

37. OTDK Biológia Szekció

A PI3K(III)-komplex és a Hsc70-4 kapcsolatának vizsgálata *Drosophila* nefrocitákban

Balogh Virág
Biológus Msc 1. év

Témavezetők:
Dr. Lőrincz Péter
egyetemi adjunktus

Nagy Anikó Zsuzsanna
tudományos segédmunkatárs
Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék



Budapest, 2025

Tartalom

Rövidítésjegyzék	3
Bevezetés.....	4
Előzetes eredmények	8
Célkitűzések	11
Anyag és módszertan	12
Légymunka	12
Immunfestés.....	12
Lakúna festés	13
Mikroszkópia	13
Eredmények:.....	15
1.PI3K és Hsc70-4 hiányában sérül a HOPS toborzás	15
2.Vps34 hiányában sérül a lakúnamintázat	16
3.PI3P hiányában p62 aggregátumok alakulnak ki	17
4.PI3K hiányában diffúzzá válik a FYVE-mintázat, de Hsc70-4 hiányában nem	18
5. PI3K és Hsc70-4 hiányában felborul a klatrin-mintázat	20
6.PI3K és Hsc70-4 hiányában sérül az eMI	22
Diszkusszió.....	24
Összefoglaló	27
Köszönetnyilvánítás	28
Irodalom	29

Rövidítésjegyzék

Rövidítés	Feloldás	Feloldás magyarul
Atg	autophagy related gene	autofágiával kapcsolt gén
clc	clathrin	klatrin
CMA	chaperon-mediated autophagy	chaperon-mediált autofágia
eMI	endosomal microautophagy	endoszomális mikroautofágia
ESCRT	endosomal sorting complexes required for transport	transzporthoz szükséges endoszomális szorting komplexek
GAL4	galactose4	
GFP	green fluorescent protein	
HA	hemagglutinin	
HOPS	homotypic fusion and vacuole protein sorting	
Hrs	hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	
Hsc70-4	heat shock cognate	
HSPA8	heat shock protein family A member 8	
ILV	intraluminal vesicle	intralumenáris vezikula
L3	larvae3	
LAMP2A	lysosome-associated membrane protein 2 A	lizoszómához kapcsolódó membránfehérje
lt	light	
mCh	mcherry	
MVB	multivesicular body	multivezikuláris test
PI3K(III)	phosphoinositide 3-kinase(III)	foszfoinozítid-3-kináz
PI3P	phosphatidylinositol 3-phosphate	foszfatidil-inozitol-3-foszfát
RME-8	receptor-mediated endocytosis-8	
SNX1	sorting-nexin-1	
UAS	upstream activating sequence	
UVRAG	UV radiation resistance-associated gene	
Vps	vacuolar protein sorting	

Bevezetés

Autofágiának nevezzük az eukariótákban azt az evolúciósan konzervált katabolikus folyamatot, melynek során fehérjék, hibás organellek a sejt lítikus organellekébe, a lizoszómába vagy késői endoszómába, növények és gombák esetén a vakuólumba szállítódnak, majd ott lebomlanak ((1-3)). A folyamat megfelelő működése elengedhetetlen a sejt homeosztázisának fenntartásában, így az autofág lebontás hibája számos neurodegeneratív, rákos és vesebetegséggel kapcsolatba hozható (1, 4). Az autofágiának három fő típusát különíthetjük el: a makroautofágiát, chaperon-mediált autofágiát és mikroautofágiát.

Makroautofágia (1. ábra a,) esetén egy kettősmembránú struktúra, a fagofór körbeveszi a lebontandó anyagot, így kialakul az autofagoszóma. Ezt az autofagoszóma és lizoszóma fúziója követi, melynek eredményeképp létrejön az autolizoszóma, így a felvett anyag bomlásnak indulhat (5).

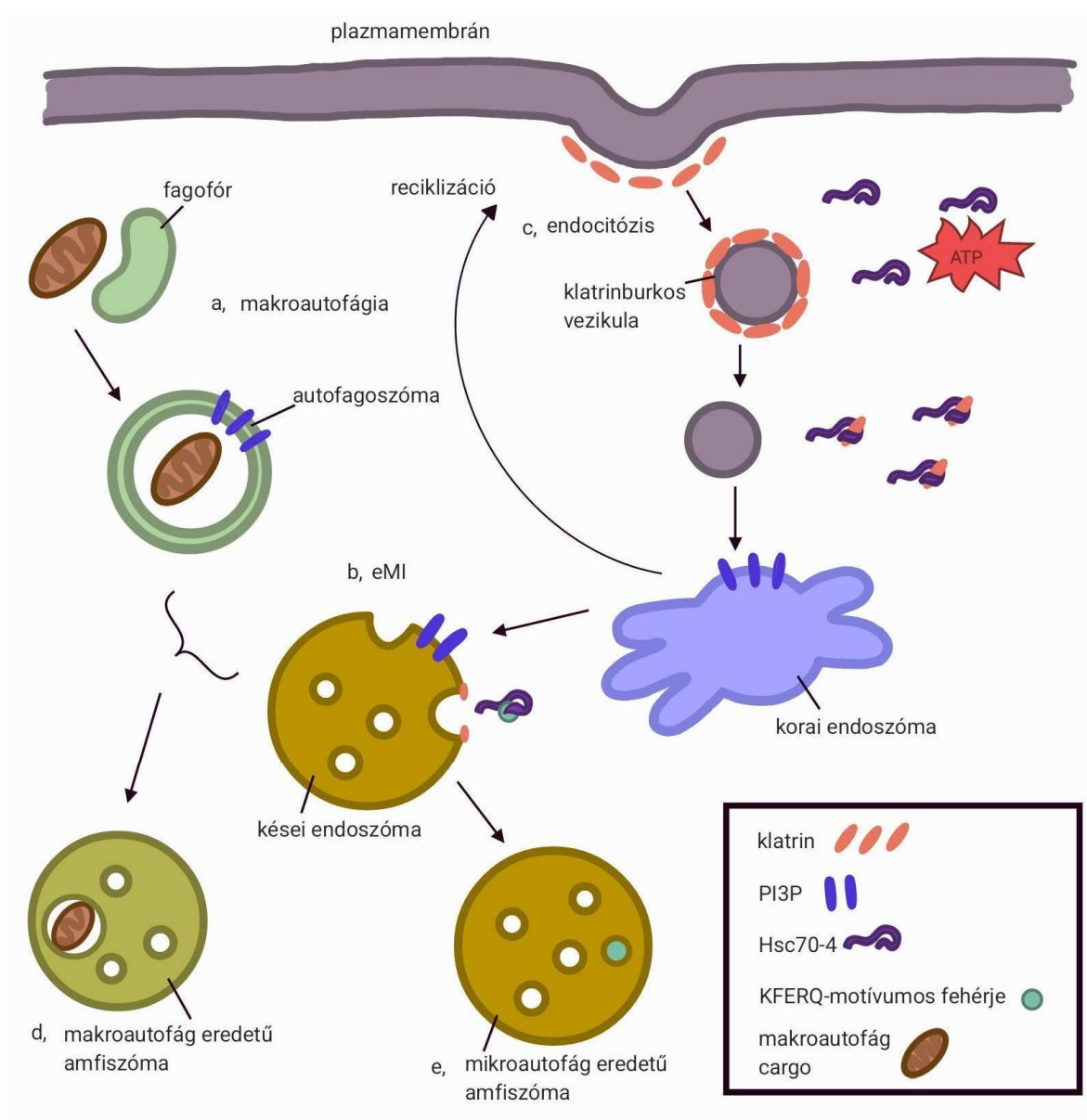
A második típus, chaperon-mediált autofágia (CMA) során a cargo olyan citoplazmatikus fehérje, amely KFERQ-motívumot tartalmaz. Ezt a motívumot a Hsc70-4 (HSPA8) hősokkfehérje ismeri fel, s ezáltal a lizoszómához szállítja az adott fehérjét, ahol a LAMP2A (lysosome-associated membrane protein 2 A) csatornán át bekerül a lítikus organellekébe. CMA csak madarakban és emlősökben figyelhető meg, ugyanis bennük van jelen a LAMP2A csatornafehérje (6).

A mikroautofág útvonal során a lizoszómák vagy késői endoszómák közvetlenül veszik fel a lebontani kívánt cargo, ez történhet lizoszomális ki- és betüremkedéssel, vagy endoszomális betüremkedéssel (7).

Az utóbbi folyamatot endoszomális mikroautofágiának (eMI) nevezzük (1. ábra b.). Az így létrejött, intralumenáris vezikulákat (ILV) tartalmazó képletet multivezikuláris testnek (MVB, multivesicular body) is nevezzük. Az eMI a cargo szempontjából lehet szelektív, és nonszelektív. Az -általunk is vizsgált- KFERQ-szelektív eMI során a lebontásra szánt anyag egy KFERQ-motívummal ellátott fehérje, amely a Hsc70-4 hősokkfehérje közvetítésével kerül a késői endoszómák közelébe, ugyanis Hsc70-4 képes a C-terminális kationos doménje által a késői endoszómák felszínén lévő negatív töltésű foszfatidilszerinhez kötni (8). Ezt követően a cargo képes lesz bejutni az endoszómába azáltal, hogy az ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport) az endoszomális felszín PI3P-ben (foszfatidil-inozitol-3-foszfát) gazdag részeihez toborzódik, ott összeszerelődik. Az ESCRT-0 komplex Hrs alegysége FYVE cink ujj doménjén keresztül képes a PI3P kötésére, és ugyanez az alegység fogja a klatrint az endoszomális felszínre toborozni. Ennek köszönhető, hogy membránbetűródés

formálódik, illetve a Hsc70-4 is képes az endoszóma membrán deformálására azáltal, hogy C-terminális doménjével képes kötni az endoszóma membrán negatív töltésű foszfatidilszerinjeit (6, 9, 10). Ahogy említettem, az ILV-genezishez szükséges még a klatrin jelenléte is, amely “flat clathrin” formában, egy kétrétegű lapos rácsként jelöli ki a betűródések helyét, interakciós felületet képezve a cargot is kötő ESCRT-komplexek számára (11, 12). A Hsc70-4 fehérje feladata lesz az endoszomális membrán klatrin-borította terület méretének szabályozása is. A hősokkfehérje endoszóma membránhoz toborzását az RME-8 (receptor-mediated endocytosis-8) végzi, amely az SNX1 (sorting-nexin-1) fehérjéhez fog kötődni, és mindkettő képes a PI3P kötésére (13). Az már ismert, hogy utóbbi hiányában felborul az endoszomális rendszer klatrin mintázata (14).

Az eMI mellett ismert az is, hogy a Hsc70-4 és klatrin az endocitózisban is részt vesznek, a lefűződő klatrinburkos vezikulákról ebben az esetben is a Hsc70-4 távolítja el a klatrint (1. ábra c,) (15).



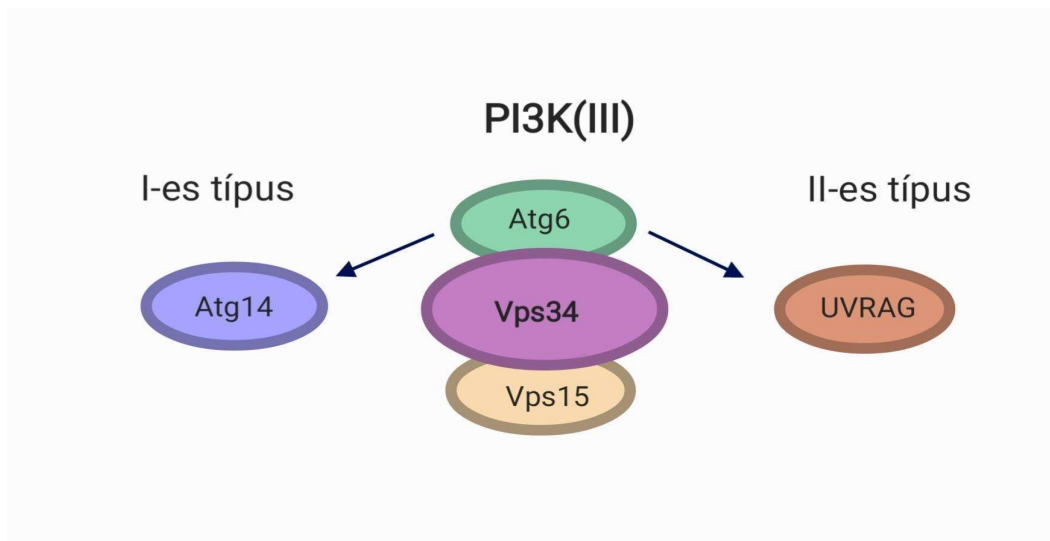
1.ábra A makro- és mikroautofág, valamint endocitotikus útvonal találkozási pontja: a kései endoszóma (MVB)

Ahol az a, a makroautofágia folyamatát, b, az eMI-t, c, az endocitotikus útvonalat jelöli. D, mutatja a makroautofág, e, a mikroautofág eredetű amfiszómákat (saját ábra).

A foszfoinozítidek fontos szerepet játszanak a membránidentitás meghatározásában azáltal, hogy az egyes membránokon a rajtuk található foszfátcsoportok száma szerint töltéseloszlási mintázatokat alakítanak ki. Így a membránfelületekhez effektorokat, mint pl. HOPS (homotypic fusion and vacuole protein sorting) pányvázó-komplexet képesek toborozni. Az egyes foszfoinozítidek egymásba képesek alakulni azáltal, hogy foszfatázok defoszforilálják, és kinázok foszforilálják az inozitol gyűrű egyes szénatomjait (16). A PI3P legfőképp a korai

endoszómákra, autofagoszómákra jellemző foszfolipid, de előfordul kései endoszómákon is. Ennek létrejöttéhez elengedhetetlen a III-as típusú foszfatidil-inozitol-3-kináz enzimkomplex (PI3K(III)) megfelelő működése. *Drosophila melanogaster*ben két típusú PI3K(III) is jelen van.

Mindkettőnek részét képezi a Vps34 alegység, amely maga a kináz, és mellette két regulációs egység, az Atg6 és Vps15. Az I-es típusú komplexhez Atg14 kapcsolódik, ez az autofagoszómákon hozza létre a PI3P-t, míg a II-es típus, amelyhez UVRAG kapcsolódik, az endoszomális PI3P létrejöttéért felel (2. ábra) (17-19).



2.ábra: Az I-es és II-es típusú PI3K(III)-komplex

A két komplex közös elemét képezi a Vps34 kináz enzim, és mellette az Atg6 és Vps15 regulációs egységek. Az I-es típusú komplexben emellett Atg14, a II-esben UVRAG vesz részt (saját ábra).

Kísérleteinket *Drosophila melanogaster* modellállat lárvális garland nefrocitáinak használatával végeztük. Ezek a sejtek feleltethetők meg a humán vese podocitáinak, emiatt nagy bazális endocitotikus aktivitással bírnak. Ennek köszönhetően nagy, jól megfigyelhető endoszómákkal rendelkeznek, ami ideális modellé teszi az endolizoszomális rendszer megfigyelésére irányuló kísérletek számára (20).

A fent említett tény, miszerint az ecetmuslicában nem található meg a CMA-ban résztvevő LAMP2A csatornafehérje, alkalmas vizsgálati modellé teszi ezt az eMI tanulmányozásához, hiszen, ebben az organizmusban CMA-val nem kell számolnunk.

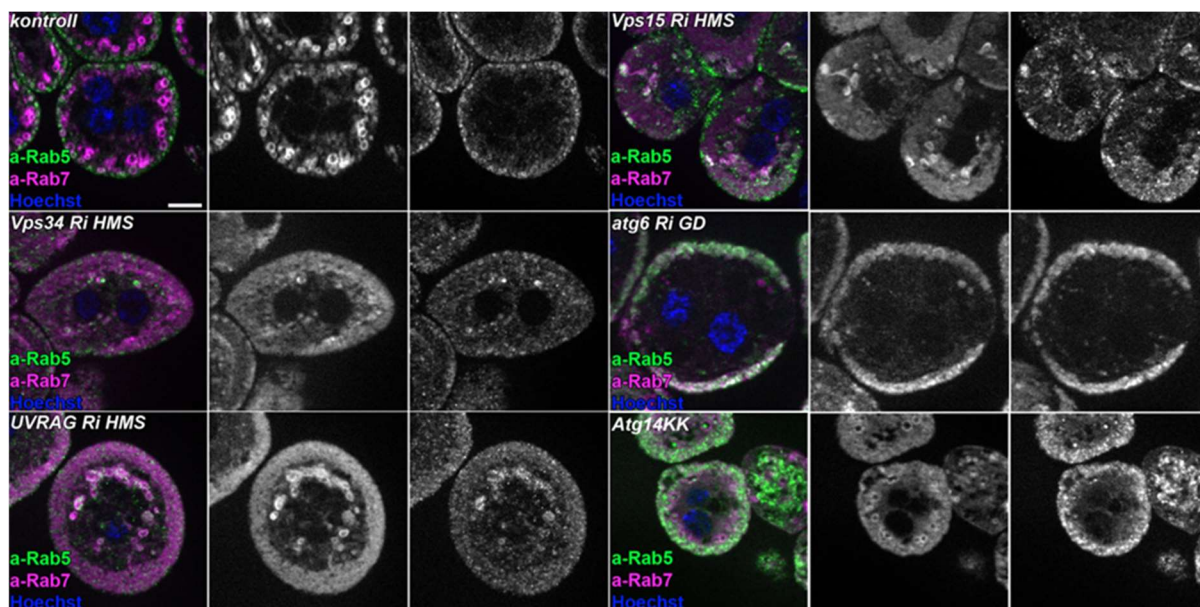
Az általunk vizsgálni kívánt transzgének szövetspecifikus -esetünkben garland nefrocitákra specifikus- kifejeződését a prospero-GAL4 rendszer teszi lehetővé. A rendszer egyik fő része a GAL4 transzkripciós aktivátor, amelynek szövetspecifikus expresszióját endogén enhancerek biztosítják. A másik fő része maga a transzgén, amelynek promotor régiója az UAS (upstream

aktivációs szekvencia) szabályozása alatt áll. Így, ha GAL4 géntermék kifejeződik, az kötődik UAS-hez, ezáltal fog termelődni a célfehérjénk (18).

A fentiek mellett az *ecetmuslica* mellett szól az is, hogy a gerinces modellekhez képest olcsó és könnyű a fenntartásuk, genetikai hátterük kellően feltárt, a recesszíven letális mutációk fenntartására pedig balanszer kromoszómák alkalmazhatók. Életciklusuk rövid, bebábozódásuk előtt három lárvastádium különíthető el, amelyek közül mi az L3-as, úgynevezett vándorló stádiumú állatokat használtuk.

Előzetes eredmények

Kutatócsoportunk előzetes kísérletei mutatják, hogy a II-es típusú PI3P(III) hiányában felborul a korai és kései endoszómák rendezettsége (3.ábra).



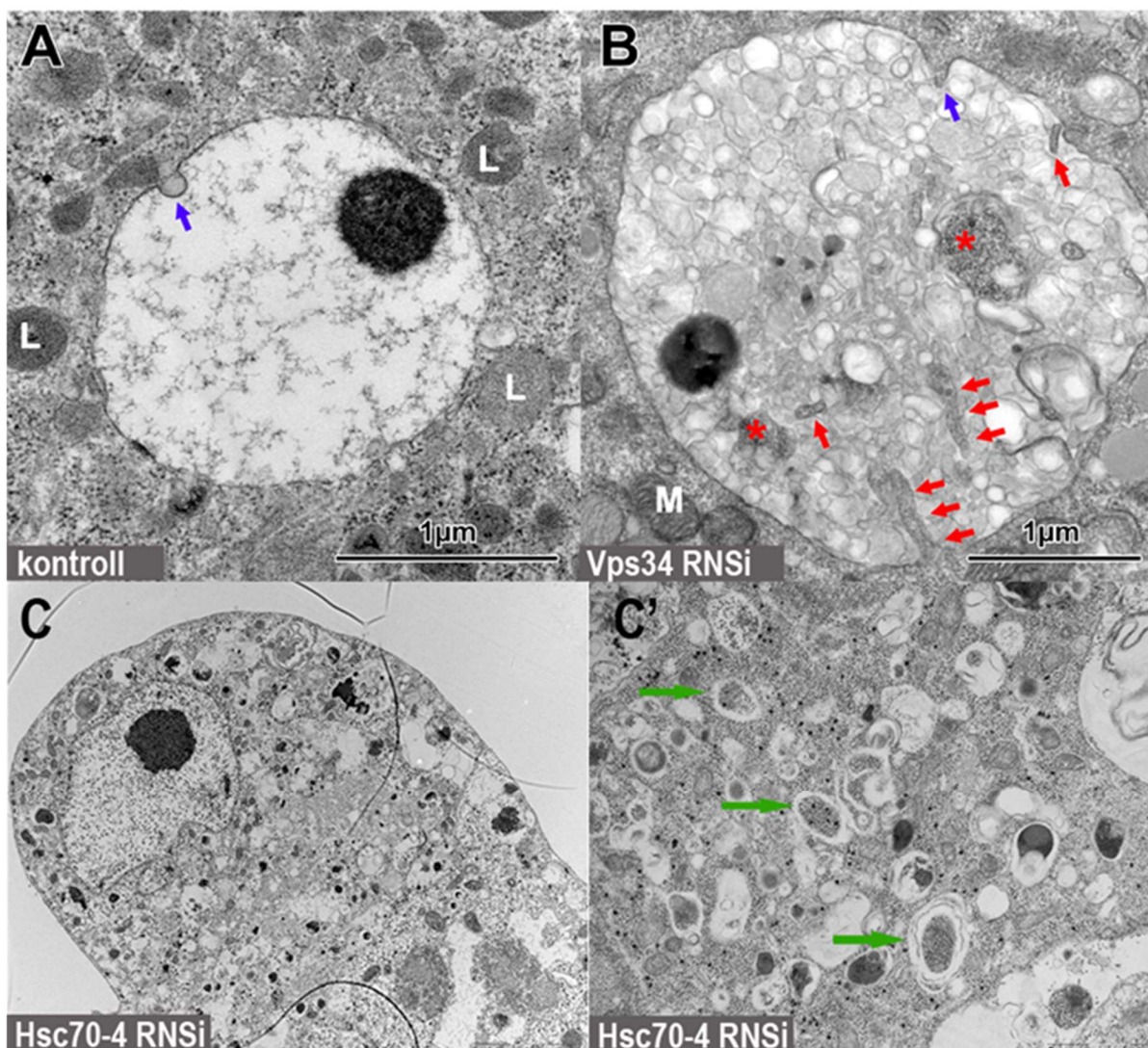
3.ábra: Az endoszomális rendszer mintázata PI3K(III)-komplex-tagok hiányában

Zöld csatornán a Rab5 festéssel a korai, a piros csatornán Rab7-tel a kései endoszómákat láthatjuk, a kék csatorna jelzi a Hoechst-tel festett sejtmagot. Méretvonal: 20µ. (Nagy Anikó képei)

A Rab7 és Rab5 is egy kis GTP-áz, melyek közül Rab5 a korai, míg Rab7 a kései endoszómákra jellemző, ezek kontroll sejtekben gyűrűként jelennek meg. Ezeknél a sejteknél látható, hogy az endoszomális rendszerre jellemző rendezettség szerint a korai, Rab5-pozitív endoszómák kívül, míg a Rab7-pozitív kései endoszómák beljebb helyezkednek el.

Ehhez képest a II-es típusú PI3K(III)-tagok hiányában felborult ez a rendezettség, a membrán alatti kortikális Rab7 jel mellett Rab5- és Rab7-pozitív rögök voltak. Mivel az Atg14 hiányában kontrollszerű képet figyelhettünk meg, arra következtethetünk, hogy az I-es típusú komplex nem szükséges a megfelelő endoszomális rendezettség kialakulásához.

Kutatócsoportunk tagjai Vps34 és Hsc70-4 hiányában garland sejtek elektronmikroszkópos felvételein citoplazmarészletet tartalmazó endoszómákat láttak, amik vélhetően amfiszómák (4. ábra B, C). Az amfiszómák az autofagoszómák autolizoszómává érésének egy fázisát képezik. Kontroll garland sejtekre nem jellemző a jelenlétük, de vélhetően a lizoszomális lebontás hibája miatt felhalmozódnak. Az amfiszómák keletkezhetnek makroautofágia során autofagoszóma és kései endoszóma fúziójával (1. ábra d.), illetve eMI útján is (1. ábra e,) (21).



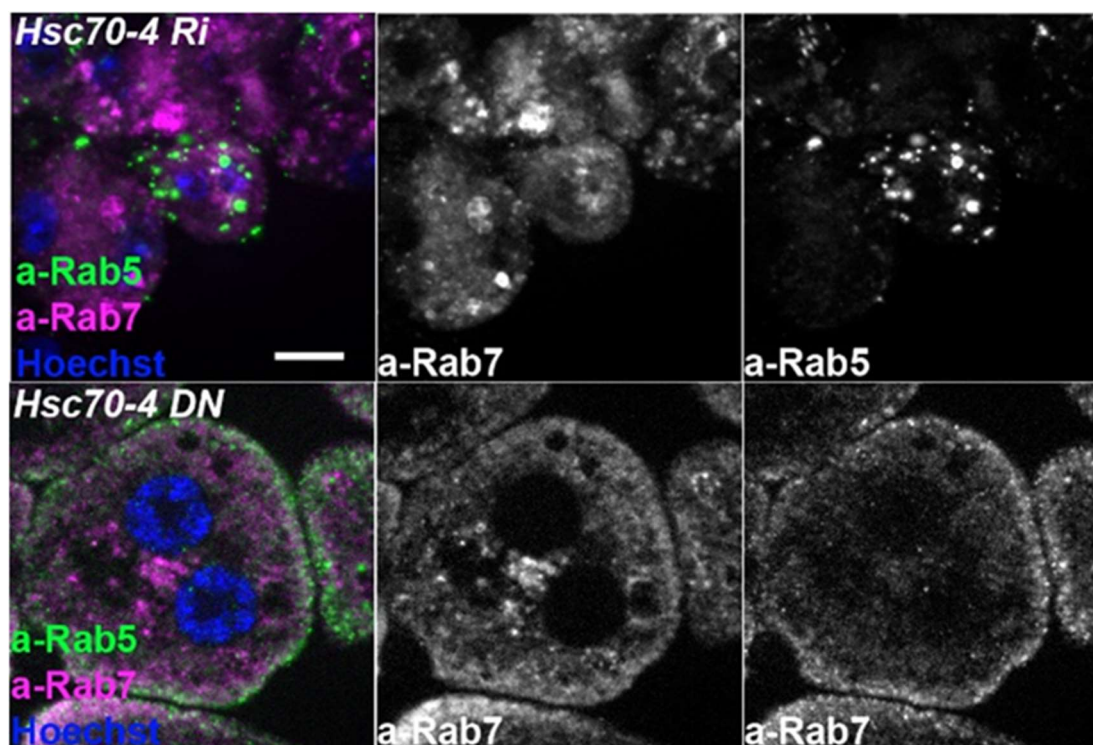
4. ábra Vad típusú (A, A') és Vps34 (B, B') és Hsc70-4 (C, C') RNS interferencia genetikai háttérű garland nefrociták elektronmikroszkópos képei

Ahol L: lizoszóma, M: mitokondrium.

Az A és B képen a kék nyilak az endoszomális betűrődéseket jelölik, míg a pirosak olyan befűződéseket, amik nem tudtak lecsípődni. B panel csillag: citoplazmarészletek, C' panel nyilak: citoplazmarészletek. (Dr. Lőrincz Péter képei)

Az elektronmikroszkópos képek a várákosainknak megfelelően -hiszen PI3K hiányában nincs autofagoszóma képződés- az utóbbi esetre utalnak, ugyanis endoszomális betüremkedések láthatók, valamint a létrejött amfiszómák sosem tartalmaztak mitokondriumot, ami makroautofág eredetű amfiszómákban jelen lenne (4. ábra A, B). Hsc70-4 hiányában ehhez hasonló fenotípust láthatunk (4. ábra C, C'). A Vps34-ben és Hsc70-4-ben található citoplazmarészletek talán megfeleltethetők egymásnak, s ha igen, azok lehetnek a Rab7-pozitív rögök. Hogy ezt megvizsgáljuk, Hsc70-4 hiányában is elvégeztük a Rab5 Rab7 festéseket.

Hsc70-4 hiányában is a PI3K(III) hiányában jelentkező fenotípust láttunk (4. ábra).



5. ábra: Az endoszomális rendszer képe Hsc70-4 hiányában

Zöld csatornán a Rab5 festéssel a korai, a piros csatornán Rab7-tel a kései endoszómákat láthatjuk, a kék csatorna jelzi a Hoechst-tel festett sejtmagot. Méretvonal: 20μ. (Nagy Anikó képei)

Célkitűzések

Meg szeretnénk volna vizsgálni a PI3K(III)-komplexek és a Hsc70-4 hősokkfehérje szerepét eMI során. Ennek érdekében az alábbi immuncitokémiás kísérleteket végeztük el az egyes PI3K-komponensek és a Hsc70-4 hősokkfehérje hiányában.

1. Rab7 és It mintázat vizsgálata annak érdekében, hogy meg tudjuk, változik-e a HOPS-komplex toborzása.
2. Lakúna festések elvégzése, hogy meg tudjuk, hogyan változik a garland sejtek lakúnamintázata.
3. Atg8a és p62 mintázat vizsgálata a csendesítések makroautofágiára kifejtett hatásának vizsgálatához.
4. Rab7 és FYVE mintázat vizsgálata, hogy megfigyeljük a PI3P mintázatát és azt, hogy képes volt-e egyáltalán kialakulni az adott genetikai háttérrel.
5. Rab7, klatrin és LAMP mintázat megfigyelése a klatrin és lizoszomális rendszer mintázat-változásainak tanulmányozásához.
6. Rab7 és a KFERQ-motívumos fehérjék vizsgálata, hogy megfigyeljük, történik-e változás az eMI-ben.

Anyag és módszertan

Légymunka

A muslicatörzsek standard körülmények között, azaz 25°C-on, 12-órás megvilágítás mellett, standard kukoricaliszt-agar-élesztő alapú táptalajon voltak tartva. A keresztezéseket 29°C-on tartottam az RNS-interferencia jobb kifejeződése érdekében. A felhasznált törzseket a 6. ábra tartalmazza. Az Atg6 hiányát kétféle csendesítés esetén is megvizsgáltam, ezeket jelöli a „GD” és „JF”. A különbséget az képezi a két törzs között, hogy az atg6 gén más részén történt az RNS-interferencia. Hsc70-4 hiányának megfigyelésére az RNS-interferenciát tartalmazó törzs mellett több esetben megvizsgáltam domináns negatív „DN” mutáció hatását is. A domináns negatív törzs használata azért előnyös, mivel a Hsc70-4 számos folyamatban chaperon fehérjeként fontos szerepet tölt be, így a teljes hiánya gyakran már lárvakori letalitást eredményezett.

Immunfestés

Az immunfestés első napján a muslicák L3-as stádiumú vándorló lárváit MSB puffer cseppben tárgylemezen felboncoltam, elkülönítve belőle a garland nefrocita sejteket. Az MSB puffer összetétele 80 mM PIPES, 5mM EGTA, 1 mM MgCl₂ desztillált vízben oldva. A preparátumokat ezután egy Eppendorf csőben MSB fixálóban 25 °C-on 40 percig fixáltam. A fixáló összetétele MSB pufferben oldva 3,7% FA, 0,25% GA, 0,2% Triton X-100. Ezt követően PBS-oldatban kiöblítettem a mintákat, majd 2 mg/ml Na-borohidrid- PBS-oldatban tartottam 5 percig majd ezt is PBS öblítés, és benne 10 percig mosás követte. Ezután 15 percig 0,1%-os PBTX (Triton X-100 PBS-ben oldva) oldatban, majd 30 percig FCS-PBTX 5%-os blokkoló oldatban tartottam a sejteket. Mindezek után a preparátumokat a kívánt elsődleges ellenanyag-blokkoló oldatba tettem, amibe 1:100 arányban Na-azidot is kevertem. Ebben inkubáltam egy éjszakán 4 °C-on.

Másnap 0,1% PBTX öblítés után 15 percig 4%-os PBTX-NaCl-sóoldatba tettem a mintákat, amely 1:200 arányban tartalmaz Hoechst sejtmagi festéket. Ezt PBTX öblítés, majd kétszer 15 percig tartó mosás követte. Ezután 30 percig 5%-os FCS-PBTX blokkoló oldatban tartottam a preparátumokat, ezt követte a 3 órás inkubálás a megfelelő másodlagos ellenanyag-blokkoló oldatban, fénytől elzártan. Ezt háromszori PBTX-öblítés követte, majd 15 percig inkubálás

Hoechst-ös sóoldatban, majd 2x15 perc PBTX mosás, végül háromszor PBS öblítés, majd 2x15 perc mosás benne. A mintákat ezután tárgylemezre tettem 13 µl fedőmédiumban, melynek összetétele: 1 rész 10X PBS, 9 rész glicerin, 0,1 rész 20%-os propil-gallát dimetil-szulfoxidban oldva, majd óvatosan tárgylemezre helyeztem rá, aminek a széleit körömlakkal rögzítettem. A kísérletsorozatokat legalább kétszer megismételtem genotípusonként 7-7 állat felhasználásával. A felhasznált ellenanyagokat a 6. ábra tartalmazza.

Lakúnafestés

A muslicák L3-as stádiumú lárváit M3 médiumban felboncoltam, és ezt követően 4%-os formalinos oldatban fixáltam szobahőn 5 percig. Ezután M3-mal átöblítettem, majd háromszor 5 perces PBS-mosás következett. Utána BSA-Alexa Fluor 647 festék 0,2 mg/ml-es koncentrációjú oldatában 15 percig inkubáltam 25°C-on 15 percig, és ennek leteltével egy PBS-öblítés után ismét formalinos fixálás következett 45 percig. Végül négyszer PBS-ben mostam a mintát. A kísérletet legalább kétszer elvégeztem genotípusonként 7-7 állat felhasználásával.

Mikroszkópia

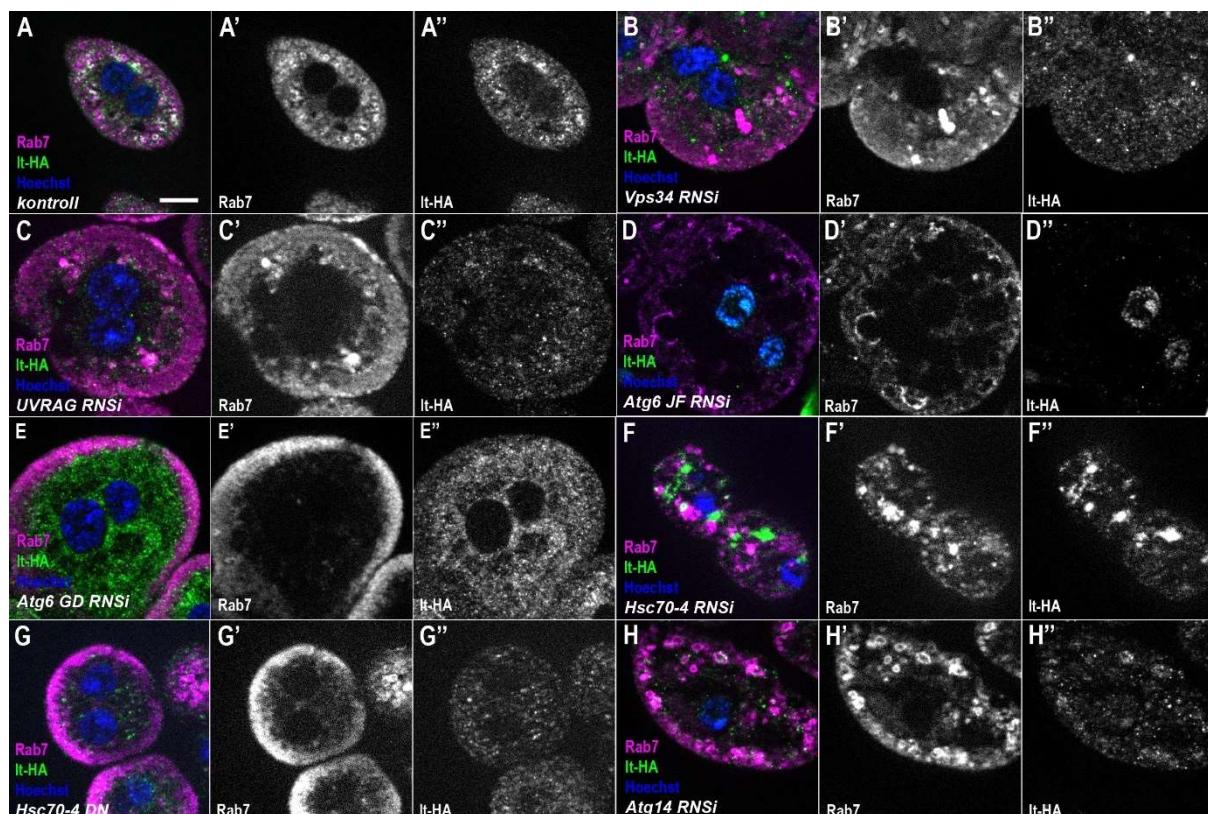
A fluoreszcens felvételekhez használt mikroszkóp típusa AxioImager M2 (Carl Zeiss), kiegészítve Apotome2 grid konfokális egységgel (Carl Zeiss), a kamera típus: Orca Flash 4.0 LT sCMOS kamerával (Hamamatsu Photonics), az általam használt objektív Plan Apochromat 63×/NA=1.40 (Zeiss) immerziós. A mikroszkópos felvételek feldolgozásához ZEN 2.3 programot (Carl Zeiss), míg a panelek elkészítéséhez Adobe Photoshop CS3-at használtam.

Felhasznált törzsek			
Rövid név	Genotípus	Törzsszám	
lucRi	UAS-pLUC RNAi JF	BDRC: 31603	
PG4	++;DCR;ProsperoGal4/TM6	Ajándék Bruce Edgartól, említés: (23)	
PG4, lt-HA	++;DCR;ProsperoGal4, lt-HA/TM6	Itt készült: (23)	
FYVE; PG4/TM6	++;UAS-GFP-myc-2xFYVE;ProsperoGal4/TM6	BDRC: 42712	
clc-GFP	++;DCR;ProsperoGal4, clc-GFP/TM6	BDRC: 7109	
KFERQ-mCh	++;UAS-KFERQ-PA-mCh	Ajándék Dr. Kovács Tibortól	
KFERQ-mCh;PG4/TM6	++;UAS-KFERQ-PA-mCh;Prospero-GAL4/TM6	Saját készítés	
Atg6 GD		VDRC: v22123	
Atg6 JF		BDSC: 28060	
Atg14 KK		VDRC:v108559	
Hsc70-4 Ri		BDSC: 28709	
Hsc70-4 DN		BDSC:5845	
UVRAG HMS		BDSC:34368	
Vps34 HMS	++;Vps34/ST6	BDSC:33384	
Hrs JF		BDSC:28026	
Vps34 HMS; Hrs JF	++;Vps34 HMS/SM6; Hrs JF/TM6	Saját készítés	
Elsődleges ellenanyagok			
Név	Típus	Hígítás	Forrás
anti-Rab7	egér	1:10	DSHB
anti-Rab5	nyúl	1:100	Abcam
anti-GFP	csirke	1:1000	Invitrogen
anti-Atg8a	patkány	1:300	Tanszéki (24)
anti-p62	nyúl	1:1000	Tanszéki (25)
anti-mCherry	tengerimalac	1:500	Tanszéki
anti-GFP	tengerimalac	1:300	Tanszéki
anti-HA	nyúl	1:200	Sigma-Aldrich/Merck
anti-LAMP1	nyúl	1:1000	Ajándék: Andreas Jenny (26)
Másodlagos ellenanyagok			
Alexa Fluor 568-konjugált anti-egér		1:1000	Invitrogen
Alexa Fluor 488-konjugált anti-nyúl		1:1000	Invitrogen
Alexa Fluor 488-konjugált anti-csirke		1:1000	Invitrogen
Alexa Fluor 658-konjugált anti-patkány		1:1000	Invitrogen
Alexa Fluor 647-konjugált anti-nyúl		1:1000	Invitrogen
DyLight 550-konjugált anti-tengerimalac		1:600	Thermo Scientific
DyLight 488-konjugált anti-tengerimalac		1:600	Thermo Scientific
Konjugált fehérje			
BSA-Alexa Fluor 647		1:10	Invitrogen

6.ábra: Felhasznált törzsek, ellenanyagok listája

Eredmények:

1.PI3K és Hsc70-4 hiányában sérül a HOPS toborzás



7. ábra: PI3K(III)-komplex-tagok és Hsc70-4 hiányának vizsgálata Rab7, Lt-HA festéssel

A piros csatorna mutatja a Rab7 festéssel jelölt kései endoszómákat, zöld csatornán pedig a HA-val jelölt Lt HOPS-komplex-tag látható, a kék csatorna a Hoechsttel festett sejtmagot jelzi. Méretvonal: 20µm.

Célunk az volt ezzel a kísérlettel, hogy megvizsgáljuk az egyes PI3K-tagok és Hsc70-4 hiányának hatását a HOPS-toborzásra. A Vps41 (*Drosophilában* Lt) a HOPS-pányvázó komplex egyik tagja, amely a legtöbb ismert lizoszómális és kései endoszómális fúzióhoz szükséges, amelynek detektálásához egy Vps41-hez fuzionált HA-t kifejező muslicatörzset használtunk.

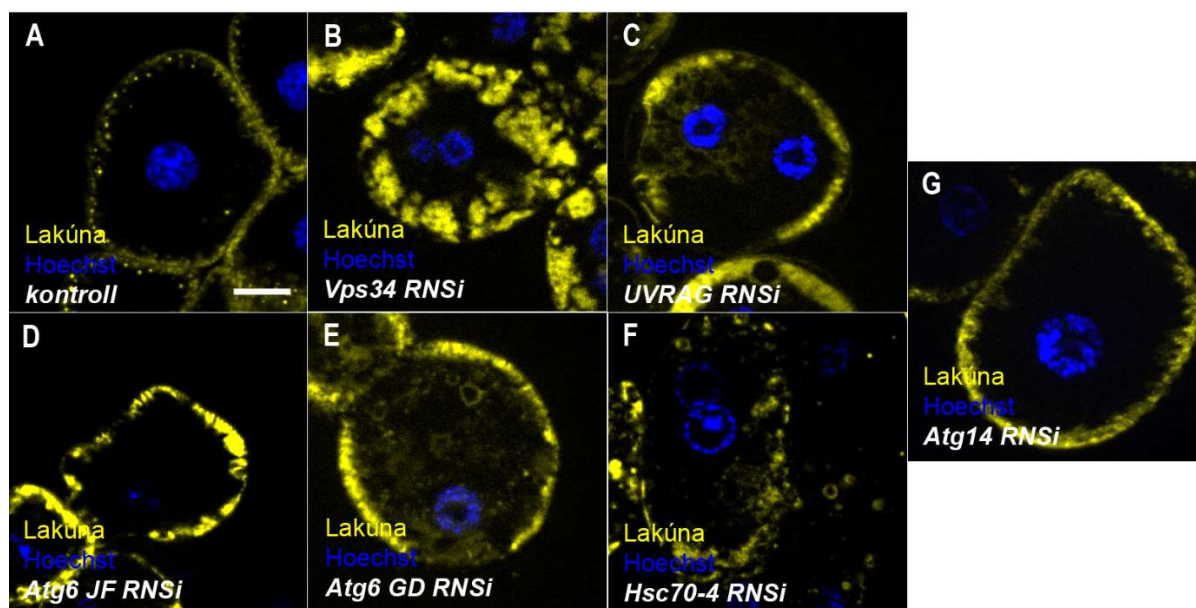
Kontroll sejtek esetén a kései endoszómák membránján a Lt-HA jel feldúsul, a HA-jel átfed a Rab7-jellel (7. ábra A panel).

A II-es típusú PI3K(III)-tagok és Hsc70-4 hiányában azonban Vps41 nem kolokalizál a Rab7 jellel (7. ábra B-G panel).

Atg14 csendesítésnél kontrollszerű sejteket láthatunk (7. ábra H panel).

Összességében az látható, hogy a II-es típusú PI3K(III) és Hsc70-4 hiányában nem toborzódik a kései endoszómákhoz a HOPS.

2.Vps34 hiányában sérül a lakúnamintázat



8. ábra: PI3K(III)-komplex-tagok és Hsc70-4 hiányának vizsgálata lakúnafestéssel

Sárga (távoli vörös csatorna) jelöli a lakúnákat, kékkel pedig a Hoechsttel festett sejtmag látható. Méretvonal: 20 μ m.

Meg szeretnénk volna vizsgálni a PI3K-tagok és Hsc70-4 hiányának hatását a lakúnamintázatra, ugyanis ismert, hogy Vps34 és Hc70-4 is részt vesz az endocitózisban (15, 18). Ennek érdekében lakúnafestést végeztünk el.

Kontroll sejtek esetén a lakúnaborítottság egyenletes, és azok mélysége is közel megegyező (8. ábra A panel).

A Vps34 és a Hsc70-4 csendesített sejteknél azt tapasztaltuk, hogy a lakúnák jelentősen hosszabbak, és távolabbak lettek a kontrollban megfigyelthez képest (8. ábra B, F panel).

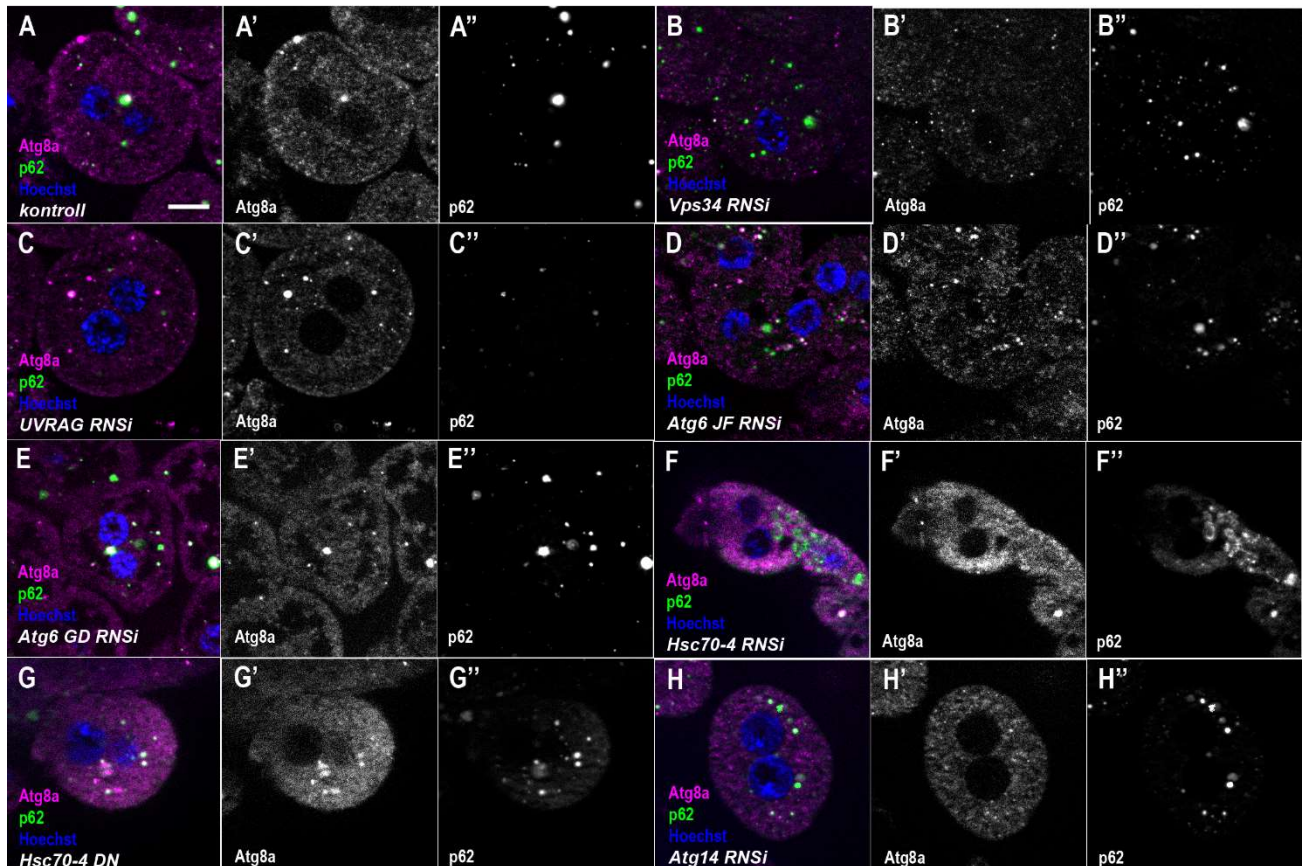
UVRAG és Atg6 GD csendesítés esetén a lakúnák szintén hosszabbak lettek, de keskenyek maradtak (8. ábra C, E panel).

Atg6 JF csendesítés kitágult, de kontrollhoz hasonló hosszúságú lakúnákat eredményezett (8. ábra D panel).

Atg14 csendesített sejtekben a lakúnamintázat kontrollszerű volt (8. ábra G panel).

A lakúnák mérete függ az endocitózis és a reciklizáció mértékétől. Ha a kettő aránya a reciklizáció felé tolódik el akár azáltal, hogy az endocitózis mértéke csökken, vagy azáltal, hogy a reciklizáció nő, a lakúnák mélyebbek lesznek. Ennek oka, hogy az endocitózis során lefűződő vezikulák membránjukat a lakúnákból nyerik, és reciklizációkor oda juttatják vissza.

3.PI3P hiányában p62 aggregátumok alakulnak ki



9.ábra: PI3K(III)-komplex-tagok és Hsc70-4 hiányának vizsgálata Atg8a és p62 festéssel

A piros csatornán az Atg8a-pozitív autofagoszómák, zöld csatornán a p62 fehérje, a kéken pedig a Hoechsttel jelölt sejtmag látható. Méretvonal: 20µm.

A kísérlet célja, hogy megvizsgáljuk a PI3K(III)-komplex-tagok és Hsc70-4 hiányának hatását a makroautofágiára. Atg8a az autofagoszómákat jelöli, míg p62 egy autofágiával lebomló fehérje.

Kontroll sejtek citoplazmájában elvélve fordul elő néhány Atg8a-pozitív és p62-pozitív pötty (9. ábra A panel).

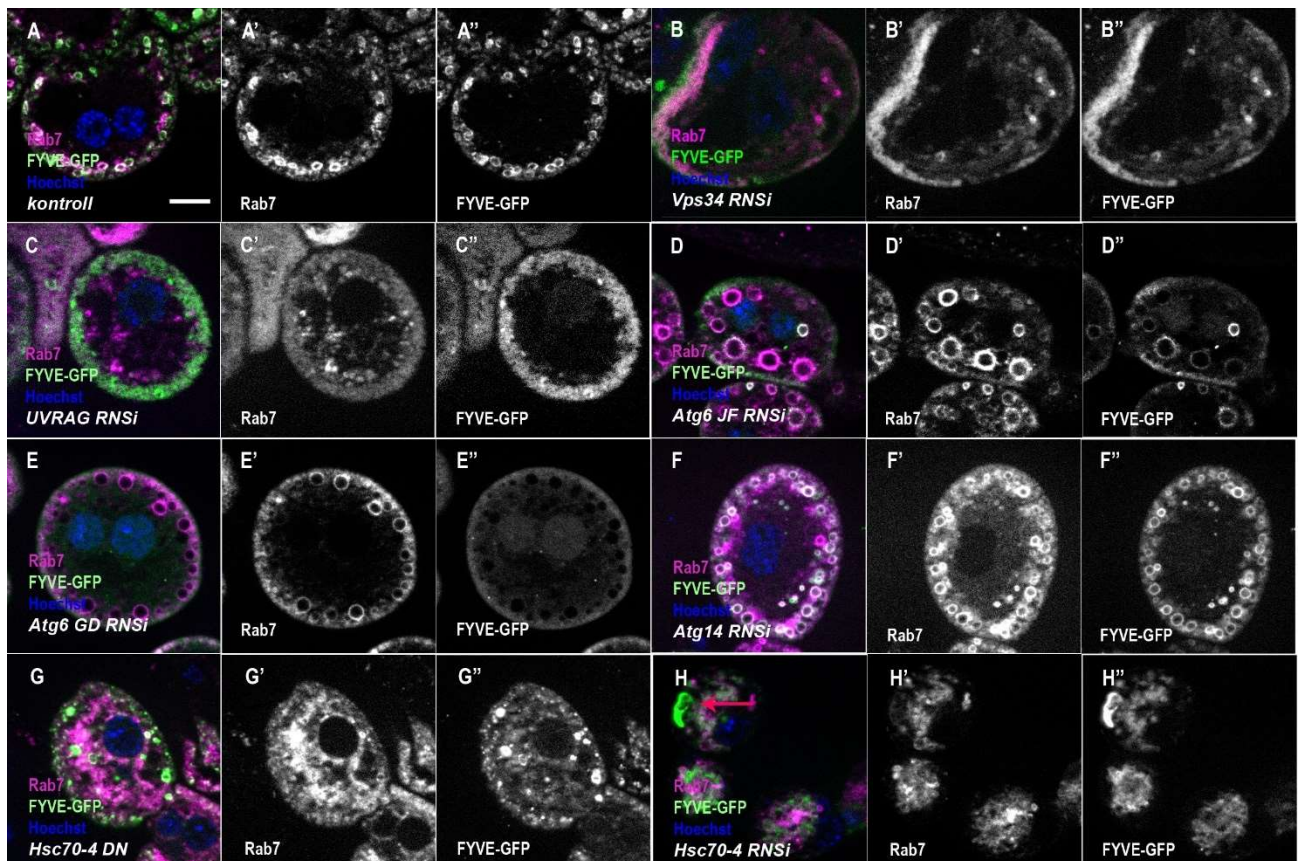
A Vps34, Atg6 JF csendesített sejtekben a több p62-rög mellett nagyobb számban láttunk Atg8a-pozitív rögöket is (9. ábra B, D panel).

UVRAG és Hsc70-4 hiányában controlszerű képet láttunk (9. ábra C, F, G panel).

Atg14 és Atg6 GD RNSi sejteknél a p62-rögök mellett Atg8a-ra és p62-re is pozitívak is megfigyelhetők (9. ábra E, H panel).

A tapasztaltak alapján arra következtethetünk, hogy a makroautofág útvonal defektusa következett be, hiszen p62 -ami tipikusan makroautofágiával bomlik- felhalmozódott.

4.PI3K hiányában diffúzzá válik a FYVE-mintázat, de Hsc70-4 hiányában nem



10.ábra: PI3K(III)-komplex-tagok és Hsc70-4 hiányának vizsgálata Rab7 és FYVE-GFP festéssel

A piros csatorna a Rab7-pozitív kései endoszómákat, a zöld a FYVE-GFP-vel kimutatott PI3P-t, a kék a Hoechsttel jelölt sejtmagok mutatja. piros nyíl: FYVE-pozitív membránszerű struktúra. Méretvonal: 20µm.

A kísérlet célja, hogy megvizsgáljuk a FYVE-jelen keresztül a PI3P-mintázat alakulását az egyes PI3K(III)-tagok és Hsc70-4 hiányában. A GFP-jel jelöli számunkra a PI3P-t tartalmazó membránokat olyan módon, hogy két FYVE-domén (ami a PI3P kötésére képes) van a GFP-hez fuzionálva (22).

Látható, hogy ez a jel kontroll sejtekben többnyire átfed a Rab7-pozitív kései endoszómákkal (10. ábra A panel).

A Vps34 és Atg6 csendesítések esetén diffúz FYVE-GFP jelet láthatunk (10. ábra B, D, E panel).

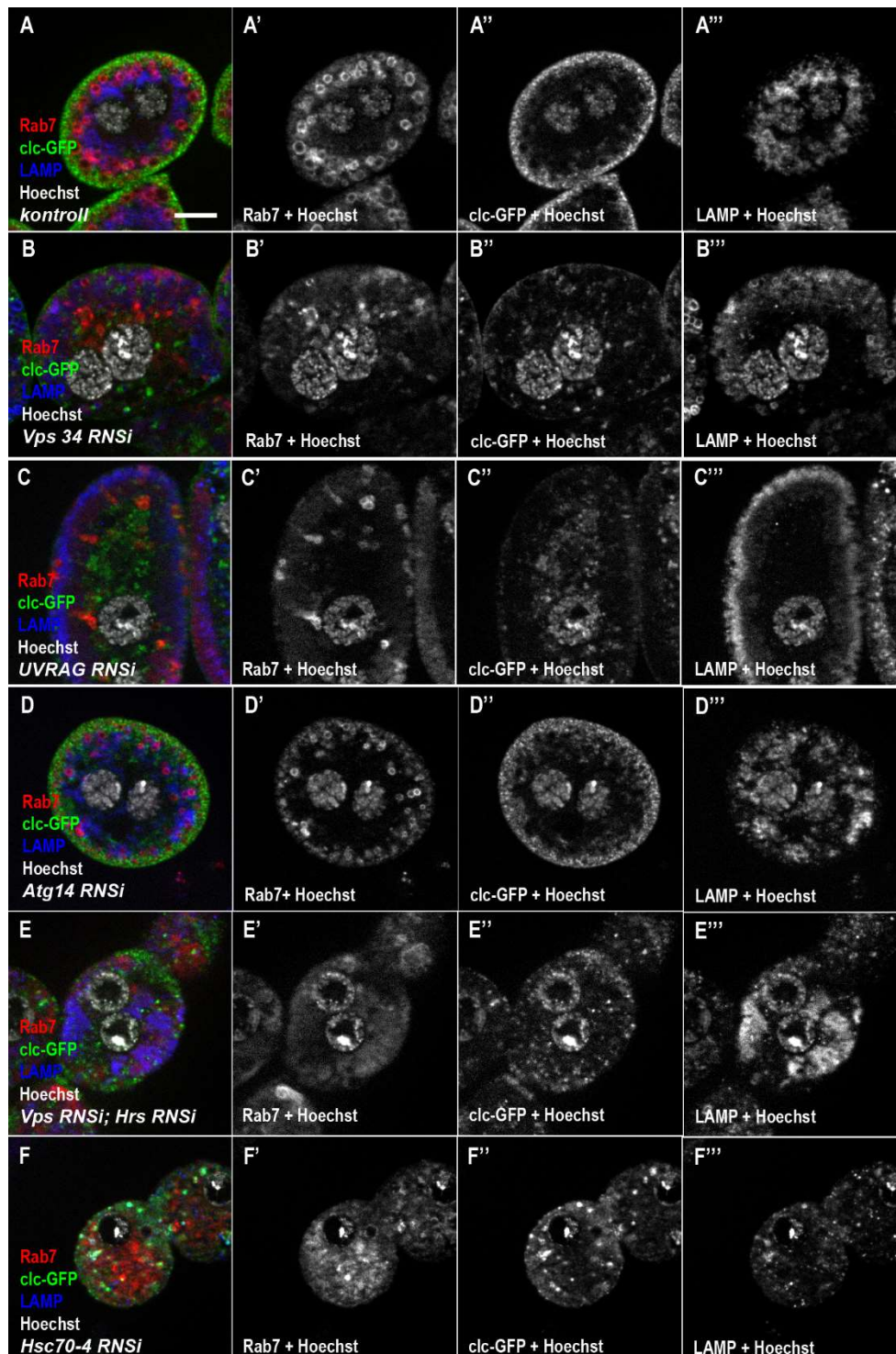
A Hsc70-4 hiányában FYVE-pozitív rögök, membránszerű struktúrák (10. ábra H panel nyíl) figyelhetők meg, ami immáron nem kolokalizál a Rab7 jellel (10. ábra G, H panel).

UVRAG hiányában a FYVE kortikálisan detektálható csupán, itt sem gyűrűs elrendeződésben (10. ábra C panel).

Atg14 csendesített sejtekben kontrollszzerű fenotípust tapasztalunk (10. ábra F panel).

Mindebből arra következtethetünk, hogy a normál endoszomális PI3P-mintázat kialakításában a II-es típusú PI3K-komplex részt vesz, de a Hsc70-4 és az I-es kináz-komplex nem.

5. PI3K és Hsc70-4 hiányában felborul a klatrin-mintázat



11.ábra: PI3K(III)-komplex-tagok és Hsc70-4 hiányának vizsgálata Rab7, LAMP és clc-GFP festéssel

A piros csatorna mutatja a Rab7-tel jelölt kései endoszómákat, a zöldön clc-GFP-vel jelölt klatrin, míg a kéken a LAMP-pozitív lizoszómák láthatók. Méretvonal: 20μm.

Ezen kísérletek célja, hogy megfigyeljük az PI3K(III)-tagok és Hsc70-4 hiányának hatását a lizoszomális rendszerre, valamint az eMI-ben és endocitózisban is résztvevő klatrin mintázatára.

Láthatjuk, hogy kontroll sejtekben a klatrin-GFP jel kortikálisan feldúsult. A lizoszómákon előforduló membránfehérjéket megjelölő LAMP festés szerint a lizoszómák a klatrinburkos vezikuláktól és kései endoszómáktól is beljebb helyezkednek el egyenletesen a citoplazmában (11. ábra A panel)

Vps34 és Hsc70-4 csendesítés következtében azonban a klatrin megjelenik a sejt belsejében is, és olykor nagyobb rögöket képez. Emellett a lizoszomális rendszer rendezettsége is felborul, a kontroll állapothoz képest kortikálisabban is megjelennek, és gyakran méretük is megnő (11. ábra B, F panel).

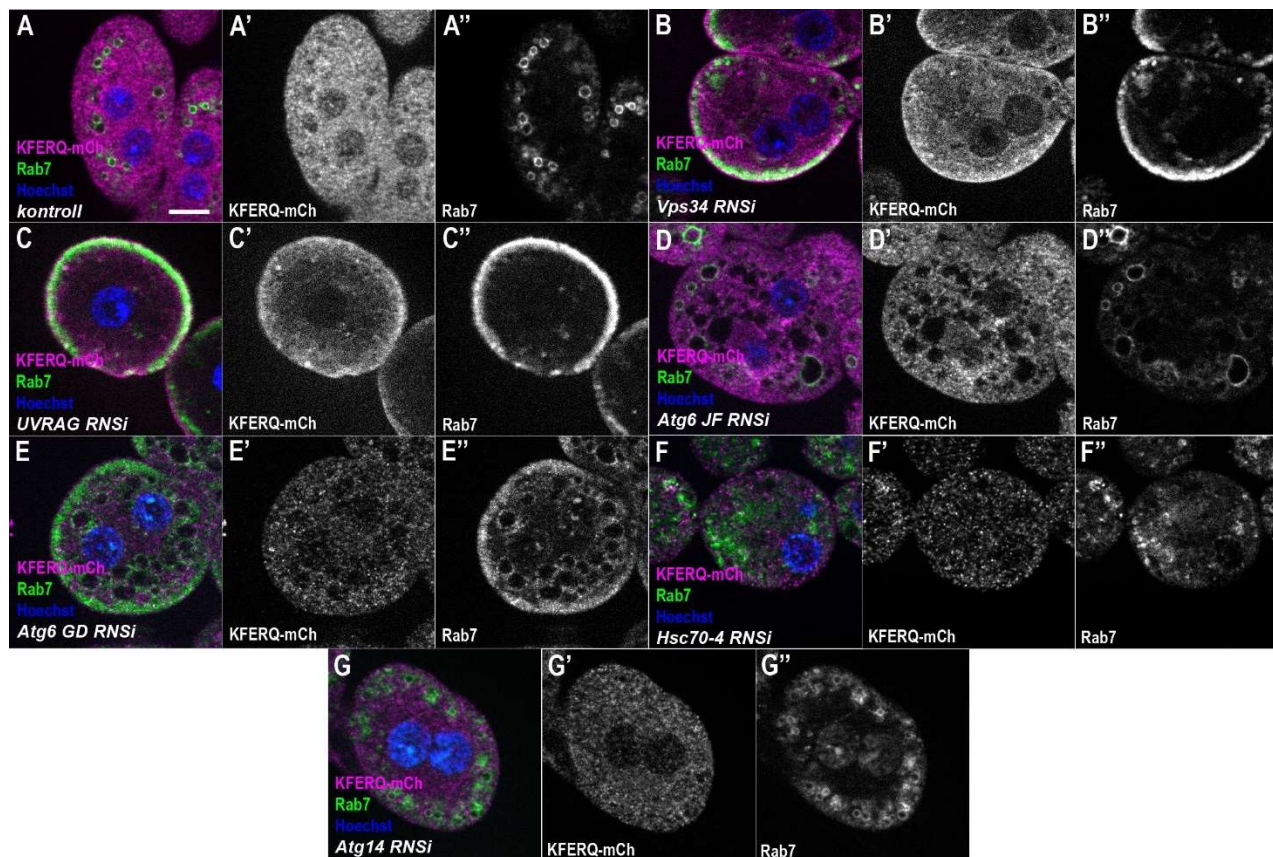
UVRAG hiányában a LAMP-jel kortikális, míg a klatrin szintén beljebb kerül, és rögöket formál (11. ábra C panel).

Atg14 csendesítés kontrollszerű képet mutat (11. ábra D panel).

Mindezekből az a következtetés vonható le, hogy az Atg14 kivételével az összes vizsgált fehérje szükséges a lizoszomális rendszer rendezettségéhez, valamint a klatrin eltávolításához.

Ahhoz, hogy kiderítsük, honnan ered a sejt belsejében megjelenő klatrin, megvizsgáltuk a klatrin-mintázat alakulását Vps34; Hrs kettős csendesített állatokon is. Ez azért volt szükséges, mert a II-es típusú PI3K(III)-tagok és Hsc70-4 hiányában is a klatrin megjelenik a sejt belsejében is. Emellett tudjuk, hogy endocitózis során a Hsc70-4 részt vesz a klatrin burok eltávolításában, ha ez nem valósul meg, sérül az endocitózis. Emiatt lehet, hogy ebben az esetben az endocitotikus vezikulákról el nem távolított klatrint látjuk megjelenni a sejt belsejében, de az is lehet, hogy az eMI sérülése következtében az endoszómákon rajta ragadt klatrint. A kettős csendesítésben a Hrs hiánya biztosította számunkra az endoszomális klatrin hiányát, ugyanis a Hrs az ESCRT-0 azon alegysége, amely többek között a klatrin endoszóma membránra való toborzásáért felel. Így, ha a Vps34; Hrs kettős csendesített sejtekben is a sejt belsejében megjelenő klatrint látunk, az vélhetően az endocitózis defektusának tudható be. Ebben az esetben, a Vps34 hiányában tapasztalhoz nagyon hasonló fenotípust láttunk, azaz a klatrin itt is a sejt belsejébe került (11. ábra E panel).

6.PI3K és Hsc70-4 hiányában sérül az eMI



12.ábra: PI3K(III)-komplex-tagok és Hsc70-4 hiányának vizsgálata KFERQ-mCh és Rab7 festéssel

Piros csatorna mutatja az mCherry-jelölt KFERQ-motívumos fehérjéket, a zöld a Rab7-pozitív kései endoszómákat, míg a kék a Hoechsttel megjelölt sejtmagot mutatja. A nyilak a felhalmozódott KFERQ-mCh-t jelölik. Méretvonal: 20 μ .

A kísérlet célja, hogy megvizsgáljuk a PI3K-tagok és Hsc70-4 hiányának hatását az eMI-re. A szelektív eMI vizsgálatát egy olyan muslicatörzs felhasználásával tettük, amelyben a KFERQ-motívumos fehérjék mCherry riporterrel lettek fuzionáltatva.

Kontroll sejtek esetén a KFERQ-mCh jel egyenletesen oszlik meg a citoplazma egészében (12. ábra A panel).

A Vps34, Hsc70-4, UVRAG csendesített sejtekben a Rab7-jellel nagyrészt kolokalizáló KFERQ-pozitív rögök jelentek meg (12. ábra B, C, F panel), és Atg6 hiányában is a KFERQ-motívumot tartalmazó fehérjék felhalmozódását láthatjuk az endoszómák körül (12. ábra D, E panel).

Atg14 csendesítés esetén kontrollszerű mCh-jelet kapunk (12. ábra G panel).

A felhalmozódott KFERQ-mCh jel alapján arra következtethetünk, hogy a II-es típusú PI3K(III) és Hsc70-4 eMI-ben betöltött szerepe elengedhetetlen.

Diszkusszió

Mivel a II-es típusú PI3K(III)-komplex valamennyi tagjának hiányában felhalmozódtak a KFERQ-motívumos fehérjék, akárcsak Hsc70-4 hiányában, így arra következtethetünk, hogy az eMI útvonal sérülése történt, és ez a komplex szintén szükséges eMI-hez. Mivel Atg14 hiányában kontrollszerű képet kaptunk, valószínűleg az I-es típusú komplex nem vesz részt az eMI-ben.

Arra a kérdésre is kerestük a választ, hogy mi a Hsc70-4 és PI3K(III) viszonya a folyamatban, melyik van upstream?

Mivel a II-es típusú PI3K(III) hiányában nem alakult ki a normál PI3P mintázat, mert diffúz FYVE-jelet láthatunk, de Hsc70-4 hiányában létre tudott jönni az endosomális PI3P. Így feltehetőleg nem a Hsc70-4 toborozza a Vps34-et.

Tudni szeretnénk volna azt is, hogy miért került be a klatrin a sejt belsejébe Vps34 és Hsc70-4 hiányában. Egy lehetséges magyarázata a felborult FYVE-jelnek, hogy a Hsc70-4 hiányában azért nem lesznek a klatrinburkos vezikulák PI3P-pozitívak, mert a Hsc70-4 így nem távolítja el onnan a klatrint, ami miatt a PI3K(III) nem tud odatoborzódni, és ezzel együtt normál PI3P jelet kialakítani. Fenntartásunk ezzel az elmélettel kapcsolatban, hogy a klatrin rácsba be kellene, hogy férjen a komplex. Ez a modell a Hsc70-4 elsőbbségét feltételezi a PI3K(III)-kompleksszel szemben az útvonal során.

Másik magyarázat szerint a II-es típusú PI3K(III) hiányában nem kerül le az endocitózis során a klatrin, mivel nem tud kialakulni a PI3P jel, így nem toborzódhat oda Hsc70-4, ami leszedné a klatrint.

Elképzelhetőnek tartjuk azt is, hogy a II-es típusú PI3K(III) hiányában, de Hsc70-4 jelenlétében az endocitóziskor lefűződő klatrinburkos vezikuláról el tudja távolítani a klatrint Hsc70-4. Azonban a kináz-komplex hiányában nem jön létre az endosomális PI3P (ezt jelzi a komplex hiányában fennálló diffúz FYVE-GFP jel). Emiatt nem tud majd megtörténni a kései endoszóma membránjához a Hsc70-4 odatoborzása (ha nincs PI3P, nem lesz, mihez kötődjön a Hsc70-4-et toborzó RME-8), így az endoszómákról nem távolítódik el a klatrin. Emellett a HOPS-komplex sem toborzódik az endosomális felszínhez, így azok lizoszómával történő

fúziója is gátolt. Feltételezésünk szerint ezek az endoszómák lesznek a képeken látható “klatrin rögök”.

A fent leírtak többnyire a PI3K elsőbbségére utalnak az endocitózis és eMI során, de láthattuk azt is, hogy Hsc70-4 nélkül a PI3P sem rendszerinti, így szinergista hatás képzelhető el a kettő között, azaz, hogy erősítik egymás toborzását.

A Vps34; Hrs kettős csendesítés eredményei -mely szerint szintén megjelent a sejt belsejében a klatrin- az endocitózis sérülésére utalnak, a klatrin az endocitotikus vezikulákról le nem szedettel egyenértékű. Ha a kísérlet ezekben a sejtekben a belső klatrin hiányát mutatta volna, az eMI sérülését feltételeztük volna, mivel ilyenkor vélhetően az endoszómákon rajta maradt a klatrint láttuk.

A kettős csendesítés eredményei mellett a lakúna festések is az endocitózis hatékonyságának csökkenésére utalnak, ugyanis mélyebb lakúnákat láthatunk Vps34 és Hsc70-4 hiányában is. Ezt az onnan lefűződő vezikulák mennyiségének csökkenése (illetve az oda reciklizálódó vezikulák mennyiségének növekedése) eredményezheti.

A Rab7, Lt-HA festéses kísérleteknél látottak háttérében állhat, hogy a II-es típusú PI3K-komplex hiányakor a HOPS-komplex nem lesz képes a fúziós felületekhez toborzódni, így az endoszómákban felhalmozódott, alapvetően lebontandó anyagok bontása nem történhet meg, s ez rögökként, vagy nagyobb endoszómákként mutatkozik meg.

Mivel csak az I-es PI3K(III)-komplex-tagok hiányában halmozódott fel p62 és Atg8a, így arra következtethetünk, hogy a makroautofág útvonalban a II-es komplex és Hsc70-4 nem vesz részt.

Eredményeink amellet, hogy újszerű információval is szolgáltak, a korábbi, szakirodalmakban feltüntetett megállapításokkal is összhangban vannak, például Hsc70-4 endocitózisban való szerepét illetően. Azonban eltérés látható a PI3P megjelenését illetően, ugyanis legtöbbször leginkább a korai endoszómákra jellemző foszfolipidként írják le, viszont a mi esetünkben a FYVE-GFP jel alapján a Rab7-pozitív kései endoszómáknál lokalizálódott.

Kísérleteink, úgy gondolom, hozzájárultak az endolizoszomális rendszer szerteágazó mechanizmusainak mélyebb szintű megértéséhez, ami időszerű, hiszen több betegség háttérében valamilyen lizoszomális lebontási defektus áll. Ide sorolható az Alzheimer-kór is,

amely során egy KFERQ-motívummal rendelkező -így potenciálisan eMI szubsztrát- fehérje, a tau hiperfoszforiláltsága miatt nem képes lebomlani, és aggregátumokat képez a neuronokban (27). Emellett a tumorfejlődésben is szerepe van az autofágiának, korai stádiumú tumorra gátlólag hat, ugyanis ekkor potenciális onkogén molekulákat is lebont, azonban előrehaladottabb állapotú tumornál már serkentheti a tumorfejlődést azáltal, hogy a sejtproliferációt gátlól stresszt is eliminálja (28).

Láthatjuk azt is, hogy számos, a sejt normál működéséhez kardinális folyamatban közös fehérjék is részt vesznek. A PI3K(III)-komplex az endoszomális mikroautofágia mellett az endocitózisban is részt vesz, vélhetően szoros együttműködésben a Hsc70-4 hősokkfehérjével. Annak érdekében, hogy még mélyebbre menően feltérképezhessük a PI3K(III)-komplex és Hsc70-4 kapcsolatát, a jövőben immunoprecipitációs kísérletek nyújthatnak segítséget. Emellett az ESCRT-komplexek felhalmozódását is megvizsgálunk western-blot alkalmazásával az egyes PI3K(III)-komplex-tagok és Hsc70-4 hiányában, utalván az eMI defektusára.

Összefoglaló

Autofágiának nevezzük azt az eukariótákban evolúciósan konzervált katabolikus folyamatot, amelynek során a lizoszómák, vagy kései endoszómák -növények és gombák esetén a vakuólumok- lebontják a már nem szükséges, vagy hibás fehérjéket, organellumokat. Az endoszomális mikroautofágia (eMI) az autofágia egy olyan típusa, amely során kései endoszómák endoszomális betüremkedéssel felveszik a lebontásra szánt anyagot, majd lizoszómává érve lebontják azt.

Ez történhet nemszelektív és KFERQ-szelektív módon is. Mindkét folyamat során a lebontásra szánt cargo a Hsc70-4 chaperonfehérje és az ESCRT-komplexek közreműködésével jut az endoszomális felszínhez, és kerül az endoszóma lumenébe.

Kutatásunk célja az eMI szabályozás hátterének felderítése, amely egyelőre igen kevésbé ismert folyamat. Megvizsgáltuk többek közt az endoszomális membrán identitását is meghatározó foszfatidilinozitolok foszforilálását végző kináz-komplex, a PI3K(III)-tagok, a klatrin és a Hsc70-4 fehérje hiányának hatását az endolizoszomális rendszerre. Azt tapasztaltuk, hogy a Hsc70-4 és PI3K(III) hiányában is felborul a lizoszomális lebontás hatékonysága, az endolizoszomális rendszer rendezettsége és a klatrin az endoszómákon ragad. Mindebből arra következtethetünk, hogy ezen fehérjék szoros kapcsolatban állhatnak az eMI szabályozását illetően.

Eredményeink azt mutatják, hogy mind a Hsc70-4, mind a II-es típusú PI3K(III)-komplex részt vesz az eMI-ben, az endocitózisban, valamint szükségesek a normál klatrin-mintázat kialakításához is. Emellett elengedhetetlenek a HOPS-toborzáshoz is, viszont az I-es típusú PI3K(III) nem vesz részt az említett folyamatokban. Láthattuk azt is, hogy a makroautofág aktivitás csupán az I-es típusú PI3K(III)-tagok hiányában sérült, így vélhetően Hsc70-4 és II-es típusú PI3K(III) nem részesei ennek az útvonalnak. Emellett a II-es típusú PI3K(III) elengedhetetlen a normál PI3P mintázat kialakulásához is, azonban Hsc70-4 nem.

Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom Dr. Lőrincz Péternek és Nagy Anikó Zsuzsannának, hogy tapasztalataikat megosztva, idejüket nem sajnálva segítettek, bátorítottak ezen dolgozat megírása során is! Köszönöm Dr. Lőw Péternek, hogy az Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszéken végezhettem a kutatásomat.

Köszönöm a tanszék valamennyi tagjának is a segítségüket, még akkor is, ha az „csupán” egy biztató mosoly volt. Meg szeretném köszönni családom és barátaim támogatását is. Köszönöm Istennek, hogy mindig adott erőt a következő kísérlethez, a következő mondathoz. Csak így születhetett meg ez a dolgozat.

Irodalom

1. M. Kocak *et al.*, Targeting autophagy in disease: established and new strategies. *Autophagy* **18**, 473-495 (2022).
2. B. Zhang *et al.*, Phosphorylation of ATG18a by BAK1 suppresses autophagy and attenuates plant resistance against necrotrophic pathogens. *Autophagy* **17**, 2093-2110 (2021).
3. K. Liu, B. M. Sutter, B. P. Tu, Autophagy sustains glutamate and aspartate synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* during nitrogen starvation. *Nat Commun* **12**, 57 (2021).
4. C. Tang, M. J. Livingston, Z. Liu, Z. Dong, Autophagy in kidney homeostasis and disease. *Nat Rev Nephrol* **16**, 489-508 (2020).
5. P. Lőrincz, G. Juhász, Autophagosome-Lysosome Fusion. *J Mol Biol* **432**, 2462-2482 (2020).
6. A. Mukherjee, B. Patel, H. Koga, A. M. Cuervo, A. Jenny, Selective endosomal microautophagy is starvation-inducible in *Drosophila*. *Autophagy* **12**, 1984-1999 (2016).
7. Y. Kuchitsu, T. Taguchi, Lysosomal microautophagy: an emerging dimension in mammalian autophagy. *Trends Cell Biol*, (2023).
8. R. Sahu *et al.*, Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Dev Cell* **20**, 131-139 (2011).
9. V. Uytterhoeven *et al.*, Hsc70-4 Deforms Membranes to Promote Synaptic Protein Turnover by Endosomal Microautophagy. *Neuron* **88**, 735-748 (2015).
10. C. Raiborg *et al.*, FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *J Cell Sci* **114**, 2255-2263 (2001).
11. E. M. Wenzel *et al.*, Concerted ESCRT and clathrin recruitment waves define the timing and morphology of intraluminal vesicle formation. *Nat Commun* **9**, 2932 (2018).
12. C. Raiborg, J. Wesche, L. Malerød, H. Stenmark, Flat clathrin coats on endosomes mediate degradative protein sorting by scaffolding Hrs in dynamic microdomains. *J Cell Sci* **119**, 2414-2424 (2006).
13. B. Xhabija, P. O. Vacratis, Receptor-mediated Endocytosis 8 Utilizes an N-terminal Phosphoinositide-binding Motif to Regulate Endosomal Clathrin Dynamics. *J Biol Chem* **290**, 21676-21689 (2015).
14. H. C. Chang, M. Hull, I. Mellman, The J-domain protein Rme-8 interacts with Hsc70 to control clathrin-dependent endocytosis in *Drosophila*. *J Cell Biol* **164**, 1055-1064 (2004).
15. S. R. Elkin, A. M. Lakoduk, S. L. Schmid, Endocytic pathways and endosomal trafficking: a primer. *Wien Med Wochenschr* **166**, 196-204 (2016).
16. A. L. Marat, V. Haucke, Phosphatidylinositol 3-phosphates-at the interface between cell signalling and membrane traffic. *EMBO J* **35**, 561-579 (2016).
17. G. Juhász *et al.*, The class III PI(3)K Vps34 promotes autophagy and endocytosis but not TOR signaling in *Drosophila*. *J Cell Biol* **181**, 655-666 (2008).
18. W. Bechtel *et al.*, Vps34 deficiency reveals the importance of endocytosis for podocyte homeostasis. *J Am Soc Nephrol* **24**, 727-743 (2013).
19. S. Takáts *et al.*, Interaction of the HOPS complex with Syntaxin 17 mediates autophagosome clearance in *Drosophila*. *Mol Biol Cell* **25**, 1338-1354 (2014).
20. P. Lőrincz *et al.*, MiniCORVET is a Vps8-containing early endosomal tether in *Drosophila*. *Elife* **5**, (2016).
21. D. Ganesan, Q. Cai, Understanding amphisomes. *Biochem J* **478**, 1959-1976 (2021).
22. P. Lőrincz *et al.*, Atg6/UVRAG/Vps34-containing lipid kinase complex is required for receptor downregulation through endolysosomal degradation and epithelial polarity during *Drosophila* wing development. *Biomed Res Int* **2014**, 851349 (2014).
23. P. Lőrincz *et al.*, Vps8 overexpression inhibits HOPS-dependent trafficking routes by outcompeting Vps41/Lt. *Elife* **8**, (2019).

24. S. Takáts *et al.*, Autophagosomal Syntaxin17-dependent lysosomal degradation maintains neuronal function in *Drosophila*. *J Cell Biol* **201**, 531-539 (2013).
25. K. Piracs *et al.*, Advantages and limitations of different p62-based assays for estimating autophagic activity in *Drosophila*. *PLoS One* **7**, e44214 (2012).
26. N. Chaudhry *et al.*, Lamp1 mediates lipid transport, but is dispensable for autophagy in. *Autophagy* **18**, 2443-2458 (2022).
27. I. Grundke-Iqbal *et al.*, Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4913-4917 (1986).
28. R. Chavez-Dominguez, M. Perez-Medina, J. S. Lopez-Gonzalez, M. Galicia-Velasco, D. Aguilar-Cazares, The Double-Edge Sword of Autophagy in Cancer: From Tumor Suppression to Pro-tumor Activity. *Front Oncol* **10**, 578418 (2020).