemzésével (ún. reverz genetikai módszerekkel), talált gének nagy része még áttételesen sem kapcsolódik az autofágiához, mivel a 20-hidroxiekdizon nem kizárólag ezek, hanem számos más, egyéb funkcióval rendelkező gének, ill. géncsoportok átírását is aktiválja *(Lee és mtsai, 2002; 2003; Gorski és mtsai, 2003; Martin és mtsai, 2007).* Így sokkal célravezetőbbnek tűnnek azok a tesztek, amelyeknek célja a mutáns fenotípusokból kiindulva (ún. forward genetikai módszerrel) megtalálni az autofágia szabályozásában részt vevő géneket. Munkánk során transzpozonokkal mutagenizált, auto- és heterofágiára nézve funkcióvesztéses *Drosophila* vonalak vizsgálatával azonosítottunk és jellemeztünk új, korábban ebben a szerepkörben ismeretlen géneket *(Lippai és mtsai, 2008; Csikós és mtsai, 2009).*

2. Célkitűzések

2.1. A cAMP szerepe az autofágia szabályozásában

Az autofágia regulációjában számos kináz és foszfatáz vesz részt, egymással rendkívül kifinomult kölcsönhatási hálózatot alkotva. Ezek hatását nagymértékben befolyásolja a sejt cAMP tartalmának alakulása, amely befolyással van az autofág folyamat indukciójára. Kísérleteinkben a vedlési hormon és a cAMP szint alakulásának összefüggéseit vizsgáljuk meg a fejlődési autofágia időszakában.

2.2. A heterofág úton kialakuló protein granulumok enzimtartalmának eredete.

Az autofágiával párhuzamosan a holometabola rovarlárvák trofocitái jelentős heterofág (endocitotikus) aktivitást is mutatnak. Az ennek során formálódó protein granulumok enzimtartalmának előállítására a már degradálódó zsírtest-sejtek nem képesek. A para-nitrofenil-foszfatáz aktivitást mutató fehérjét felismerő antiszérum segítségével megvizsgáljuk, hogy létezik-e az enzimet inaktív formában raktározni képes szövetféleség a lárvák szervezetében.

2.3. Az autofágiában részt vevő gének homológjainak vizsgálata *Drosophila* lárvában

Az autofágia gének ecetmuslicában fellelhető homológjainak azonosítását követően célul tűztük ki, hogy egy kiválasztott gén (Aut1/Apg3, az Aut7/Apg8 ubiquitinszerű konjugációs rendszer E2 típusú enzime) *Drosophila* homológjának vizsgálatával igazoljuk annak autofágiában játszott szerepét, valamint hogy - funkcióvesztéses állatok létrehozásával - információt nyerjünk az autofágia szükségességéről az egyedfejlődés során.

2.4. Új, az autofágiában részt vevő gének felkutatása P-elem inzerciót hordozó Drosophila mutánsparkok segítségével

Az autofág mechanizmusban defektust mutató törzsek kiválasztása fénymikroszkópos tesztelés útján, amit a jelölt vonalak elektronmikroszkópos vizsgálatával is megerősítünk. 20-hidroxiekdizon kezeléssel kiszelektáljuk azokat a vonalakat, amelyekben nem az autofágiában részt vevő géneket, hanem a folyamatot fiziológiásan kiváltó vedlési

hormon bioszintézisét érinti a mutáció. A P-elem beépülési helyének meghatározását követően a Flybase adatbázis segítségével azonosítani tudjuk az érintett, autofág fenotípust okozó gént. Végezetül a P-elem remobilizálásával igazoljuk, hogy ténylegesen az adott génbe beépült transzpozon, nem pedig egy háttérmutáció okozta a megfigyelt fenotípust.

2.5. Az *snf4aγ (AMPK)* szerepe az autofág folyamatok szabályozásában

Az l(3)S005042-es vonal megfelelt az előző pontban leírt feltételeknek, és az általa hordozott P-elem az *snf4aγ* génben foglal helyet, amely az AMPK egyik alegységének Drosophila homológja. A gén érintettségét az autofág fenotípus kialakításában egy SNF4aγ-RNAi konstrukt előállításával, illetve az ennek segítségével létrehozott transzgén lárvák vizsgálatával igazoljuk. A gén egyik exonját klónozva, arról fehérjét termeltetünk, amely segítségével antiszérumot állítunk elő. A specifikus antiszérummal Western bloton megvizsgáljuk, hogy hogyan alakul az SNF4aγ mennyisége a lárvális zsírtrestben a posztembrionális fejlődés idején, továbbá immunhisztokémiai módszerrel nyomonkövetjük a fehérje lokalizációját az utolsó lárvastádium idején.

2.6. Az *lqf* gén jelentősége az auto- és heterofág folyamatokban

A P-elem inszercióval létrehozott mutánspark l(3)S011027-es vonala szintén megfelelt az előzetes kritériumoknak, és benne a mutáció az *liquid facets (lqf)* gént érintette. Mivel ezeknek a lárváknak a zsírtest-sejtjei sem auto- sem pedig heterofág eredetű granulumokat nem tartalmaztak, ezért megvizsgáljuk, hogy az adott gén milyen szerepet játszhat ezekben a folyamatokban. Lqf-RNAi konstrukciót hordozó transzgén állatok előállításával igazoljuk, hogy ténylegesen ennek a génnek a hibája okozza a fenotípust. Megvizsgáljuk, hogy az Lqf-GFP fúziós fehérje milyen eloszlást mutat a lárvális zsírtest-sejtekben. Specifikus Lqf-antiszérum előállítása után immunhisztokémiai módszerrel megnézzük, hogy az Lqf fehérje milyen lokalizációt mutat az utolsó lárvastádium idején. Rapamicin kezeléssel megvizsgáljuk, hogy az Lqf az autofág folyamatban a TOR-hoz képest azt megelőzően, vagy pedig az után játszik fontos szerepet.

3. Anyagok és módszerek

Az állatok tartása:

A *Mamestra brassicae* lárvákat mesterséges táptalajon, 25-27°C-os termosztátban, napi 16 órás megvilágítás mellett tartottuk. Az állatokat a vedlések alkalmával szinkronizáltuk. Kísérleteinkhez a bebábozódást megelőző, utolsó lárvastádiumban lévő egyedeket használtuk.

A kifejlett és a lárvaállapotú *Neobellieria bullata* egyedeket 24 ^{o}C-on tartottuk, és számukra 60-70%-os relatív páratartalmat és napi 16 órás megvilágítást biztosítottunk. A felnőttek tejporral kevert cukrot, a lárvák marhamájat ettek *ad libitum*.

A *Drosophila melanogaster* vonalakat mesterséges táptalajon, 20°C-os klímaszobában, 60-70%-os relatív páratartalom mellett tartottuk. Napi ritmusuk megörzésére16 fény- és 8 órás sötét periódust biztosítottunk. A transzgén vonalak fenntartását w^{1117} háttéren végeztük, és a nem megfelelő markereket hordozó egyedeket az átrázások idején távolítottuk el.

Az állatok kezelése:

A *Mamestra brassicae* lárvák 20-hidroxiekdizonnal (20-HE), dibutiril-cAMP-vel (db-cAMP) illetve teofillinnel való kezelése mindig az utolsó lárva-lárva vedlést követő 48-50. órában történt. 12-12 lárva kapott egyféle kezelést 10 µl-es injekció formájában, amely vagy 5 µg 20-HE-t, vagy 10 µg db-cAMP-t vagy 30 µg teofillint tartalmazott testsúlygrammonként, Grace médiumban oldva. A kontrollcsoport lárvái 10 µl tiszta Grace médiummal lettek beinjektálva. A 3 órás kezelés után a kontroll- és a 20-HE kezelést kapott csoport tagjainak zsírtestéből elektronmikroszkópos (ELMI) vizsgálathoz, illetve a cAMP tartalom meghatározására mintát gyűjtöttünk. A db-cAMP illetve teofillin kezelésben részesült lárvák zsírtestéből csak ELMI vizsgálathoz vettünk ki mintákat.

A *Neobellieria bullata* lárvák hormonkezelésekor 1 µg/testsúlygramm 20-HE-t injektáltunk a testüregbe, 10 µl-es injekció formájában. A bebábozódás kivédésére ún. water stress kezelést alkalmaztunk: a lárvákat 2 ml csapvizet tartalmazó 100 ml-es Erlenmayer lombikba tettük, amit hálóval zártunk le. Amennyiben ekkor is hormonkezelést alkalmaztunk, abban az esetben 10 µg 20-HE-t tettünk a csapvíz minden milliliterébe.

A *Drosophila melanogasteren* végzett kezelésekhez az állatokat 2 órán át petéztettük, és az azonos korú lárvákat az utolsó lárva-lárva vedlés ideje szerint még egyszer szinkronizáltuk.

20-HE kezelés esetén sütőélesztőt hígítottunk azonos térfogatú desztillált vízzel, majd a szuszpenziót felforraltuk. Lehűlés után 10 µl 20-HE oldatot (1 ml, 5% etanolt tartalmazó nanopure vízben oldottunk fel 5 mg hormont) adtunk 1 ml élesztő szuszpenzióhoz. Ebből a keverékből 100-100 µl-t tettünk egy 24 lyukú szövettenyésztő lemez minden egyes kamrájába, és ezekbe helyeztük bele a lárvákat. A kontrollok csak tiszta élesztő szuszpenziót kaptak. 12 órás inkubáció után a lárvákat felboncoltuk a megfelelő vizsgálatok céljaira.

Rapamicinnel történő kezeléshez az élesztő szuszpenzió 4 µM rapamicint (Sigma) tartalmazott. Az antibiotikumból először egy 80 µM rapamicin törzsoldatot készítettünk, 10% DMSO-t (dimetilszulfoxid) tartalmazó PBS-ben, és ebből tettük a megfelelő mennyiséget az élesztő szuszpenzióba. A 6 órán át tartó kezelés itt is 24 lyukú szövettenyésztő lemezen történt.

Aminosav megvonás (éheztetés): Az autofágiát még nem mutató, 95-100 AEL korú lárvákat a táptalajból kigyűjtöttük, és 4 órás időtartamra 20% szukrózt tartalmazó vizes oldatba helyeztük őket úgy, hogy az oldat éppen ellepje az állatokat. A kezelés után a lárvákat felboncoltuk, és az autofágia jelenlétét vagy hiányát LysoTracker Red festéssel mutattuk ki. A zsírtest-lebenyeket ebben az estben is Olympus BX-51 fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

In vitro kezelések:

Az utolsó lárvastádiumban lévő *Mamestra brassicae* lárvákból óvatosan kiemeltük a zsírtest lebenyeket, majd 3 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk őket milliliterenként 10 µg db-cAMP-t vagy 30 µg teofillint tartalmazó Grace médiumban. Ezt követően a szövetdarabkákat ELMI vizsgálatra rögzítettük.

A zsírtest cAMP tartalmának meghatározása:

A szinkron nevelt lárvák közül az utolsó lárvastádium minden napján azonos időpontban 5-5 lárvából kiboncoltuk a zsírtestet, majd annak egy darabját elektronmikroszkópos vizsgálat céljára rögzítettük. A szövet többi részét a következő pufferben gyűjtöttük össze: 5 mM TRIS-HCl, 8 mM teofillin, 6mM β-merkaptoetanol, pH: 7,4. Az 5 állatból hozzávetőlegesen 70 mg szövetet gyűjtöttünk, amit elhomogenizáltunk, majd 15 percen át centrifugáltunk, 4°C-on 12000-es fordulatszámmal. A tiszta fölülúszóból 3 x 400 µl-nyi mennyiséget fagyasztottunk le -20°C-ra a cAMP tartalom meghatározásához, amit Brown és mtsai (1971) által kifejlesztett kompetitív fehérje kötő módszerrel (competitive protein binding method) végeztünk. A kötőfehérjét a leírás

szerint borjú mellékvesekéregből preparáltuk és 0,2 ml-es egységekben tároltuk -20°C-on, legfeljebb egy hónapig. A tesztcsőbe 100 µl puffert, 100 µl kötőfehérje-preparátumot, 50 µl (5 µCi) H^3cAMP-t (Amersham) és 100 µl felülúszót tettünk, majd 90 percen át 0°C-on inkubáltuk. A reakció leállítását 100 µl szénszuszpenzió (5 g Norit A, 1 g BSA (bovine serum albumin, 50 ml pufferben) hozzáadásával végeztük. 15 percen át tartó, 3000-es fordulatszámmal végzett centrifugálás után a felülúszóból 200 µl-nyi mennyiséget adtunk a scintillációs keverékhez (toluene-ethoxy-ethanol és PPOPOPOP 3:1 arányú keveréke), végül a minták radioaktivitását Beckman LS-100 folyadék scintillációs számláló segítségével határoztuk meg. A standard görbe felvételéhez 100 µl, ismert mennyiségű (0,5 – 16 pM), nem radioaktív cAMP-t tartalmazó oldatot raktunk a tesztcsőbe a minta helyett. Az eredményeket logit-log módszerrel számoltuk ki. A minták fehérjetartalmát Bio-Rad Protein assay segítségével határoztuk meg.

A hemolimfa és a zsírtest savas foszfatáz aktivitásának meghatározása:

Az utolsó lárvastádium minden napján ugyanabban az időpontban vettünk mintát a *Neobellieria bullata* lárvákból. Az állatok testének hátsó végén egy kis sebet ejtve a kicseppenő hemolimfát egy Eppendorf csőben gyűjtöttük, amely 500 µl jéghideg, 0,1 M-os TRIS-HCl puffert (pH: 7,4), és néhány ditiotreitol kristályt tartalmazott. Öt percig tartó, óvatos (2000 rpm, 4°C) centrifugálást követően a felülúszót maradéktalanul összegyűjtöttük, majd lemértük és -20°C-on tároltuk. A kipreparált és átmosott zsírtest lebenyeket 1 ml 0,1 M TRIS-HCl pufferben gyűjtöttük, majd üveg-teflon homogenizálóval 4°C-on elhomogenizáltuk. A 7 perces centrifugálást követően (2000 rpm, 4°C) a felszínt borító zsír eltávolítása után kigyűjtöttük a felülúszót, majd -20°C-on tároltuk. A savas foszfatáz aktivitás mérése Barrett (1972) kissé módosított módszere szerint történt: a reakciókeverék 800 µl 0,2 M-os nátrium-citrát puffert (pH: 4,5), 100 µl 10 mM para-nitrofenil foszfátot és 100 µl hemolimfa vagy zsírtest felülúszót tartalmazott. 37°C-on történő. 60 perces inkubáció után a reakciót 1,2 ml jéghideg, 1% sodium-dodecil-szulfátot (SDS) tartalmazó 2,0 M-os TRIS puffer (pH: 9,5) hozzáadásával állítottuk le. Az oldat abszorbanciáját 410 nm-es hullámhossznál mértük. A kalibrációs görbe felvételéhez ismert mennyiségű para-nitrofenilt tartalmazó oldatsort használtunk.

A savas foszfatáz enzim izolálása:

260 g fagyasztott, utolsó stádiumos *Neobellieria bullata* lárvából tisztítottuk az enzimet, Feigen és mtsai (1980) által kidolgozott módszerrel. Az eljárást annyiban módosítottuk, hogy a végső Concanavalin A-agaróz kromatográfiás lépést elhagytuk. A tisztított enzim frakció aktivitás mintegy négyszázszorosa volt a kiinduláshoz használt durva homogenátuménak. A frakció tisztaságát SDS-gélelektroforézissel igazoltuk.

Immunizálások:

Savas foszfatáz antiszérum előállítása: a tisztított fehérjét 1 mg/ml koncentrációban tartalmazó Na-acetát puffert 1.1 arányban összekevertünk komplett Freund adjuvánssal, majd ebből a keverékből 1-1ml-t nyulak bőrébe injektáltunk. Ezt követően 10 naponként, összesen 3 alkalommal hasonló arányú, de inkomplett adjuvánssal készített keverékkel emlékeztető oltásokat adtunk az állatoknak. Az utolsó oltást követő 10. napon kb. 10 ml vért vettünk le a nyulakból, amit 30 perces ülepítés után 3000 rpm-mel, 10 percen át 4°C-on centrifugáltunk. A szérumot tartalmazó felülúszót jéghideg ammónium szulfát oldattal 70%-ig telítettük, aminek következtében az immunglobulinok kicsapódtak. A csapadékot enyhe centrifugálással (5000 rpm, 10 percig, 4°C-on) összegyűjtöttük, majd 0,4%-os NaCl oldatban feloldottuk, végül egy éjszakán keresztül ugyanilyen oldattal szemben dializáltuk. A dializátumot Sephadex G-25 oszlopon kromatografáltuk, hogy eliminájuk annak endogén savas foszfatáz tartalmát. A tisztított antiszérumot 300 µl-es egységekben, -20°C-on tároltuk.

ELISA:

A zsírtest- és hemolimfa minták savas foszfatáz tartalmának meghatározását ELISA módszerrel *(Engvall and Perlmann, 1972; Butler és mtsai, 1978)* végeztük. A savas foszfatáz antiszérumot 1:500-szoros, a második antitestet (horseradish peroxidase–labelled anti-rabbit antibody) pedig 1:300-as hígításban használtuk.

SDS-gélelektroforézis és Western Blot:

A minta készítéséhez a kipreparált szövetet vagy a teljes állatot 1x SDS futtató pufferben elhomogenizáltuk, amely 2mM Complete Proteinase Inhibitor Cocktail (Roche) tartalmazott. A homogenátumot egy percen keresztül forraltuk, majd 2 percen át centrifugáltuk (12000 rpm, 4°C), majd a felülúszót legyűjtöttük és -20°C-on tároltuk.

A gélelektroforézishez 10- vagy 12%-os denaturáló szeparációs gélek használtunk, amelyeket Laemmli (1970) leírása szerint készítettünk el. A gélek blottolását Bio-Rad Miniblot nedves blotkamrában végeztük el, Towbin és mtsai (1979) metódusa szerint. A membránokat ezután 5% tejport tartalmazó TBS pufferben blokkoltuk egy órán keresztül, majd 3 x 5 percig mostuk TTBS pufferrel. Az első antiszérumot 1:750 ill. 1:1000 hígításban 3% tejport tartalmazó TTBS pufferben használtuk, ezzel egész éjjelen át inkubáltuk a membránt lengőasztalon, 4°C-on. Az újabb 3 x 5 perces mosást követően a második antitestet (Amersham anti-nyúl vagy anti-egér alkalikus foszfatázzal jelölt antitest) szintén 3% tejport tartalmazó TTBS-ben tettük rá a membránra. Egy órás, szobahőmérsékleten, folyamatos mozgatás mellett történt inkubálás után a membránt ismét háromszor mostuk, majd BCIP/NBT szubsztrátot használva előhívtuk.

Immunhisztokémia:

A *Neobellieria bullata* lárvákat és bábokat frissen készített Bouin oldattal 2 órán át fixáltuk. A rögzített állatokból készített blokkokat 80%-os alkohollal mostuk, majd dehidráltuk és paraplasztba ágyaztuk. Az 5 μm vastagságú metszeteket TBS pufferben (TRIS buffered saline, 0.15 M TRIS, 0.5 M NaCl, pH 7.5) rehidráltuk, majd 5% Carnation tejport tartalmazó TBS-ben inkubáltuk egy órán át szobahőmérsékleten, hogy blokkoljuk az aspecifikus kötőhelyeket. Ezt követően a metszeteket háromszor 5 percen át mostuk TTBS pufferrel (5% Tween 20 detergenst tartalmazó TBS puffer), majd az első antiszérumot TTBS pufferben, 1:1000 hígításban rátettük a metszetekre. Egész éjjelen át tartó, 4°C-on végzett inkubálás után a metszeteket ismét háromszor 5 percen át mostuk TTBS pufferrel, majd ezt követően a második antitestet 1:500-as, TTBS-ben történt hígításban rátettük a metszetekre. Egy órán át szobahőmérsékleten végzett inkubálás után ismét TTBS-sel mostuk a metszeteket, majd Sigma Fast Red TR/Naphthol ASMX kitből készített szubsztráttal elvégeztük a reakciót. A leállítást követően a metszeteket 10% PBS-t (Phasphate buffered saline, pH:7,4) tartalmazó glicerinnel fedtük le.

Drosophila lárvák zsírtestét kiboncoltuk, majd 2%-os, PBS-ben oldott paraformaldehidben 15 percen át szobahőmérsékleten fixáltuk őket. Ezután a 2 x 5 percig PBS pufferrel mostuk, majd 20 percen át 0,1% Triton X-100 detergenst tartalmazó PBS-ben tártuk fel a szövetdarabkákat. A preparátumot 5% Carnation tejport tartalmazó PBS-ben inkubáltuk egy órán át szobahőmérsékleten, így blokkoltuk az aspecifikus kötőhelyeket. Ezt követően a lebenyeket háromszor 5 percen át mostuk TPBS pufferrel (5% Tween 20 detergenst tartalmazó PBS puffer), majd az első antiszérumot TPBS pufferben, 1:100 hígításban rátettük a szövetmintákra. Éjszakán át

tartó, 4°C-on végzett inkubálás után a preparátumot ismét háromszor 5 percen át mostuk TPBS pufferrel, majd ezt követően a második antitestet (anti-nyúl Cy3, vagy anti-egér Alexa 488) (Sigma illetve Molecular Probes termékek) 1:500-as, PBS-ben történt hígításban alkalmaztuk. Egy órán át szobahőmérsékleten végzett inkubálás után ismét PBS-sel mostuk a metszeteket, majd magfestés céljából 1 μg/ml DAPI-t tartalmazó PBS-ben inkubáltuk azokat. Az ismételt PBS pufferrel történő mosást követően a preparátumot 20% PBS-t tartalmazó glicerinnel fedtük le, és Olympus BX-51 fluoreszcens mikroszkóppal, vagy Olympus IX-81 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

Az autofág struktúrák kimutatása fluoreszcens festésekkel:

A mutánsparkok teszteléséhez, valamint a kísérletek során a savas beltartalmú struktúrák (elsősorban autolizoszómák) kimutatásához akridin oranzs, illetve LysoTracker Red festékeket használtunk. A zsírtestet egy PBS-csepp alatt kiboncoltuk a lárvákból, majd 5 percen keresztül, szintén PBS-ben oldott 5 mg/ml akridin oranzs, vagy 100 μM koncentrációjú LysoTracker Red DND 99 (Molecular Probes) oldatban inkubáltuk őket, amely magfestés céljából 1 μg/ml DAPI-t (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Sigma) is tartalmazott. Ezt követően a zsírtest lebenyeket tárgylemezekre helyeztük, majd 20% PBS-t tartalmazó glicerinben fedtük le azokat. A vizsgálatokat Olympus BX-51 fluoreszcens mikroszkóppal végeztük, a fényképeket pedig Fluo View programmal készítettük.

Elektronmikroszkópos vizsgálatok

A zsírtest lebenyeket finoman kiemeltük a lárvák testüregéből, majd 2 órás időtartamra 1% glutáraldehidet tartalmazó, 0,1 M kakodilát-HCl-oldatba (pH: 7,4) tettük őket. Ezt követően a szövetmintákat tiszta kakodilát pufferben mostuk, majd 2% ozmium-tetroxidot tartalmazó kakodilát oldatban utórögzítést végeztünk. A beágyazás Araldítba történt, és az ultravékony metszeteket Jeol CM II-100 transzmisszios elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

Amennyiben félvékony metszeteket is készítettünk az Araldítba ágyazott mintákból, úgy azokat toluidin kék – azúrII festékkeverékkel festettük meg.

P-elem remobilizálás (revertáns állatok előállítása):

A harmadik kromoszómán ülő P-elemet balanszer kromoszómával szemben hordozó vonalat (P-elem / TM6 Tb) bekereszteztük a TM3, Ser, delta2-3/Dr, delta2-3 törzzsel. Az F1 generációból kiválogattuk a P-elem / TM3, Ser, delta2-3 hímeket és ezeket egyedileg

összekereszteztük az eredeti P-elemes vonal nőstényeivel. Az utódok közül kiválogattuk a Tb és Ser markereket nem hordozó, piros szemű egyedeket, amelyek a tovább ugrasztott P-elemmel rendelkeznek, majd ezeket törzsbe állítottuk.

Inverz PCR:

A *P{lacW}* transzpozon inzerciós helyének meghatározására genomi DNS preparátumon végzett inverz PCR reakciót a http://www.fruitfly.org/about/methods/inverse.pcr.html weboldalon leírtak szerint végeztük.

Reverz transzkriptáz PCR (RT-PCR):

A harmadik stádiumú lárvákból a teljes RNS mennyiséget kivontuk a RevertAid Total RNA Isolation Kit (Fermentas) segítségével, majd a First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) felhasználásával reverz transzkripciót végeztünk.

Az *snf4aγ* esetén a PCR reakcióhoz a következő primerpárokat használtuk:

5'-CTTCTTCTTGAGTGCGCGGT-3' és 5'-GTCTTGTTTTTGCCGCTTGG-3' (SNF4Aγ-RG)

5'-CTGGCGCTCGCTAAACTCTT-3' and 5'-GTCTTGTTTTTGCCGCTTGG-3' (SNF4Aγ-RL)

5'-ACGGGCAGACGACACAAAAT-3' and 5'-AAGACAACCAACTTGGCGGA-3' (SNF4Aγ-RI)

A belső kontrollként használt aktin mRNS felsokszorozásához a következő primerpárt alkalmaztuk:

5'-GTCGCTTAGCTCAGCCTCG-3' and 5'-TAACCCTCGTAGATGGGCAC-3' (Actin5C).

Fél-kvantitatív PCR vizsgálatok:

A w^{1117} (kontroll) és az *lqfS011027* lárvákból teljes mennyiségű RNS-t izoláltunk QIAeasy RNA isolation kit (Qiagen) segítségével. A preparátum RNáz-mentes DNáz enzimmel való kezelése után RevertAid kit (Fermentas) felhasználásával reverz transzkripciót végeztünk. A felsokszorozáshoz az alábbi primereket használtuk:

5' GGCAAAGGAAAGATTCGCCC 3' és 5' CCATGCCAGGTCCAAGAGCT 3'.

Belső kontrollként a Drosophila Act5 specifikus primereket használtuk. Az RT-PCR reakciót 28 ciklus után állítottuk le, majd a termékeket 1%-os agaróz gélen futtattuk meg, amelyet SybrSafe festékkel (Invitrogen) festettünk tettünk láthatóvá.

A rekombináns fehérjék előállítása:

A Draut1 rekombináns fehérje létrehozásához szükséges DNS szekvenciát a következő primerekkel sokszoroztuk fel *Drosophila* genomi DNS-ből:
5'CATATGCAGAGTGTTCTCAACACCG3' és 5'CTCGAGAGACATGTTGAAGTTTTGC3'. A PCR terméket TA klónozással expressziós vektorba helyeztük, amellyel BL21 sejteket transzformáltunk. A fehérjét tartalmazó zárványtesteket (inclusion bodies) ultracentrifugálással szeparáltuk, majd SDS gélelektroforézissel tisztítottuk. A tiszta, denaturált fehérjével CB57black egereket immunizáltunk.

Az *snf4aγ* esetében a gén 9. exonját sokszoroztuk fel a következő primerek segítségével:
GAGGTCGGCTGACCCGCAGG 3' és 5'GGGGAATCTAGATTAACTAATTATTCG 3', majd a PCR terméket közvetlenül a pQE-UA bakteriális expressziós vektorba (Qiagen) illesztettük be. A vektorral transzformált M15 *E. coli* baktériumok a fehérjét már úgy expresszálják, hogy annak N terminálisán egy hat hisztidinből álló szakasz jelenik meg. Az így megjelölt fehérje tisztításához QIA expressionist kit-et (Qiagen) használtunk. A preparátum tisztaságát SDS gélelektroforézissel ellenőriztük, majd a tiszta fehérjével nyulakat immunizáltunk.

Az *lqf* gén vizsgálatakor a kódoló szekvencia 5. exonját sokszoroztuk fel a következő primerpár felhasználásával:
5'GGATCCCCAAAACTTCCGCCTCCCGT3' és 5'CTGCAGTTCCAGCTTGCAGTTGGCCG3'. Az ezt követő lépések pontosan megegyeztek az Snf4aγ rekombináns fehérje előállításánál leírtakkal. A tisztított fehérjével egereket immunizáltunk.

Az RNS-interferencia konstrukt elkészítése:

A Draut1 klónozásához szükséges szekvenciát a bloomingtoni Drosophila Genomics Resource Centerből megkapott, GH28859 EST-ből (expressed sequence tag) a következő primerpárral sokszoroztuk fel:
5' CATATGCAGAGTGTTCTCAACACCG 3' és 5' CTCGAGAGACATGTTGAAGTTTTGC GTA 3', majd a kapott PCR terméket TA klónozással egy pBLTA vektorba illesztettük be. Innen NdeI és XhoI enzimpárral kivágtuk, és egy, az ugyanezekkel az enzimekkel meghasított pET21 vektorba illesztettük bele (pET21Draut1). Következő lépésként a GH28859 EST-ből EcoRI-XhoI enzimpár segítségével kivettük a transzlációs start kodont már nem tartalmazó szekvenciát, és azt egy pUAST vektorba klónoztuk (pUASTDraut1). A pET21Draut1 vektorból XhoI-XbaI enzimekkel kihasítottuk a korábban beillesztett szekvenciát, majd fordított orientációban beligáltuk

az ugyanezen enzimekkel megemésztett pUAT Draut1 vektorba. Ellenőrzés után a kész vektorral w^{1117} legyektől származó petéket transzformáltunk, a Rubin és Spradling (1982) által kifejlesztett metodikával.

SNF4Aγ-RNAi: A gén valamennyi splice-variánsában meglévő, a 3' véghez közel elhelyezkedő 0,7 kb méretű szakaszt a következő primerek:
5'AATCTCGCCGCCGAGAAA3' és 5'GTCAGTGACTGGCCCAAA3' segítségével úgy tudtuk felsokszorozni, hogy a termék végein BglII illetve XhoI hasítóhely legyen. A PCR reakcióhoz ExTaq DNS polymerázt (Takara) PCR használtunk. A kapott terméket Topo TA PCR Cloning vektorba (Invitrogen) szubklónoztuk, majd átvittük egy módosított pUAST vektorba (pWizMod), amely már alkalmas a kettős szálú RNS (dsRNA) előállítására (GenBank accession number AB186054; *Kurucz és mtsai, 2007*). Ez két lépésben történt: először a fragmentet beillesztettük a pWizMod vektor BglLL-XhoI helyére, majd ezt követően ugyanezt a szekvenciát KpnI-XbaI enzimpárral kivágtuk a Topo TA vektorból, és az előbbihez képest fordított orientációban beraktuk az első fragmentet már tartalmazó pWizMod vektorba. A konstrukciókat mikroinjektálással juttattuk be a w^{1117} vonal 2-3 órás petéibe, a Rubin és Spradling (1982) által leírt eljárás szerint.

Lqf-RNAi konstrukció előállításához a gén 5. exonjának egy 605 bp hosszúságú szakaszát választottuk ki, amelyet a következő primerekkel sokszoroztunk fel közvetlenül a genomi DNS-ből: 5'GGATCCAGCGAGATAGCGGAACTCACC3' és 5'CTCGAGTCACTTGAAATCCTGCT CACT C3'. Ezt követően pontosan úgy jártunk el, mint az SNF4Aγ-RNAi konstrukt és transzgén vonal létrehozásakor.

RNAi expresszió:

A megfelelő hatásfokú RNS csendesítés eléréséhez olyan Gal4 forrást hordozó legyekkel kereszteztük be az RNAi konstrukciót tartalmazó vonalak egyedeit, amelyek a dicer2 enzim overexpressziójára is képesek. Ezeket a vonalakat (*DCR2; hsGal4)* William Ja bocsátotta a rendelkezésünkre.

Az SNF4Aγ-RG menekítő konstrukt előállítása:

Az *snf4aγ-RG* transzkriptumot tartalmazó szekvenciát a bloomingtoni Drosophila Genomics Resource Centerből megkapott, LD30628 számú, a gén teljes hosszúságú cDNS szakaszát tartalmazó plazmidból vágtuk ki, EcoRI-XhoI enzimpár segítségével. Az így kapott DNS

szakaszt pUAST Drosophila transzformációs vektorba illesztettük be, amelyet tisztítás után transzformálásra használtunk.

A GFP-Lqf konstrukt létrehozása:

A GFP-t tartalmazó szekvenciát a pRSET/EmGFP (Invitrogen) plazmidból sokszoroztuk fel egy olyan primerpárral, amelynek tagjai a megfelelő végükön tartalmazták a BamHI, illetve a BglII hasítóhelyeket:
5'ATTGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAG3' és 5'CTTAGACTCCTTGTACAGCTCGTC CAT3'. Ezt követően a fragmentet - a helyes leolvasási keretet megtartva - beklónoztuk egy BglII-vel megemésztett pUAST vektor multiklónozó helye elé. Következő lépésként az *lqf* gén teljes hosszúságú cDNS-ét tartalmazó pOT2 vektorból (Berkeley Drosophila Genome Project, BDGP) felsokszoroztuk az *lqf* szekvenciáját olyan primerekkel, amelyek szintén ki voltak egészítve a BglII, illetve a XhoI hasítóhelyekkel:
5'AGATCTATGGATCCGGTATCGGCGAAC3' és 5'CTCGAGCGACAAAAACGGATTTGT TGC3'. Utolsó lépésként ezeket a fragmenteket BglII-vel és XhoI-gyel megemésztettük, majd frame-ben beillesztettük a GFP-t már tartalmazó pUAST vektorba, amelyet mikroinjektálással juttattuk be a w^{1117} vonal 2-3 órás petéibe, Rubin és Spradling (1982) által leírt eljárásnak megfelelően.

Transzgén Drosophila vonalak előállítása és használata:

Az endotoxinoktól mentesített (endotoxin free) konstrukciókat mikroinjektálással juttattuk be a w^{1117} vonal 2-3 órás petéibe, Rubin és Spradling (1982) által leírt eljárás szerint. A kifejeztetni szánt konstrukciók előtt a Gal4 transzkripciós faktor kötőhelyéül szolgáló 5 darab UAS (upstream activating sequence) helyezkedett el. Amennyiben az ezeket a konstrukciókat hordozó vonalakat a megfelelő promóter mögött ülő Gal4-et kifejező törzzsel kereszteztük be, akkor az utódnemzedék egy része mind a transzkripciós faktort, mind az ezt fogadni képes konstrukciót is tartalmazta. Amennyiben az adott szövetspecifikus expressziót csupán meghatározott fejlődési időszakban akartuk megengedni, akkor további keresztezésekkel a Gal4 forrás és UAS-t hordozó konstrukciót mellé még egy tubulin promóter mögé helyezett $Gal80^{ts}$ fehérjét kódoló szekvenciát is be kellett juttatnunk az állatokba. Ebben az esetben a Gal4 csak akkor tudta kifejteni fenotípust okozó expressziós hatását a konstrukcióra, amennyiben az addig 18°C-on tartott kísérleti állatokat a 48 órán át 32°C-on tartottuk.

A mitotikus klónok előállítása és vizsgálata:

A Th. Neufeld laboratóriumából kapott, *hsFlp; cgGal4, UAS-GFP, FRT80B* genotípusú vonalból szüzeket gyűjtöttünk, amelyeket a J. Fischer által elküldött *lqfL71FRT80B/TM6b* genotípusú hímekkel kereszteztünk össze. A frissen lerakott, 8 óránál nem idősebb petéket 30 percre 32°C-os hősokk hatásnak tettük ki. Ezt követően az embriók és a lárvák normál táptalajon, 25°C-on növekedtek 95-100 órás korukig. Mivel a lárvák zsírtestében lévő, GFP-t expresszáló klónok megfelelő gerjesztő fényben a kültakaró keresztül is felismerhetők, a 488 nm hullámhosszú fényt kibocsátó LED segítségével a klónokat tartalmazó lárvákat kiválogattuk, majd 4 órán át tartó aminosav-megvonás után felboncoltuk őket. A LysoTracker Reddel megfestett zsírtest-sejteket Olympus BX-51 fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

4. Eredmények

Az autofág folyamatának és szabályozásának vizsgálata

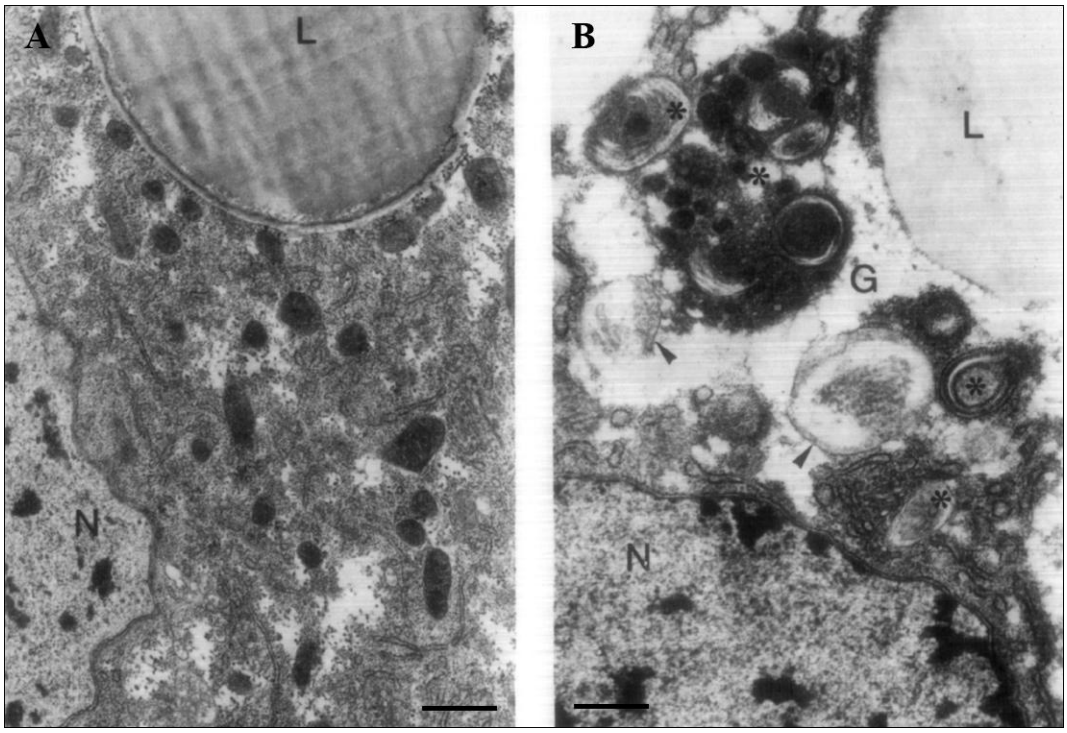
Tanszékünkön több, mint három évtizede kezdődött el az autofág folyamatok rovarszervezeteken történő vizsgálata, amely azóta is laboratóriumunk kutatási profiljának meghatározó eleme. A kezdeti időszakban elsősorban hazai Lepidopterák (*Pieris brassicae* és *Mamestra brassicae*) voltak a kísérleti alanyaink, a későbbiekben a Dipterák közül először a *Neobelleria bullata*, majd végezetül a *Drosophila melanogaster* lett az autofágiával kapcsolatos vizsgálataink kísérleti objektuma. Ezekkel a váltásokkal párhuzamosan bővült a kutatási repertoár a különféle kezelésekkel kiegészített morfológiai vizsgálatoktól kezdve az enzimaktivitás-meghatározásokon keresztül az immunbiológiai eljárásokon át a modern molekuláris-genetikai módszerek használatáig.

4.1. Az auto- és heterofág folyamatok szabályozásának vizsgálata

4.1.1. A cAMP szint változása az utolsó lárvastádium során a *Mamestra brassicae* zsírtestében jól korrelál a 20-hidroxiekdizon által kiváltott autofág folyamatokkal.

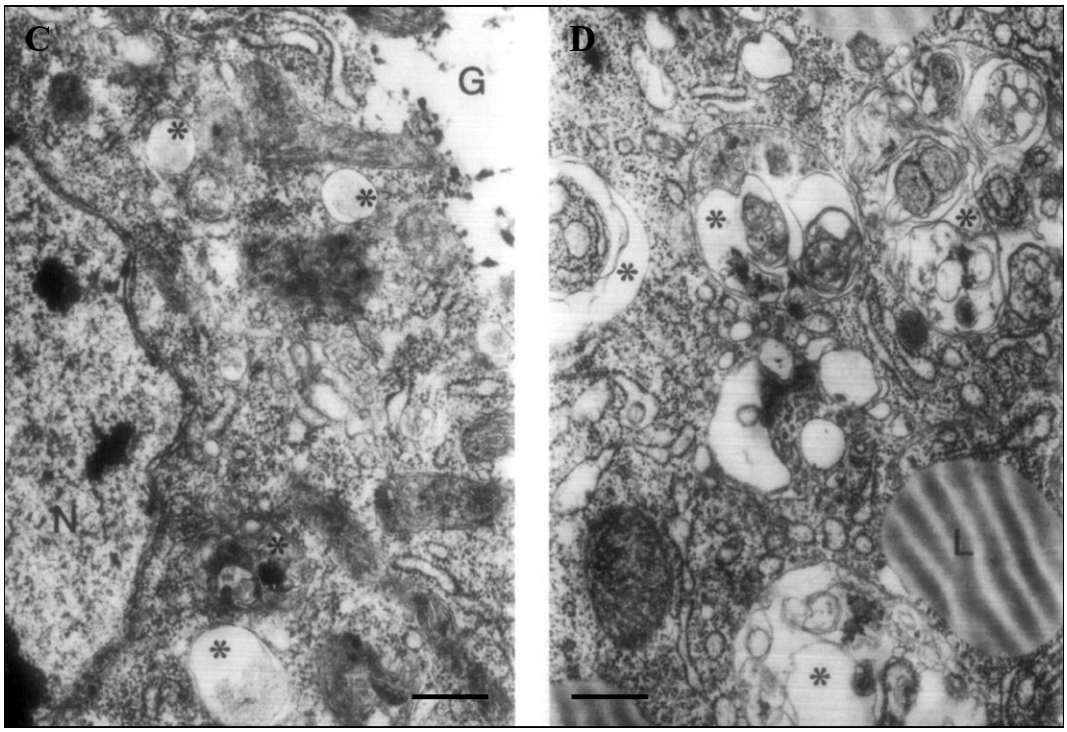
Korai vizsgálati eredményeink közül mindenképpen említésre méltó az a kísérletsorozat, amelyben elsőként igazoltuk, hogy a metamorfózisra készülő Lepidoptera lárvák zsírtestében tömegesen jelentkező fiziológiás autofágiát a szöveti ciklikus adenozin-monofoszfát (cAMP) szintemelkedése kíséri.

A káposzta-bagolylepke (*Mamestra brassicae*) hernyójának zsírtestében az utolsó lárvastádium első, táplálkozó időszakában nem találunk autofágiára utaló struktúrákat (1. ábra, A kép). Ezzel szemben az utolsó lárvastádium második, vándorló periódusának vége felé a zsírtest-sejtek nagyszámú autofág vakuólumot (autofagoszómát) tartalmaztak (1. ábra, B kép).



1. ábra. Az utolsó lárvastádium során a *Mamestra brassicae* hernyóinak zsírteste drámai változásokon megy keresztül: a kezdetben normális szerkezetű trofociták a stádium végére erőteljes autofagocitózist mutatnak. N: sejtmag, L: zsírcsepp, G: raktározott glikogén, *: autofág vakuólumok, nyílhegyek: multivezikuláris testek. Méretjel: 1 μm.

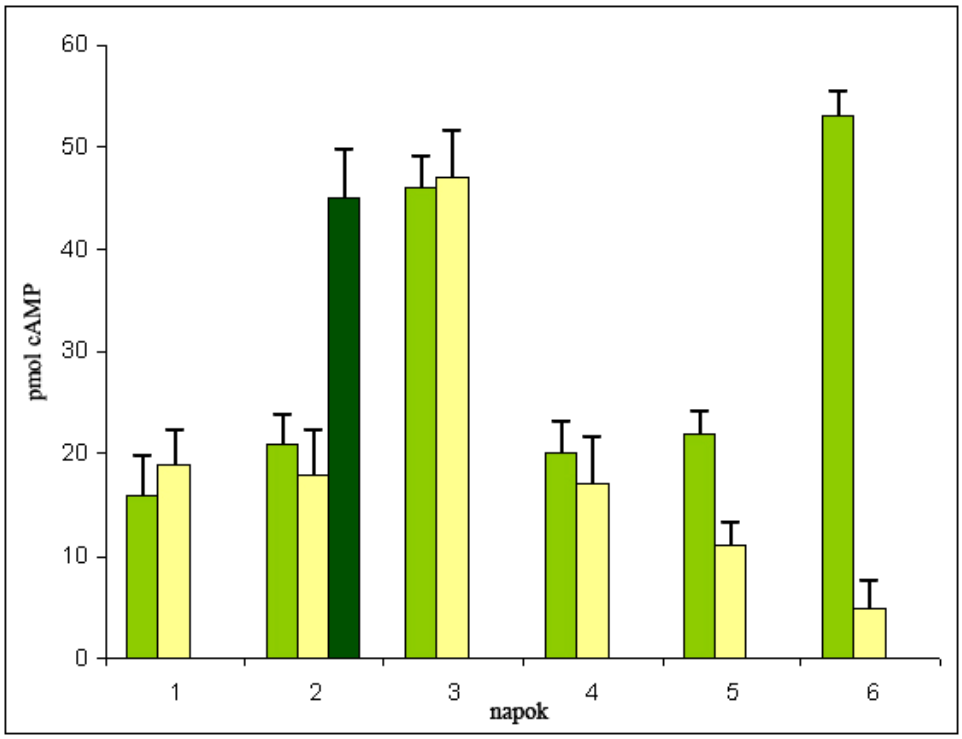
Amennyiben a még táplálkozó hernyókat a sejtmembránon áthatolni képes dibutiril-cAMP-vel, vagy pedig az endogén cAMP-t lebontó foszfodiészterázokat gátló teofillinnel kezeltük, abban az esetben az autofágia ebben a szövetben a fiziológiás időpontnál korábban is kiváltható volt (2. ábra, C és D képek).



2. ábra. A fiziológiásan autofágiát nem mutató trofocitákban db-cAMP- (C kép), valamint teofillin (D kép) kezeléssel autofág struktúrák megjelenése indukálható. N: sejtmag, L: zsírcsepp, G: raktározott glikogén, *: autofág vakuólumok. Méretjel: 1 μm.

A Holometabola rovarokban a fiziológiásan megjelenő autofágia elsődleges induktora a vedlési hormon (20-hidroxiekdizon, 20-HE) szintjének megemelkedése. CPBA (Competitive protein binding assay) módszer segítségével meghatározva az endogén cAMP szintjének változását, kimutattuk, hogy az jól illeszkedett az utolsó lárvastádium idején tapasztalható vedlési hormon (20-hidroxiekdizon) titerének alakulásához. A fiziológiás autofágia megjelenése előtt egy nappal 20-HE kezeléssel indukált autofág folyamat a trofociták cAMP tartalmának jelentős megemelkedésével járt együtt. A hormonkezelés után mért cAMP szint feltűnő egyezést mutatott azzal az értékkel, amelyet a fiziológiás autofágia megindulásának idején mértünk (3. ábra). Az egyes mérési eredményekből származó cAMP-értékeket kétféle vonatkoztatási alaphoz viszonyítottuk: a frissen kipreparált zsírtest 1 mg-jára, illetve a benne található fehérje 1 mg-jára. Mivel a zsírtest-sejtek az utolsó stádium második felében igen jelentő mennyiségű lárvális szérum fehérjét vesznek fel a hemolimfából, ezért fehérjetartalmuk exponenciálisan növekszik. Emiatt viszonyítási alapként csak igen korlátozottan lehet használni. Mivel a trofociták a fehérjékkel párhuzamosan jelentős mennyiségű lipidet és glikogént is felhalmoznak, ezért a nedves szöveti

súly változása a linearishoz közelít. Erre viszonyítva a mérési adatainkat tapasztaltuk azt, hogy a vedlési hormon és a cAMP szint alakulása egyezést mutat az utolsó lárvastádium során.



3. ábra. Az endogen cAMP szint változása a Mamestra brassicea zsírtestében, az utolsó lárvastádium 6 napja alatt. A zöld színű oszlopok a friss szövet 1 milligramjára, míg a sárga oszlopok a szövetben lévő 1 mg fehérjére vonatkoztatott cAMP mennyiséget mutatják. A sötétzöld színnel jelölt oszlop a 20-HE kezelést követően mért cAMP mennyiségét jelzi, 1 mg friss szöveti súlyra vonatkoztatva.

A két folyamat közötti közvetlen ok-okozati összefüggést nem lehetett igazolni, annak ellenére, hogy a vizsgált Holometabola rovarok lárvális szerveinek lebontását végző autofág folyamatok beindítását a vedlési hormon titerének megemelkedése okozza *(Sass és Kovács, 1975; 1977, Dai és Gilbert, 1999; Lee és Baehrecke, 2001; Lee és mtsai 2002; Rusten és mtsai, 2004).* Mivel a cikk megjelenése idején az autofágia molekuláris mechanizmusáról még semmilyen adat nem állt rendelkezésre, csak jóval később, mintegy másfél évtized múlva jelentek meg azok a beszámolók, amelyek igazolták, hogy az intracelluláris cAMP szint megemelkedése szükséges a folyamat korai, membránszerveződéssel és –átrendeződéssel járó lépéseinek szabályozásában

(Holen és mtsai, 1996; Budovskaya és mtsai, 2004; Kimura és mtsai, 2004; Ugland és mtsai, 2011).

4.1.2. A savas foszfatáz tartalom és aktivitás alakulása a *Neobellieria bullata* lárválís zsírtestében és hemolimfájában.

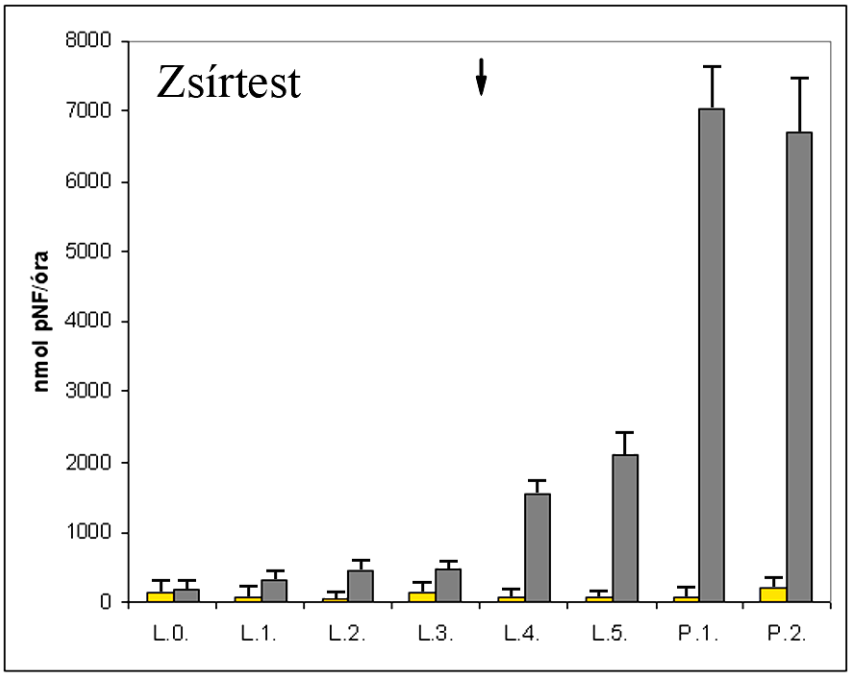
A sejtek önemésztésének valódi végrehajtói a lizoszómális enzimek, *(Deter és mtsai, 1967; Ericsson, 1969; Locke és Sykes, 1975; Dean, 1977; Glaumann és mtsai, 1981; Sass és mtsai, 1989).* Azokban a szövetekben – ilyen például a máj - , ahol az autofágia a sejtek normális működésének részét képezi és nem vezet azok pusztulásához, a lizoszómális enzimek keletkezése és aktivitása egyenes arányban áll az autofág folyamatok intenzitásával *(Deter és mtsai, 1967; Sanghavi és Koenig, 1976; Lawrence és Brown, 1993).* Azokban a szövetekben azonban, ahol az autofágia a sejtek végleges lebontásának eszköze – ilyen például a lárválís zsírtest – a folyamat fokozatosan bővülő primer lizoszóma- ill. lizoszómális enzim igényét a sejt az egyre fogyatkozó citoplazmája és sejtorganellumai miatt egy idő után már nem tudja fedezni. A probléma feloldása lehet egy olyan - sejten belüli vagy kívüli – lerakat (depo), ahol az enzimek inaktív formában raktározhatók, és onnan szükség szerint felvehetők, vagy felszabadíthatók.

A Holometabola rovarok a bábállapot során a leendő felnőtt állat képződő szöveteinek és szerveinek aminosav igényét különleges úton, a kizárólag erre a célra készített raktározó fehérjék lebontásából fedezi *(Levenbook és Bauer, 1984).* Ezeket a proteineket az utolsó lárvastádium során a zsírtest sejtjei - a trofociták - szintetizálják, majd a hemolimfába szekretálják. A szintézis és a szekréció volumenére jellemző, hogy a stádium vége felé ezek a fehérjék lesznek a hemolimfa meghatározó fehérjéi, és ennek alapján kapták nevüket is: lárválís szérum proteinek (LSP-k). Ezeket a trofociták a metamorfózis kezdet előtt receptor mediált endocitózissal visszaveszik a hemolimfából és a felhasználásig protein granulumok formájában tárolják *(Locke és Collins, 1966; 1968; Lepesant és mtsai, 1982; Levenbook és Bauer, 1984; Schenkel és Scheller, 1986; Burmester és Scheller, 1992).*

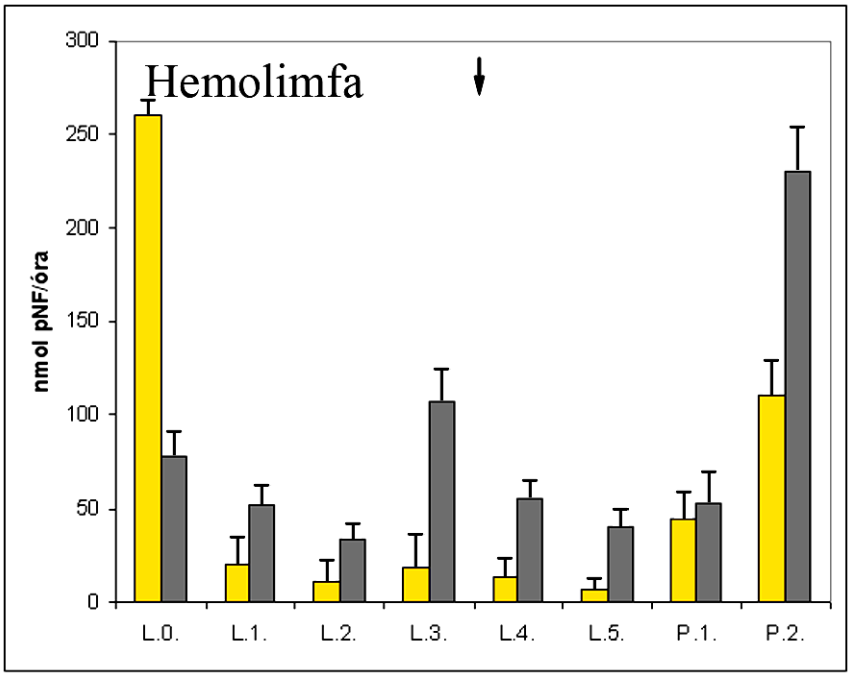
Mivel tehát az utolsó lárvastádium idején a hemolimfa egy átmeneti fehérjeraktárként is funkcionál, ez felvetette annak lehetőségét, hogy nem csak a LSP-k, hanem – inaktív formában – a lizoszómális enzimek is tárolódhatnak ebben a speciális szövetben.

Erre a lehetőségre utal közvetetten a savas foszfatáz enzim aktivitásának alakulása a zsírtestben és a hemolimfában az utolsó lárvastádium során és a bábállapot első napjaiban is. A zsírtest szövetében az enzim specifikus aktivitása (nmol pNF/óra/mg fehérje) gyakorlatilag nem

mutat jelentős változást, ugyanakkor a teljes aktivitás (nmol pNF/óra/szerv) bábállapot elején ugrásszerűen, több mint huszonötszörösére növekszik (4. ábra), annak ellenére, hogy a vándorlási periódus kezdetétől a már egyre fokozódó autofág folyamatok mindjobban beszűkítik a sejtek fehérjeszintézis-kapacitását. A hemolimfában mérhető enzimakivitás egy nagyságrenddel kisebb, mint a zsírtestben található, és azzal összevetve nem mutat jelentős változást (5. ábra).

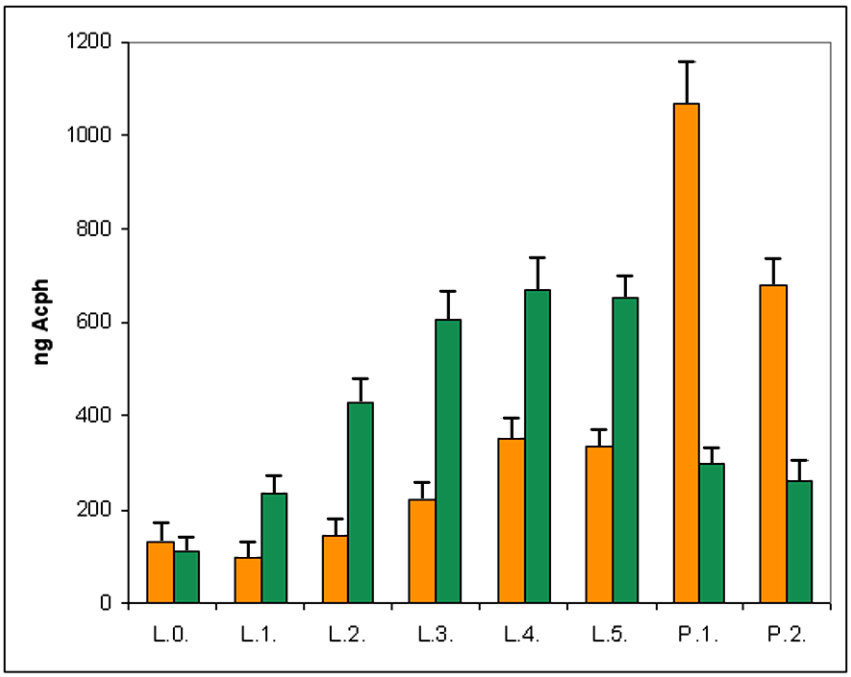


4. ábra. A savas foszfatáz enzim aktivitásának alakulása a zsírtestben az utolsó lárvastádium öt napján (L0 – L5) és a bábállapot első két napján (P1 és P2). A sárga színű oszlopok a specifikus- (nmol pNF/óra/mg fehérje), a szürkék pedig a teljes aktivitás-értékeket (nmol pNF/óra/szerv) mutatják. A nyíl a vándorlás kezdetét mutatja.



5. ábra. A savas foszfatáz enzim aktivitásának alakulása a hemolimfában az utolsó lárvastádium öt napja (L0 – L5) és a bábállapot első két napja (P1 és P2) során. A sárga színű oszlopok a specifikus- (nmol pNF/óra/mg fehérje), a szürkék pedig a teljes aktivitás-értékeket (nmol pNF/óra/szerv) mutatják. A nyíl a vándorlás kezdetét jelzi.

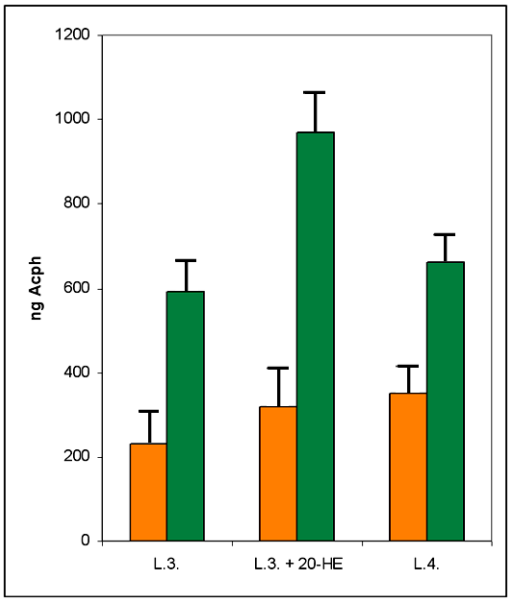
Hipotézisünk igazolására – mely szerint a trofociták a bennük megjelenő autofágiához szükséges enzimek egy részét is átmenetileg a hemolimfában tárolják - a kockás húslégyből (*Neobellieria bullata)* izoláltuk a para-nitrofenilfoszfát-foszfatáz (klasszikus nevén: savas foszfatáz) aktivitással rendelkező fehérjét, majd ennek segítségével poliklonális antiszérumot állítottunk elő. Az antiszérum specifitását Western blottal, illetve az emzimaktivitásra gyakorolt gátló hatásával igazoltuk. Ezt követően ELISA-val (Enzyme-linked immunosorbent assay) vizsgáltuk az enzimfehérje megoszlását a zsírtest és a hemolimfa között az utolsó lárvastádium folyamán és a bábállapot elején. Kimutattuk, hogy a kérdéses fehérje mennyisége a vizsgált időszakban fokozatosan növekedett mindkét szövetféleségben és egy maximum-értéket ért el a pupárium formálódása előtt. Ezután viszont egy igen erőteljes csökkenés volt tapasztalható a hemolimfa savas foszfatáz tartalmában, amivel párhuzamosan növekedett az enzimfehérje mennyisége a zsírtestben (6. ábra).



6. ábra. A para-nitrofenilfoszfát-foszfatáz aktivitást mutató fehérje megoszlása a zsírtest (sárga színű oszlopok) és a hemolimfa (zöld színnel jelölt oszlopok) között, az utolsó lárvastádium idején és a bábállapot első két napján.

Mindez egyértelműen arra utal, hogy a vizsgált rovar lárvák képesek nagymennyiségű lizoszómális enzimet inaktív formában felhalmozni a hemolimfájukban, majd onnan visszavéve azokat az auto- és heterofág folyamatokban felhasználni.

Az utolsó lárvastádium harmadik napján alkalmazott 20-hidroxiekdizon kezelés hatására a zsírtestben a para-nitrofenilfoszfát-foszfatáz aktivitással rendelkező fehérje mennyisége csak kismértékben emelkedett meg, viszont a hemolimfában jelentős mértékben megnövekedett ennek a fehérjének a jelenléte (7. ábra). Mindez arra engedett következtetni, hogy mind az enzimfehérje szintézise, mind szekvesztrációja a 20-HE kontrollja alatt áll.



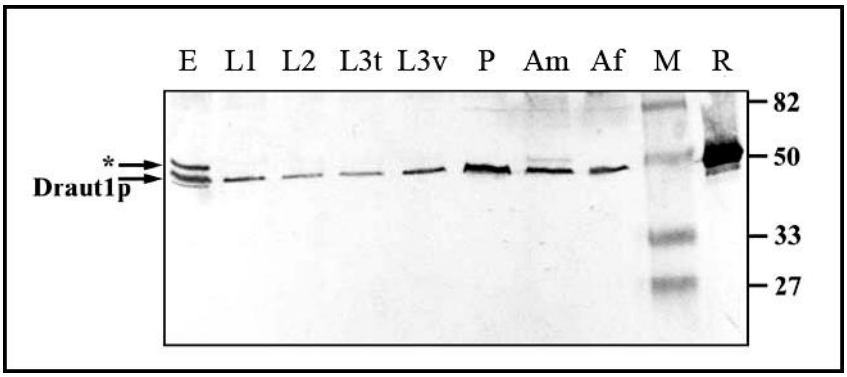
7. ábra. 20-HE kezelés hatására zsírtestben csak kismértékben emelkedett meg a para-nitrofenilfoszfát-foszfatáz aktivitással rendelkező fehérje mennyisége (sárga színnel jelölt oszlopok), ugyanakkor viszont a hemolimfában ennek a fehérjének a jelenléte nagymértékben megnövekedett (zöld színű oszlopok).

Kísérleteink eredményei alapján egy lehetséges, újszerű mechanizmus létezését bizonyítottuk, amely lehetővé teszi az aminosav-forrásként szolgáló fehérjék (az LSP-k) és a lebontásukhoz szükséges enzimek (pl. savas foszfatáz) párhuzamos szekrécióját, átmeneti tárolását és közel egyidejű visszavételét, majd aktivizálását.

4.1.3. Az *aut1* gén homológja Drosophilában nélkülözhetetlen az autofágiához és a posztembrionális fejlődéshez.

Az ezredforduló idejére már számos, az autofágiát irányító gént írtak le az élesztő vizsgálata alapján, ezek azonosítása azonban a magasabbrendű gerinctelenekben, így a

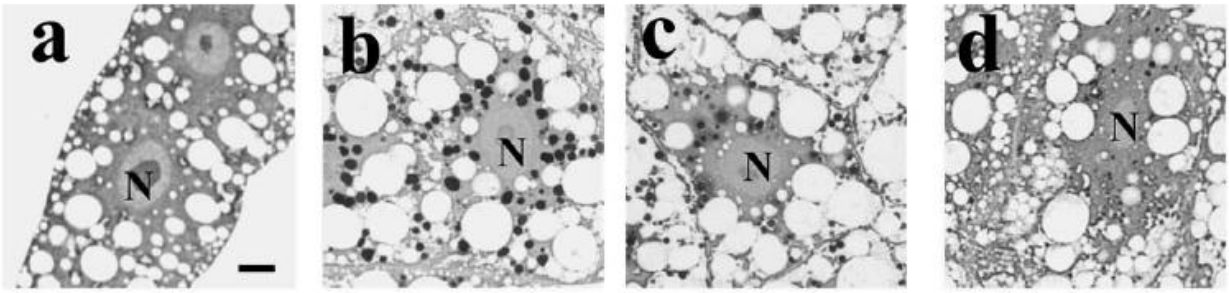
Drosophilában is még váratott magára. A mi laboratóriumunkból került ki az első, *in silico* analízisen alapuló közlemény, amelyik 14, az élesztőből ismert gén ortológjának meglétét mutatta ki a *Drosophila* genomban *(Juhász és mtsai, 2001).* Ennek alapján kezdtük el az élesztőben leírt *aut1* gén *(Schlumpberger és mtsai, 1997)* – a későbbi egységesített nomenklatúra szerint *atg3 (Klionsky és mtsai, 2003) – Drosophilában* meglévő ortológjának (*draut1*) vizsgálatát. A gén terméke ellen készített antiszérumot használva Western blottal kimutattuk, hogy a Draut1 fehérje, bár a fejlődés valamennyi fázisában jelen van, mennyisége jelentősen megnövekszik azokban az időszakokban, amikor az autofág folyamatok dominálnak, azaz a metamorfózist megelőző periódusban és a bábállapot elején (8. ábra).



8. ábra. A Draut1 fehérje relatív mennyiségének változása a Drosophila fejlődése során. E: embrió, L1 és L2: első- és második lárvastádium, L3t: harmadik lárvastádium táplálkozó időszak, L3v: harmadik lárvastádium vándorló periódus, P: báb, Am: felnőtt hím, Af: felnőtt nőstény, M: molekulatömeg marker, R: rekombináns Draut1 fehérje. A *-gal jelzett, csak az embrió- és a felnőtt hímekből származó mintákban jelen lévő fehérje valószínűleg a Draut1 módosulata.

A géncsendesítésre alkalmas, *daut1RNAi* konstrukciót több kópiában hordozó transzgén állatok előállításával lehetőségünk nyílt arra, hogy a *draut1* gén expresszióját tetszőleges időpontban megakadályozzuk. A géncsendesítés megvalósulását, azaz a Draut1 fehérje mennyiségének csökkenését Western blottal, ennek hatását a fiziológiás autofágiára pedig fény- és elektronmikroszkópos módszerekkel vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy a vad típusú lárvák zsírtest-sejtjei a táplálkozó periódusban egyáltalán nem tartalmaznak autofág vakuólumokat, viszont ezek nagy számban vannak jelen a késői vándorló stádiumban lévő lárvák trofocitáiban (9. ábra, a és b képek). A *draut1* gén csendesítésének mértékétől függően az autofág vakuólumok mennyisége

jelentősen lecsökkent, vagy pedig teljesen hiányoztak (9. ábra, c és d képek). Mindez igazolta az előzetes várakozásunkat, mely szerint a Draut1 fehérje nélkülözhetetlen az autofágia normális lefolyásához.



9. ábra. Drosophila zsírtestéből készült félvékony metszetek. a: A vad típusú táplálkozó lárva trofocitáiban nem találunk autofágiára utaló granulációt. b: Az ugyancsak vad típusú, vándorló lárvák zsírtest-sejtjeiben nagyszámú, denz autofág vakuólum jelenik meg. c és d képek: *draut1* gén csendesítésekor az autofág struktúrák mennyisége jelentősen lecsökkent, vagy pedig teljesen hiányoztak. Méretjel: 10 μm.

Amennyiben a géncsendesítést egy olyan deléciót hordozó – egyébként normális fejlődésű, vad fenotípust mutató – *Drosophila* törzsben végeztük, ahol csak egy működőképes *draut1* gén volt az állatokban, akkor a hatás 100%-s volt: az állatok képtelenek voltak a metamorfózisra, és az utolsó lárvastádium végén, vagy a bábállapot elején elpusztultak. Ennek alapján bizonyítottnak tekinthetjük, hogy a holometabola rovaroknál az autofágia nélkülözhetetlen része a metamorfózisnak és hogy az autofág folyamat kulcsfontosságú lépéseinek gátlása a posztembrionális fejlődés megakadályozásához és így a fejlődő szervezet elpusztulásához vezet.

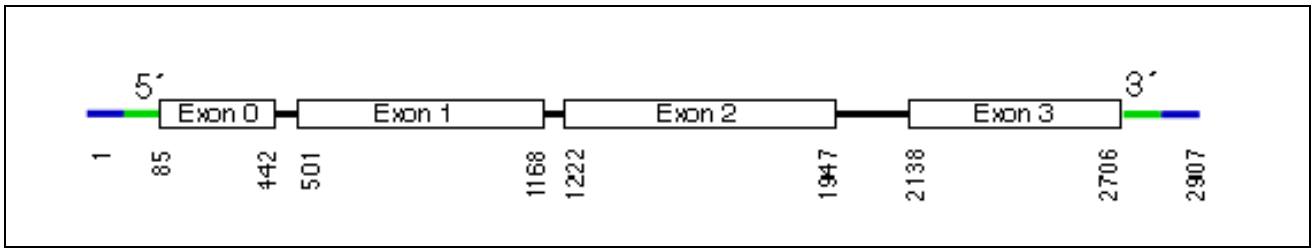
Élesztőben az aut1/atg3 gén terméke az utolsó tagja annak a konjugáló enzim-sorozatnak, amely az ubiquitin-szerű fehérjék családjába tartózó Atg8 fehérje aktiválásáért és foszfatidiletanolaminnal (PE) történő konjugálásáért felelős *(Kirisako és mtsai, 1999; Ichimura és mtsai, 2000; Tanida és mtsai, 2003)*. Amint a bevezetőben láttuk, az Atg8-PE nélkülözhetetlen a formálódó autofág vezikulum növekedéséhez és záródásához, funkcióképtelensége az autofágia defektusát okozza *(Abeliovich és mtsai; 2000 Ohsumi, 2001).*

4.2. Új, az auto- és heterofágiában szerepet játszó gének azonosítása

Korábbi eredményeinkre támaszkodva egy nagyobb volumenű vizsgálatot terveztünk, amelynek célja olyan gének megtalálása és azonosítása volt *Drosophilában*, amelyek autofágiában játszott szerepéről eddig nem volt tudomásunk. Ennek kivitelezésére ideális lehetőséget biztosítottak a magyarországi *Drosophila*-mutánsparkok: az akkor még működő Szeged Stock Center illetve Dr. Kiss István gyűjteménye. Mindkét kollekció P-elem beépüléssel előidézett funkcióvesztéses vonalakat tartalmazott.

2.2.1. A P-elem szerkezete és felhasználása molekuláris-genetikai kisérletekben

A *Drosophila melanogaster* többféle transzpozont is hordozhat a genomjában, ezek egyike a P-elem. Ez a mindössze 2907 bázispárból (bp) álló, két végén fordítottan ismétlődő (inverted repeated, IR) szekvenciákat hordozó mobil elem az általa kódolt transzpozáz enzim segítségével képes saját magát az IR szekvenciáknál kivágva a genom egyik pontjából a másikba áthelyezni *(O'Hare és Rubin, 1983)* (10. ábra).



10. ábra. A P-elem szerkezete. A kék színnel jelölt szakaszok a fordítottan ismétlődő (inverted repeated) szekvenciákat, jelölik, a zöld szinűek pedig a transzpozáz enzim felismerő helyeit mutatják. A négy exon a transzpozáz enzimet kódolja. O'Hare és Rubin nyomán (1983)

Ez az „ugrás” azonban csak a csíravonalban valósul meg, a differenciált szövetekben már nem, tehát egy generáció életében csak egyszer történhet meg ez a folyamat. Ha a transzpozázt kódoló szekvenciát a P-elemben elrontjuk, akkor a hibás enzim nem lesz képes kivágni és újra beilleszteni a transzpozont, tehát az mozgásképtelenné válik, és ettől kezdve generációk során át a genom ugyanazon pontján lesz megtalálható *(Robertson és mtsai, 1988)*. A transzpozázt kódoló gén módosításával párhuzamosan egy, a P-elem jelenlétének detektálására alkalmas szekvenciát

(ez általában a piros szemszínt meghatározó miniwhite$^+$ szekvencia) is beültetnek a transzpozonba *(Searles és mtsai, 1982)*.

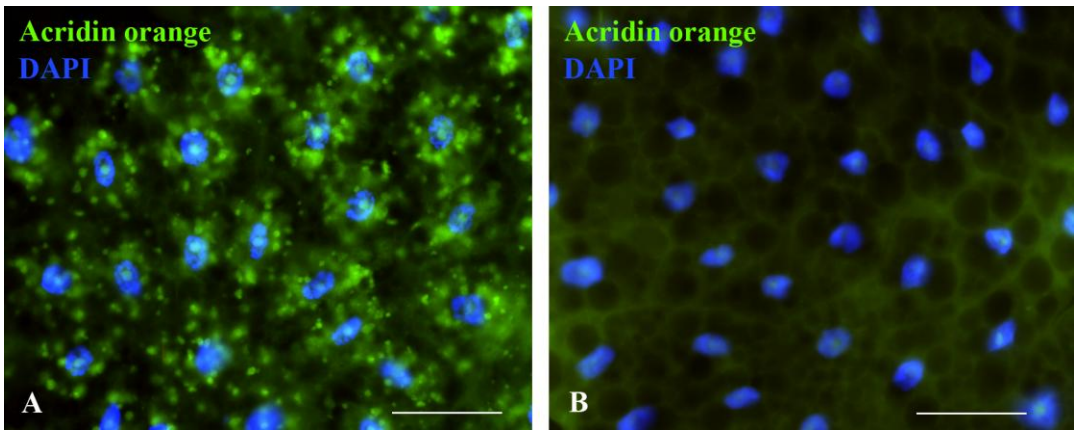
Ha viszont csak az IR-szekvenciákat módosítjuk, akkor is immobilis, de működőképes transzpozászt hordozó P-elemet kapunk, amely szintén hosszú ideig fenntartható az adott *Drosophila*-vonalban *(Robertson és mtsai, 1988)*. Ha a fenti két vonalat összekeresztezzük, akkor az utódok csíravonalában a funkcióképes transzpozáz kivágja és áthelyezi az ép IR-szekvenciákkal rendelkező P-elemet a genom egy másik pontjába, amely egyedenként eltérő lesz. A beépülő P-elem mintegy széttolja az eredeti DNS-szekvenciát, ezáltal csökkenti vagy lehetetlenné teszi az érintett gén expresszióját, hipomorf- ill. null mutánst hozva létre. Megfelelő keresztezésekkel a genomjukban különböző helyeken P-elemet hordozó egyedekből folyamatosan fenntartható törzseket lehet létrehozni. Ezek jelentős részében a mutáció homozigóta formában letalitást okoz, amely az egyedfejlődés egyik vagy másik szakaszában jelentkezik, attól függően, hogy az érintett gén melyikben játszott volna nélkülözhetetlen szerepet. Ezeket a vonalakat balanszer kromoszóma segítségével, heterozigóta formában lehet fenntartani. A Szegedi Törzsgyűjteményben található vonalak a harmadik kromoszómájuk különböző pontjain hordozták a transzpozont, míg a Dr. Kiss Istvántól kapott törzsek esetében a második kromoszómát érintette a P-elem inzerció.

4.2.2. Új autofág gének keresésének munkahipotézise

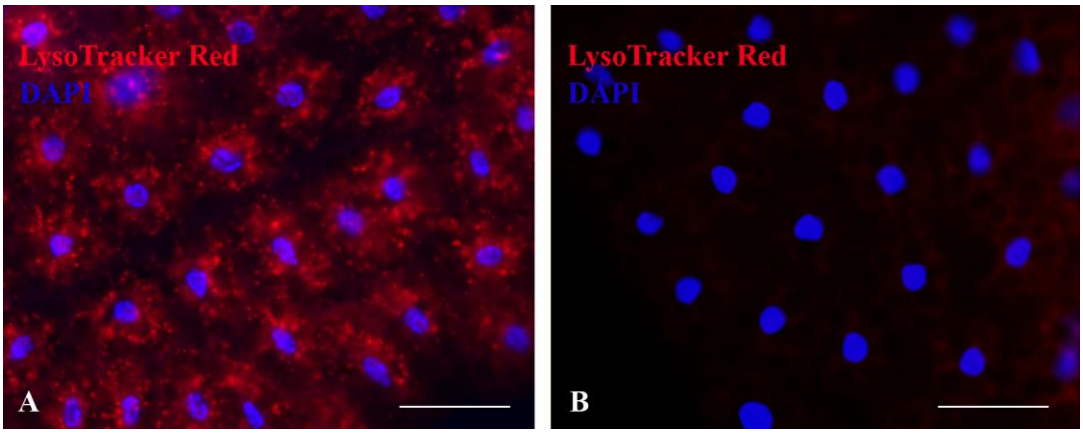
A munkahipotézis – amelynek használhatóságáról a későbbiekben meggyőződhetünk – a következő volt: Mivel a metamorfózis előtt álló lárvák zsírtestét poliploid sejtekből álló egyetlen egy réteg alkotja, ezért kiboncolás után fénymikroszkóppal könnyen vizsgálható *in vivo* formában is, azaz beágyazás és lemetszés nélkül. A trofocitákban ebben az időszakban tömegesen megjelenő, autofágiához kapcsolódó organellumok (lizoszómák és autofág vakuólumok) beltartalma savas pH-jú, ilyen módon klasszikus hisztológiai festésekkel (mint például neutrálvörös vagy akridin oranzs) jól és specifikusan jelölhetők, vagyis jelenlétük, hiányuk vagy mennyiségbeli változásuk könnyen meghatározható volt. Ezen túlmenően az akridin oranzs festés alkalmas a protein granulumok, vagyis a heterofágia/endocitózis meglétének vagy hiányának a kimutatására is (11. ábra). Minden vonal egyedeinek zsírtestét legalább kétféle festéssel vizsgáltuk, és csak azokban az esetekben folytattuk a kutatást, amelyekben a két különböző eljárás megegyező eredményt mutatott (12. ábra).

Mivel korábbi vizsgálatainkból ismert volt, hogy az autofágia hiánya ellehetetleníti a metamorfózist: a túlélő lárvális szövetek anyagai nélkül az imágó szervei nem tudnak kialakulni és

ez az egyed elpusztulásához vezet. Éppen ezért a törzsgyűjteményekből csak azokat a vonalakat vontuk be a vizsgálatba, amelyek homozigóta egyedei késői lárva- illetve korai báb letalitást mutattak, azaz abban az időszakban pusztultak el, amikor a fiziológiás autofágiának működnie kellett volna.



11. ábra. Ugyanazon vonal vándorló korú lárváinak zsírteste, akridin oranzs festés után. Az A) képen a heterozigóta lárvából származó zsírtest sejtjei tele vannak akridin oranzs pozitív granulumokkal, addig a B) képen látható homozigóta lárva trofocitáiból ezek teljesen hiányoznak. Méretjel: 50 μm.



12. ábra. A ábrán már bemutatott vonal vándorló időszakból származó lárváinak zsírteste, Lysotracker red festést követően. A heterozigótak trofocitái nagyszámban tartalmazzák a Lysotacker Red festéket felhalmozó granulumokat (A kép), ugyanakkor a homozigóták zsírtest-sejtjei üresek (B kép). Méretjel: 50 μm.

4.2.3. A p-elemet hordozó mutánsparkok tesztelésének eredménye

A fenti módszer segítségével 62 darab, a második-, és 175 darab, a harmadik kromoszómáján a P-elem beépülése által okozott mutációt hordozó vonal homozigóta egyedeit teszteltünk le (1. és 2. táblázat).

k00115	k00119	k00230	k00231	k00302	k00312	k00403
k00507	k00602	k00604	k00613	k00705	k00803	k00805
k00812	k01002	k01104	k01502	k01802	k02002	k02401
k02512	k02615	k02703	k02705	k02707	k03117	k03501
k04203	k04207	k04301	k04405	k05313	k05517	k06106
k06130	k06602	k07020	k07120	k07302	k07409	k08625
k08707	k08903	k10415	k10815	k11002	k11328	k12702
k12909	k13101	k13217	k13409	k13510	k13624	k13705
k14112	k14316	k14816	k16514	k16616	k16802	

1. táblázat. Az általunk tesztelt, második kromoszómájukon P-elemet hordozó törzsek.

S000616	S000625	S000721	S001704	S001813	S002001	S003612
S005042	S007902	S008309	S008931	S011027	S011046	S012719
S018301	S018812	S019203	S020514	S021202	S022241	S023820
S023825	S023826	S023941	S024309	S024314	S024533	S024715
S027614	S028206	S028416	S028510	S029120	S029910	S032301
S041316	S044402	S045831	S050006	S050016	S050501	S050515
S051010	S051406	S054507	S054515	S054516	S055015	S062105
S062118	S063003	S063304	S065103	S065711	S066105	S066607
S066610	S066619	S066813	S067003	S067404	S068111	S068502
S068510	S069701	S071615	S071901	S073002	S073502	S073810
S074510	S075807	S076807	S078709	S083005	S084307	S084402
S084507	S084512	S089106	S090101	S091604	S091801	S092712
S093614	S094405	S094906	S095108	S095203	S095304	S095501
S095708	S096003	S096108	S096713	S097301	S098202	S098905
S098910	S098916	S099312	S099504	S100303	S101710	S101801
S102409	S102412	S102908	S102910	S103114	S103207	S103401
S103515	S103712	S104415	S104903	S106710	S110416	S112609
S113105	S113208	S113410	S115214	S117809	S125012	S126206
S126215	S130813	S130911	S131005	S131092	S132214	S132304
S132306	S132312	S132413	S133501	S133603	S133809	S134802
S135301	S136110	S138210	S138815	S139101	S139116	S139210
S139602	S140307	S141207	S141709	S141803	S142411	S142607
S142909	S143907	S144201	S144801	S145211	S145808	S146507
S146604	S146901	S147310	S147402	S147406	S147410	S147804
S147910	S147911	S148906	EP(3)1107	EP(3)3116	EP(3)3332	EP(3)3377

2. táblázat. A megvizsgált, harmadik kromoszómájukon P-elem inzerciós vonalak.

Természetesen a késői lárva-, vagy a korai báb letalitás mögött nemcsak az autofágiát érintő defektusok húzódhatnak meg. Ennek megfelelően a megvizsgált 237 vonal közül csak 82 zsírteste mutatott a normálistól eltérő granulációt (34,5%). Mivel az autofág folyamatok indukciója a 20-hidroxiekdizon titerének emelkedésétől függ, csupán teoretikus úton nem lehetett kizárni annak lehetőségét, hogy a granuláció hiányának hátterében a nem megfelelő mértékű hormonszintézis húzódik meg. Ezért az első teszt eredményeként kapott 82 vonal homozigóta egyedeit 20-hidroxiekdizonnal történő kezelés után felboncoltuk és zsírtestüket ismét megfestettük. Tizenegy vonal esetében a granuláció a kezelést követően megjelent, tehát ezeknél nem egy, az autofágiában fontos, hanem egy másik, a vedlési hormon szintézise szempontjából fontos gént érintett a P-elem inzerció. Ezeket a vonalakat a továbbiakban a mi szempontunkból nem volt érdemes vizsgálni. A fennmaradó 71 törzset kétféleképpen vizsgáltuk a továbbiakban: egyrészt elektronmikroszkópos, azaz szubcelluláris szinten is ellenőriztük bennük az autofág struktúrák hiányát, másrészt plazmid-menekítéssel, majd az ezt követő PCR- és szekvenálási lépések után a Flybase adatbázis segítségével (http://flybase.org/) meghatároztuk a P-elem beépülésének helyét, vagyis az ennek következtében funkcióképtelenné vált gént. Mindkét vizsgálattal tovább tudtuk szűkíteni a számunkra érdekes vonalak körét, kiszűrve a fénymikroszkóppal nem detektálható, kismértékű autofágiára képes törzseket, valamint azokat, amelyekben többszörös P-elem inzerciót találtunk. Utolsó ellenőrző lépésként a további vizsgálatra kijelölt vonalakat olyan törzsekkel kereszteztük be, amelyek az adott gént hordozó kromoszóma-szekvenciára nézve egy deléciót hordoztak. Amennyiben az így előállított hemizigóta vonalak is mutatták az eredeti, autofágia-defektes fenotípust, úgy abban az esetben biztosak lehettünk abban is, hogy a megfigyelt fenotípust nem egy, az adott vonalban ugyancsak homozigóta formában előforduló háttérmutáció okozta. Ezen ellenőrző vizsgálatok elvégzése után 18 olyan vonalat találtunk, amelyben az autofágia-defektes fenotípusát a P-elem beépülésével elrontott gén termékének hiánya okozhatta. Meglepő módon három törzs esetében a mutáció ugyanazt a gént érintette (CG17299), természetesen ugyanolyan fenotípust létrehozva. Ez jelentősen megerősítette a szűrő- és ellenőrző vizsgálataink helyességét (3. táblázat).

3. táblázat. A P-elemet hordozó vonalak tesztelése után a további vizsgálatokra kiválasztott törzsek listája. A bekeretezett kódszámok azokat a vonalakat jelzik, amelyekben a mutáció ugyanazt a gént (CG17299) tette működésképtelenné.

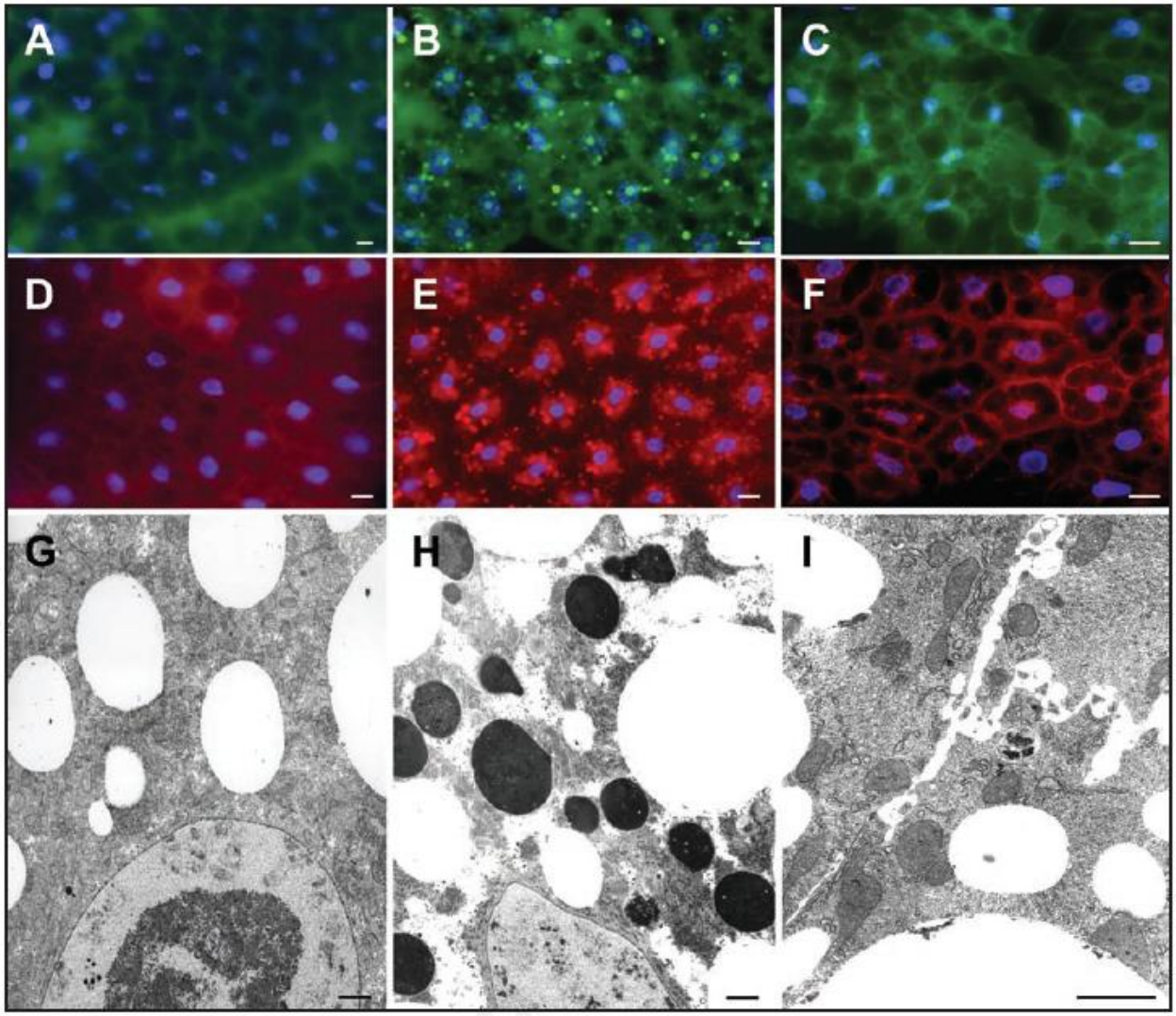
k00115	k01502	k02401	k04203	k04405	k06130
S005042	S011027	S011046	S012719	S028510	S050515
S065103	S094312	S110416	S132413	EP(3)316	EP(3)3332

A 16, funkcióvesztéses formában autofágia-defektes fenotípust okozó gén közül elsőként a három vonalban is azonosított, CG17299 számú, a szukrózt nem fermentáló 4/adenosin monofoszfát által aktivált protein kináz γ alegységét kódoló (SNF4Aγ/AMP-activated protein kinase γ subunit) gént vizsgáltuk meg és jellemeztük alaposabban.

4.3. A *Drosophila* AMPK γ alegysége részt vesz a fejlődési és a stressz-indukált autofágia szabályozásában

4.3.1. Az 1(3)S005042 vonalból származó homozigóta lárvák zsírtestének morfológiai leírása

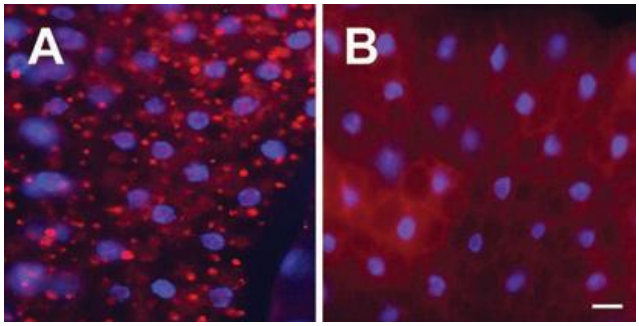
A három, az SNF4Aγ alegységét érintő P-elem inzerciót hordozó vonal közül az 1(3)S005042 választottuk ki a további vizsgálatok céljára. Ennek a törzsnek a szinkron petéztetésből származó, a transzpozon jelenléte szempontjából hetero- és homozigóta egyedeinek posztembrionális fejlődése megközelítőleg azonos volt. Az utolsó lárvastádium táplálkozó periódusában (AEL72-108h) lévő állatok zsírtestében – a vad típusú lárvákhoz hasonlóan (13. ábra A és D képek) sem akridin oranzs-, sem pedig Lysotracker Red pozitivitást mutató granulációt nem lehetett detektálni, ill. a trofociták ultrastuktúrája is megegyezett a kontrollokéval (13. ábra G kép). Az ezt követő vándorlási periódusban a vad fenotípusú lárvák zsírtestében – éppúgy, mint az l(3)S005042 vonal heterozigóta állatokéban – egyre növekvő számban jelennek meg az autofagoszómák, majd kevéssel később a protein granulumok, és az előbbiek száma a prepupa stádium idejére eléri a sejtenkénti 35-50 darabot (13. ábra, B, E és H képek). Ugyanakkor az l(3)S005042 törzs AEL144h korú homozigóta lárváinak zsírtest-sejtjeiben sem akridin oranzs-, sem pedig Lysotracker Red pozitivitást mutató granulációt nem lehetett detektálni (13. ábra C és F képek). Elektronmikroszkóppal megvizsgálva ezt a szövetet, sejtenként csupán egy-két fiatal autofág vakuolumot lehetett találni, ettől eltekintve viszont a többi sejtorganellum normális méretűnek és szerkezetűnek mutatkozott (13. ábra, I kép).



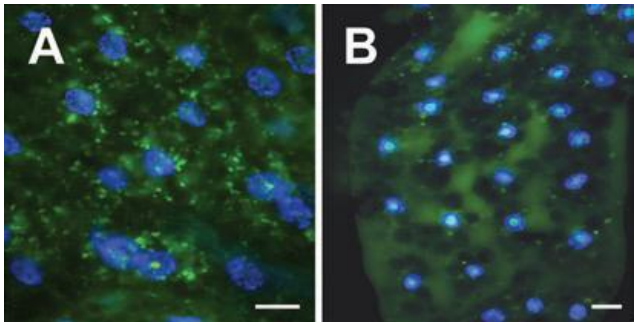
13. ábra. Akridin oranzzsal (A-C) és LysoTracker Reddel (D-F) megfestett zsírtest-lebenyek, valamint az ugyanolyan korú lárvák trofocitáinak elektronmikroszkópos felvételei (G-I). Az első oszlopban lévő, a vad típusú, táplálkozó lárvák zsírtestéről készült felvételeken nem láthatók olyan struktúrák, amelyek akridin oranzzsal, vagy pedig LysoTracker Reddel lennének megfesthetőek (A és D képek), illetve az elektronmikroszkópos felvételen sem találunk autofág vakuólumokat vagy protein granulumokat (G kép). A középső oszlop képein lévő, vándorló korú, vad típusú lárvális zsírtest viszont már bővelkedik a savas beltartalmú struktúrákban (B és E képek), amelyek az elektronmikroszkópos vizsgálat eredménye szerint főként autofág vakuólumok, illetve kisebb számban protein granulumok (H kép). Az l(3)S005042 törzs ugyanilyen korú homozigóta lárváinak zsírtestét bemutató, a harmadik oszlopban lévő képekről viszont ezek a struktúrák – mind fény-, mind elektronmikroszkópos szinten – teljesen hiányoznak ((C, F és I képek). Megjegyzendő, hogy az l(3)S005042 vonal heterozigóta egyedeinek zsírtest-sejtjei a vad típussal megegyezően fejlődnek, és bennük a megfelelő időpontokban ugyanazok a strukturális változások figyelhetők meg. Méretjelek: 25µm (A-F) és 1 µm (G-I).

4.3.2. A 20-hidroxiekdizon kezelés hatása az l(3)S005042 homozigóta lárvák zsírtestére

Mivel a rovarokban az autofágia fő induktora a JH szint csökkenése mellett megemelkedő 20-HE szint, ezért fontos volt megvizsgálni, hogy az autofág-defektes fenotípust esetleg nem a tartósan alacsony 20-HE koncentráció okozza-e. Azonos korú, AEL80h kontroll és l(3)S005042 homozigóta lárvákat 20-hidroxiekdizonnal kezelve azt tapasztaltuk, hogy míg a vad típusú lárvák trofocitáiban jelentős számú, LysoTracker Reddel megfesthető granulum jelent meg (14. ábra A kép), addig az l(3)S005042 homozigóta mutánsokban ilyen változás nem volt megfigyelhető (14. ábra B kép).



14. ábra. A 20-HE kezelést követően csak a kontrolllárvák zsírtestében jelentek meg a LysoTrackerRed-del jelölhető granulumok (A), ugyanakkor a homozigota mutánsok esetében ilyen változást nem tapasztaltunk (B). Méretjel: 25µm



15. ábra. A négy órás aminosav-megvonást követően csak a vad típusú lárvák trofocitái voltak képesek akridin oranzs-pozitív garnulumokat képezni (A), az l(3)S005042 lárvák zsírteste továbbra is üres maradt (B). Méretjel: 25µm

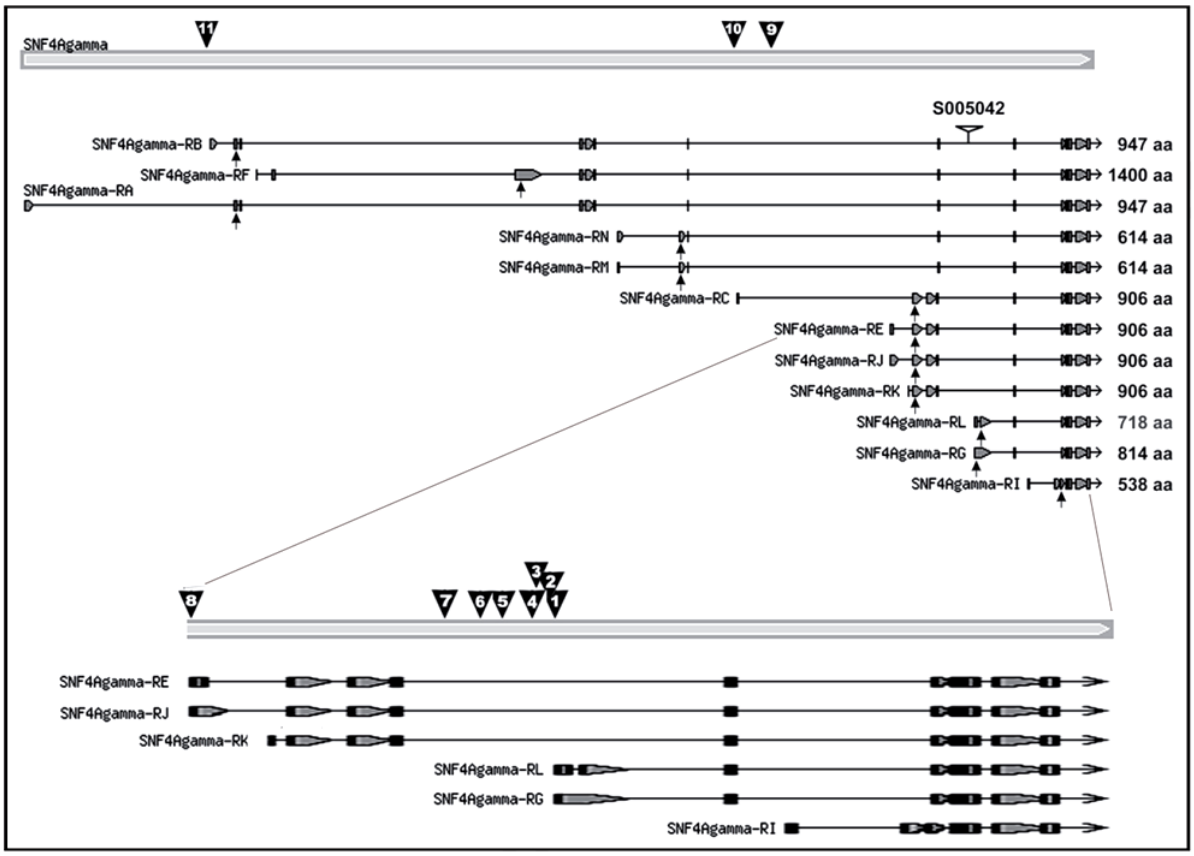
4.3.4. Az aminosav-megvonás hatása az l(3)S005042 homozigóta lárvák zsírtestére

Az autofágia kiváltásának egyik általánosan elterjedt módszere az aminosav-megvonáson alapuló éheztetés. Mivel ekkor a sejteken belüli degradáció más, részleteiben eddig még nem teljesen feltárt jelátviteli útvonalakon át érkező jelek hatására aktiválódik, ezért volt fontos megvizsgálni, hogy a 20-HE kezelésre nem reagáló szövetek képesek-e aminosav-megvonásra autofágiával válaszolni. A szinkron petéztetett, táplálkozó periódusban lévő, AEL80h kontroll és homozigóta mutáns lárvákat éheztettünk 4 órán keresztül. Ennek hatására a vad típusú lárvák zsírtestében tekintélyes mennyiségű, akridin oranzzsal jelölhető granulum jelent meg (15. ábra A kép), ugyanakkor az l(3)S005042 homozigóta egyedek trofocitáiban nem láttunk változást (15. ábra B kép).

4.3.5. A P-elem inzerció által érintett gén meghatározása

Plazmid menekítéses módszer segítségével igazoltuk, hogy az l(3)S005042 vonal esetében a transzpozon az *snf4aγ* gén (CG17299) tizenhatodik intronjában található, 29 bázispárral előrébb az *snf4aγ-RL*, és 86 bázispárral feljebb az *snf4aγ*-RG transzkriptumának kezdőpontjától (16. ábra).

Erről a terjedelmes Drosophila génről relatíve nagyszámú, eltérő exonszerkezetű mRNS keletkezhet (alternatív splicing útján), amelyekről legkevesebb hétféle fehérje készülhet (http://flybase.org/). Ez utóbbiak a C terminusuk közelében valamennyien tartalmazzák azt a CBP (cAMP response element binding protein (CREB) binding protein (CBP)) domént, amelyik közvetetten felelős az AMP-kötéséért, ugyanakkor viszont nagyfokú változatosságot mutatnak az N-terminus felőli szekvenciáikat illetően.



16. ábra. Az *snf4aγ* gén feltételezett exon-intron szerkezete az l(3)S005042 vonalban hordozott P-elem inzerciós helyének megjelölésével (vastag, számozott nyílhegyek), valamint a lehetséges transzkriptumok feltüntetésével. Ez utóbbiakon kis nyilak jelzik a transzlációs startkodon helyét. Az egyes mRNS-ek mögötti számok a róluk szintetizálódó fehérjék méretét (aminosav-számát) mutatják). Az ábra alsó felében az *snf4aγ* gén 3' végének kinagyított részletén feltüntettük azokat a további, a megjelölt helyen transzpozont tartalmazó vonalakat, amelyeket az l(3)S005042 törzzsel kapcsolatban megvizsgáltunk. Ezek a következők voltak : (1) EP648 (Szegedi Törzsközpontból, SzSC); (2) l(3)S005042 (SzSC); (3) l(3)S012719 (SzSC); (4) EP3015b (SzSC); (5) EP3310 (SzSC); (6) EP3332 (SzSC); (7) EP3176 (SzSC); (8) KG10152 (Bloomingtoni Törzsközpontból, BSC); (9) EP772 (SzSC); (10) KG00325 (BSC); (11) EY07066 (BSC).

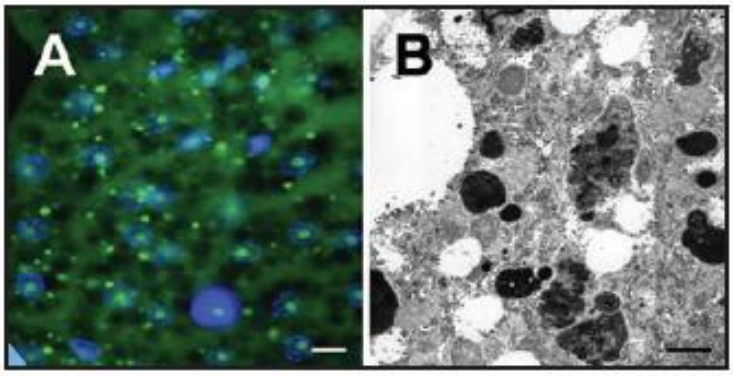
4.3.6. Az *snf4aγ* gén leírása és transzkriptumainak kapcsolata az autofágiával

Az *snf4aγ* gén a harmadik kromoszóma jobb karján, a 93C1-93C5 citogenetikai pozicióban található, teljes mérete a 16966463 – 17038409 bázispárok közé esik. Jelenleg összesen 16 féle transzkriptumot és ugyanennyi fehérjét tételeznek fel, mint ennek a génnek a termékeit, azonban ezek közül csak néhánynak igazolták a létezését (http://flybase.org/).

Az *snf4aγ* gén 12 féle mRNS-e közül kilenc tartalmazza a tizenhatodik intront, így ezek esetében valószínűsíthető volt, hogy az l(3)S005042 vonalban lévő inzerció hatással van a géntermék megjelenésére és/vagy működésére. De mivel a P-elem beépülés az *snf4aγ*-RG, -RL, -RI transzkriptuma kezdőpontjának közelében helyezkedik el, nem volt kizárható annak a lehetősége sem, hogy ez érinthette ez utóbbi három mRNS-változat keletkezését is. Ennek eldöntésére a 4. ábrán 1-11 számmal megjelölt helyeken transzpozont tartalmazó törzseken is elvégeztük a fénymikroszkópos autofágia tesztet. Meglepő módon, csupán egy esetben, az l(3)S012719 vonal (a 8. ábrán 3-as számmal jelölve) vizsgálatakor találtunk kifejezetten autofágia-defektusra utaló jeleket. Az itt megfigyelt fenotípus erősen hasonlított az l(3)S005042 törzs esetében tapasztaltra, és a l(3)S005042 / l(3)S012719 traszheterozigóták nem voltak képesek sem az autofágiára sem pedig a metamorfózisra, hanem még a pupárium kialakítása előtt elpusztultak. Az l(3)S012719 vonal esetében a P-elem 53 bázispárral előrébb helyezkedik el, mint a l(3)S005042 törzsben. Érdekes módon két további vonal (EP3015b és EP3310, a 8. ábrán 4-es és 5-ös számmal jelölve) homozigóta lárvái nem élték meg a 3. lárvastádiumot, hanem korábban elpusztultak, annak ellenére, hogy bennük a transzpozon igen közel ül az l(3)S005042 törzsben lévő P-elem inzerciós pontjához. Ugyanakkor viszont az EP648 vonal homozigóta egyedei - amelyekben a transzpozon csupán 24 bázispárral helyezkedett el hátrább, mint az l(3)S005042 törzsben – teljes mértékben életképesek voltak, és bennük nem mutatkozott autofágia-defektus. Mindezek arra utalnak, hogy az autofágiával összefüggésbe hozható régiót az *snf4aγ* gén RL transzkriptumának kezdőpontja előtt lévő, mintegy 200-500 bázispár hosszúságú szakasz hordozhatja.

4.3.7. A transzpozon továbbugratásával a vad fenotípus helyreállítható volt

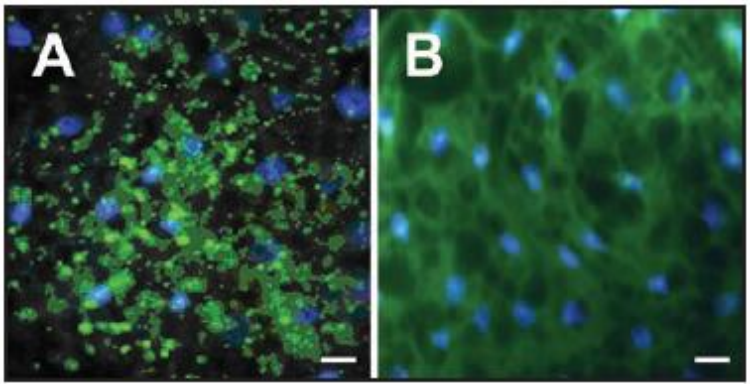
Az l(3)S005042 törzs heterozigóta egyedeit működőképes transzpozázt hordozó muslicákkal bekeresztezve az *snf4aγ* génben ülő P-elem továbbugratható volt. Azokban az egyedekben, ahol a P-elem kivágása pontosan sikerült, ott az autofág folyamat a megfelelő időben és mértékben megjelent (17. ábra A és B kép), és ezek az állatok a vad típusúakhoz teljesen hasonló módon fejlődtek és szaporodtak.



17. ábra. A P-elem eltávolítása után az l(3)S005042 egyedeiben a vad fenotípus helyreállt. A kép: Akridin oranzzsal megfestett, késői vándorló (AEL140h) lárvából származó zsírtest, a vad típusra jellemző granulációval. B kép: Az ugyanilyen korú lárva trofocitáinak ultrastruktúrája is a vad fenotípust mutatta. Méretjel: A: 25µm, B: 1 µm.

4.3.8. Az autofágia csendesítése UAS-SNF4IR RNAi segítségével

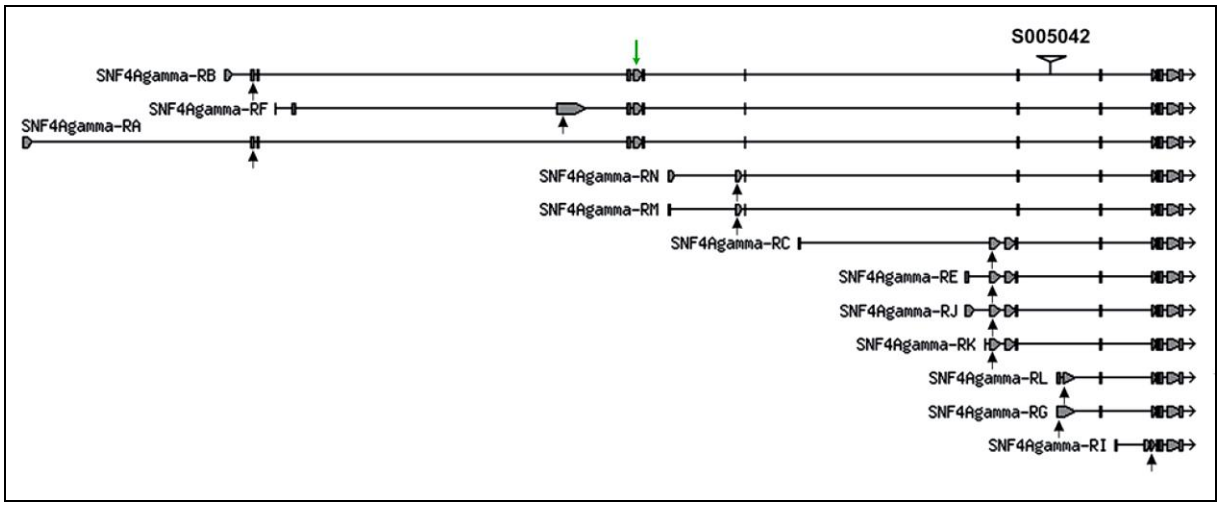
Annak igazolására, hogy az *snf4aγ* gén termékének jelenléte a zsírtest sejtjeiben szükséges az autofág folyamatok beindulásához, a gén 3' végén lévő, valamennyi transzkriptumban megjelenő exonok szekvenciáira RNS csendesítésre alkalmas konstrukciót készítettünk. Ezzel az UAS-SNF4IR-t hordozó vektorral transzgén állatokat hoztunk létre, amelyeket a megfelelő Gal4 forrást hordozó egyedekkel bekeresztezve az RNS csendesítést tetszőleges szövetben és csupán a szükséges időpontban válthattuk ki. Kísérleteinkben a csak a zsírtestben kifejeződő cgGal4-et használtuk az UAS-SNF4IR szövetspecifikus expresszáltatásához. Az időbeni szabályozhatóságot az tub-Gal80^{ts} rendszerrel biztosítottuk. Ez utóbbi egy hőérzékeny represszor folyamatos termelésével megakadályozza, hogy a Gal4 fehérje szobahőmérsékleten - hozzákötődve az RNAi konstrukció UAS szekvenciájához - átirassa a csendesítéshez szükséges génszakaszt. Ha azonban ezeket a kísérleti állatokat 32°C-on tartjuk, akkor a hőérzékeny represszor inaktiválódik, és a Gal4 fehérje megindítja a géncsendesítést. Ezt a rendszert használva lehetőségünk nyílt arra, hogy az *snf4aγ* gén kifejeződését csak a harmadik lárvastádium idején akadályozzuk meg. Amennyiben az Gal80ts/cgGal4; UAS-SNF4IR/+ genotípusú lárvákat a posztembrionális fejlődés során végig 20°C-on tartottuk, úgy trofocitáikban a szokásos időben és mennyiségben megjelentek az acridin oranzs pozitivitást mutató granulumok (10. ábra, A kép). Ha viszont az ugyanilyen genotípusú állatokat azok utolsó lárvastádiumuk első napjától (AEL78h) 32°C-on tartottuk, akkor az autofág folyamatok beindulását jelző granuláció nem jelent meg a szokásos időpontban (18. ábra, B kép).



18. ábra. Az *snf4aγ* gén csendesítése a zsírtest-sejtekben képes meggátolni az autofágiára jellemző granulumok kialakulását. A: kontroll, B: az azonos korú géncsendesített lárva zsírteste. Méretjel: 25µm.

4.3.9. Anti- Snf4aγ ellenanyag előállítása és tesztelése

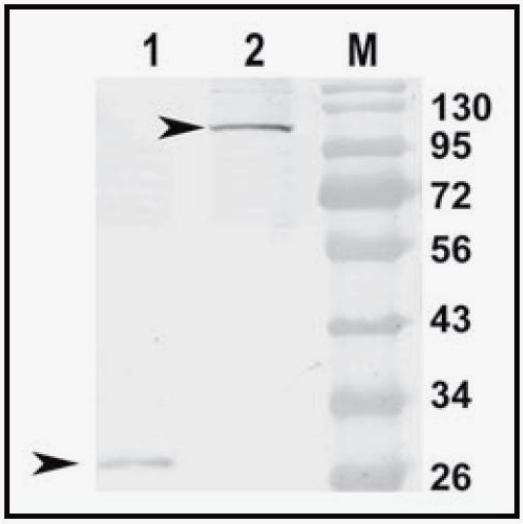
Egy, az *snf4aγ* génről átíródó három leghosszabb transzkriptum - az *snf4aγ*–RA, -RB és -RF - mindegyikében jelen lévő exont (az *snf4aγ*–RA esetében ez a 9. exon (FBgn0025803:9), a 19. ábrán zöld nyíllal jelölve) választottuk ki, mint az immunizálásra megfelelő szekvenciát. Döntésünkben fontos jelentőséggel bírt az a tény, hogy az *snf4aγ*–RF mRNS-ről keletkező fehérjéről már bebizonyították, hogy hiánya súlyos neuronpusztuláshoz vezet a kifejlett *Drosophilában (Tschäpe és mtsai, 2002).*



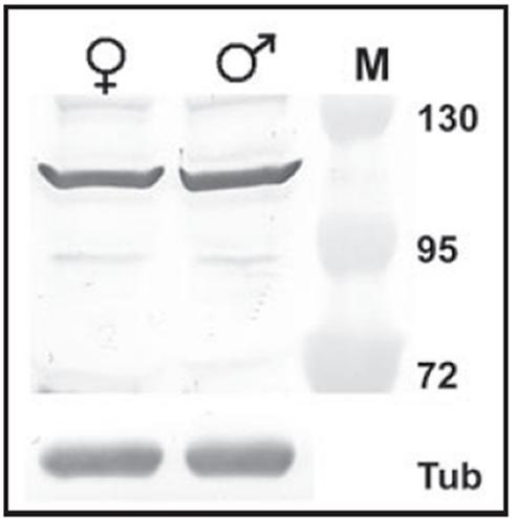
19. ábra. Az immunizáláshoz használt szekvencia helyzete az *snf4aγ*–RA, -RB és –RF transzkriptumokon belül.

A kiválasztott génszakasz klónozása, kifejeztetése, majd a fehérjével történő immunizálás után nyert ellenanyagot Western blottal ellenőriztük. A poliklonális antiszérum tisztán felismerte a rekombináns, baktériumban előállított fehérjét, amelynek mérete megfelelt a

klónozáshoz használt génszakaszról elvileg készülhető fehérje méretével (28 kDa) (20. ábra, 1. oszlop). Amennyiben harmadik stádiumban lévő, AEL110h korú lárvákból készített teljes homogenátumon teszteltük az ellenanyagot, abban az esetben az egy 105 kDa molekulatömegű fehérjével mutatott keresztreakciót. Ez a molekulatömeg jó egyezést mutat az *snf4aγ*–RA és –RB transzkriptumok által kódolt aminosavak számából (947) kalkulálható értékkel (20. ábra, 2. oszlop).



20. ábra. az *snf4aγ* gén RA, RB és RF transzkriptumaiban közös exon ellen termeltetett antiszérum ellenőrzése. Az ellenanyag felismeri mind a rekombináns- (1. oszlop), mind pedig az eredeti fehérjében lévő szekvenciát (2. oszlop).

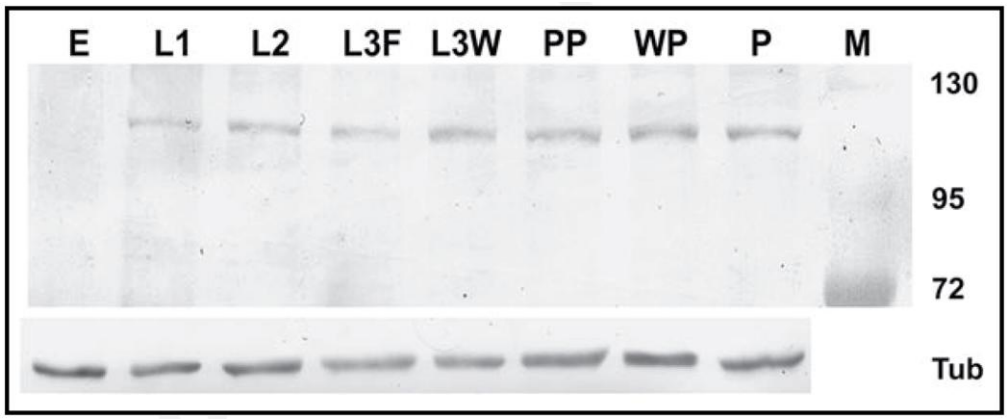


21. ábra. Anti Snf4aγ– ellenanyag által felismert fehérje nem mutat mennyiségi különbséget az azonos korú és fejlettségi állapotú, vad típusú nőstény (első oszlop) és hím (második oszlop) lárvákból származó mintákban.

A következő lépésben megvizsgáltuk, hogy az általunk készített ellenanyag által felismert fehérje mutat-e bármilyen mennyiségi különbséget a különböző nemű lárvák esetében. Mivel ilyen eltérést nem tudtunk detektálni (21. ábra), ezért ettől kezdve a Western blot minták készítésekor 1:1 arányban használtuk a nőstény és a hím lárvákat.

4.3.10. Az Snf4aγ fehérje kifejeződése az embrionális- és a posztembrionális fejlődés, valamint a metamorfózis idején

Az ellenanyag ellenőrzését követően w^{1118} vonalból származó embriókból, L1-L3 stádiumú lárvákból, továbbá elő-, fehér- és barna bábokból készített homogenátumokban vizsgáltuk az Snf4aγ fehérje jelentétét és relatív mennyiségét. Az egyes minták teljes fehérje tartalmát a bennük lévő tubulin mennyisége alapján egyensúlyoztuk ki. A korábbi eredményeknek megfelelően az anti-Snf4aγ ellenanyag – az embriókból származó minta kivételével – valamennyi mintában csak egy, a 105 kDa molekulatömegű fehérjét ismert fel. Szemikvantitatív becslés alapján az Snf4aγ mennyisége nem változik számottevően az első lárvastádiumtól (L1) a harmadik lárvastádium táplálkozó periódusának (L3F) végéig (22. ábra, L1-L3F oszlopok). A vándorló periódusban viszont ennek a fehérjének a részaránya jelentősen megemelkedik, és a metamorfózis időszakából származó mintákat is ez a magas Snf4aγ tartalom jellemzi (22. ábra, LW-P oszlopok).

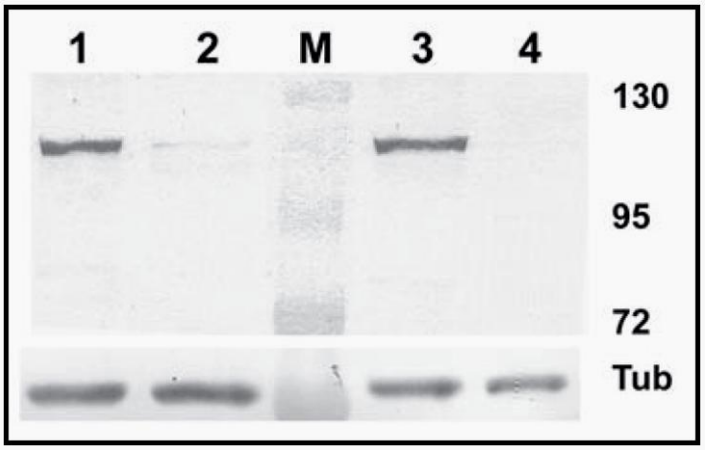


22. ábra. Az Snf4aγ fehérje jelenlétének és mennyiségi változásának szemikvantitatív kimutatása a *Drosophila* egyedfejlődése során, az embrió kialakulásától a báb létrejöttéig tartó időszakban. A teljes homogenátumot tartalmazó minták jelölése a következő: E: embrió (AEL16h), L1: első stádiumos lárva (AEL36h), L2: második stádiumos lárva (AEL60h), L3F: harmadik stádiumos táplálkozó lárva (AEL86h), L3W: harmadik stádiumos vándorló lárva (AEL120h), PP: előbáb (prepupa, AEL146h), WP: fehér báb (AEL150h), P: barna báb (AEL175h). Az ábra alsó részén a mennyiségi referenciaként szolgáló tubulin kimutatása látható.

Ezek az eredmények jó egyezést mutattak azzal a feltételezéssel, hogy az *snf4aγ* gén RA, RB és RF transzkriptumairól készülő fehérje szerepet játszhat a metamorfózis előkészítésében és lebonyolításában.

4.3.1.1. Az l(3)S5042 vonal homozigóta egyedeiben az Snf4aγ fehérje mennyisége erősen lecsökkent

A P-elem inzerciót hordozó l(3)S005042 vonal L3 táplálkozó (AEL86h)- illetve vándorló (AEL120h) korú homozigóta lárváiból készített teljes homogenátumot Western blotton, az anti- Snf4aγ ellenanyag segítségével vizsgálva megállapítottuk, hogy a vad típusú, hasonló korú lárvákhoz képest a mutáns táplálkozó lárvák jóval kevesebb, míg a vándorlók ezzel a módszerrel a kimutathatóság határa alatti mennyiségű Snf4aγ fehérjét tartalmaztak (23. ábra).

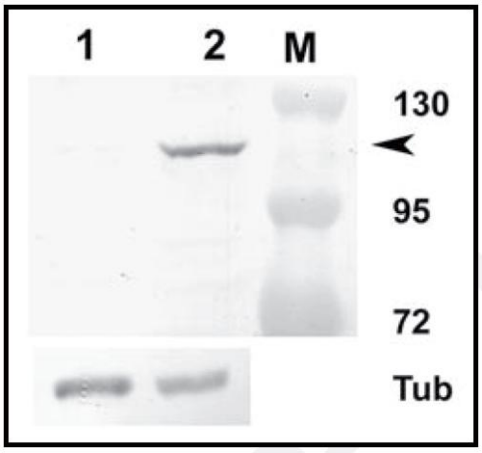


23. ábra. A vad típusú táplálkozó- illetve vándorló lárvák homogenátumában nagy mennyiségben van jelen a 105 kDa molekulatómegű Snf4aγ fehérje (1. és 3. oszlop), ugyanakkor ennek a fehérjének a jelenléte a mutáns táplálkozó lárvákban alig, míg a vándorlókban egyáltalán nem mutatható ki (2. és 4. oszlop). Az ábra alsó részén a mennyiségi referenciaként szolgáló tubulin-kimutatás látható.

4.3.12. A géncsendesítés is csökkentette az Snf4aγ fehérje mennyiségét

Az általunk előállított, az *snf4aγ* génre nézve RNAi konstrukciót hordozó transzgén vonal lárváiban is ellenőriztük, hogy a géncsendesítés képes-e csökkenteni az Snf4aγ fehérje mennyiségét. Az RNS-interferencia kiváltásához ugyanazt a Gal80^{ts}/Gal4 rendszert alkalmaztuk, amit korábban az autofág fenotípus kiváltásához is használtunk, azzal a különbséggel, hogy jelen esetben nem a zsírtest-specifikus cgGal4, hanem a valamennyi szövetben kifejeződő aktin promóterrel ellátott ActGal4 szerepelt Gal4 forrásként. Ezt a

változtatást az indokolta, hogy a Western blotokon teljes homogenátumokat vizsgáltunk, így ha csak a zsírtestben csökkentjük az Snf4aγ fehérje mennyiségét, akkor ezt a változást a többi szövet normális Snf4aγ expressziója elfedhette volna. A Gal80^{ts}/ActGal4; UAS-SNF4IR/+ genotípusú, vándorló korú (AEL120h) lárvákból származó mintákban nem tudtuk kimutatni az Snf4aγ fehérje jelenlétét (24. ábra, 1. oszlop), ugyanakkor a Gal80^{ts}/ActGal4; +/+ genotípusú, ugyanolyan módon kezelt, hasonló korú állatokban ez a fehérje nagy mennyiségben van jelen (24. ábra, 2. oszlop).

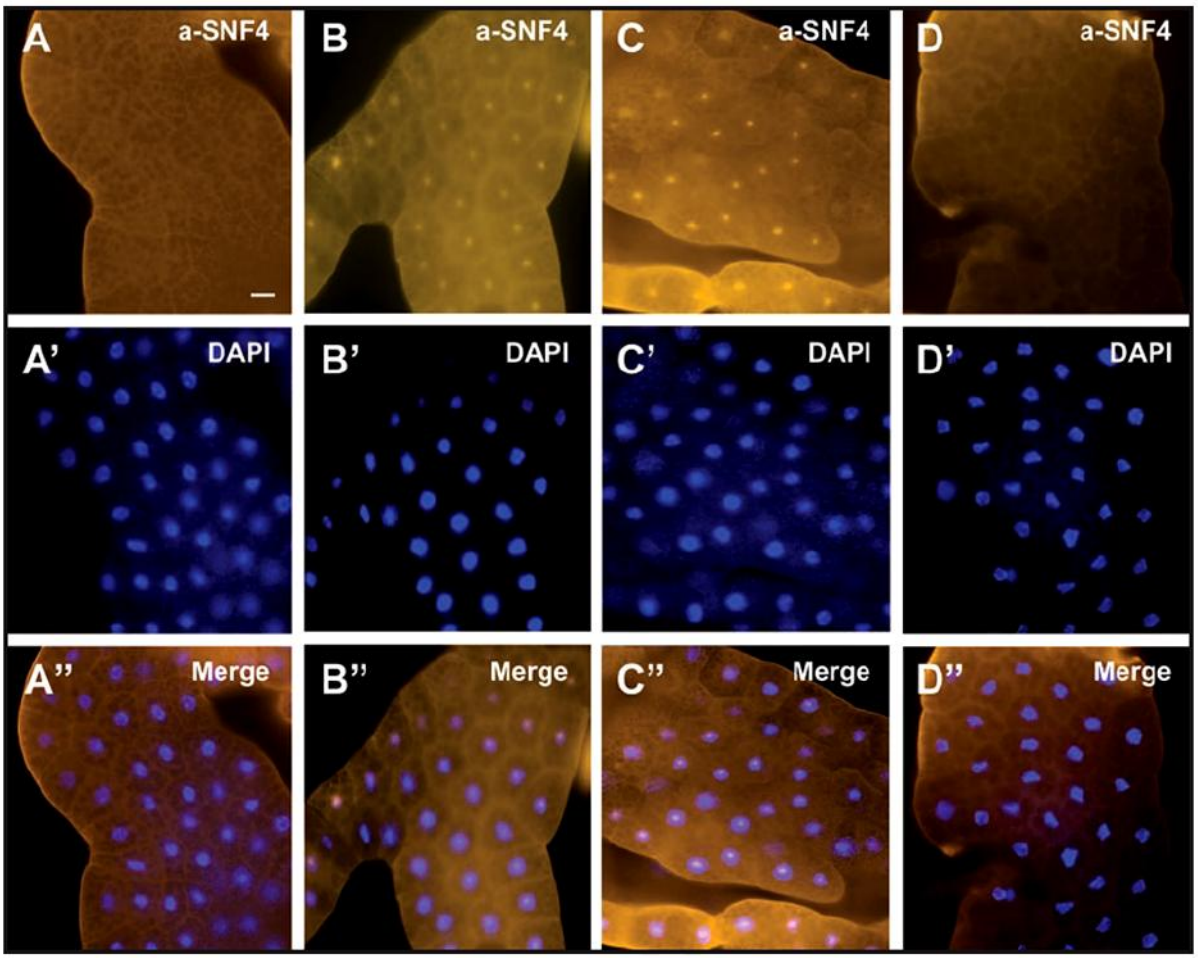


24. ábra. Az RNS-interferencia a kimutathatóság határa alá csökkentette az Snf4aγ fehérje mennyiségét (1. oszlop). A Gal80^{ts}/ActGal4 rendszer elemeit tartalmazó, viszont a géncsendesítő konstrukciót nem hordozó lárvákban a kérdéses fehérje mennyisége nem változott (2. oszlop). Az ábra alsó részén a mennyiségi referenciaként szolgáló tubulin-kimutatás látható.

4.3.1.3. Snf4aγ fehérje sejten belüli elhelyezkedése

A posztembrionális és a metamorfózis korai időszakának vizsgálatából származó Western blot eredmények azt mutatták, hogy az Snf4aγ fehérje mennyisége jelentősen megemelkedett a vándorlási periódus kezdetén. Hogy megtudjuk, ez a folyamat együtt jár-e a fehérje sejten belüli eloszlásának a megváltozásával is, vad típusú, normális fejlődésű-, illetve éheztetett táplálkozó stádiumban lévő (AEL86), valamint vándorló (AEL120h) lárvákat, továbbá szintén vándorló korú (l)S005042 homozigóta lárvákat vizsgáltunk meg immunhisztokémiai módszerrel.

A vad genotípusú, rendesen táplálkozó lárvák zsírtest-sejtjeiben az Snf4aγ fehérje a várt, citoplazmatikus lokalizációt mutatta (25. ábra, A-A'' képek). Ezzel ellentétben viszont a vándorló korú, vad lárvák trofocitáit vizsgálva, az immunfluoreszcens jel elsősorban a sejtmagokban mutatkozott (25. ábra, B-B'' képek). A vad típusú, táplálkozó korú, ám három órán át éheztetett lárvák zsírtestében Snf4aγ fehérje szintén a sejtmagokban halmozódott föl (25. ábra, C-C'' képek), míg a mutáns vonal homozigóta lárváinak trofocitáiban nem tudtuk kimutatni a vizsgált fehérje jelenlétét (25. ábra, D-D'' képek).

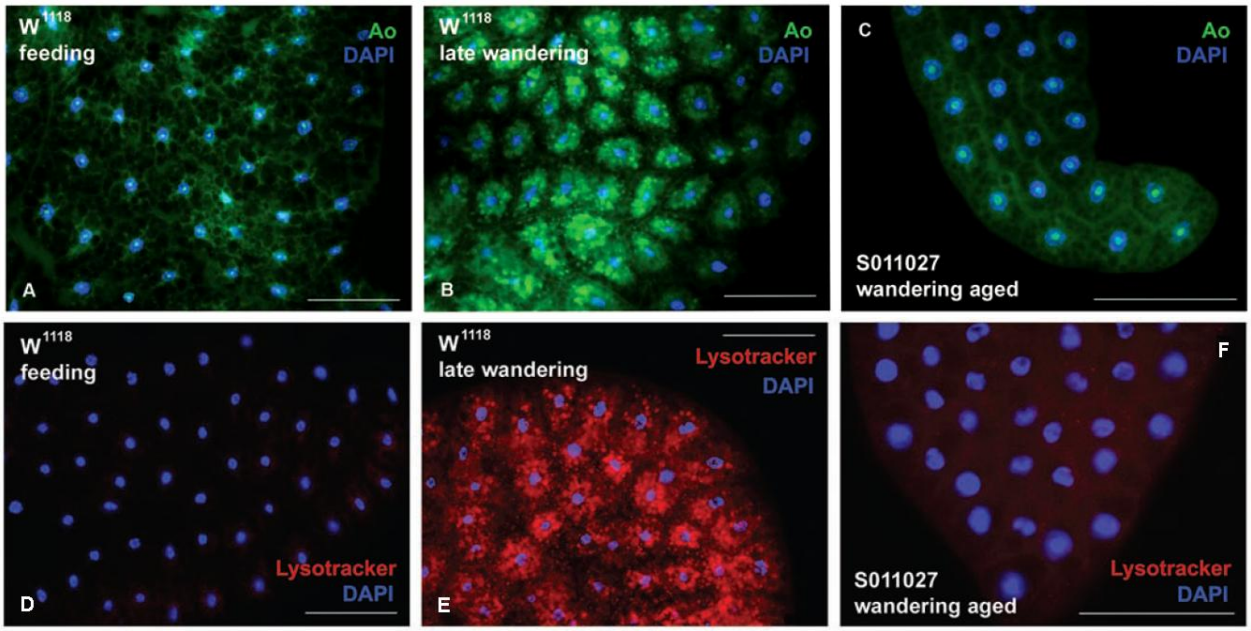


25. ábra. Snf4aγ fehérje a vad típusú táplálkozó lárvákban a trofociták citoplazmájában (A-A'' képek), míg az idősebb, vándorló lárvák esetében már elsősorban a sejtmagokban található (B-B'' képek). A táplálkozó lárvák rövid ideig tartó éheztetése kiváltja a fehérje sejtmagban történő felhalmozódását (C-C'' képek). Az l(3)S005042 homozigóta lárvák zsírtest-sejtjeiben nem mutatható ki az Snf4aγ fehérje jelenléte (D-D'' képek). Méretjel: 25 μm.

4.4. A *liquid facets (lqf)* gén termékének részvétele az auto- és heterofágiában

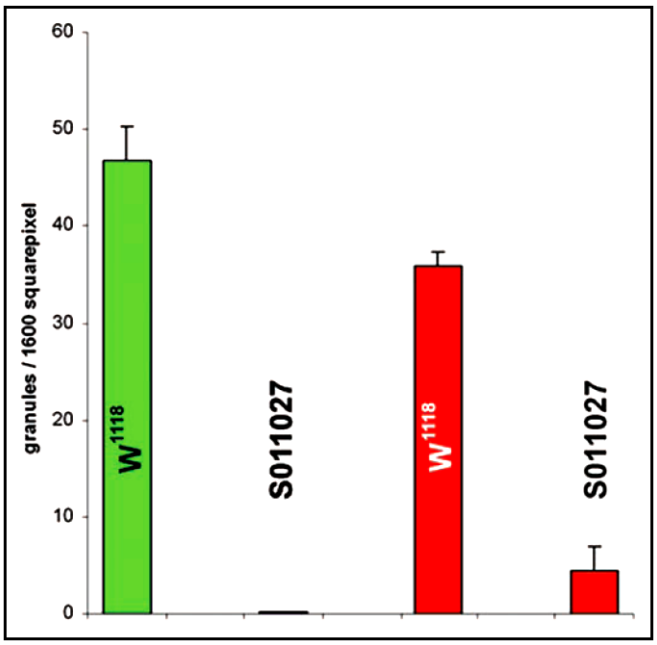
4.4.1. Az l(3)S011027 vonal tesztelésének eredményei

A P-elem beépüléssel létrehozott mutánsparkok tesztelése során került látóterünkbe az l(3)S011027 vonal, amelynek homozigóta, vándorló korú (AEL120h) lárváinak zsírtestében sem akridin oranzs- (26. ábra, felső képsor), sem pedig LysoTracker Red festéssel nem tudtuk az auto- és a heterofág (endocitotikus) eredetű granulumok jelenlétét kimutatni (26. ábra, alsó képsor).



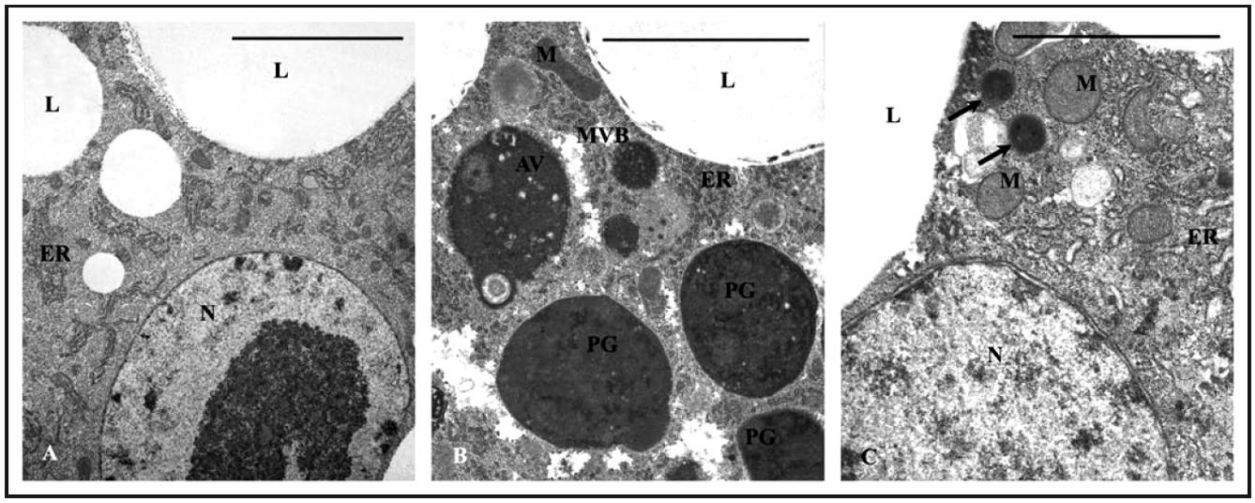
26. ábra. A vad típusú, táplálkozó periódusban lévő (AEL86h) lárvák zsírtestében nincsenek jelen azok az akridin oranzs-, illetve LysoTracker Red-pozitivitást mutató granulumok (A és D képek), amelyek viszont egy nappal később, a már vándorló (AEL120h) lárva trofocitáinak meghatározó sejtorgenellumai lesznek (B és E képek). Ezzel szemben az l(3)S011027 vonal ugyanilyen idős (AEL120h), homozigóta lárváinak zsírtest-sejtjei egyáltalán nem tartalmaznak akridin oranzzsal vagy Lysotracker Reddel festődő granulumokat (C és F képek). Méretjel: 100 µm.

Az előbbi, elsősorban vizuális-kvalitatív megfigyelésünket egy egyszerű statisztikai elemzéssel is megerősítettük, amelyből kiderült, hogy a mutáns lárvák trofocitái gyakorlatilag képtelenek az acridin oranzzsal megfesthető (protein)granulunok előállítására, viszont kis mennyiségben képesek Lysotracker Red-pozitivitást mutató granulumok megjelenítésére. Ez utóbbiak azonban mind méretben, mind számban jelentősen elmaradnak a vad típusú lárvában megfigyelhetőtől (27. ábra)

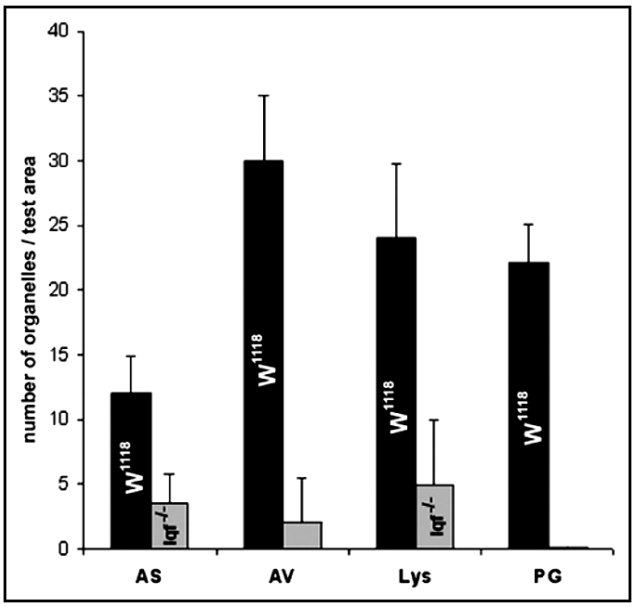


27. ábra. Az akridin oranzzsal, illetve a Lysotracker Reddel jelölhető granulumok száma az azonos korú vad típusú (W) és a mutációt hordozó (S011027) homozigóta lárvák zsírtestében, 1600 négyzetpixel méretű területekre vetítve.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatok teljes mértékben alátámasztották a fénymikroszkópos szinten megfigyelt jelenségeket. A vad típusú (w^{1117}), táplálkozó periódusban lévő, (AEL86h) lárvákból származó mintákban nem találtunk sem autofág vakuólákat, sem pedig protein granulumokat (28. ábra, A kép). Mindkét, a metamorfózis előtti időszakra jellemző struktúra viszont nagy számban volt jelen a vad, már vándorló stádiumban lévő (AEL120h) lárvákból készített mintákban (28. ábra, B kép). Az l(3)S011027 vonal homozigóta (AEL120h) lárváinak zsírtestében azonban autofagoszómák és autofág vakuólák csak elvétve, heterofág eredetű organellumok pedig egyáltalán nem voltak megtalálhatóak, ezekben a trofocitákban csak néhány, a szokásosnál kissé nagyobb lizoszóma jelenlétét tudtuk kimutatni (28. ábra, C kép). Az előbbi megfigyeléseinket egy egyszerű morfometriai analízissel is alátámasztottuk (29. ábra).



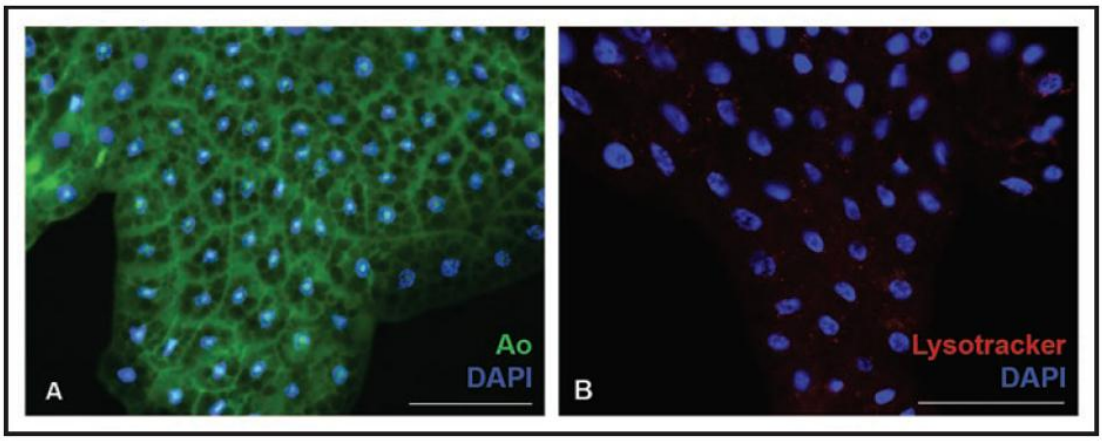
28. ábra. A normális fejlődésű, vad típusú lárvák zsírtest-sejtjeiben a táplálkozó időszakban nem mutatható ki sem auto-, sem pedig heterofág eredetű organellum (A kép), ezek csak a vándorlási periódusban jelennek meg, egyre növekvő számban a trofocitákban (B kép). Az l(3)S011027 vonal vándorló stádiumban lévő homozigóta lárvák zsírtest-sejtjeiben csak elvétve találunk autofág struktúrákat vagy nagyobb lizoszómákat, míg a heterofág úton kialakuló protein granulumok teljesen hiányoznak ezekből a sejtekből (C kép). L.lipidcseppek, ER: endoplazmatikus hálózat, N: sejtmag, MVB: multivezikuláris test, PG: fehérje granulum, M: mitokondrium, a nyilak a szokásosnál nagyobb méretű lizoszómákra mutatnak. Méretjel: 10 µm.



29. ábra. Az autofagoszómák (AS), az autofág vakuólumok (AV), a lizoszómák (Lys) és a protein granulumok (PG) relatív mennyisége a vándorló korú, vad típusú (W^{1117}) és az l(3)S011027 mutáns lárvák trofocitáiban.

4.4.2. Az l(3)S011027 vonal homozigóta egyedei 20-HE kezeléssel nem voltak menekíthetők

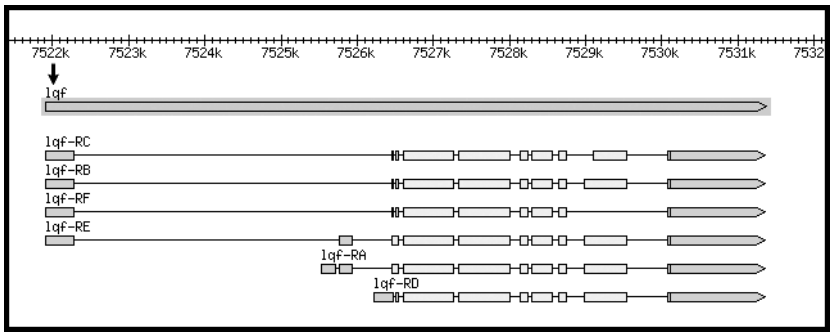
A 20-HE szintemelkedés a normális fejlődés folyamán a metamorfózist megelőző időszakban serkenti az autofág és az endocitotikus folyamatokat, ezért ennek a vonalnak az esetében is fontos volt annak megvizsgálása, hogy vajon nem a vedlési hormon szignalizációjának hibája okozza-e a tapasztalt fenotípust. Míg a négy órás 20-HE kezelést követően a vad típusú lárvák zsírtestében jelentős számú akridin oranzs- illetve LysoTracker Red pozitív struktúra jelent meg (14. ábra A kép), addig az l(3)S011027 vonal homozigóta lárváinak trofocitáiban viszont még 8 órás 20-HE kezelést követően sem találtunk akridin oranzzsal festődő struktúrákat. (30. ábra A kép). Ugyanakkor a kezelés hatására kisszámú, LysoTracker Reddel jelölhető organellum jelent meg a mutánsok zsírtest-sejtjeiben (30. ábra B kép)



30. ábra. A 20-HE kezelést követően a homozigóta mutáns lárvák továbbra sem voltak képesek akridin oranzs-pozitív granulumok előállítására (A kép), viszont trofocitáikban néhány LysoTracker reddel festődő struktúra megjelenését detektáltuk (B kép). Méretjel: 100 μm.

4.4.3. A P-elem inzerció helyének meghatározása az l(3)S011027 vonalban

Inverz PCR metodikával meghatározva a transzpozon helyét a genomban a Flybase adatbázis (http://flybase.org/) segítségével igazoltuk, hogy a P-elem a *liquid facets* gén (*lqf*, CG8532, FBgn0028582) startpontjától - a kódoló szekvencia irányába - 32 bázispárnyira található. Ennek alapján a mutációnak érintenie kell az lqf-RC, -RB, -RE és –RF transzkripteket, és mivel jelenleg a génen belül nem tételeznek fel további startponto(ka)t, ezért valószínűleg a rövidebb lqf-RA és –RD transzkriptek sem jöhetnek létre (31. ábra).



31. ábra. Az *lqf* gén és a róla készülő transzkriptek szerkezete (http://flybase.org/). A fekete nyíl az l(3)S011027 vonalban ülő transzpozon helyét jelöli.

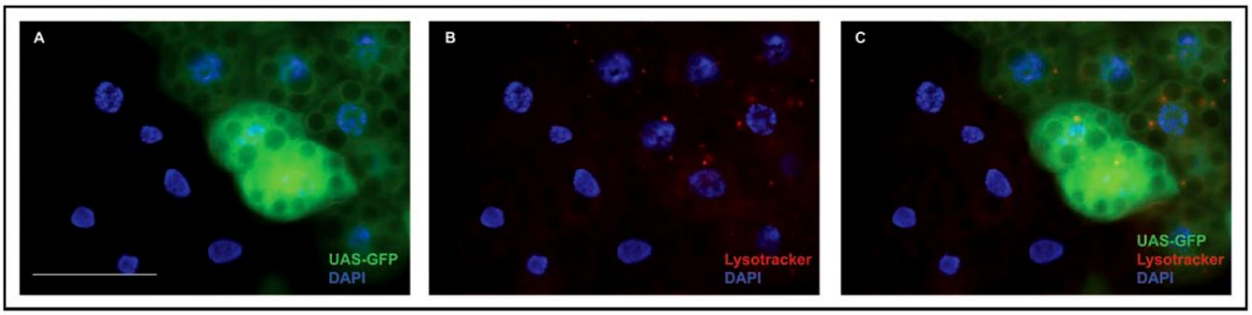
Bár az inverz PCR eredménye egyértelműen megmutatta, hogy az l(3)S011027 törzsben csupán egyetlen P-elem található, annak lehetőségét, hogy a tapasztalt fenotípust mégsem a P-elem beépülése, hanem esetleg egy, a transzpozonnal azonos kromoszómán lévő háttérmutáció okozza, azt további keresztezésekkel tudtuk kizárni. Mivel az *lqf* gén a harmadik kromoszómán, a 66A4-66A5 citológiai helyen található, ezért az l(3)S011027 vonal heterozigóta egyedeit az ebben a kromoszómális régióban deléciót hordozó *pbl-X1(65F, 66B)* törzzsel kereszteztük be. Mivel a deléciós vonallal történő keresztezés az F1 nemzedékben nem szüntette meg (nem komplementálta) a tapasztalt fenotípust, így egyfelől kizárhattuk annak a lehetőségét, hogy egy háttérmutáció okozta az autofág defektust, másfelől megerősíthettük azt az álláspontunkat, hogy az *lqf* génben lévő P-elem okozta funkcióvesztés áll a jelenség mögött.

Ez utóbbit két másik, az *lqf* génben igazoltan mutáció hordozó, homozigóta formában letalitást mutató törzs l(3)S011027 vonallal történő keresztezésével is igazoltuk. Mind az lqf^{ari}*/TM6B* x $lqf^{l(3)S011027}$*/TM6b*, mind pedig az lqf^{L71}*/TM6b* x $lqf^{l(3)S011027}$*/TM6b*

keresztezésekből csak a TM6b balanszert hordozó heterozigóták voltak életképesek, a heteroallélikus állatok nem.

4.4.4. Mitotikus klónok vizsgálata

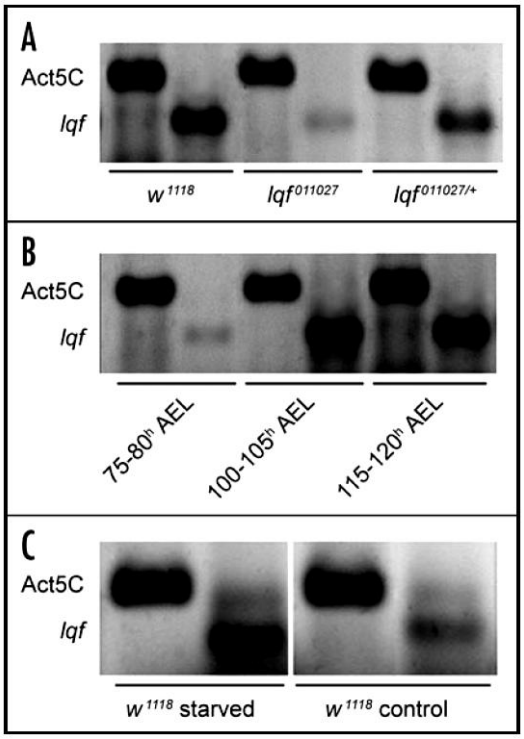
Amennyiben a *hsFlp; cgGal4, UAS-GFP, FRT80B* vonalból származó szüzeket összekeresztezzük az lqf^{L71}*FRT80B/TM6b* hímekkel, úgy egy olyan vonal birtokába jutunk, amelyben az embrionális fejlődés elején alkalmazott rövid idejű hősokkal mitotikus rekombinációt lehet kiváltani. A keletkező lqf^{L71} homozigóta sejtklónokból hiányozni fog a zöld fluoreszcens fehérje (GFP), viszont a szomszédos sejtekben – amelyek vad típusúak lesznek -kétszer annyi lesz a GFP mennyisége. Az ilyen, zsírtestükben sötét- illetve zölden erősen világító ikerfoltokat hordozó lárvák normális fejlődésűek Amennyiben ezeket a lárvákat 90 órás korukban (AEL90h) négy órán át tartó aminosav megvonásnak tesszük ki, úgy trofocitáik közül az lqf^{L71}/+, illetve a +/+ genotípusúak nagyszámú, az autofágia megindulását jelző LysoTracker Red pozitivitást mutató granulumot halmoznak fel, viszont erre az lqf^{L71}/ lqf^{L71} klónok továbbra sem képesek (32. ábra).



32. ábra. A négy órán keresztül aminosav-megvonással éheztetett lárvák lqf^{L71} mutációra nézve heterozigóta (halványzöld)-, illetve a vad típusú (erős zöld színű) zsírtest-sejtjeiben (A kép) megjelentek az autofágiára utaló LysoTracker Red festődésű granulumok (B és C képek). Ezzel szemben viszont az lqf^{L71}/lqf^{L71} homozigóta (zölden nem világító) trofocitákban ilyen granulációt nem találunk (A-C képek). Méretjel: 100 µm.

4.4.5. Az *lqf* génről átíródó mRNS szintjének alakulása vad típusú és mutáns lárvákban

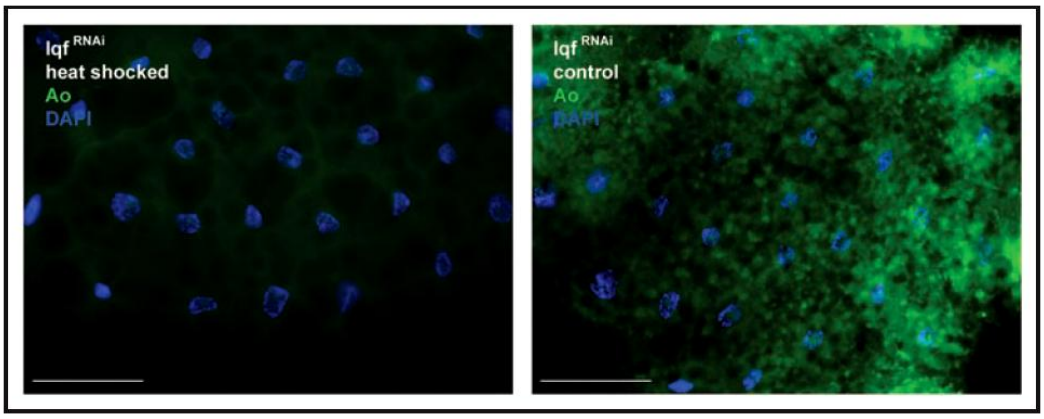
Reverz transzkriptáz-PCR (RT-PCR) technikát alkalmazva megvizsgáltuk, hogy az $lqf^{d(3)S011027}$ vonal hetero- és homozigóta lárvái - a vad típusú kortársaikhoz képest - milyen mennyiségben képesek az lqf-mRNS-t szintetizálni, valamint, hogy a vad típusú lárvákban az utolsó lárvastádium során, illetve éhezéskor hogyan változik az *lqf* génről átíródó mRNS szintje. A vándorló időszakban lévő (AEL120h) $lqf^{d(3)S011027}$/ $lqf^{d(3)S011027}$homozigóta lárvákban csak nagyon kis mennyiségű *lqf* transzkriptumot sikerült kimutatnunk, szemben a hasonló korú heterozigóta- és vad típusú társaikkal (33. ábra, A kép). A homozigóta mutáns lárvákban detektált minimális lqf-mRNS jelenlétének oka a P-elem inzerció esetén gyakran megmutatkozó hipomorf hatás, következménye pedig az, hogy ezek a lárvák képesek a metamorfózis kezdetéig életben maradni. Ezt követően azt vizsgáltuk meg, hogy van-e változás az lqf gén expressziójában az auto- és heterofág folyamatok fiziológiás beindulásakor, vagy az azt megelőző időszakban. Vad típusú, táplálkozó (AEL75-80h), korai- (AEL100-105h) és késői (AEL115-120h) vándorló lárvákban vizsgálva az *lqf* transzkriptum mennyiségét azt tapasztaltuk, hogy az igen jelentősen megnövekszik a vándorlás kezdetekor, és folyamatosan magas szinten marad a prepupa stádium létrejöttéig (33. ábra, B kép). Ezzel összhangban azt találtuk, hogy a vad genotípusú, táplálkozó (AEL75-80h) lárvákban az éheztetéssel indukált autofágia esetében is jelentősen megemelkedett az *lqf* gén expressziója (33. ábra, C kép). Ezekhez a szemikvantitatív kísérletekhez a folyamatosan kifejeződő aktin5C (Act5C) mRNS mennyiségét használtuk viszonyítási alapként.



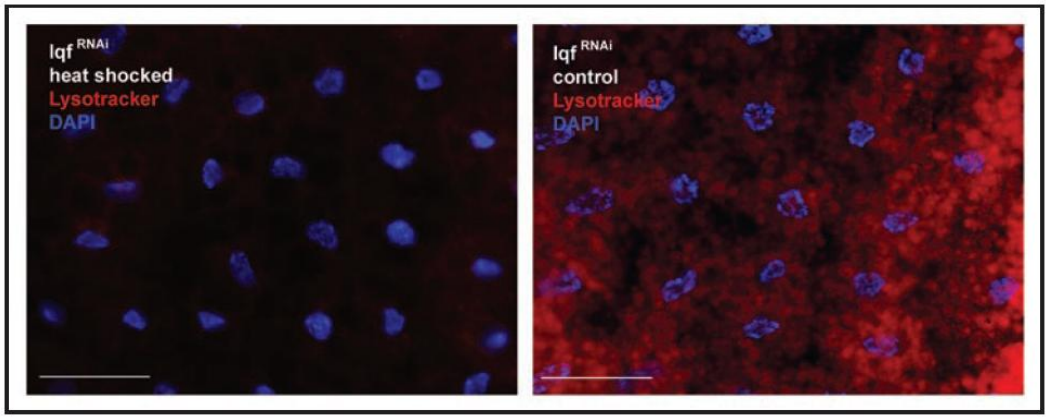
33. ábra. A: Az lqf gén kifejeződése a vad típusú- (W^{1114}), az $lqf^{d(3)S011027}$/ $lqf^{d(3)S011027}$homozigóta- és az $lqf^{d(3)S011027}$/ + *heterozigóta* lárvákban. B: Az lqf gén expressziójának változása vad típusú lárvákban, az utolsó lárvastádium idején. C: Az éheztetés hatása az lqf gén kifejeződésére, vad típusú, táplálkozó lárvákban.

4.4.6. Az lqfRNAi hatása a fiziológiás auto- és heterofágiára

Annak bizonyítására, hogy az l(3)S011027 vonalban az auto- és heterofág folyamatok valóban az *liquid facets* gén elégtelen expressziója miatt gátoltak, az *lqf* gén valamennyi transzkriptumában megjelenő 6. exon (FBgn0028582:6) egy darabjára tervezett UAS-lqfIR konstrukció felhasználásával négy *Drosophila* transzgén vonalat állítottunk elő (*lqf6, lqf7, lqf10, lqf12*). Az RNS interferencia kiváltásához szükséges Gal4 fehérjét kifejező törzsben – az RNAi hatásfokának emelése végett – egy UAS-DCR2 konstrukció is jelen volt *(UAS-DCR2; hsGal4)*. Amennyiben a keresztezéssel létrehozott *UAS-lqfIR/UAS-DCR2; hsGal4/+* genotípusú, addig 18°C-on tartott, AEL70h korú lárvákat életük következő három napjában 32°C-on tartottuk, abban az esetben a zsírtest-sejtjeikben sem akridin oranzs-, sem pedig LysoTracker Red-pozitív granulumok jelenlétét nem tudtuk detektálni (34. és 35. ábra, bal oldali képek). Ezek a lárvák egy megnyújtott posztembrionális fejlődés után sem voltak képesek a metamorfózisra. Ezzel szemben a folyamatosan 18°C-on tartott testvéreikben - ugyanebben az időpontban - mindkét festékkel jelölhető, erőteljes granuláció jelentkezett (34. és 35. ábra, jobb oldali képek), és ezek az állatok a továbbiakban is normálisan fejlődtek, majd imágóvá alakultak.



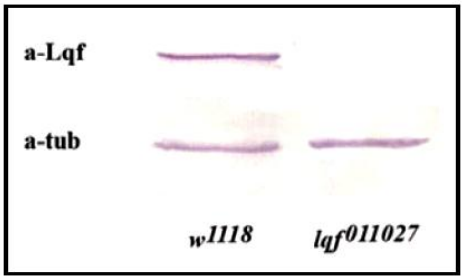
34. ábra. A hő-sokkal indukált lqfRNAi következtében a vándorló korú lárvák zsírtestében nem jelennek meg az akridin oranzzsal festődő granulumok. Méretjel: 100 µm.



35. ábra. Az lqf-RNS interferencia hatása az LysoTracker Reddel jelölhető granuláció megjelenésére. Méretjel: 100 µm.

4.4.7. Az anti-Lqf ellenanyag előállítása és ellenőrzése

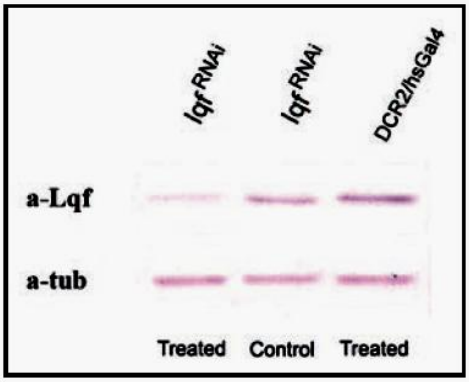
Az lqf gén 6. exonjának (FBgn0028582:6) egy szakaszát expressziós vektorba klónoztuk, majd az ennek segítségével termeltetett fehérjével egereket immunizáltunk. Az így kapott poliklonális szérum Western blotton a vad típusú, vándorló lárvák homogenátumából készített mintában egy 95 kDa molekulatömegű fehérjével adott keresztreakciót, ami egyaránt megfeleltethető a 824 vagy 831 aminosavból álló *lqf*-RB, -RC, -RE vagy –RF transzkriptumokról készülő fehérjéknek éppúgy, mint az *lqf*-RA vagy –RD mRNS-ek által kódolt proteineknek. Ugyanakkor az $lqf^{l(3)S011027}$homozigóta lárvák mintáiban az antiszérum egyáltalán nem mutatott keresztreakciót (36. ábra).



36. ábra. Az anti-Lqf ellenanyag a vad típusú lárvákból készített mintában felismeri az Lqf fehérjét, míg ez az $lqf^{l(3)S011027}$homozigóta lárvákból hiányzik. A minták fehérjetartalmát a tubulin segítségével állítottuk be azonos mennyiségűre.

Az előző pontban ismertetett UAS-lqfIR konstrukciót hordozó transzgén vonalakat is megvizsgáltuk, hogy az RNS csendesítést követően vajon az Lqf fehérje is eltűnik-e a trofocitákból? A Western blot vizsgálatok alapján kijelenthetjük, hogy a sikeres RNS interferenciával párhuzamosan a lárvákban az Lqf fehérje mennyisége a kimutathatósági határ alá csökkent (37. ábra, első oszlop). Amennyiben nem hő-sokkolt, *UAS-lqfIR/UAS-DCR2; hsGal4/+* genotípusú lárvákat vizsgáltunk, úgy azokban az Lqf mennyisége a vad típuséhoz

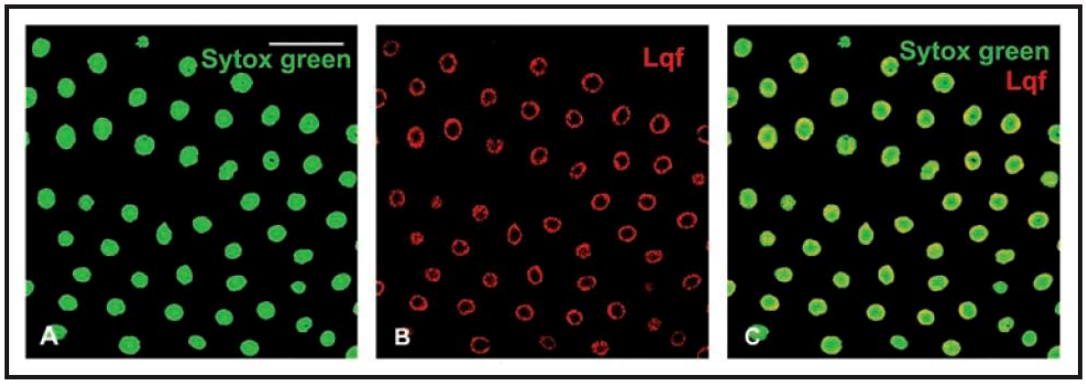
hasonló volt (37. ábra, második oszlop), éppúgy, mint az UAS-lqfIR-t nem tartalmazó, csupán az *UAS-DCR2; hsGal4* konstrukciókat hordozó, hő-sokkolt lárvákban (37. ábra, harmadik oszlop).



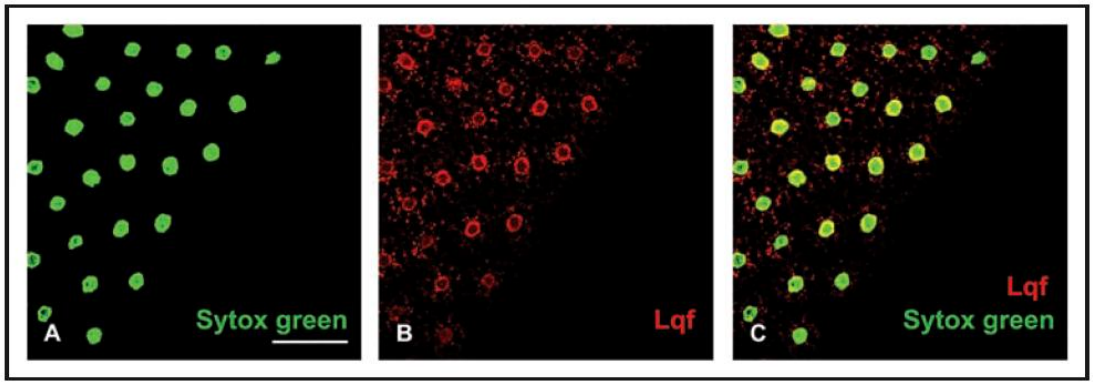
37. ábra. Az Lqf fehérje nem volt kimutatható az RNS csendesített lárvákban, viszont az azonos genotípusú, de nem hő-sokkolt lárvákban jelen volt, éppúgy, mint a csak az UAS-lqfIR aktiválásához szükséges konstrukciókat hordozó, de hő-sokknak kitett lárvákban. A minták fehérjetartalmát a tubulin segítségével állítottuk be azonos mennyiségűre.

4.4.8. Az Lqf fehérje eloszlása a trofocitákban az utolsó lárvastádium idején

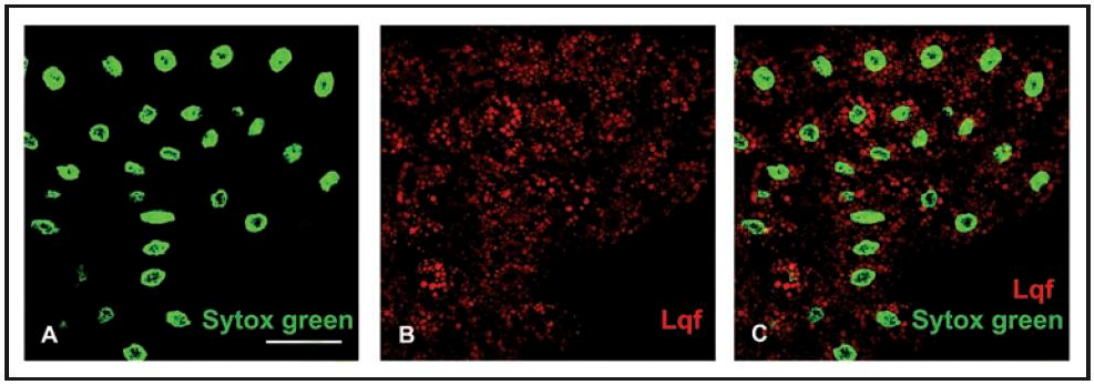
Az anti-Lqf ellenanyag segítségével immunlokalizációs vizsgálatokat végeztünk táplálkozó, korai és késői vándorló stádiumban lévő, vad típusú lárvákon. A 4%-os paraformaldehiddel végzett rövid idejű fixálás után az AEL80h korú lárvák zsírtestében az Lqf protein jelenléte a sejtmag perifériáján volt detektálható (38.ábra, A-C képek). Ez a jellegzetes lokalizáció a vándorló stádium elején (AEL110h) megváltozott: anélkül, hogy a sejtmag körüli jel gyengült volna, Lqf-pozitívitást mutató granulumok jelentek meg a trofociták citoplazmájában (39. ábra, A-C képek). Ezzel szemben a prepupa stádiumot megelőző időszakban (AEL130h) markáns változást tapasztaltunk az Lqf fehérje sejten belüli lokalizációjában: a fehérje perinukleáris akkumulációja megszűnt, ugyanakkor a granulumok jelölődése igen erőteljessé vált (40. ábra, A-C képek)



38. ábra. A táplálkozó lárvák zsírtestében az Lqf fehérje a sejtmagok perifériáján található. Méretjel: 100 μm.



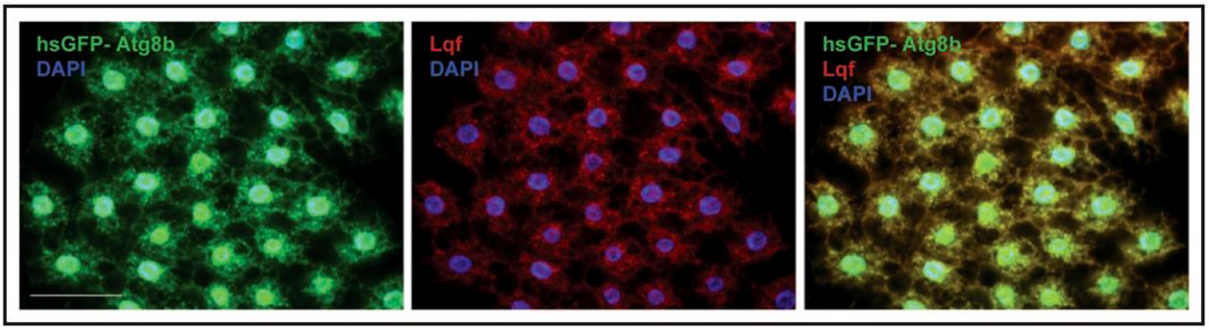
39. ábra. A korai vándorló lárvák zsírtest-sejtjeiben az Lqf fehérje a formálódó granulumokban is megtalálható. Méretjel: 100 μm.



40. ábra. A vándorló periódus végére az *lqf* gén terméke csak a granulumok területén mutatható ki. Méretjel: 100 μm.

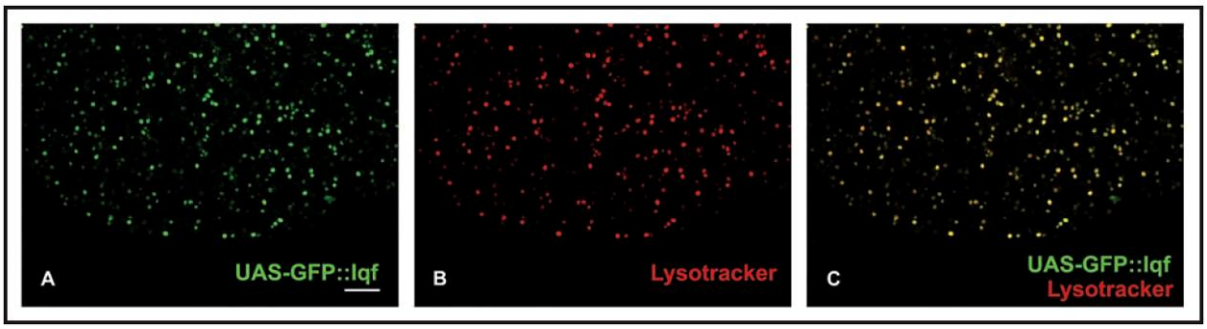
4.4.9. Az *lqf* gén terméke kolokalizációt mutat az autofagoszóma, illetve az autofág vakuólum markereivel.

Az Atg8 fehérje az egyik legjobb - és ezért széles körben elfogadott – autofagoszóma-marker. Amennyiben vándorló korú, *hsGFP::Atg8* konstrukciót expresszáló transzgén lárvák zsírtestén végeztük el az Lqf kimutatására szolgáló immuncitokémiát, abban az esetben a két fehérje igen erős kolokalizációját észleltük a citoplazmában lévő granulumokon (41. ábra, A-C képek).



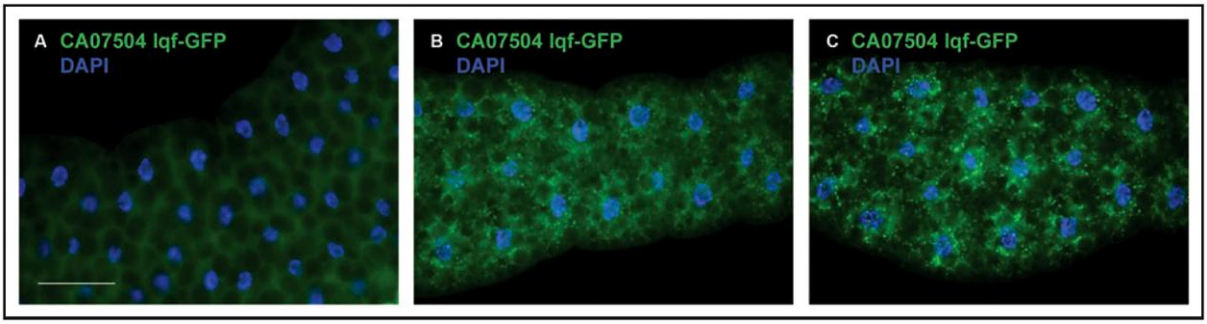
41. ábra. Az Lqf protein eloszlása a vándorló lárva trofocitáiban pontosan megegyezik az Atg8 eloszlásával. Méretjel: 100 µm.

Vizsgálataink során legtöbbször a LysoTracker Red festékkel detektáltuk az autofág struktúrák jelenlétét. Mivel ezt a fluorofór vegyületet csak fixálatlan szövet esetében lehet használni, ezért annak a kérdésnek az eldöntésére, hogy a LysoTracke Red pozitivitást mutató granulumok egyben tartalmazzák-e az Lqf fehérjét is, létrehoztunk egy *UAS-GFP::Lqf* konstrukciót hordozó transzgén muslica vonalat. A GFP::Lqf fehérje megjelenését hsGal4 segítségével kiváltva azt tapasztaltuk, hogy a GFP::Lqf fúziós fehérje teljes mértékű kolokalizációt mutatott a LysoTracker Red-del megjelölhető struktúrákkal (42. ábra, A-C képek).



42. ábra. A GFP::Lqf fehérje is a vándorló lárva zsírtest-sejtjeinek granulumaiban halmozódik fel (A kép), amelyeket a LysoTacker Red festék is jelöl (B kép). Az egymásra vetített képen (C kép) jól látható, hogy a kétféle jel teljesen átfed. Méretjel: 20 µm.

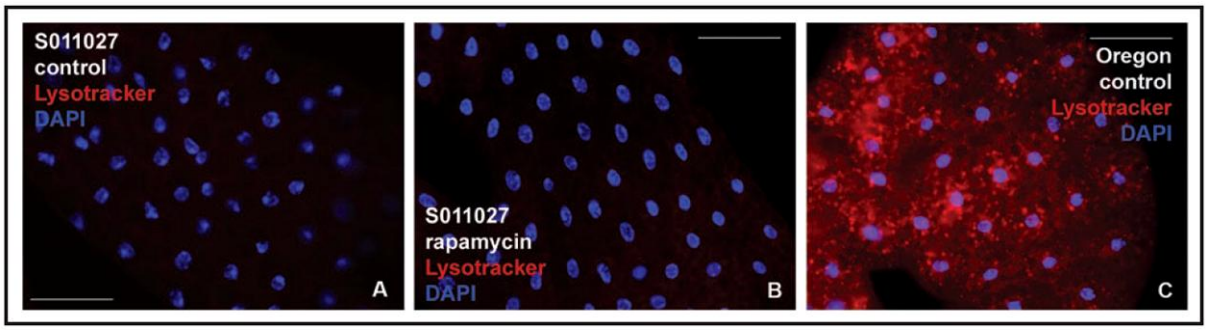
Egy adott konstrukcióról szintetizálódó fehérje mennyiségét nem a fiziológiai paraméterek, hanem az expresszióhoz használt rendszer erőssége és annak alkalmazási ideje határozza meg, és ez bizonyos esetekben hatással lehet az adott fehérje lokalizációjára is. Ezt a problémát lehet kiküszöbölni a Flytrap törzsgyűjtemény vonalaival, ahol az eredeti gén szekvenciájába, azzal megegyező leolvasási keretbe illesztik be a GFP-t kódoló DNS szakaszt. A CA07504 vonal az lqf gén végére illesztett GFP szekvenciát hordoz. Az erről a génről szintetizálódó Lqf-GFP fehérje a táplálkozó állatokban gyenge citoplazmatikus lokalizációt mutatott (43. ábra, A kép). Ezzel szemben, a korai és a késői vándorló lárvák trofocitáiban egyre kifejezettebb granuláris jelölést tapasztaltunk (43. ábra, B és C képek).



43. ábra. A saját promótere és enhancere szabályozása alatt kifejeződő, GFP-vel ellátott *lqf* gén terméke a táplálkozó lárva zsírtest-sejtjeiben a citoplazmában található (A kép). A korai (B kép) és a késői (C kép) vándorló lárva trofocitáiban viszont az Lqf-GFP az egyre élesebb kontúrokkal kirajzolódó granulumokban mutatható ki. Méretjel: 100 µm

4.4.10. Az *lqf*^{011027} homozigóta lárvákon *in vivo* végzett rapamicin kezelés hatása

Az előzőekben ismertetett eredményeink alapján az *lqf* gén termékének részvétele az autofág folyamatban bizonyítottnak tekinthető. Az autofágia központi regulátora a target of rapamicin (TOR) kináz, melynek aktivitását rapamicin kezeléssel meg lehet gátolni, és ezáltal az adott sejtben autofágiát lehet indukálni. Vizsgálatunk utolsó lépésében arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az Lqf fehérje részvétele az autofágia folyamatában a TOR-hoz viszonyítva attól korábban („upstream") vagy pedig azt követően („downstream") szükséges. Amennyiben az előbbi feltételezés az igaz, úgy a rapamicin kezelést követően LysoTracker Red pozitivitást mutató autofág granulumoknak kell megjelenniük a mutáns lárvák trofocitáiban, viszont ha az Lqf a TOR-t követően vesz részt a folyamatban, akkor a granulumok megjelenése elmarad. Mivel a vándorló (120h AEL) korú *lqf*^{011027} homozigóta lárvákon *in vivo* végzett rapamicin kezelés mind a granulum-képződés (44. ábra B kép), mind pedig a lárva-letalitás menekítése szempontjából hatástalan maradt, ebből arra következtettünk, hogy az Lqf fehérje az autofágia későbbi, a TOR szabályozási pontja alatti folyamataiban vesz részt.

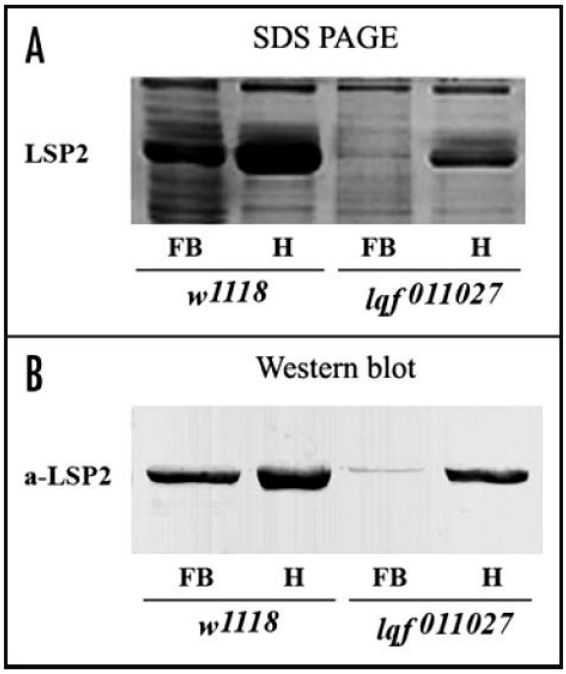


44. ábra. Az l(3)S011027 homozigóta lárva zsírtestének képe a rapamicin kezelés körülményit utánzó (A kép) és a ténylegesen megtörtént rapamicin kezelés után (B kép). A C képen az azonos korú vad típusú lárva zsírteste látható. Méretjel: 100 µm

4.4.11. Az Lqf fehérje részt vesz a lárválís szérum fehérjék receptor-mediált endocitózisában

A lárválís szérum fehérjéket (LSP) az utolsó lárvastádium első felében a zsírtest sejtjei szintetizálják és szekretálják a hemolimfába. A vándorlási periódus során viszont ugyanazek a sejtek receptor-mediált endocitózissal visszaveszik az LSP-ket, majd protein granulumok formájában raktározzák őket. Mivel az l(3)S011027 vonal homozigóta lárváinak trofocitái sem autofág-, sem pedig heterofág eredetű granulumok képzésére nem voltak képesek, ezért megvizsgáltuk, hogy az Lqf fehérje hiánya hogyan befolyásolja ezt az endocitotikus (heterofág) folyamatot.

Vad, illetve l(3)S011027 homozigóta, vándorló korú (115-120h AEL) zsírtest és hemolimfa mintákat gyűjtöttünk, majd fehérjetartalmukat 1 μm/μl értékre beállítva, SDS-PAGE segítségével ellenőriztük használhatóságukat. Ezt követően anti-LSP2 ellenanyagot használva, Western bloton kimutattuk, hogy mind a vad, mind a homozigóta mutáns lárvák képesek azonos mennyiségű LSP2 szintézisére, és annak hemolimfába történő szekréciójára (45. ábra, A és B képek H betűvel jelölt mintái). Mivel a vándorlási időszakban az LSP-k visszavétele zajlik, ezért a zsírtest-sejtekben ennek a fehérjének a mennyisége folyamatosan növekszik. Ezt a jelenséget azonban csak a vad típusú lárvák esetében tudtuk detektálni, az *lqf*^{011027} homozigóta mutánsok trofocitái erre képtelenek voltak (45. ábra, A és B képek FB-vel jelölt mintái).

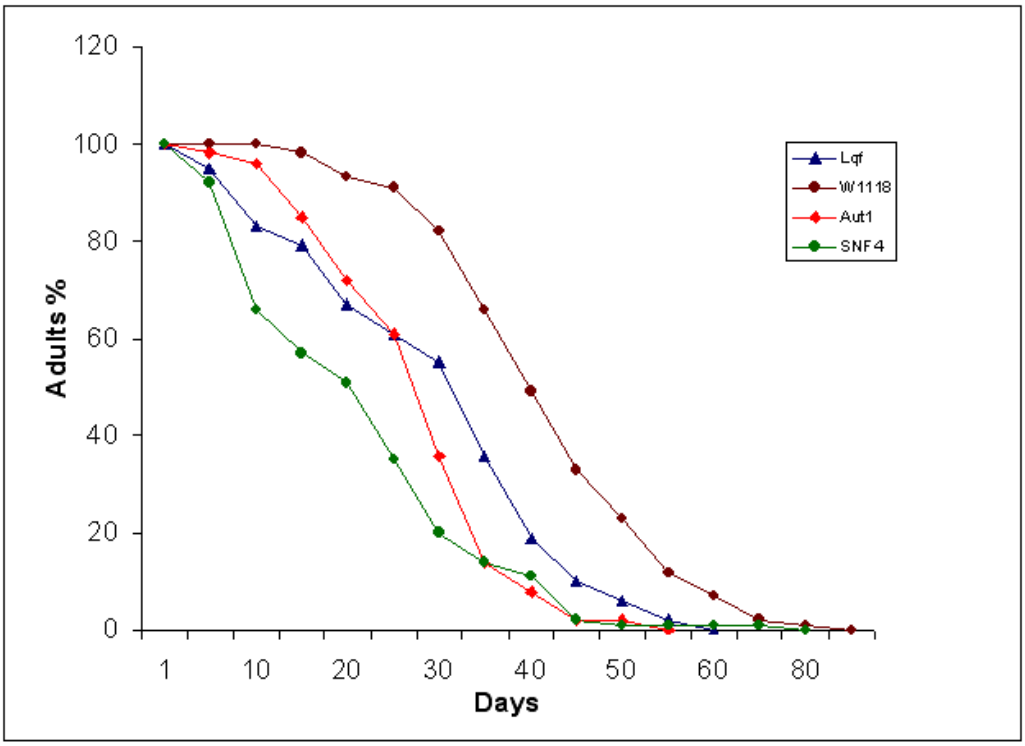


45. ábra. A vad (W^{1118}) és az *lqf*^{011027} homozigóta lárvák zsírtestéből és hemolimfájából készített minták egybevetéséből kitűnik, hogy a vándorló korú mutáns lárvák trofocitái nem képesek az LSP2 receptor-mediált endocitózisára.

4.5. Az *aut1*, az *SNF4Aγ* és az *lqf* gének termékeinek hatása az élethosszra

Az a metabolikus hálózat, amelynek az autofág mechanizmus is része, fontos szerepet játszik az öregedési folyamatok és ezen keresztül az élethossz szabályozásában azáltal, hogy fenntartja a homeosztázist mind a sejtek, mind pedig szervek és az egész szervezet szintjén. Az autofág kapacitás megváltozása – elsősorban a beszűkülése – jelentős mértékben csökkenti az adott organizmus élethosszát *(Donati és mtsai, 2001; Bergamini és mtsai, 2004; Hars és mtsai, 2007; Juhasz és mtsai, 2007; Tóth és mtsai, 2008; Vellai és mtsai, 2009; Bjedov és mtsai, 2010).*

Ennek tükrében megnéztük, hogy az általunk vizsgált autofág-gének csökkentett expressziója milyen hatással van a *Drosophila* élethosszára (46. ábra).



46. ábra. Az azonos körülmények között tartott vad típusú, hsGal4-et expresszáló legyek élethosszához képest a mérsékelten csendesített autofág géneket hordozó állatok élethossza jelentősen (22,5-40%-kal) megrövidült.

A korábbi kísérleteinkben is alkalmazott *UAS-draut1RNAi*, *UAS-SNF4RNAi*, illetve *UAS-lqfRNAi* konstrukciókat hordozó transzgén vonalakat a Gal4 fehérjét hő-sokk promóter mögött tartalmazó *(hsGal4)* törzzsel kereszteztük össze. Mivel a hő-sokk promóter nem a „minden vagy semmi" elven működik, ezért kismértékű transzkripciót indukál már az

alacsonyabb hőmérsékleteken is. Ezért, amikor a *hsGal4/+; UAS-daut1RNAi/+*, illetve a *hsGal4/+; UAS-SNF4RNAi/+*, valamint a *hsGal4/+; UAS-lqfRNAi/+* genotípusú állatokat a bábból történő kikelésük után folyamatosan 25°C tartottuk, akkor bennük az adott RNAi szekvencia expressziója - és ezzel együtt az RNS csendesítés mértéke - állandóan alacsony szintű volt. Ennek következtében mindhárom gyengén géncsendesített vonalban a felnőtt legyek féléletideje (MT50%) 22,5-40,0 %-kal lecsökkent, az azonos körülmények között tartott, *hsGal4/+; +/+* állatokéhoz képest (4. táblázat).

4. táblázat. Az autofág gének mérsékelt csendesítésének hatása az élethosszra. Amennyiben a vad típusú, hsGal4-et expresszáló legyek élethosszát 100%-nak tekintjük, akkor ehhez képest az autofág gének csendesítése 22,5-40%-os élethossz-rövidülést okoz.

MT(50) %	
W1118	100,0
Lqf	87,5
Aut1	77,5
SNF4	60,0

A kísérleteinkben alkalmazott folyamatos, kismértékű RNS csendesítés nem érintette az állatok fertilitását és nem tapasztaltunk különbséget az egyes géncsendesített vonalakon belül a nőstények és a hímek élethossz-változása között.

5. Megvitatás

A fejlődő, vagy éppen a kifejlett szervezetekben lezajló szöveti differenciálódás és az azt követő morfológiai változásokban az autofág mechanizmusnak kiemelt fontosságú szerepe van. Az autofágia, mint a programozott sejthalál II. típusa (PCD II), elsősorban akkor kerül előtérbe, amikor nagy tömegű sejt, vagy szövet eliminálására van szükség, mint például az emlősök esetében a pro- és a mezonefrosz telepének felszámolása, hímekben a Müller-féle cső eliminálása, illetve kasztrálás után a prosztata állományának jelentős redukciója, nőstényekben a posztlaktációs periódusban a tejmirigyek visszafejlesztése. Hasonló módon történik a kétéltűek lárváinak farokregressziója, illetve a holometabola rovarok lárvális szöveteinek lebontása is, a metamorfózis idején (*De Duve és Wattiaux, 1966; Helminen és Ericsson, 1970; Helminen és mtsai, 1970; Schweichel és Merkel, 1973; Watanabe és Sasaki, 1974; Sass és Kovács, 1975; Clarke, 1990; Lockshin és Zakeri, 2004*). Az utóbb említettek közé tartozó *Drosophila melanogaster* esetében is már az embrionális fejlődés során megtörténik a lárva és az imágó szöveteinek elkülönülése, és ez az eltérő irányú differenciálódás vezet oda, hogy a lárvális szövetek a metamorfózis során programozott sejtpusztulás révén lebomlanak. Ebben a folyamatban az autofágia (PCD II) indítja meg és viszi csaknem végig a sejtpusztulás menetét, de az utolsó lépéshez sok esetben az apoptózis (a PCD I. típusa) is hozzájárul *(Lee és Baehrecke, 2001; Lee és mtsai, 2003; Martin és Baechrecke, 2003; Müller és mtsai, 2004; Berry és Baehrecke, 2008; Facey és Lockshin, 2010).*

A posztembrionális periódus a teljes átalakulással fejlődő rovarok esetében az intenzív táplálkozás és a növekedés időszaka, melynek során az egyed felkészül az imágó testének metamorfózis alatt történő kialakítására. Ennek következményeképpen a petéből történő kibújást követő életszakaszban elsősorban a lárvális szövetek és szervek azok, amelyek folyamatosan proliferálnak, míg a majdani imaginális szerveket kialakító sejtek csak a vedlések időszakában bekövetkező mitózisokkal tudják számukat növelni. Az utolsó lárvastádium vándorlási szakaszában megkezdődik a lárvális szövetek sejtjeinek autofágiával történő lebontása, és a belőlük felszabaduló monomerek építőanyag- és energiaforrásként szolgálnak az imaginális szervek kialakításához a metamorfózis idején *(Locke és Sykes, 1975; Sass és Kovács, 1975; Larsen, 1976; Sass és Kovács, 1977; Butterworth és mtsai, 1988; Sass és mtsai, 1989; Lee és Baehrecke, 2001; Thummel, 2001; Lee és mtsai, 2002; Scott és mtsai,*

2004; Yin és Thummel, 2005; Hennig és mtsai, 2006; Neufeld, 2008; McPhee és Baehrecke, 2009; Chang és Neufeld, 2010).

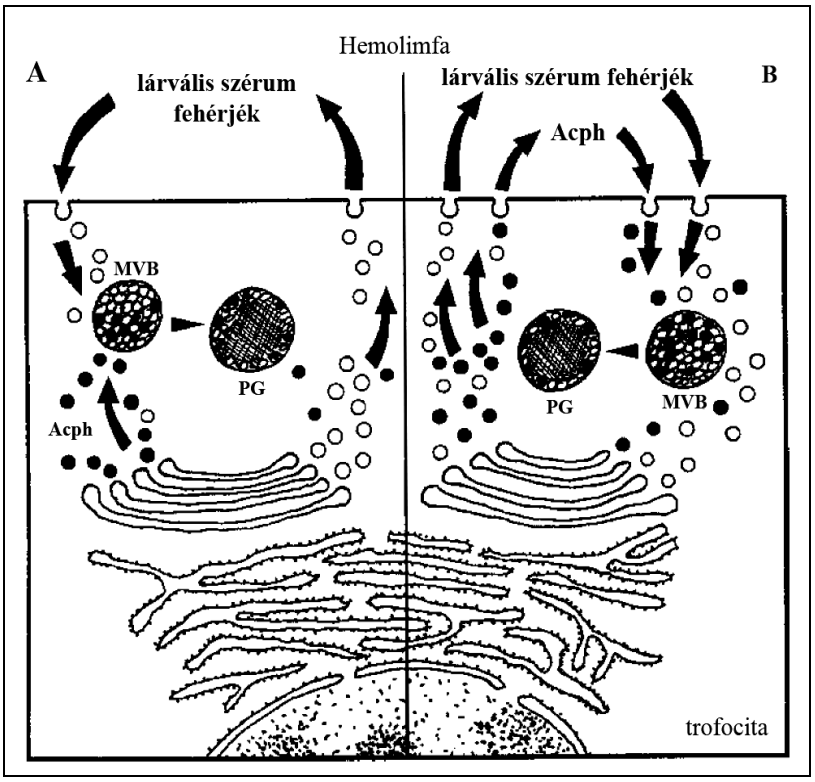
Az autofágia folyamata – függetlenül attól, hogy fejlődési- vagy stressz által indukált autofágiáról beszélünk – precízen szabályozott és csak meghatározott feltételek mellett indukálódó sejtbiológiai reakció. Kísérletes munkánk során ennek a regulációs rendszernek egyes elemeit azonosítottuk és vizsgáltuk meg a holometabola rovarok lárvális szöveteiben.

A metamorfózist közvetlenül megelőző időszakban a lárvális szervek lebontását végző autofág folyamatok beindítását a vedlési hormon titerének megemelkedése okozza *(Sass és Kovács, 1975; 1977; Dai és Gilbert, 1999; Lee és Baehrecke, 2001; Thummel, 2001; Lee és mtsai 2002; Rusten és mtsai, 2004).* A 20-HE a sejtekbe belépve saját, több izoformában (EcRA, EcRB1 és EcRB2) létező intracelluláris receptorához kötődik, és azzal együtt önállóan, vagy az *ultraspiracle* gén termékével heterodimert képezve a sejtmagba transzlokálódik, ahol génexpressziót képes kiváltani *(Koelle és mtsai, 1991; Yao és mtsai, 1992; Riddiford, 1993; Talbot és mtsai, 1993; Robinow és mtsai, 1993).* Ez történik a lárvális szövetek pusztulásának indukciójakor is; laboratóriumunkból került ki az első olyan eredmény, amelyik egyértelműen bebizonyította, hogy a génexpresszó általános csendesítése esetén a fejlődési autofágia teljes mértékben gátlódik *(Sass és Kovács, 1980).* Ugyanakkor más eredményeink arra engedtek következtetni, hogy a fehérjék foszforilációja vagy defoszforilációja szintén lényeges az autofág folyamatok megindulása szempontjából *(Sass, Kőműves, Csikós, nem publikált eredmények).* Mivel akkori ismereteink szerint az intracelluláris cAMP szintemelkedés állhatott a fehérjék foszforilációs állapotának megváltozása mögött, ezért megvizsgáltuk, hogy a két folyamat - az endogén 20-HE hemolimfatikus titerének és a zsírtest cAMP tartamának változása az utolsó lárvastádium során – mutat-e bármilyen összefüggést. Eredményeink szerint a két vegyület mennyiségének változása szoros korrelációban áll, és az exogén vedlési hormon is képes megemelni a trofociták cAMP tartalmát *(Sass és mtsai, 1983).* Eredményeink publikálása óta kiderült, hogy az intracelluláris cAMP szint megemelkedése nélkülözhetetlen az autofág folyamat korai, membránszerveződéssel és –átrendeződéssel járó lépéseinek szabályozásában *(Holen és mtsai, 1996; Budovskaya és mtsai, 2004; Kimura és mtsai, 2004).* A legfrissebb, mezenhimatikus törzs-sejteken (mesenchymal stem cells, MSCs) kapott eredmények azt valószínűsítik, hogy a sejten belüli cAMP tartalom megemelkedése aktiválja az ERK-t (extracellular signal-regulated protein kinase), amely a cyclin E inaktiválása útján serkenti az Atg6/Beclin1 felhalmozódását a sejtmag körüli régióban, ez pedig a fagofór iniciálásához,

azaz az autofágia megindulásához vezet *(Ugland és mtsai, 2011).* Mivel a 20-HE az autofágia indukciójakor a PI3K útvonalon keresztül fejti ki a hatását *(Rusten és mtsai, 2004),* így jelenlegi tudásunk szerint sem az endogén, sem pedig az exogén vedlési hormon nem vezethet közvetlenül a cAMP szint változásához.

A rovarlárvák zsírtestében az autofágia megindulását – kis késéssel – követik a heterofág (endocitotikus) folyamatok, azaz a lárvális szérum fehérjék szelektív visszavétele a hemolimfából *(Locke és Collins 1965; 1966; 1968; Tojo és mtsai, 1978; Lepesant és mtsai, 1982; Levenbook és Bauer, 1984; Schenkel és Scheller, 1986; Burmester és Scheller, 1992).* A receptor-mediált endocitózissal felvett szérumfehérjék az endoszómális rendszeren keresztül először multivezikuláris testekbe (MVB) kerülnek, majd ezekből – az elektronmikroszkópban sokszor kristályos szerkezetet mutató – protein granulumok keletkeznek *(Locke és Collins, 1968).* Az ebben a formában tárolt raktározó fehérjék nagy enzim-igényű lebontása a metamorfózis idején történik meg, amikor viszont a trofociták szintetikus kapacitása már erőteljesen beszűkült. Feltételeztük, hogy zsírtest-sejtekben a szérumfehérjék keletkezésével egyidőben valósul meg a lebontásukhoz szükséges enzimek szintézise és inaktív formában történő együttes szekréciójuk a hemolimfába. A kétféle fehérjepopuláció egy időben megvalósuló receptor mediált visszavétele biztosítaná, hogy a protein granulumok mindkét fehérjeféleséget tartalmazzák (47. ábra) *(Csikós és Sass, 1997).*

A para-nitrofenil-foszfatáz aktivitással rendelkező protein részt vesz a trofociták, és a bennük tárolt protein granulumok lebomlásában *(de Priester és mtsai, 1979; van Pelt-Verkuil, 1979).* Az általunk izolált fehérje ellen termeltetett antiszérum segítségével, immunbiológiai módszerekkel igazoltuk, hogy az inaktív enzimfehérje időlegesen valóban a hemolimfában halmozódik fel, majd visszavétel után jelen van a protein granulumokban. Hasonló jelenséget tapasztaltak egy cisztein pro-proteáz esetében, amelynek inaktív formában való – és ugyancsak immunhisztokémia segítségével igazolható – jelenléte a nőstény csótányok zsírtestében formálódó vitellin granulumokban volt kimutatható *(Yin és mtsai, 2001).*



47. ábra. A protein granulumokban (PG) megjelenő inaktív savas foszfatáz (Acph) klasszikus (A) és az általunk feltételezett útvonala (B). Az előző esetben az Acph-t tartalmazó vezikulumok nem űrítik ki tartalmukat a hemolimfába, hanem közvetlenül belekerülnek a multivezikuláris testekbe (MVB), majd az azokból formálódó protein granulumokba. A másik lehetőség szerint viszont az inaktív Acph is kikerül a hemolimfába, ahonnan a szérum fehérjékkel együtt szekvesztrálódik, és épül be a MVB-n keresztül a protein granulumokba *(Csikós és Sass, 1997).*

Az autolizoszómák kialakulásához vezető szignalizációs és sejtbiológiai útvonalak, valamint az azokban részt vevő molekulák vagy komplexek nagyfokú hasonlóságot mutatnak az élesztőtől kezdve az emlősökkel bezárólag *(Meijer és mtsai, 2007),* ami jelentős mértékben megkönnyíti a különféle modellszervezetek vizsgálatával nyert eredmények adaptálását.

Az élesztőben leírt aut1/atg3 gén *(Schlumpberger és mtsai, 1997)* terméke egy konjugáló enzim, amely képes kovalens kötést létesíteni az Atg8 és a foszfatidiletanolamin molekulák között *(Ichimura és mtsai, 2000).* Az így keletkezett Atg8-PE részt vesz az autofagoszóma növekedésében *(Kirisako és mtsai, 1999).* Az általunk vizsgált *Drosophila aut1 (draut1)* gén terméke szükséges a fejlődési autofágiához, hiányában a zsírtest-sejtekben nem lehet autofág struktúrákat megfigyelni *(Juhász és mtsai, 2003)*. Mivel a Draut1 az Atg8

konjugációs rendszerének tagja, megfelelő működése csak a rendszer többi komponensének (Atg4 és Atg7) jelenlétében lehetséges. Az élesztő Atg4 ortológját már korábban megtalálták a *Drosophila melanogasterben*, és igazolták, hogy az ezt kódoló gén képes menekíteni az Atg4 deléciót hordozó, és autofág defektust mutató élesztő vonalakat *(Thumm és Kadowaki, 2001).* Az Atg7 muslica ortológjának mutációi lassítják a fejlődési autofágia folyamatát, azonban még az *atg7* null mutáns egyedek is képesek szaporodóképes felnőttekké válni *(Juhász és mtsai, 2007).* Mivel az Atg7 aktiváló enzim nemcsak az atg8, hanem az atg12 konjugációs rendszernek is tagja, ennek alapján elképzelhető, hogy más, hasonló tulajdonságokkal rendelkező fehérjék képesek részlegesen helyettesíteni, illetve, hogy a metamorfózis idején tapasztalható gyors és intenzív autofágia – legalábbis bizonyos atg gének esetében - helyettesíthető egy lassú, elhúzódó folyamattal *(Juhász és mtsai, 2007).* Érdekes módon a P-elemes gyűjtemények általunk alkalmazott, ún. forward genetikai tesztelése során kiválasztott, autofágia-defektust okozó mutáns gének egyike sem mutatott ilyen jelenséget.

Az Atg8 fehérje, amely szubsztrátja az aut1/atg3 gén termékének, szintén megtalálható a muslicában, és a zsírtest-sejtekben részt vesz az autofagoszóma kialakításában *(Scott és mtsai, 2004).* Mindez arra enged következtetni, hogy az atg8 konjugációs rendszer tagjai nemcsak megtalálhatóak a *Drosophilában,* hanem autofágia esetén aktív résztvevői is az Atg8-PE komplex kialakításának.

A Draut1 fehérje a posztembrionális fejlődés teljes időszakában jelen van a lárvális szövetekben, de mennyisége megemelkedik a metamorfózist megelőző időszakban, ami jó egyezést mutat az ugyanakkor meginduló autofág folyamatokkal *(Butterworth és mtsai, 1988; Rusten és mtsai, 2004).* Ugyanakkor viszont az *aut1* gén megfelelő mértékű csendesítése késői lárva- vagy korai báb letalitást okoz, vagyis a hiányában elmaradó autofágia következtében éppúgy csökken a túlélés valószínűsége, ahogy azt az *aut1* null mutáns élesztő vonalak esetében leírták *(Schlumpberger és mtsai, 1997).*

Az ortológok genetikai és funkcionális vizsgálata, kölcsönható partnereik és az adott organizmusra jellemző szabályozásuk megismerése fontos, ám de nem egyetlen útja annak, hogy az autofágia indukciójáért vagy éppen gátlásáért felelős további géntermékeket találjunk. A *Drosophila* funkcióvesztéses vonalait tartalmazó mutánsparkok tervszerű és célzott tesztelése jelentős számú, az autofág folyamatokban szerepet játszó, eddig ismeretlen génre irányíthatja a figyelmet.

Az általunk morfológiai módszerekkel megvizsgált 237, P-elem beépülést hordozó *Drosophila* vonal közül végül is 16 különböző, az auto- és/vagy a heterofág folyamatokban

nélkülözhetetlen gént sikerült azonosítanunk, amelyek szerepe a fenti folyamatokban a tesztelés időpontjában ismeretlen volt.

Ezek közül az egyik vonal az l(3)S005042 számú vonal volt, amelyben a transzpozon az *snf4aγ* génbe épült be. Az Snf4aγ fehérje egyike az AMP-aktivált protein kináz (AMPK) komplex szabályozó alegységeinek *(Gao és mtsai, 1996; Woods és mtsai, 1996),* míg maga az AMPK egy, evolúciós szempontból konzervált, a sejtek folyamatos energia-ellátásáért felelős kináz, amelyet a metabolikus stressz során megnövekvő AMP mennyisége képes aktiválni *(Hardie és Hawley, 2001; Hardie és mtsai, 2006).* Az AMPK komplex aktivitása segít fenntartani az egész szervezet energia-egyensúlyát, ugyanis képes ösztönözni a táplálékfelvételt hipoglikémia esetén, illetve hipoxiás állapotban megemeli a légzés frekvenciáját *(Hardie és mtsai, 2006).* Az élesztőben található homológja - az Snf1/Snf4 kináz komplex – elsősorban a felhasználható glükóz mennyiségének csökkenésekor aktiválódik, de az AMPK-tól eltérően ez a komplex nem érzékeny az AMP szintjének változására *(Mitchelhill és mtsai, 1994).*

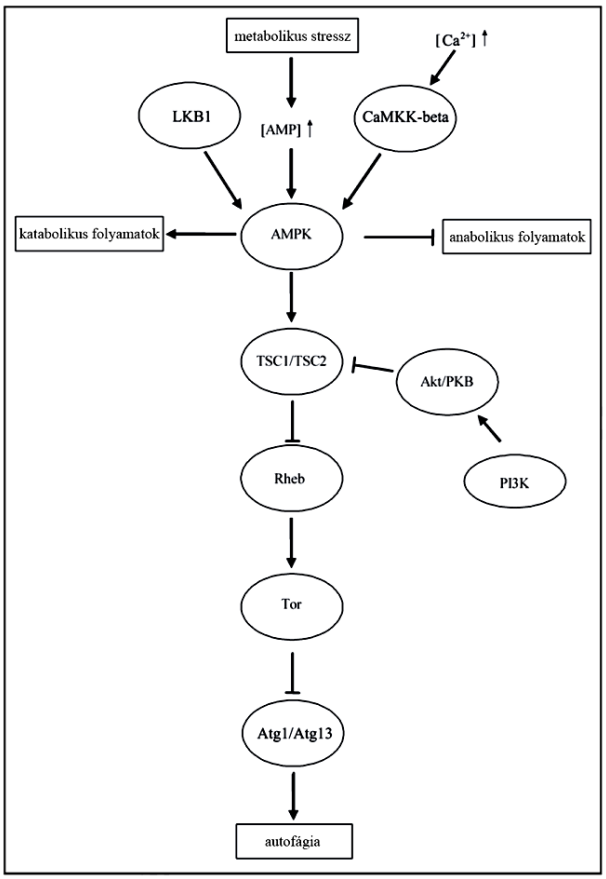
Az AMPK komplex egy heterotrimer, amelyben az α alegység rendelkezik a katalitikus aktivitással, míg a β és γ alegységek regulációs funkciót töltenek be. Az eukarióták körében mindhárom alegység hasonló domén-szerkezettel rendelkezik *(Hardie és mtsai, 1998; Adams és mtsai, 2004).* Az emlősöknél mindegyik alegységre számos izoforma található, amelyeket más és más gének kódolnak, a *Drosophila* esetében viszont alegységenként csak egy-egy gén áll az adott fehérje mögött *(Pan és Hardie, 2002),* amelyekről viszont többféle transzkriptum is keletkezhet *(http://Flybase.org).*

Az l(3)S005042 törzs homozigóta egyedeiben az *snf4aγ*-RG, az *snf4aγ*-RL és az *snf4aγ*-RI transzkriptumok mennyisége jelentősen lecsökkent, éppúgy, mint a génről keletkező Snf4aγ -PA/PB fehérje mennyisége. Mivel az *snf4aγ* génben P-elem inzerciót hordozó vonal homozigóta egyedeinek zsírtest-sejtjeiben sem a metamorfózist megelőző időszakban, sem éhezés vagy 20-HE kezelés után nem lehet autofág struktúrák jelenlétét megfigyelni, ami igazolja az Snf4aγ fehérje szükségességét mind a fiziológiás, mind pedig a stressz-indukált autofágiában *(Lippai és mtsai, 2008).*

Az AMPK képes foszforiláció útján aktiválni a TCS1/2 komplexet, és ezáltal inaktiválni a TORC1 kinázt *(Inoki és mtsai, 2006; Meijer és Codogno, 2007),* ami az autofágia indukciójához vezet (2. ábra). A szövettenyészetben alkalmazott metabolikus stresszt vagy a növekedés faktor megvonást az emlős sejtek LKB1-AMPK szignalizációtól függő autofágiával tudják túlélni *(Liang és mtsai, 2007),* éppúgy, mint a keringésétől

időlegesen vagy részlegesen megfosztott egér szívszövet *(Takagi és mtsai, 2007),* vagy a kaempferol kezelésnek kitett carcinóma sejtek (Filomeni és mtsai, 2010). Az irodalmi adatok és a saját megfigyeléseink alapján az AMPK-t a metabolikus stressz miatt felhalmozódó AMP-n kívül még aktiválhatja az LKB1, valamint az intracelluláris Ca^{2+} szint megnövekedése következtében aktiválódó calmodulin kináz kináz β (CaMKKβ) is *(Høyer-Hansen és mtsai, 2007).* Az AMPK-t érintő, valamint a tőle kiinduló szabályozási útvonalakat a 48. ábrán tüntettük fel.

Az irodalmi adatok szerint az AMPK komplex tagjai normális körülmények között a citoplazmában találhatók *(Gao és mtsai, 1996; Woods és mtsai, 1996; Hardie és Hawley, 2001; Hardie és mtsai, 2006).* Immunlokalizációs kísérleteink szerint viszont a vad típusú Drosophila lárvák trofocitáiban az SNF4Aγ fehérje a fiziológiásan jelentkező autofágia kezdetekor a sejtmagban halmozódott fel. Ugyanezt tapasztaltuk a lárvák éheztetésekor, illetve vedlési hormonnal történő kezelésük esetében is *(Lippai és mtsai, 2008).* A PredictNLS szoftver *(Cokol és mtsai, 2000)* segítségével kimutattuk, hogy a *snf4aγ* gén 8. exonja valóban tartalmaz magi lokalizációs szekvenciát (nuclear localization signal, NLS), és az megjelenik az SNF4Aγ-PA, PB és PF fehérjékben.



48. ábra. Az AMPK aktivitását közvetlenül befolyásolja az LKB1, a CaMKKβ és az intacelluláris AMP szint növekedése. Az AMPK ennek megfelelően serkentheti a katabolikus folyamatokat és gátolhatja az anabolikusakat; ugyanakkor a TSC1/2 komplex aktiválása révén csökkentheti a TOR kináz működését és ezek keresztül beindíthatja az autofágiát *(Lippai és mtsai, 2008).*

Mindez nagyon jó egyezést mutatott azokkal a megfigyelésekkel, amelyek szerint az AMPK alegységei stressz esetén a sejtmagba transzlokálódnak *(Salt és mtsai, 1998; McGee és mtsai, 2003; Kodiha és mtsai, 2007).* Feltételezések szerint az AMPK komplex a sejtmagban

lévő fehérjék direkt foszforilálásával képes szabályozni bizonyos gének kifejeződését *(Leff, 2003),* amelynek lehetőségét az autofág folyamatok esetén sem vethetjük el.

A P-elem inzerciót hordozó *Drosophila* törzsek tesztelésekor szembetűnő volt az a jelenség, hogy egyetlen egy olyan vonalat sem találtunk, amelyben vagy csak az auto- vagy pedig csak a heterofág folyamat mutatott volna defektust. Ez a megfigyelés volt az alapja annak az elképzelésnek, hogy a magasabbrendű eukarióták esetében a kétféle mechanizmus több közös ponttal rendelkezik. Az egyik ilyen összekapcsolódási pont a *liquid facets (lqf)* gén és terméke lehet.

Az *l(3)S011027* vonal esetében a transzpozon az *lqf* gén első exonjába ült be, aminek következtében a homozigóta lárvák zsírtestében az autofágia sem fiziológiás körülmények között, sem 20-HE kezelés, sem pedig éhezés vagy hipoxia hatására nem volt képes megindulni. Ezzel párhuzamosan a trofociták – bár nagy mennyiségben szintetizálták és szekretálták a lárvális szérum fehérjéket – képtelenek voltak azok receptor mediált endocitózisára *(Csikós és mtsai, 2009)*.

A *Drosophila* genomjában található *lqf* gén a gerincesek epsinjeihez rendkívül hasonló fehérjét kódol, amely a clathrin-mediált endocitózis komplexnek a tagja *(Cadavid és mtsai, 2000).* A moduláris szerkezetű epsineket a foszfoinozitidek kötésére alkalmas N-terminális homológia domén (ENTH), az ezek után helyet foglaló ubiqutin-interakciós motívumok (UIM), végül a clathrin-, az AP2 adaptor- és az Eps15 fehérjék kötésére szolgáló szekvenciák építik fel *(Hofmann és Falquet, 2001; Wendland, 2002; De Camilli és mtsai, 2002; Polo és mtsai, 2003).* Az UIM azonosítása az epsin szerkezetében vezetett arra a felismerésre, hogy ez a molekula a cargoszelektív adapterek családjába tartozik (*Wendland, 2002).*

Az epsinek egyik legfontosabb alkotóeleme az ENTH domén, amelynek megléte a fehérjében mind emlős, mind pedig élesztő sejtek esetében nélkülözhetetlen az endocitózishoz *(Wendland és mtsai, 1999; Chen és mtsai, 1998; Ford és mtsai 2002).* Az Lqf, azaz a Drosophila epsin hiányában nem történik meg a Delta ligand endocitózisa, amely megkerülhetetlen lépése a muslica differenciálódó szemében zajló Delta-Notch szignalizációnak *(Overstreet és mtsai, 2003).*

A fenti irodalmi adatokat saját kísérleti eredményeink is alátámasztják. Az utolsó lárvastádium első felében a vad típusú *Drosophila* lárvák zsírtest-sejtjei nagy mennyiségű LSP2-t szintetizálnak és szekretálnak a hemolimfába. *(Lepesant és mtsai, 1982; Powell és mtsai, 1984; Benes és mtsai, 1990).* A vándorlási periódus folyamán viszont ugyanezek a sejtek receptor-mediált endocitózis segítségével visszaveszik az LSP2-t a hemolimfából *(Tojo*

és mtsai, 1981; Levenbook és Bauer, 1984). Mindkét folyamat a 20-HE szabályozása alatt áll *(Wolfe és mtsai, 1977; Lepesant és mtsai, 1982; Powell és mtsai, 1984).* Bár a P-elem beépüléssel tönkretett lqf gént homozigóta formában hordozó lárvák trofocitái képesek az LSP2 szintézisére és szekréciójára, azonban azok endocitózissal történő visszavételére - az Lqf fehérje hiányában - nem kerülhetett sor *(Csikós és mtsai, 2009).*

Az Lqf protein zsírtest-sejteken belüli lokalizációja jelentős különbséget mutatott a táplálkozó és a vándorló lárvák esetében. Az előbbi időszakban az Lqf a sejtmagok belsejében, közvetlenül azok membránja alatt volt kimutatható. Az eddig vizsgált emlős sejtekben az epsinek - még azok túltermeltetése esetén is - a citoplazmában voltak megtalálhatók (*Chen és mtsai, 1998; Rosenthal és mtsai, 1999).* Ugyanakkor az irodalomban arra is találunk utalást, hogy az epsin1 és PLZF (promyelocytic leukemia Zn^{2+} finger protein) együttes túltermeltetése esetén az epsin a sejtmagba transzlokálódott, ahol valószínűleg a specifikus génexpresszió szabályozásában vesz részt *(Hyman és mtsai, 200).* A vándorlási periódus kezdetétől – ami hozzávetőlegesen egybeesik az auto- és heterofág folyamatok megindulásával – az Lqf fehérje a savas beltartalmú vakuólumok membránjához kapcsolódott. Ugyanez a lokalizáció volt megfigyelhető az GFP-Lqf fúziós fehérjék esetében is, ami kizárja a műtermék lehetőségét *(Csikós és mtsai, 2009).* Az ENTH domént hordozó fehérjék közül mind az epsin1-ről, mind a huntingtin interacting protein 1 (HIP1)-ről kimutatták, hogy képesek az endocitotikus vakuólumok membránjához kötődni *(Drake és mtsai, 2000; Waelter és mtsai, 2001*). Saját elképzeléseink szerint az Lqf – mint egy olyan fehérje, amely képes a membránokba ékelődve azok görbületét megnövelni egyaránt részt vehet az auto- és az endocitotikus vakuólum kialakításában vagy formálásában.

Ezt a lehetőséget támasztotta alá a rapamicinnel végzett kezelés eredménye is. A homozigóta mutáns lárvák zsírtestében a TORC1 inhibitoraként ismert rapamicin *(Blommaart és mtsai, 1995; Noda és Ohsumi, 1998)* nem volt képes kiváltani az autofág struktúrák megjelenését a trofocitákban. Ez arra enged következetni, hogy az Lqf a TORC1-től lejjebb lévő szinten fejti ki pozitív hatását az auto- és heterofág folyamatokra.

Felnőtt egyedekben az autofág kapacitás beszűkülése az élethossz megrövidüléséhez vezet *(Bergamin és mtsai, 2003; 2004; Hars és mtsai, 2007; Vellai és mtsai, 2009; Partridge és mtsai, 2011).* Az RNS interferencia segítségével csendesített *lqf* transzláció a muslicák élethosszát jelentősen megrövídítette, ami közvetetten is igazolja az Lqf auto- és heterofágiában játszott szerepét *(Csikós és mtsai, 2009).* Azonban ez elsősorban az Lqf a membránok görbítésében végzett tevőleges funkciójával függ össze, nem pedig szignalizációs

vagy szabályozási lépésekkel, mint ahogy azt az ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) tagjainál tapasztalhajuk, amelyek mutációi gátolják az endocitózis folyamatát, ugyanakkor az autofagoszómák felhalmozódásához vezetnek *(Rusten és mtsai, 2007; Rusten és Stenmark, 2009; Vaccari és mtsai, 2009).* Az, hogy az Lqf homozigóta mutánsok zsírtest-sejtjeiben az auto- és heterofág folyamatok egyaránt gátoltak, erősen emlékeztet a Vps43 mutáció következtében fellépő fenotípusra, amelyet ezen folyamatok hiánya jellemez *(Juhász és mtsai, 2008).* A Vps34 protein pedig - az Lqf fehérjéhez hasonlóan - az izoláló membránhoz kapcsolódó komplex részeként vesz részt a formálódó autofagoszóma kialakításában.

Összefoglalva vizsgálati eredményeinket elmondhatjuk, hogy egyfelől sikerült igazolnunk, hogy a rovar szervezetekben a fejlődési autofágia szoros kapcsolatban áll a heterofág (endocitotikus) folyamattal, amely a különleges feltételeknek megfelelően bizonyos esetekben speciális megoldásokat alkalmaz. Másfelől bebizonyítottuk, hogy a széles körben ismert, az élesztőben leírt *atg* gének mellett a magasabbrendű eukariótákban jelentős számban vannak olyan gének, amelyek termékei szükségesek, vagy éppen nélkülözhetetlenek az auto- és heterofágiához. Jövőbeni kutatásaink során elsősorban ezek vizsgálatára szeretnénk koncentrálni.

6. Rövidítések jegyzéke:

20-HE – 20-hydroxyecdysone, molting hormone

4E-BP - eukariotic translation initiation factor 4E-binding protein

AEL - after egg laying

AGC kinázok – az A, G és C protein kináz családba tartozó kinázok

Alfy - autophagy-linked FYVE protein

AMPK - AMP-activated protein kinase

Atg - Autophagy-related gene

class I PI3K - class 1 foszfoinozitid 3-kinase

Cvt - cytoplasm to vacuole targeting

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole

DEPTOR - DEP-domain interactor of mTOR

DFCP1 - double FYVE domain–containing protein

DFCP1 - double FYVE-containing protein 1

ENTH - epsin N-terminal homology

ERK - extracellular signal-regulated protein kinase

ESCRT - endosomal sorting complex required for transport

FIP200 - focal adhesion kinase (FAK) family interacting protein of 200 kDa

FKBP12 - FK506 binding protein 12

FKBP38 - FK506 binding protein 38

GABARAP - c-aminobutyric acid (GABA) receptor associated protein

GAP1 - general amino acid permease 1

GATE-16 - Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa

GβL- G-protein beta-subunit-like

MLST8 - mTOR associated protein LST8 homolog

hVps34 - human ortholog of yeast vacuolar protein sorting 34

ISR1 - inzulin receptor szubsztrát 1

ISR2 - inzulin receptor szubsztrát 2

LAMP-2a - Lizoszóma asszociált membrán protein 2[a]

LKB1 – liver kinase B 1

LSP – larval serum protein

MEK - mitogen-activated protein kinase kinase

mTOR - mammalian target of rapamycin;

PAS – pre-autophagosomal structure, ill. phagophore assembly site

PCD – programmed cell death

PDK1 - phosphoinositide-dependent protein kinase 1

PE – phosphatidylethanolamine

PH domain - pleckstrin homology domain

PI3K - phosphoinositid 3-kinase

PIKK - phosphatidylinositol kinase related kinase

PKB - protein kinase B

PKB/Akt - protein kinase B/Akt

PRAS40 - proline-rich Akt substrate of 40kDa

PRR5 - proline-rich protein 5

PTEN – phosphatase and tensin homolog

raptor - regulatory associated protein of mTOR

Ras - Rat sarcoma small GTPase

Rheb - ras homolog enriched in brain

rictor - rapamycin insensitive companion of mTOR

rictor - rapamycin-insensitive companion of mTOR

S6 kinase - ribosomal protein S6 kinase 1

SIN1 - stress-activated protein kinase-interacting protein 1

SLC1A5 - soluble carrier family 1 member 5

SLC7A5 - soluble carrier family 7 member 5

TGN - trans-Golgi network

TOR - target of rapamycin kinase

TORC1- target of rapamycin kinase complex 1

TORC2- target of rapamycin kinase complex 2

TSC - tuberous sclerosis complex

UIM - ubiquitin interacting motif

ULK1 - UNC-51-like kinase 1

ULK2 - UNC-51-like kinase 2

UVRAG - ultraviolet irradiation resistance-associated gene

Vps - vacuolar protein sorting

WIPI1 - WD repeat proteins interacting with phosphoinositides 1

WIPI2 - WD repeat proteins interacting with phosphoinositides 2

7. Irodalomjegyzék

Abeliovich H, Dunn WA Jr, Kim J, Klionsky DJ. (2000) Dissection of autophagosome biogenesis into distinct nucleation and expansion steps. J Cell Biol. 2000 Nov 27;151(5):1025-34.

Adams J, Chen ZP, Van Denderen BJ, Morton CJ, Parker MW, Witters LA, Stapleton D, Kemp BE. (2004) Intrasteric control of AMPK via the γ1 subunit AMP allosteric regulatory site. Protein Sci 2004; 13:155-65.

Adhami F, Schloemer A, Kuan CY. (2007) The roles of autophagy in cerebral ischemia. Autophagy. 2007 Jan-Feb;3(1):42-4.

Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. Curr Biol. 1997 Apr 1;7(4):261-9.

Avruch J, Hara K, Lin Y, Liu M, Long X, Ortiz-Vega S, Yonezawa K. (2006) Insulin and amino-acid regulation of mTOR signaling and kinase activity through the Rheb GTPase. Oncogene. 2006 Oct 16;25(48):6361-72.

Avruch J, Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Rapley J, Papageorgiou A, Oshiro N, Kikkawa U. (2009) Activation of mTORC1 in two steps: Rheb-GTP activation of catalytic function and increased binding of substrates to raptor. Biochem Soc Trans. Feb;37(Pt 1):223-6.

Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, Griffiths G, Ktistakis NT. (2008) Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. J Cell Biol. Aug 25;182(4):685-701.

Bai X, Ma D, Liu A, Shen X, Wang QJ, Liu Y, Jiang Y. (2007) Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38. Science. 2007 Nov 9;318(5852):977-80.

Barrett AJ (1972): Lysosomal enzymes. In Dingle JT (ed): Lysosomes, a Laboratory Handbook. New York: Elsevier, pp 46–135.

Benes H, Spivey DW, Miles J, Neal K, Edmondson RG. (1990) Fat-body-specific expression of the Drosophila Lsp-2 gene. SAAS Bull Biochem Biotechnol 1990; 3:129-33.

Berg TO, Fengsrud M, Strømhaug PE, Berg T, Seglen PO. (1998) Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. J Biol Chem. Aug 21;273(34):21883-92.

Bergamini E, Cavallini G, Donati A, Gori Z. (2004) The role of macroautophagy in the ageing process, anti-ageing intervention and age-associated diseases. Int J Biochem Cell Biol. Dec;36(12):2392-404.

Bernales S, McDonald KL, Walter P. (2006) Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. PLoS Biol. 2006 Nov;4(12):e423.

Bernales S, Schuck S, Walter P. (2007) ER-phagy: selective autophagy of the endoplasmic reticulum. Autophagy. 2007 May-Jun;3(3):285-7.

Berry DL, Baehrecke EH. (2007) Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in Drosophila. Cell. 2007 Dec 14;131(6):1137-48.

Berry DL, Baehrecke EH. (2008) Autophagy functions in programmed cell death. Autophagy. 2008 Apr 1;4(3):359-60.

Bialik S, Kimchi A. (2010) Lethal weapons: DAP-kinase, autophagy and cell death DAP-kinase regulates autophagy. Curr Opin Cell Biol.

Bjedov I, Toivonen JM, Kerr F, Slack C, Jacobson J, Foley A, Partridge L. (2010) Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly Drosophila melanogaster. Cell Metab. Jan;11(1):35-46.

Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H, Johansen T. (2005) p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. J Cell Biol. 2005 Nov 21;171(4):603-14.

Blommaart EF, Luiken JJ, Meijer AJ. (1997) Autophagic proteolysis: control and specificity. Histochem J. 1997 May;29(5):365-85.

Boellaard JW, Kao M, Schlote W, Diringer H. (1991) Neuronal autophagy in experimental scrapie. Acta Neuropathol.;82(3):225-8.

Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248–254.

Brown, B. L., Albano, J. D. M., Ekins, R. P., and Sgherzi, A. M. (1971). A simple and sensitive saturation assay method for the measurement of adenosine 3 ‘-5 ‘-cyclic monophosphate. Biochem J. 121, 561-562.

Budovskaya YV, Stephan JS, Reggiori F, Klionsky DJ, Herman PK. (2004) The Ras/cAMP-dependent protein kinase signaling pathway regulates an early step of the autophagy process in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem. 2004 May 14;279(20):20663-71.

Burmester, T., Scheller, K. (1992) Identification of binding proteins involved in the stage-specific uptake of arylphorin by the fat body cells of Calliphora vicina Insect Biochem. Molec. Biol. 22, 211-220.

Bursch W. (2001) The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. Cell Death Differ. 2001 Jun;8(6):569-81.

Butler JE, Feldbush TL, McGivern PL, Stewart N (1978): The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): A measure of antibody concentration of affinity. Immunochemistry 15:131–136.

Butterworth FM, Emerson L, Rasch EM. (1988) Maturation and degeneration of the fat body in the Drosophila larva and pupa as revealed by morphometric analysis. Tissue Cell. 1988;20(2):255-68.

Butterworth FM, Rasch EM. (1986) Adipose tissue of Drosophila melanogaster: VII. Distribution of nuclear DNA amounts along the anterior-posterior axis in the larval fat body. J Exp Zool. 1986 Jul;239(1):77-85.

Butterworth, FM, Bodenstein, D and King RC. (1965) Adipose tissue of Drosophila melanogaster. I. An experimental study of larval fat body. J Exp Zool. 1965 Mar;158:141-53.

Byfield MP, Murray JT, Backer JM. (2005) hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. J Biol Chem. 2005 Sep 23;280(38):33076-82.

Cadavid ALM, Ginzel A, Fischer JA. (2000) The function of the Drosophila Fat facets deubiquitinating enzyme in limiting photoreceptor cell number is intimately associated with endocytosis. Development 2000; 127:1727-36.

Cameron AJ, Linch MD, Saurin AT, Escribano C, Parker PJ. (2011) Dissecting the role of Sin1 in AGC kinase regulation by TORC2. Biochem J. 2011 Aug 1.

Cebollero E, Reggiori F. (2009) Regulation of autophagy in yeast Saccharomyces cerevisiae. Biochim Biophys Acta. 2009 Sep;1793(9):1413-21.

Chan TF, Bertram PG, Ai W, Zheng XF. (2001) Regulation of APG14 expression by the GATA-type transcription factor Gln3p. J Biol Chem. Mar 2;276(9):6463-7.

Chang YY, Neufeld TP. (2009) An Atg1/Atg13 complex with multiple roles in TOR-mediated autophagy regulation. Mol Biol Cell. Apr;20(7):2004-14.

Chang YY, Neufeld TP. (2010) Autophagy takes flight in Drosophila. FEBS Lett. 2010 Jan 12.

Chen H, Fre S, Slepnev VI, Capua MR, Takei K, Butler MH. (1998) Epsin is an EH domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis. Nature 1998; 394:793-97.

Chen N, Debnath J. (2010) Autophagy and tumorigenesis. FEBS Lett. Apr 2;584(7):1427-35.

Chen Q, Xie W, Kuhn DJ, Voorhees PM, Lopez-Girona A, Mendy D, Corral LG, Krenitsky VP, Xu W, Moutouh-de Parseval L, Webb DR, Mercurio F, Nakayama KI, Nakayama K, Orlowski RZ. (2008) Targeting the p27 E3 ligase SCF(Skp2) results in p27- and Skp2-mediated cell-cycle arrest and activation of autophagy. Blood. 2008 May 1;111(9):4690-9.

Cheong H, Nair U, Geng J, Klionsky DJ. (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. 2008 Feb;19(2):668-81.

Cherra SJ, Dagda RK, Chu CT. (2010) Autophagy and Neurodegeneration: Survival at a cost? Neuropathol Appl Neurobiol. Feb 19.

Chhipa RR, Wu Y, Ip C. (2011) AMPK-mediated autophagy is a survival mechanism in androgen-dependent prostate cancer cells subjected to androgen deprivation and hypoxia. Cell Signal. 2011 Sep;23(9):1466-72.

Clark, S. L. Jr. (1957) Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studied with the electron microscope. J. Biophys. Biochem. Cytol. 3, 349–362

Clarke P.G. H. (1990) Developmental cell death-morphological diversity and multiple mechanisms. Anat Embryol (Berl) 1990; 181:195-213.

Clausen T. H, Lamark T, Isakson P, Finley K, Larsen KB, Brech A, Øvervatn A, Stenmark H, Bjørkøy G, Simonsen A, Johansen T. (2010) p62/SQSTM1 and ALFY interact to facilitate the formation of p62 bodies/ALIS and their degradation by autophagy. Autophagy. 2010 Apr;6(3):330-44.

Claypool JA, French SL, Johzuka K, Eliason K, Vu L, Dodd JA, Beyer AL, Nomura M. (2004) Tor pathway regulates Rrn3p-dependent recruitment of yeast RNA polymerase I to the promoter but does not participate in alteration of the number of active genes. Mol Biol Cell. 2004 Feb;15(2):946-56.

Cokol M, Nair R, Rost B. (2000) Finding nuclear localization signals. EMBO Rep 2000; 1:411 -5.

Cybulski N, Hall MN. (2009) TOR complex 2: a signaling pathway of its own. Trends Biochem Sci. 2009 Dec;34(12):620-7.

Csikós G, Lippai M, Lukácsovich T, Juhász G, Henn L, Erdélyi M, Maróy P, Sass M. (2009) A novel role for the Drosophila epsin (lqf): involvement in autophagy. Autophagy. 2009 Jul;5(5):636-48.

Csikós, Gy., Sass, M. (1997) Changes of acid phosphatase content and activity in the fat body and the hemolymph of the flesh fly Neobellieria (Sarcophaga) bullata during metamorphosis Arch. Insect Biochem. Phys. 34, 369-390.

Dai JD, Gilbert LI. (1999) An in vitro analysis of ecdysteroid-elicited cell death in the prothoracic gland of Manduca sexta. Cell Tissue Res. 1999 Aug;297(2):319-27.

De Camilli P, Chen H, Hyman J, Panepucci E, Bateman A, Brunger AT.(2002) The ENTH domain. FEBS Lett 2002; 20: 513:11-8.

De Duve C, Wattiaux R. (1966) Functions of lysosomes. Annu Rev Physiol. 1966;28:435-92.

De Virgilio C, Loewith R. (2006) Cell growth control: little eukaryotes make big contributions. Oncogene. Oct 16;25(48):6392-415.

Dean RT. (1977) Lysosomes and protein degradation. Acta Biol Med Ger. 1977;36(11-12):1815-20.

Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Gélinas C, Fan Y, Nelson DA, Jin S, White E. (2006) Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. Cancer Cell. Jul;10(1):51-64.

Denton D, Shravage B, Simin R, Baehrecke EH, Kumar S. (2010) Larval midgut destruction in Drosophila: not dependent on caspases but suppressed by the loss of autophagy. Autophagy. 2010 Jan;6(1):163-5.

Deter RL, Baudhuin P, De Duve C. (1967) Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon. J Cell Biol. 1967 Nov;35(2):C11-6.

Deter RL. (1975) Analog modeling of glucagon-induced autophagy in rat liver. I. Conceptual and mathematical model of telolysosome-autophagosome-autolysosome interaction. Exp Cell Res. 1975 Aug;94(1):122-6.

Dice JF. (2007) Chaperone-mediated autophagy. Autophagy. 2007 Jul-Aug;3(4):295-9.

Ding WX, Ni HM, Li M, Liao Y, Chen X, Stolz DB, Dorn GW 2nd, Yin XM. (2010) Nix is critical to two distinct phases of mitophagy, reactive oxygen species-mediated autophagy induction and Parkin-ubiquitin-p62-mediated mitochondrial priming. J Biol Chem. 2010 Sep 3;285(36):27879-90.

Donati A, Cavallini G, Paradiso C, Vittorini S, Pollera M, Gori Z, Bergamini E. (2001) Age-related changes in the autophagic proteolysis of rat isolated liver cells: effects of antiaging dietary restrictions. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. Sep;56(9):B375-83.

Donati A. (2006) The involvement of macroautophagy in aging and anti-aging interventions. Mol Aspects Med. Oct-Dec;27(5-6):455-70.

Drake MT, Downs MA, Traub LM. (2000) Epsin binds to clathrin by associating directly with the clathrin-terminal domain. Evidence for cooperative binding through two discrete sites. J Biol Chem 2000; 9:6479-89.

Dunn WA Jr, Cregg JM, Kiel JA, van der Klei IJ, Oku M, Sakai Y, Sibirny AA, Stasyk OV, Veenhuis M. (2005) Pexophagy: the selective autophagy of peroxisomes. Autophagy. 2005 Jul;1(2):75-83.

Dunn WA Jr. (1990) Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole.J Cell Biol. Jun;110(6):1935-45.

Edinger AL, Thompson CB. (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. Curr Opin Cell Biol. 2004 Dec;16(6):663-9.

Eisenberg-Lerner A, Kimchi A. (2009) The paradox of autophagy and its implication in cancer etiology and therapy. Apoptosis. Apr;14(4):376-91.

Engvall E, Perlmann P (1972): Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobin in antigen-coated tubes. J Immunol 109:129–135.

Eskelinen EL. (2005) Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. Autophagy. Apr;1(1):1-10.

Facey CO, Lockshin RA. (2010) The execution phase of autophagy associated PCD during insect metamorphosis. Apoptosis. 2010 Apr 20.

Farré JC, Krick R, Subramani S, Thumm M. (2009) Turnover of organelles by autophagy in yeast. Curr Opin Cell Biol. Aug;21(4):522-30.

Feigen MI, Johns MA, Postlethwait JH, Sederoff RR (1980): Purification and characterization of acid phosphatase-1 from Drosophila melanogaster. J Biol Chem 255:10338–10343.

Filimonenko M, Isakson P, Finley KD, Anderson M, Jeong H, Melia TJ, Bartlett BJ, Myers KM, Birkeland HC, Lamark T, Krainc D, Brech A, Stenmark H, Simonsen A, Yamamoto A. (2010) The selective macroautophagic degradation of aggregated proteins requires the PI3P-binding protein Alfy. Mol Cell. 2010 Apr 23;38(2):265-79.

Filomeni G, Desideri E, Cardaci S, Graziani I, Piccirillo S, Rotilio G, Ciriolo MR. (2010) Carcinoma cells activate AMP-activated protein kinase-dependent autophagy as survival response to kaempferol-mediated energetic impairment. Autophagy. 2010 Feb;6(2):202-16.

Ford MGJ, Mills IG, Peter BJ, Vallis Y, Praefcke GJK, Evans PR. (2002) Curvature of clathrin coated pits driven by epsin. Nature 2002; 419:361-66.

Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T. (2008) The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. Mol Biol Cell. May;19(5):2092-100.

Funakoshi T, Matsuura A, Noda T, Ohsumi Y. (1997) Analyses of APG13 gene involved in autophagy in yeast, Saccharomyces cerevisiae. Gene. Jun 19;192(2):207-13.

Furuya N, Yu J, Byfield M, Pattingre S, Levine B. (2005) The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppressor function. Autophagy. 2005 Apr;1(1):46-52.

Ganley IG, Lam du H, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X. (2009) ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. J Biol Chem. 2009 May 1;284(18):12297-305.

Gao G, Fernandez CS, Stapleton D, Auster AS, Widmer J, Dyck JR, Kemp BE, Witters LA. (1996) Non-catalytic beta- and gamma-subunit isoforms of the 5'-AMP-activated protein kinase. J Biol Chem. 1996 Apr 12;271(15):8675-81.

Gao X, Zhang Y, Arrazola P, Hino O, Kobayashi T, Yeung RS, Ru B, Pan D. (2002) Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. Nat Cell Biol. 2002 Sep;4(9):699-704.

Geeraert C, Ratier A, Pfisterer SG, Perdiz D, Cantaloube I, Rouault A, Pattingre S, Proikas-Cezanne T, Codogno P, Poüs C. (2010) Starvation-induced hyperacetylation of tubulin is

required for the stimulation of autophagy by nutrient deprivation. J Biol Chem. 2010 Jul 30;285(31):24184-94.

Geng J, Klionsky DJ. (2008) The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. EMBO Rep 2008. Sep;9(9):859-64.

Giansanti V, Tillhon M, Mazzini G, Prosperi E, Lombardi P, Scovassi AI. (2011) Killing of tumor cells: A drama in two acts. Biochem Pharmacol. 2011 May 27.

Glaumann H, Ericsson JL, Marzella L. (1981) Mechanisms of intralysosomal degradation with special reference to autophagocytosis and heterophagocytosis of cell organelles. Int Rev Cytol. 1981;73:149-82.

Glaumann H, Ericsson JL, Marzella L.(1981) Mechanisms of intralysosomal degradation with special reference to autophagocytosis and heterophagocytosis of cell organelles. Int Rev Cytol. 1981;73:149-82.

Goldman SJ, Taylor R, Zhang Y, Jin S. (2010) Autophagy and the degradation of mitochondria. Mitochondrion. 2010 Jun;10(4):309-15.

Gordon PB, Høyvik H, Seglen PO. (1992) Prelysosomal and lysosomal connections between autophagy and endocytosis. Biochem J. 1999 Apr 15;283 (Pt 2):361-9.

Gorski SM, Chittaranjan S, Pleasance ED, Freeman JD, Anderson CL, Varhol RJ, Coughlin SM, Zuyderduyn SD, Jones SJ, Marra MA. (2003) A SAGE approach to discovery of genes involved in autophagic cell death. Curr Biol. 2003 Feb 18;13(4):358-63.

Hall DJ, Grewal SS, de la Cruz AF, Edgar BA. (2007) Rheb-TOR signaling promotes protein synthesis, but not glucose or amino acid import, in Drosophila. BMC Biol. Mar 19;5:10.

Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, Inagaki F, Ohsumi Y. (2007) The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. J Biol Chem. Dec 28;282(52):37298-302.

Hara T, Takamura A, Kishi C, Iemura S, Natsume T, Guan JL, Mizushima N. (2008) FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. J Cell Biol. 2008 May 5;181(3):497-510.

Hardie DG, Carling D, Carlson M. (1998) The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? Annu Rev Biochem 1998; 67:821-55.

Hardie DG, Hawley SA, Scott JW. (2006) AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. J Physiol. Jul 1;574(Pt 1):7-15.

Hardie DG, Hawley SA. (2001) AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. Bioessays. 2001 Dec;23(12):1112-9.

Hardie DG. (2004) The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. J Cell Sci. 2004 Nov 1;117(Pt 23):5479-87.

Hardie DG. (2005) New roles for the LKB1-->AMPK pathway. Curr Opin Cell Biol. 2005 Apr;17(2):167-73.

Hardwick JS, Kuruvilla FG, Tong JK, Shamji AF, Schreiber SL. (1999) Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Dec 21;96(26):14866-70.

Hars ES, Qi H, Ryazanov AG, Jin S, Cai L, Hu C, Liu LF. (2007) Autophagy regulates ageing in C. elegans. Autophagy. 2007 Mar-Apr;3(2):93-5.

Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, Mäkelä TP, Alessi DR, Hardie DG. (2003) Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. J Biol. 2(4):28.

Hay N, Sonenberg N. (2004) Upstream and downstream of mTOR. Genes Dev. 2004 Aug 15;18(16):1926-45.

Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A. (2010) Electron tomography reveals the endoplasmic reticulum as a membrane source for autophagosome formation. Autophagy. 2010 Feb;6(2):301-3.

Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A. (2009) A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. Nat Cell Biol. 2009 Dec;11(12):1433-7.

He C, Klionsky DJ. (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. Annu Rev Genet. 2009;43:67-93.

Heenan EJ, Vanhooke JL, Temple BR, Betts L, Sondek JE, Dohlman HG. (2009) Structure and function of Vps15 in the endosomal G protein signaling pathway. Biochemistry. 2009 Jul 14;48(27):6390-401.

Heitman J, Movva NR, Hall MN. (1991) Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. Science. 1991 Aug 23;253(5022):905-9.

Helminen HJ, Ericsson JL, Niemi M. (1970) Lysosomal changes during castration-induced prostatic involution in the rat. Acta Pathol Microbiol Scand A. 1970;78(4):493-4.

Helminen HJ, Ericsson JL. (1970) Quantitation of lysosomal enzyme changes during enforced mammary gland involution. Exp Cell Res. 1970 Jun;60(3):419-26.

Hofmann K, Falquet L. (2001) A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. Trends Biochem Sci 2001;26:347-50.

Holen I, Gordon PB, Strømhaug PE, Seglen PO. (1996) Role of cAMP in the regulation of hepatocytic autophagy. Eur J Biochem. 1996 Feb 15;236(1):163-70.

Hong-Brown LQ, Brown CR, Kazi AA, Huber DS, Pruznak AM, Lang CH. (2010) Alcohol and PRAS40 knockdown decrease mTOR activity and protein synthesis via AMPK signaling and changes in mTORC1 interaction. J Cell Biochem. 2010 Apr 15;109(6):1172-84.

Hosokawa N, Sasaki T, Iemura S, Natsume T, Hara T, Mizushima N. (2009) Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. Autophagy. 2009 Oct;5(7):973-9.

Huang C, Andres AM, Ratliff EP, Hernandez G, Lee P, Gottlieb RA. (2011) Preconditioning involves selective mitophagy mediated by Parkin and p62/SQSTM1. PLoS One. 2011;6(6):e20975.

Huang J, Manning BD. (2008) The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. Biochem J. Jun 1;412(2):179-90.

Huang J, Manning BD. (2009) A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. Biochem Soc Trans. Feb;37(Pt 1):217-22.

Huang WP, Scott SV, Kim J, Klionsky DJ. (2000) The itinerary of a vesicle component, Aut7p/Cvt5p, terminates in the yeast vacuole via the autophagy/Cvt pathways. J Biol Chem. Feb 25;275(8):5845-51.

Hubbard VM, Valdor R, Macian F, Cuervo AM. (2011) Selective autophagy in the maintenance of cellular homeostasis in aging organisms. Biogerontology. 2011 Apr 3.

Hyman J, Chen H, Di Fiore PP, De Camilli P, Brunger AT. (2000) Epsin 1 undergoes nucleocytosolic shuttling and its eps15 interactor NH(2)-terminal homology (ENTH) domain, structurally similar to Armadillo and HEAT repeats, interacts with the transcription factor promyelocytic leukemia Zn(2)+ finger protein (PLZF). J Cell Biol 2000; 149:537-46.

Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, Mizushima N, Tanida I, Kominami E, Ohsumi M, Noda T, Ohsumi Y. (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. Nature. 2000 Nov 23;408(6811):488-92.

Inoki K, Corradetti MN, Guan KL. (2005) Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. Nat Genet. 2005 Jan;37(1):19-24.

Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X, Yang Q, Bennett C, Harada Y, Stankunas K, Wang CY, He X, MacDougald OA, You M, Williams BO, Guan KL. (2006) TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. Cell. 2006 Sep 8;126(5):955-68.

Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N. (2008) Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. Mol Biol Cell. 2008 Dec;19(12):5360-72.

Jacinto E, Lorberg A. (2008) TOR regulation of AGC kinases in yeast and mammals. Biochem J. 2008 Feb 15;410(1):19-37.

Jäger S, Bucci C, Tanida I, Ueno T, Kominami E, Saftig P, Eskelinen EL. (2004) Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. J Cell Sci. Sep 15;117(Pt 20):4837-48.

Juhász G, Csikós G, Sinka R, Erdélyi M, Sass M. (2003) The Drosophila homolog of Aut1 is essential for autophagy and development. FEBS Lett. 2003 May 22;543(1-3):154-8.

Juhász G, Csikós GY, Sass M. (2001) A possible approach to study autophagy in Drosophila. Acta Biol Hung. 2001;52(4):485-90.

Juhász G, Erdi B, Sass M, Neufeld TP. (2007) Atg7-dependent autophagy promotes neuronal health, stress tolerance, and longevity but is dispensable for metamorphosis in Drosophila. Genes Dev. Dec 1;21(23):3061-6.

Juhasz G, Neufeld TP.(2006) Autophagy: a forty-year search for a missing membrane source. PLoS Biol. 2006 Feb;4(2):e36.

Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH. (2009) ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. Mol Biol Cell. 2009 Apr;20(7):1992-2003.

Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. (2010) mTOR regulation of autophagy. FEBS Lett. 2010 Apr 2;584(7):1287-95.

Kabeya Y, Kamada Y, Baba M, Takikawa H, Sasaki M, Ohsumi Y. (2005) Atg17 functions in cooperation with Atg1 and Atg13 in yeast autophagy. Mol Biol Cell. May;16(5):2544-53.

Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. EMBO J. Nov 1;19(21):5720-8.

Kabeya Y, Noda NN, Fujioka Y, Suzuki K, Inagaki F, Ohsumi Y. (2009) Characterization of the Atg17-Atg29-Atg31 complex specifically required for starvation-induced autophagy in Saccharomyces cerevisiae. Biochem Biophys Res Commun. Nov 27;389(4):612-5.

Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y. (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. J Cell Biol. Sep 18;150(6):1507-13.

Kamada Y, Sekito T, Ohsumi Y. (2004) Autophagy in yeast: a TOR-mediated response to nutrient starvation. Curr Top Microbiol Immunol. 2004;279:73-84.

Kamada Y, Yoshino K, Kondo C, Kawamata T, Oshiro N, Yonezawa K, Ohsumi Y. (2010) Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy. Mol Cell Biol. Feb;30(4):1049-58.

Kamada Y. (2010) Prime-numbered Atg proteins act at the primary step in autophagy: Unphosphorylatable Atg13 can induce autophagy without TOR inactivation. Autophagy. Apr 3;6(3).

Kametaka S, Okano T, Ohsumi M, Ohsumi Y. (1998) Apg14p and Apg6/Vps30p form a protein complex essential for autophagy in the yeast, Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem. Aug 28;273(35):22284-91.

Kanki T, Klionsky DJ. (2010) The molecular mechanism of mitochondria autophagy in yeast. Mol Microbiol. 2010 Feb;75(4):795-800.

Kanki T, Wang K, Baba M, Bartholomew CR, Lynch-Day MA, Du Z, Geng J, Mao K, Yang Z, Yen WL, Klionsky DJ. (2009) A genomic screen for yeast mutants defective in selective mitochondria autophagy. Mol Biol Cell. Nov;20(22):4730-8.

Kawamata T, Kamada Y, Kabeya Y, Sekito T, Ohsumi Y. (2008) Organization of the pre-autophagosomal structure responsible for autophagosome formation. Mol Biol Cell. May;19(5):2039-50.

Kazi AA, Hong-Brown L, Lang SM, Lang CH. (2011) Deptor knockdown enhances mTOR activity and protein synthesis in myocytes and ameliorates disuse muscle atrophy. Mol Med. 2011 May 19. doi: 10.2119/molmed.2011.00070.

Kelekar A. (2005) Autophagy Ann N Y Acad Sci. 2005 Dec;1066:259-71.

Kihara A, Noda T, Ishihara N, Ohsumi Y. (2001) Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in Saccharomyces cerevisiae. J Cell Biol. Feb 5;152(3):519-30.

Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. (2002) mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. Cell. 2002 Jul 26;110(2):163-75.

Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan KL. (2008) Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. Nat Cell Biol. 2008 Aug;10(8):935-45.

Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ. (2007) Selective degradation of mitochondria by mitophagy. Arch Biochem Biophys. 2007 Jun 15;462(2):245-53.

Kim JE, Chen J. (2000) Cytoplasmic-nuclear shuttling of FKBP12-rapamycin-associated protein is involved in rapamycin-sensitive signaling and translation initiation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Dec 19;97(26):14340-5.

Kim PK, Hailey DW, Mullen RT, Lippincott-Schwartz J. (2008) Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Dec 30;105(52):20567-74.

Kimura K, Kodama A, Hayasaka Y, Ohta T. (2004) Activation of the cAMP/PKA signaling pathway is required for post-ecdysial cell death in wing epidermal cells of Drosophila melanogaster. Development. 2004 Apr;131(7):1597-606.

Kimura S, Noda T, Yoshimori T. (2008) Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. Cell Struct Funct. 2008;33(1):109-22.

Kirisako T, Baba M, Ishihara N, Miyazawa K, Ohsumi M, Yoshimori T, Noda T, Ohsumi Y. (1999) Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. J Cell Biol. 1999 Oct 18;147(2):435-46.

Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi M, Takao T, Noda T, Ohsumi Y. (2000) The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. J Cell Biol. Oct 16;151(2):263-76.

Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA Jr, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M, Ohsumi Y. (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. Dev Cell. 2003 Oct;5(4):539-45.

Klionsky DJ. (2005) Autophagy Curr Biol. 2005 Apr 26;15(8):R282-3..

Klionsky DJ. (2005) The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. J Cell Sci. Jan 1;118(Pt 1):7-18.

Köchl R, Hu XW, Chan EY, Tooze SA. (2006) Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. Traffic. 2006 Feb;7(2):129-45.

Kodiha M, Rassi JG, Brown CM, Stochaj U. (2007) Localization of AMP kinase is regulated by stress, cell density, and signaling through the MEK-->ERK1/2 pathway. Am J Physiol Cell Physiol. 2007 Nov;293(5):C1427-36.

Koelle MR, Talbot WS, Segraves WA, Bender MT, Cherbas P, Hogness DS. (1991) The Drosophila EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. Cell. 1991 Oct 4;67(1):59-77.

Komatsu M, Tanida I, Ueno T, Ohsumi M, Ohsumi Y, Kominami E. (2001) The C-terminal region of an Apg7p/Cvt2p is required for homodimerization and is essential for its E1 activity and E1-E2 complex formation. J Biol Chem. Mar 30;276(13):9846-54.

Kon M, Cuervo AM. (2009) Chaperone-mediated autophagy in health and disease. FEBS Lett. 2009 Dec 22.

Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S. (2005) The role of autophagy in cancer development and response to therapy. Nat Rev Cancer. Sep;5(9):726-34.

Kraft C, Deplazes A, Sohrmann M, Peter M. (2008) Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. Nat Cell Biol. 2008 May;10(5):602-10.

Kurucz E, Márkus R, Zsámboki J, Folkl Medzihradszky K, Darula Z, Vilmos P, Udvardy A, Krausz I, Lukácsovich T, Gateff E, Zettervall CJ, Hultmark D, Andó I. (2007) Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in Drosophila plasmatocytes. Curr Biol 2007;17:649-54.

Lawrence BP, Brown WJ. (1993) Inhibition of protein synthesis separates autophagic sequestration from the delivery of lysosomal enzymes. J Cell Sci. 1993 Jun;105 (Pt 2):473-80.

Lee CH, Inoki K, Guan KL. (2007) mTOR pathway as a target in tissue hypertrophy. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2007;47:443-67.

Lee CY, Baehrecke EH. (2001) Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. Development. 2001 Apr;128(8):1443-55.

Lee CY, Clough EA, Yellon P, Teslovich TM, Stephan DA, Baehrecke EH. (2003) Genome-wide analyses of steroid- and radiation-triggered programmed cell death in Drosophila. Curr Biol. 2003 Feb 18;13(4):350-7.

Lee CY, Simon CR, Woodard CT, Baehrecke EH. (2002) Genetic mechanism for the stage- and tissue-specific regulation of steroid triggered programmed cell death in Drosophila. Dev Biol. 2002 Dec 1;252(1):138-48.

Leff, T. (2003) AMP-activated protein kinase regulates gene expression by direct phosphorylation of nuclear proteins. Biochemical Society 2003; 31:224-7.

Lepesant JA, Levine M, Garen A, Lepesant-Kejzlarvoa J, Rat L, Somme-Martin G. (1982) Developmentally regulated gene expression in Drosophila larval fat bodies. J Mol Appl Genet. 1982;1(5):371-83.

Levenbook, L., Bauer A. (1984) The fate of the larval storage protein calliphorin during adult development of Calliphora vicina Insect Biochem. 14, 77-86

Levine B, Klionsky DJ. (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. Dev Cell. 2004 Apr;6(4):463-77.

Levine B, Yuan J. (2005) Autophagy in cell death: an innocent convict? J Clin Invest. 2005 Oct;115(10):2679-88.

Liang C, Feng P, Ku B, Oh BH, Jung JU. (2007) UVRAG: a new player in autophagy and tumor cell growth. Autophagy. Jan-Feb;3(1):69-71.

Liang C, Lee JS, Inn KS, Gack MU, Li Q, Roberts EA, Vergne I, Deretic V, Feng P, Akazawa C, Jung JU. (2008) Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. Nat Cell Biol. 2008 Jul;10(7):776-87.

Liang J, Shao SH, Xu ZX, Hennessy B, Ding Z, Larrea M, Kondo S, Dumont DJ, Gutterman JU, Walker CL, Slingerland JM, Mills GB. (2007b) The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. Nat Cell Biol 2007; 9:218-24.

Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. Nature. 1999 Dec 9;402(6762):672-6.

Liang XH, Yu J, Brown K, Levine B. (2001) Beclin 1 contains a leucine-rich nuclear export signal that is required for its autophagy and tumor suppressor function. Cancer Res. Apr 15;61(8):3443-9.

Lindmo K, Stenmark H. (2006) Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. J Cell Sci. 2006 Feb 15;119(Pt 4):605-14.

Liou W, Geuze HJ, Geelen MJ, Slot JW. (1997) The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles. J Cell Biol. Jan 13;136(1):61-70.

Lippai M, Csikós G, Maróy P, Lukácsovich T, Juhász G, Sass M. (2008) SNF4Agamma, the Drosophila AMPK gamma subunit is required for regulation of developmental and stress-induced autophagy. Autophagy. 2008 May 16;4(4):476-86.

Lizcano JM, Göransson O, Toth R, Deak M, Morrice NA, Boudeau J, Hawley SA, Udd L, Mäkelä TP, Hardie DG, Alessi DR. (2004) LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. EMBO J. Feb 25;23(4):833-43.

Locke M, Collins JV. (1965) The structure and formation of protein granules in the fat body of an insect J Cell Biol. 1965 Sep 1;26(3):857-884.

Locke M, Collins JV. (1966) Sequestration of protein by the fat body of an insect. Nature. 1966 Apr 30;210(5035):552-3.

Locke M, Collins JV. (1968) Protein uptake into multivesicular bodies and storage granules in the fat body of an insect. J Cell Biol. 1968 Mar;36(3):453-83.

Locke M, Sykes AK. (1975) The role of the Golgi complex in the isolation and digestion of organelles. Tissue Cell. 1975;7(1):143-58.

Lockshin RA, Zakeri Z. (2004) Apoptosis, autophagy, and more. Int J Biochem Cell Biol. 2004 Dec;36(12):2405-19.

Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P, Hall MN. (2002) Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. Mol Cell. 2002 Sep;10(3):457-68.

Long X, Ortiz-Vega S, Lin Y, Avruch J. (2005) Rheb binding to mammalian target of rapamycin (mTOR) is regulated by amino acid sufficiency. J Biol Chem. 2005 Jun 24;280(25):23433-6.

Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB. (2005) Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005 Jun;6(6):439-48.

MacIntosh GC, Bassham DC. (2011) The connection between ribophagy, autophagy and ribosomal RNA decay. Autophagy. 2011 Jun;7(6):662-3.

Majeski AE, Dice JF. (2004) Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. Int J Biochem Cell Biol. 2004 Dec;36(12):2435-44.

Manjithaya R, Nazarko TY, Farré JC, Subramani S. (2010) Molecular mechanism and physiological role of pexophagy. FEBS Lett. 2010 Apr 2;584(7):1367-73.

Manning BD, Cantley LC. (2003) Rheb fills a GAP between TSC and TOR. Trends Biochem Sci. 2003 Nov;28(11):573-6.

Martin DN, Baehrecke EH. (2004) Caspases function in autophagic programmed cell death in Drosophila. Development. 2004 Jan;131(2):275-84.

Martin DN, Balgley B, Dutta S, Chen J, Rudnick P, Cranford J, Kantartzis S, DeVoe DL, Lee C, Baehrecke EH. (2007) Proteomic analysis of steroid-triggered autophagic programmed cell death during Drosophila development. Cell Death Differ. 2007 May;14(5):916-23..

Marzella L, Ahlberg J, Glaumann H. (1981) Autophagy, heterophagy, microautophagy and crinophagy as the means for intracellular degradation. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol. 1981;36(2-3):219-34.

Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. (2007) Role of autophagy in cancer. Nat Rev Cancer. Dec;7(12):961-7.

Matsuura A, Tsukada M, Wada Y, Ohsumi Y. (1997) Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in Saccharomyces cerevisiae. Gene. Jun 19;192(2):245-50.

Mayer C, Grummt I. (2006) Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. Oncogene. Oct 16;25(48):6384-91.

Mayer C, Zhao J, Yuan X, Grummt I. (2004) mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. Genes Dev. 2004 Feb 15;18(4):423-34.

Mazure NM, Pouysségur J. (2009) Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? Curr Opin Cell Biol. 2009 Dec 18.

McGee SL, Howlett KF, Starkie RL, Cameron Smith D, Kemp BE, Hargreaves M. (2003) Exercise increases nuclear AMPK α2 in human skeletal muscle. Diabetes 2003; 52:926-8.

Meijer AJ, Codogno P. (2007) AMP-activated protein kinase and autophagy. Autophagy. 2007 May-Jun;3(3):238-40.

Meijer WH, van der Klei IJ, Veenhuis M, Kiel JA. (2007) ATG genes involved in non-selective autophagy are conserved from yeast to man, but the selective Cvt and pexophagy pathways also require organism-specific genes. Autophagy. 2007 Mar-Apr;3(2):106-16.

Meléndez A, Neufeld TP. (2008) The cell biology of autophagy in metazoans: a developing story. Development. 2008 Aug;135(14):2347-60.

Meléndez A, Tallóczy Z, Seaman M, Eskelinen EL, Hall DH, Levine B. (2003) Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in C. elegans. Science. Sep 5;301(5638):1387-91.

Mercer CA, Kaliappan A, Dennis PB. (2009) A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. Autophagy. 2009 Jul;5(5):649-62.

Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. (2011) Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. Autophagy. 2011 Jul;7(7):673-82.

Mitchelhill KI, Stapleton D, Gao G, House C, Michell B, Katsis F, Witters LA, Kemp BE. (1994) Mammalian AMP-activated protein kinase shares structural and functional homology with the catalytic domain of yeast Snf1 protein kinase. J Biol Chem 1994; 269:2361-4.

Mitchener JS, Shelburne JD, Bradford WD, Hawkins HK. (1976) Cellular autophagocytosis induced by deprivation of serum and amino acids in HeLa cells. Am J Pathol. Jun;83(3):485-92.

Mizushima N, Klionsky DJ. 820079 Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. Annu Rev Nutr. 2007;27:19-40.

Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, Natsume T, Ohsumi Y, Yoshimori T. (2003) Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. J Cell Sci. May 1;116(Pt 9):1679-88.

Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y. (1999) Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. EMBO J. Jul 15;18(14):3888-96.

Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD, Klionsky DJ, Ohsumi M, Ohsumi Y. (1998) A protein conjugation system essential for autophagy. Nature. Sep 24;395(6700):395-8.

Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T. (2002) Autophagosome formation in mammalian cells. Cell Struct Funct. 2002 Dec;27(6):421-9.

Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K, Tokuhisa T, Ohsumi Y, Yoshimori T. (2001) Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. J Cell Biol. Feb 19;152(4):657-68.

Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. (2011) The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. Annu Rev Cell Dev Biol. 2011 Oct 29.

Moscat J, Diaz-Meco MT, Wooten MW. (2007) Signal integration and diversification through the p62 scaffold protein. Trends Biochem Sci. 2007 Feb;32(2):95-100.

Müller F, Adori C, Sass M. (2004) Autophagic and apoptotic features during programmed cell death in the fat body of the tobacco hornworm (Manduca sexta). Eur J Cell Biol. 2004 Mar;83(2):67-78.

Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y. (2007) Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. Cell. 2007 Jul 13;130(1):165-78.

Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y (2009) Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009 Jul;10(7):458-67.

Natarajan K, Meyer MR, Jackson BM, Slade D, Roberts C, Hinnebusch AG, Marton MJ. (2001) Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. Mol Cell Biol. Jul;21(13):4347-68.

Neufeld TP. (2003) Body building: regulation of shape and size by PI3K/TOR signaling during development. Mech Dev. 2003 Nov;120(11):1283-96.

Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B, Yang H, Hild M, Kung C, Wilson C, Myer VE, MacKeigan JP, Porter JA, Wang YK, Cantley LC, Finan PM, Murphy LO. (2009) Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. Cell. 2009 Feb 6;136(3):521-34.

Nixon RA, Cataldo AM, Mathews PM. (2000) The endosomal-lysosomal system of neurons in Alzheimer's disease pathogenesis: a review. Neurochem Res. Oct;25(9-10):1161-72.

Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, Dann SG, Kim SY, Gulati P, Byfield MP, Backer JM, Natt F, Bos JL, Zwartkruis FJ, Thomas G. (2008) Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Oct 4;102(40):14238-43.

Noda T, Ohsumi Y. (1998) Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. J Biol Chem. 1998 Feb 13;273(7):3963-6.

Ogier-Denis E, Codogno P. (2003) Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. Biochim Biophys Acta. Mar 17;1603(2):113-28.

O'Hare, K. and G. M. Rubin. (1983) Structure of P transposable elements and their sites of insertion and excision in the Drosophila melanogaster genome. Cell 34:25-35.

Ohsumi Y, Mizushima N. (2004) Two ubiquitin-like conjugation systems essential for autophagy. Semin Cell Dev Biol. Apr;15(2):231-6.

Ohsumi Y. (2001) Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Mar;2(3):211-6.

Oku M, Sakai Y. (2010) Peroxisomes as dynamic organelles: autophagic degradation. FEBS J. 2010 Aug;277(16):3289-94.

Overstreet E, Chen X, Wendland B, Fischer JA. (2003) Either part of a Drosophila epsin protein, divided after the ENTH domain, functions in endocytosis of delta in the developing eye. Curr Biol 2003; 13:854-60.

Pan DA, Hardie DG. (2002) A homologue of AMP-activated protein kinase in Drosophila melanogaster is sensitive to AMP and is activated by ATP depletion. Biochem J 2002; 367:179-86.

Partridge L, Alic N, Bjedov I, Piper MD. (2011) Ageing in Drosophila: the role of the insulin/Igf and TOR signalling network. Exp Gerontol. 2011 May;46(5):376-81.

Pelt-Verkuil, van E, van Rongen E, de Priester W. (1979) Normal and experimentally induced lysosomal activity in the larval fat body of Calliphora erythrocephala Meigen. Cell Tissue Res. 1979;203(3):443-55.

Poeting A, Koerwer W, Pongs O. (1982) Ecdysterone induced protein synthesis in salivary glands and in fat body of Drosophila melanogaster larvae. Chromosoma. 1982;87(1):89-102.

Polo S, Confalonieri S, Salcini AE, Di Fiore PP. (2003) EH and UIM: endocytosis and more. Sci STKE. 2003; 16;2003(213):re17

Polson HE, de Lartigue J, Rigden DJ, Reedijk M, Urbé S, Clague MJ, Tooze SA. (2010) Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. Autophagy. 2010 May 23;6(4).

Postlethwait JH, Jones GJ. (1978) Endocrine control of larval fat body histolysis in normal and mutant Drosophila melanogaster. J Exp Zool. 1978 Feb;203(2):207-14.

Potter CJ, Pedraza LG, Xu T. (2002) Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. Nat Cell Biol. Sep;4(9):658-65.

Powell D, Sato JD, Brock HW, Roberts DB. (1984) Regulation of synthesis of the larval serum proteins of Drosophila melanogaster. Dev Biol. 1984 Mar;102(1):206-15.

Powell D, Sato JD, Brock HW, Roberts DB. (1984) Regulation of synthesis of the larval serum proteins of Drosophila melanogaster. Dev Biol 1984; 102:206-15.

Powers T, Walter P. (1999) Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in Saccharomyces cerevisiae. Mol Biol Cell. Apr;10(4):987-1000.

Price GM. (1973) Protein and nucleic acid metabolism in insect fat body. Biol Rev Camb Philos Soc. 1973 Aug;48(3):333-75.

Priester, de W, van Pelt-Verkuil E, de Leeuw G. (1979) Demonstration of acid phosphatase activity induced by 20-hydroxyecdysone in the fat body of Calliphora. Cell Tissue Res. 1979 Sep 1;200(3):435-42.

Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G, Levine B. (2003) Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. J Clin Invest. Dec;112(12):1809-20.

Raught B, Gingras AC, Sonenberg N. (2001) The target of rapamycin (TOR) proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jun 19;98(13):7037-44.

Ravikumar B, Duden R, Rubinsztein DC. (2002) Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. Hum Mol Genet. May 1;11(9):1107-17.

Reggiori F, Klionsky DJ.(2002) Autophagy in the eukaryotic cell. Eukaryot Cell. 2002 Feb;1(1):11-21.

Richards G. (1980) The polytene chromosomes in the fat body nuclei of Drosophila melanogaster. Chromosoma. 1980;79(2):241-50.

Riddiford LM. (1993) Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis. Receptor. 1993 Fall;3(3):203-9.

Robertson, H. M., Preston, C. R., Phillis, R. W., Johnson-Schlitz, D., Benz W. K. and Engels W. R. (1988) A stable genomic source of P element transposase in Drosophila melanogaster. Genetics 118:461-470.

Robinow S, Talbot WS, Hogness DS, Truman JW. (1993) Programmed cell death in the Drosophila CNS is ecdysone-regulated and coupled with a specific ecdysone receptor isoform. Development. 1993 Dec;119(4):1251-9.

Rodriguez-Enriquez S, Kim I, Currin RT, Lemasters JJ. (2006) Tracker dyes to probe mitochondrial autophagy (mitophagy) in rat hepatocytes. Autophagy. Jan-Mar;2(1):39-46.

Rosenthal JA, Chen H, Slepnev VI, Pellegrini L, Salcini AE, Di Fiore PP. (1999) The epsins define a family of proteins that interact with components of the clathrin coat and contain a new protein module. J Biol Chem 1999; 274:33959-65.

Rosner M, Fuchs C, Siegel N, Valli A, Hengstschläger M. (2009) Functional interaction of mammalian target of rapamycin complexes in regulating mammalian cell size and cell cycle. Hum Mol Genet. 2009 Sep 1;18(17):3298-310.

Rosner M, Hengstschläger M. (2008) Cytoplasmic and nuclear distribution of the protein complexes mTORC1 and mTORC2: rapamycin triggers dephosphorylation and delocalization of the mTORC2 components rictor and sin1. Hum Mol Genet. 2008 Oct 1;17(19):2934-48.

Rubin GM, Spradling AC. Genetic transformation of Drosophila with transposable element vectors. Science 1982; 218:348-53.

Rubinsztein DC, DiFiglia M, Heintz N, Nixon RA, Qin ZH, Ravikumar B, Stefanis L,

Rudkin GT. (1972) Replication in polytene chromosomes. Results Probl Cell Differ. 1972;4:59-85.

Salt I, Celler JW, Hawley SA, Prescott A, Woods A, Carling D, Hardie DG. (1998) AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform. Biochem J. 1998 Aug 15;334 (Pt 1):177-87.

Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, Sabatini DM. (2008) The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. Science. 2008 Jun 13;320(5882):1496-501.

Sánchez-Margalet V, Najib S. (1999) p68 Sam is a substrate of the insulin receptor and associates with the SH2 domains of p85 PI3K. FEBS Lett. 1999 Jul 23;455(3):307-10.

Sanghavi P, Koenig H. (1976) Autophagy-related changes of arylsulphatases A and B in rat liver lysosomes. Biochem J. 1976 Jun 1;155(3):725-8.

Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM. (2005) Growing roles for the mTOR pathway. Curr Opin Cell Biol. 2005 Dec;17(6):596-603.

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. Science. 2005 Feb 18;307(5712):1098-101.

Sass M, Csikós G, Kömüves L, Kovács J. (1983) Cyclic AMP in the fat body of Mamestra brassicae during the last instar and its possible involvement in the cellular autophagocytosis induced by 20-Hydroxyecdysone. Gen Comp Endocrinol. 1983 Apr;50(1):116-23.

Sass M, Kovács J. (1975) Ecdysterone and an analogue of juvenile hormone on the autophagy in the cells of fat body of mamestra brassicae. Acta Biol Acad Sci Hung. 1975;26(3-4):189-96.

Sass M, Kovács J. (1977) The effect of ecdysone on the fat body cells of the penultimate larvae of Mamestra brassicae. Cell Tissue Res. 1977 May 31;180(3):403-9.

Sass M. (2008) Autophagy research on insects. Autophagy. Apr 1;4(3):265-7.

Sass M. and Kovács, J (1980) The effect of actinomycin D, cycloheximide and puromycin on 20-hydroxyecdysone induced autophagocytosis in larval fat body cells of Pieris brassicae J. Insect Physiol. 26. 568-577

Sass, M., Kömüves, L., Csikós, Gy. and Kovács, J. (1989) Changes in the activities of lysosomal enzymes in the fat body and mid gut of two Lepidopteran insects during metamorphosis. Comp. Biochem. Physiol. 92A, 285-289

Schenkel, H., Scheller, K. (1986) Stage- and tissue-specific expression of the genes encoding calliphorin, the major larval serum protein of Calliphora vicina Roux's Arch. Dev. Biol. 195, 290-295.

Schlumpberger M, Schaeffeler E, Straub M, Bredschneider M, Wolf DH, Thumm M. (1997) AUT1, a gene essential for autophagocytosis in the yeast Saccharomyces cerevisiae. J Bacteriol. 1997 Feb;179(4):1068-76.

Schmelzle T, Hall MN. (2000) TOR, a central controller of cell growth. Cell. 2000 Oct 13;103(2):253-62.

Schweichel JU, Merkel HJ. (1973) The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. Teratology 1973; 7:253-66.

Scott RC, Juhász G, Neufeld TP. (2007) Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. Curr Biol. 2007 Jan 9;17(1):1-11.

Scott RC, Schuldiner O, Neufeld TP. (2004) Role and regulation of starvation-induced autophagy in the Drosophila fat body. Dev Cell. 2004 Aug;7(2):167-78.

Scott SV, Nice DC 3rd, Nau JJ, Weisman LS, Kamada Y, Keizer-Gunnink I, Funakoshi T, Veenhuis M, Ohsumi Y, Klionsky DJ. (2000) Apg13p and Vac8p are part of a complex of

phosphoproteins that are required for cytoplasm to vacuole targeting. J Biol Chem. Aug 18;275(33):25840-9.

Searles, L. L., R. S. Jokerst, P. M. Bingham, R. A. Voelker and A. L. Greenleaf. (1982) Molecular cloning of sequences from a Drosophila RNA polymerase II locus by P element transposon tagging. Cell 31:585-592.

Seglen PO, Bohley P. (1992) Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. Experientia. 1992 Feb 15;48(2):158-72.

Shaw RJ. (2009) LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. Acta Physiol (Oxf). May;196(1):65-80.

Shigemitsu K, Tsujishita Y, Hara K, Nanahoshi M, Avruch J, Yonezawa K. (1999) Regulation of translational effectors by amino acid and mammalian target of rapamycin signaling pathways. Possible involvement of autophagy in cultured hepatoma cells. J Biol Chem. Jan 8;274(2):1058-65.

Shintani T, Klionsky DJ. (2004) Autophagy in health and disease: a double-edged sword. Science. 2004 Nov 5;306(5698):990-5.

Shintani T, Mizushima N, Ogawa Y, Matsuura A, Noda T, Ohsumi Y. (1999) Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. EMBO J. Oct 1;18(19):5234-41.

Short JD, Dere R, Houston KD, Cai SL, Kim J, Bergeron JM, Shen J, Liang J, Bedford MT, Mills GB, Walker CL. (2010) AMPK-mediated phosphorylation of murine p27 at T197 promotes binding of 14-3-3 proteins and increases p27 stability. Mol Carcinog. 2010 May;49(5):429-39.

Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, Gaffney PR, Reese CB, Painter GF, Holmes AB, McCormick F, Hawkins PT. (1997) Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. Science. 1997 Jul 25;277(5325):567-70.

Stromhaug PE, Klionsky DJ. (2001) Approaching the molecular mechanism of autophagy. Traffic. 2001 Aug;2(8):524-31.

Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y. (2001) The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. EMBO J. Nov 1;20(21):5971-81.

Suzuki K, Ohsumi Y. (2007) Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, Saccharomyces cerevisiae. FEBS Lett. May 22;581(11):2156-61.

Takagi H, Matsui Y, Hirotani S, Sakoda H, Asano T, Sadoshima J. (2007) AMPK mediates autophagy during myocardial ischemia in vivo. Autophagy 2007; 3:405-7.

Takeshige K, Baba M, Tsuboi S, Noda T, Ohsumi Y. (1992) Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. J Cell Biol. 1992 Oct;119(2):301-11.

Talbot WS, Swyryd EA, Hogness DS. (1993) Drosophila tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. Cell. 1993 Jul 2;73(7):1323-37.

Tanaka Y, Guhde G, Suter A, Eskelinen EL, Hartmann D, Lüllmann-Rauch R, Janssen PM, Blanz J, von Figura K, Saftig P. (2000) Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. Nature. Aug 24;406(6798):902-6.

Tanida I, Komatsu M, Ueno T, Kominami E. (2003) GATE-16 and GABARAP are authentic modifiers mediated by Apg7 and Apg3. Biochem Biophys Res Commun. 2003 Jan 17;300(3):637-44.

Tanida I, Mizushima N, Kiyooka M, Ohsumi M, Ueno T, Ohsumi Y, Kominami E. (1999) Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. Mol Biol Cell. May;10(5):1367-79.

Tanida I, Ueno T, Kominami E. (2004) LC3 conjugation system in mammalian autophagy. Int J Biochem Cell Biol. 2004 Dec;36(12):2503-18.

Tanida I. (2011) Autophagy basics. Microbiol Immunol. 2011 Jan;55(1):1-11.

Teichert U, Mechler B, Müller H, Wolf DH. (1989) Lysosomal (vacuolar) proteinases of yeast are essential catalysts for protein degradation, differentiation, and cell survival. J Biol Chem. 1989 Sep 25;264(27):16037-45.

Thumm M, Kadowaki T. (2001) The loss of Drosophila APG4/AUT2 function modifies the phenotypes of cut and Notch signaling pathway mutants. Mol Genet Genomics. 2001 Dec;266(4):657-63.

Thumm M, Kadowaki T. (2001) The loss of Drosophila APG4/AUT2 function modifies the phenotypes of cut and Notch signaling pathway mutants. Mol Genet Genomics. 2001 Dec;266(4):657-63.

Thummel CS. (2001) Steroid-triggered death by autophagy. Bioessays. 2001 Aug;23(8):677-82.

Tojo S, Betchaku T, Ziccardi VJ, Wyatt GR. (1978) Fat body protein granules and storage proteins in the silkmoth, Hyalophora cecropia. J Cell Biol. 1978 Sep;78(3):823-38.

Tojo S, Kiguchi K, Kobazashi M. (1981) Hormonal control of the storage protein synthesis and uptake by the fat body in the silkworm Bombyx mori. J Insect Physiol 1981; 27:491-7.

Tolkovsky A. (2005) Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair. Autophagy 2005; 1:11-22.

Tóth ML, Sigmond T, Borsos E, Barna J, Erdélyi P, Takács-Vellai K, Orosz L, Kovács AL, Csikós G, Sass M, Vellai T. (2008) Longevity pathways converge on autophagy genes to regulate life span in Caenorhabditis elegans. Autophagy. Apr 1;4(3):330-8.

Tsang CK, Liu H, Zheng XF. (2010) mTOR binds to the promoters of RNA polymerase I- and III-transcribed genes. Cell Cycle. Feb 7;9(5).

Tschäpe JA, Hammerschmied C, Mühlig-Versen M, Athenstaedt K, Daum G, Kretzschmar D. (2002) The neurodegeneration mutant löchrig interferes with cholesterol homeostasis and Appl processing. EMBO J. 2002 Dec 2;21(23):6367-76.

Ugland H, Naderi S, Brech A, Collas P, Blomhoff HK. (2011) cAMP induces autophagy via a novel pathway involving ERK, cyclin E and Beclin 1. Autophagy. 2011 Oct 1;7(10).

Uttenweiler A, Mayer A. (2008) Microautophagy in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Methods Mol Biol. 2008;445:245-59.

Vellai T, Takács-Vellai K, Sass M, Klionsky DJ. (2009) The regulation of aging: does autophagy underlie longevity? Trends Cell Biol. Oct;19(10):487-94.

Vellai T. (2009) Autophagy genes and ageing. Cell Death Differ. Jan;16(1):94-102.

Ventruti A, Cuervo AM. (2007) Autophagy and neurodegeneration. Curr Neurol Neurosci Rep. Sep;7(5):443-51.

Vieira OV, Botelho RJ, Rameh L, Brachmann SM, Matsuo T, Davidson HW, Schreiber A, Backer JM, Cantley LC, Grinstein S. (2001) Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. J Cell Biol. 2001 Oct 1;155(1):19-25.

Waelter S, Scherzinger E, Hasenbank R, Nordhoff E, Lurz R, Goehler H. (2001) The huntingtin interacting protein HIP1 is a clathrin and alpha-adaptin-binding protein involved in receptor-mediated endocytosis. Hum Mol Genet 2001; 10:1807-17.

Wang CW, Klionsky DJ. (2003) The molecular mechanism of autophagy. Mol Med. 2003 Mar-Apr;9(3-4):65-76.

Wang L, Harris TE, Lawrence JC Jr. (2008) Regulation of proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) function by mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)-mediated phosphorylation. J Biol Chem. 2008 Jun 6;283(23):15619-27.

Wang RC, Levine B. (2010) Autophagy in cellular growth control. FEBS Lett. Apr 2;584(7):1417-26.

Wang X, Proud CG. (2009) Nutrient control of TORC1, a cell-cycle regulator. Trends Cell Biol. 2009 Jun;19(6):260-7.

Watanabe K, Sasaki F. (1974) Ultrastructural changes in the tail muscles of anuran tadpoles during metamorphosis. Cell Tissue Res. 1974;155(3):321-36.

Weidberg H, Shvets E, Elazar Z. (2011) Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. Annu Rev Biochem. 2011 Jun 7;80:125-56.

Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z. (2010) LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. EMBO J. 2010 Jun 2;29(11):1792-802.

Weisman R, Choder M. (2001) The fission yeast TOR homolog, tor1+, is required for the response to starvation and other stresses via a conserved serine. J Biol Chem. 2001 Mar 9;276(10):7027-32.

Wendland B, Steece KE, Emr SD. (1999) Yeast epsins contain an essential N-terminal ENTH domain, bind clathrin and are required for endocytosis. EMBO J 1999; 18:4384-93.

Wendland B. (2002) Epsins: adaptors in endocytosis? Nat Rev Mol Cell Biol 2002; 3:971-7.

Wigglesworth, VB. (1949) The utilization of reserve substances in Drosophila during flight. J Exp Biol. 1949 Aug;26(2):150-63,

Wolfe J, Akam ME, Roberts DB.(1977) Biochemical and immunological studies on larval serum protein 1, the major haemolymph protein of Drosophila melanogaster third-instar larvae. Eur. J. Biochem. 1977; 79:47-53.

Woo SY, Kim DH, Jun CB, Kim YM, Haar EV, Lee SI, Hegg JW, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH. (2007) PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor beta expression and signaling. J Biol Chem. 2007 Aug 31;282(35):25604-12.

Woods A, Cheung PC, Smith FC, Davison MD, Scott J, Beri RK, Carling D. (1996) Characterization of AMP-activated protein kinase beta and gamma subunits. Assembly of the heterotrimeric complex in vitro. J Biol Chem. 1996 Apr 26;271(17):10282-90.

Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. (2006) TOR signaling in growth and metabolism. Cell. 2006 Feb 10;124(3):471-84.

Xie Z, Klionsky DJ. (2007) Autophagosome formation: core machinery and adaptations. Nat Cell Biol. 2007 Oct;9(10):1102-9.

Xie Z, Nair U, Klionsky DJ. (2008) Dissecting autophagosome formation: the missing pieces. Autophagy. 2008 Oct 1;4(7):920-2.

Xie Z, Nair U, Klionsky DJ. (2008b) Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. Mol Biol Cell. 2008 Aug;19(8):3290-8

Yamamoto A, Simonsen A. (2011) The elimination of accumulated and aggregated proteins: a role for aggrephagy in neurodegeneration. Neurobiol Dis. 2011 Jul;43(1):17-28.

Yang Z, Klionsky DJ. (2009) Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. Curr Opin Cell Biol. 2009 Dec 22.

Yao TP, Segraves WA, Oro AE, McKeown M, Evans RM. (1992) Drosophila ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. Cell. 1992 Oct 2;71(1):63-72.

Yen WL, Klionsky DJ. (2008) How to live long and prosper: autophagy, mitochondria, and aging. Physiology (Bethesda). Oct;23:248-62.

Yen WL, Shintani T, Nair U, Cao Y, Richardson BC, Li Z, Hughson FM, Baba M, Klionsky DJ. (2010) The conserved oligomeric Golgi complex is involved in double-membrane vesicle formation during autophagy. J Cell Biol. 2010 Jan 11;188(1):101-14.

Yin L, Nordin JH, Lucches P, Giorgi F. (2001) Cysteine proprotease colocalizes with vitellogenin in compound granules of the cockroach fat body. Cell Tissue Res. 2001 Jun;304(3):391-9.

Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL. (2009) 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. Autophagy. 2009 Nov;5(8):1180-5.

Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL. (2009) 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. Autophagy. Nov;5(8):1180-5.

Yoshimori T. (2004) Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jan 9;313(2):453-8.

Zhang H, Stallock JP, Ng JC, Reinhard C, Neufeld TP. (2000) Regulation of cellular growth by the Drosophila target of rapamycin dTOR. Genes Dev. Nov 1;14(21):2712-24.

Zhang Y, Gao X, Saucedo LJ, Ru B, Edgar BA, Pan D. (2003) Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. Nat Cell Biol. 2003 Jun;5(6):578-81.

Zheng YT, Shahnazari S, Brech A, Lamark T, Johansen T, Brumell JH. (2009) The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway. J Immunol. 2009 Nov 1;183(9):5909-16.

Zhong Y, Wang QJ, Li X, Yan Y, Backer JM, Chait BT, Heintz N, Yue Z. (2009) Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. Nat Cell Biol. Apr;11(4):468-76.

Zhu C, Wang X, Xu F, Bahr BA, Shibata M, Uchiyama Y, Hagberg H, Blomgren K. (2005) The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia. Cell Death Differ. Feb;12(2):162-76.

Zinke I, Schütz CS, Katzenberger JD, Bauer M, Pankratz MJ. (2002) Nutrient control of gene expression in Drosophila: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response. EMBO J. Nov 15;21(22):6162-73.

Zutphen, van T, van der Klei IJ, Kiel JA. (2008) Pexophagy in Hansenula polymorpha. Methods Enzymol. 2008;451:197-215.

8. Summary

Autophagy is a basic cell biological process of self-digestion in eukaryotic cells that maintains homeostasis by cleaning up and recycling long-lived or damaged proteins and cellular organelles. When the cells are challenged by different stress conditions such as hypoxia, cold or heat stress or starvation, autophagy provides monomers and energy for the survival of a cell or organism. Interestingly, autophagy also has been linked to programmed cell death, especially during postembryonal development of metamorphosing animals, which initiates a controversial discussion on how a suggested role of autophagy in cell suicide might meet with its survival function.

In holometabolous insects, autophagy is induced in larval tissues before and during metamorphosis, when the majority of these cells die. The timing and hormonal control of this process are well-known, making these animals a remarkable model system to study autophagy. At the time of wandering period, in one of the most important larval tissue, the fat body, the emerging autophagosome fuses with a lysosome, and forms an autophagic vacuole, in which the sequestered material is degraded. In alignment with this increasing degradation, the total activity of the lysosomal enzymes is low during the feeding period and higher in the course of wandering stage and strikingly increased at the time of puparium formation. Because the capacity of protein synthesis is dramatically weakened, the origin of the elevating enzyme activity seemed to be mysterious. Our investigations showed that at least one of these enzymes, the para-nitrophenyl phosphate phosphatase (Acph) is secreted by fat body cells into the hemolymph during the larval stage, where it is stored in an inactive form. An increase in the 20-HE titer at the end of last larval stage reverses this process, and the enzyme is taken up by the fat body cells, where it becomes activated.

Recently it is a widely accepted that the autophagy is a highly conserved process in eukaryotes. By our investigations, the *Drosophila* homolog of yeast Aut1, CG6877/Draut1, is a ubiquitously expressed cytosolic protein in the larval tissues, including fat body. Larvae expressing an Daut1RNAi construct were unable to induce autophagy and heterophagy in their trophocytes before pupariation and die during metamorphosis proving that Draut1 has a essential role during the fruit fly development. To our knowledge, this is the first report of a multicellular animal lacking the function of a gene participating in the protein conjugation systems of autophagy.

Screening P-element-induced mutant collections, 52 lines were selected as potentially defected ones in endocytosis or autophagy. After excluding those which were rescued by 20-hydroxyecdysone treatment, the exact position of the inserted P-element was determined in the remaining lines. One of the isolated mutants carries an insertion of a P-element in the gene coding *snf4aγ*, the Drosophila homologue of the AMPK (AMP-activated protein kinase) subunit. The ability to form autophagic vesicles can be restored by remobilization of the P-element in the mutant. Silencing of *snf4aγ* by RNAi suppresses autophagic vesicle formation in wildtype flies. The antibody raised against Snf4aγ showed that this gene product is constitutively present in the wild-type larval tissues during postembryonal development, but the Snf4aγ protein was nearly absent from the cells of homozygous mutants. Snf4aγ translocates into the nuclei of fat body cells at the onset of the wandering stage concurrently with the beginning of the autophagic process. Our results demonstrate that Snf4aγ has an essential role in the regulation of autophagy in Drosophila larval fat body cells.

The other finding of screening P-element-induced mutant collections was the *l(3)S011027* stock, in that *liquid facets (lqf)* gene was affected which codes an epsin homolog protein in *Drosophila*. We revealed that Lqf is essential to the receptor-mediated endocytosis of larval serum proteins (LSPs) in the larval fat body cells of *Drosophila*. In *l(3)S011027* line, lack of Lqf fails the formation of autophagosomes thus leading to the arrest of destroying of trophocytes. Transgenic larvae carrying Lqf-RNAi construct were unable to generate endocytic and autophagic vacuoles and led to a prolonged larval stage. On the other hand, GFP-tagged Lqf protein showed an exclusive colocalization with the LysoTracker Red- or GFP-Atg8a labeled autophagosomes. By using the antiserum generated against the fifth exon of *lqf*, we demonstrated that prior to the onset of developmental autophagy the Lqf protein was present in the nucleus of fat body cell, but thereafter the protein was localized in the territory of endocytic and autophagic vacuoles. The fact that the inhibition of the target of rapamycin (TOR) did not restore the autophagic process and the normal development in the case of *lqf* mutant larvae points to that the Lqf is downstream to the TOR, the central kinase of the autophagy pathway.

There is still much more to learn about programmed cell death during animal development. We believe that with our contribution the mechanism of autophagy can be a little bit better understood.

Köszönetnyilvánítás:

Igaz köszönettel tartozom mindenekelőtt **Prof. Sass Miklós**nak, aki hosszú évtizedeken át irányította és támogatta munkámat, állandóan bíztatva arra, hogy megírjam ezt a disszertációt, és aki folyamatosan bízott abban, hogy képes leszek erre.

Köszönetemet szeretném kifejezni a Tanszék volt és jelenlegi oktatóinak, akik megtanították nekem, hogy mit jelent egyetemi oktatónak és kutatónak lenni, és hogy hogyan kell ezt a nehéz mesterséget művelni:

Prof. Kovács János
Dr. Zboray Géza
Kondics Lajos
Dr. Réz Gábor
Dr. László Lajos
Dr. Csörgő Tibor
Pálfia Zolt
Dr. Fellinger Erzsében
Dr. Kőműves László
Dr. Kovács Attila
Válóczi Károlyné
Pálfia Sarolta
Dr. M. Odorfer Magdolna
Dr. Víghné H. Borbála

Köszönöm jelenlegi kollégáimnak, hogy eddig segítettek a munkámban, és remélem, hogy a jövőben is együtt dolgozhatom velük:

Dr. Lukácsovich Tamás
Dr. Vellai Tibor
Dr. Lippai Mónika
Dr. Lőw Péter
Dr. Maróy Péter
Dr. Erdélyi Miklós
Dr. Molnár Kinga
Dr. Schlett Katalin
Dr. Juhász Gábor
Dr. Tárnok Krisztián
Dr. Holderith Noémi
Saródi Mariann
Kováts Zsófia
Vágó Eszter

Végül, de nem utolsósorban, köszönet illeti tanítványaimat, akikkel jó volt sikeresen együtt dolgozni:

Dr. Füredi Sándor
Bánréti Ágnes
Kis Viktor
Lőrincz Péter
Maruzs Tamás
Skrapits Katalin
Széplaki Szilvia
Sándor Zoltán