

Az autofágia különböző lépéseinek hatása a tumorfejlődésre

TDK dolgozat

készítette:

Neuhauser Natali Julianna

Biológus mesterszak, 1. évfolyam

Molekuláris Genetika, Sejt- és Fejlődéstudomány szakirány

témavezető:

dr. Takáts Szabolcs egyetemi adjunktus
Anatómia, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék

és

Szenci Győző tudományos segédmunkatárs
Anatómia, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest 2024

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	3
Összegzés.....	4
1. Bevezetés.....	5
1.1 A lizoszómális lebontó folyamatok.....	5
1.2 Az autofágiában és az endocitózisban szereplő komplex és gének bemutatása.....	5
1.3 A rákos elváltozások vizsgálata Drosophilában.....	7
2. Célkitűzések:	9
3. Anyagok és módszerek	10
3.1 Genetikailag indukált tumorgenezis:.....	10
3.2 Tumor térfogat analízis:	12
3.3 Immuncitokémia:	12
3.4 Western blot:.....	13
3.5 Statisztika:.....	13
4. Eredmények és megvitatásuk	16
4.1 Az autofágiában és az endocitózisban résztvevő C típusú Vps komplexek szerepe a tumornövekedésben.....	16
4.2 A HOPS és CORVET komplex tumornövekedésre gyakorolt lehetséges sejtbiológiai okai	18
4.3 A JNK jelátviteli útvonal vizsgálata fúzió mutáns daganatokban.....	20
4.4 Az endszómális kompartmentek vizsgálata HOPS és CORVET hiányos daganatokban .	21
Összefoglalás	23
Szerzői nyilatkozat.....	24
Köszönetnyilvánítás	25
Irodalomjegyzék	26

Rövidítésjegyzék

ATG	Autofágiával összefüggő gének (Autophagy-related genes)
CORVET	C osztályú vakuólum/ endoszóma pányvázó komplex (class C core vacuole/endosome tethering)
Dcp-1	Halál-Caspase -1 (death-Caspase-1)
HOPS	Homotípusos fúzió és fehérjeválogató komplex (homotypic fusion and protein sorting complex)
JAK/STAT	Janus kináz/Szignál jelátvivő és aktiváló transzkripció faktor jelátvitel (Janus kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription)
JNK	c-Jun N terminális kináz
MARCM	Mozaikelemzés represszív sejtmarkerrel (Mosaic Analysis with Repressible Cell Marker)
MMP-1	Mátrix metallo-proteáz 1
P-H3	Foszfo- hiszton 3
PVDF	Polivinilidén-fluorid
Rab	Ras-asszociált kötő fehérje (Ras-associated binding protein)
SNARE	Oldható N-etilmaleimid-érzékeny faktor-csatlakozási fehérje receptor (Soluble N-ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Protein Receptor)
TNF-α	Tumor nekrosis faktor - α
VPS komplex	Vakuoláris fehérje válogató komplex (Vacuolar protein sorting complex)

Összegzés

Az autofágia során a sejt felesleges anyagai kettős membránnal határolt vezikulákba, autofagoszómákba csomagolódnak, ezek lizoszómákkal fuzionálva autolizoszómákat hoznak létre, melyekben a felvett anyag lebomlik és újrahasznosul. Korábban már ismert volt, hogy az autofagoszóma képződést segítő gének, például az Atg13 elvesztése gátolja a tumornövekedést, ugyanakkor az autofágia későbbi lépéseinek, valamint a másik lizoszomális lebontó útvonallal, az endocitózissal való kapcsolatának hatása a tumorképződésre még kevésbé tisztázott. Kutatásunk során *Drosophila* tumormodellben megvizsgáltuk, hogy az autofagoszóma-lizoszóma fúziót segítő HOPS pályvázó komplex egyes alegységeinek hiánya milyen hatással lehet a tumorok méretére. Azt tapasztaltuk, hogy a Vps39 alegység hiánya, bár meggátolta az autofág lebontást, mégsem zavarta meg a tumor növekedését, ami valószínűsíti, hogy az autofágiának nem a lebontó funkciója szükséges a tumorok növekedéséhez. Ezzel szemben egy másik HOPS alegység a – korai endocitózist szabályozó CORVET komplexben is résztvevő – Vps16A hiánya ismét a tumorok kis méretét eredményezte, amely összefüggésben állhat azon megfigyelésünkkel, hogy a HOPS és a CORVET kettősen hiányos tumorsejtekben az apoptózis fokozódik. Emellett megállapítottuk, hogy a HOPS és a CORVET együttes hiányának következtében kóros korai endoszómák halmozódtak fel, amely – a $\text{TNF}\alpha$ -JNK fokozott működésén keresztül – kiváltó oka lehet a megnövekedett apoptózisnak.

1. Bevezetés

1.1 A lizoszómális lebontó folyamatok

A lizoszómális rendszer elsősorban az endocitózissal felvett extracelluláris anyagok, illetve az autofágia útján belékerülő intracelluláris sejtalkotók lebontásért felel.

Az endocitózis során a plazmamembrán bemélyedését és lefűződését követően egy korai endocitotikus vezikula keletkezik amely korai endoszómákkal képes fuzionálni. Utóbbiak enyhén savasodó pH-val rendelkező belsejében a felvett ligand-receptor komplexekről a ligand disszociál. A szabad receptorok képesek reciklizálódni és visszakerülni a plazmamembránra, vagy intralumináris vezikulákba csomagolódva lebontásra kerülnek. E lebontó útvonal során a korai endoszómák késői endoszómákká (multivezikuláris testekké) érnek, amelyek lizoszómákkal fuzionálva endolizoszómákká alakulnak [1], s így bennük a felvett és nem reciklizálódó anyag lebomlik **(1.ábra)**. Az endocitózisnak a jelátviteli receptorok reciklizációján, illetve lebontásán keresztül kiemelt szerepe van a különböző jelátviteli folyamatok szabályozásában.

Az autofágia során azok a sejten belüli struktúrák, melyek a sejt számára már feleslegessé váltak egy fagofór képződésén keresztül autofagoszómába csomagolódnak. Ezek a transzport vezikulák lizoszómákkal képesek fuzionálni, ami autolizoszóma képződéshez vezet, amelyben a felvett anyag lebomlik, a felszabaduló szerves építőkövek pedig újrahasznosulnak **(1.ábra)**. Az autofágiának más a lebontástól független feladatai is lehetnek, mint például bizonyos jelátviteli folyamatok befolyásolása és a szekréciós autofágia [2].

1.2 Az autofágiában és az endocitózisban szereplő komplex és gének bemutatása

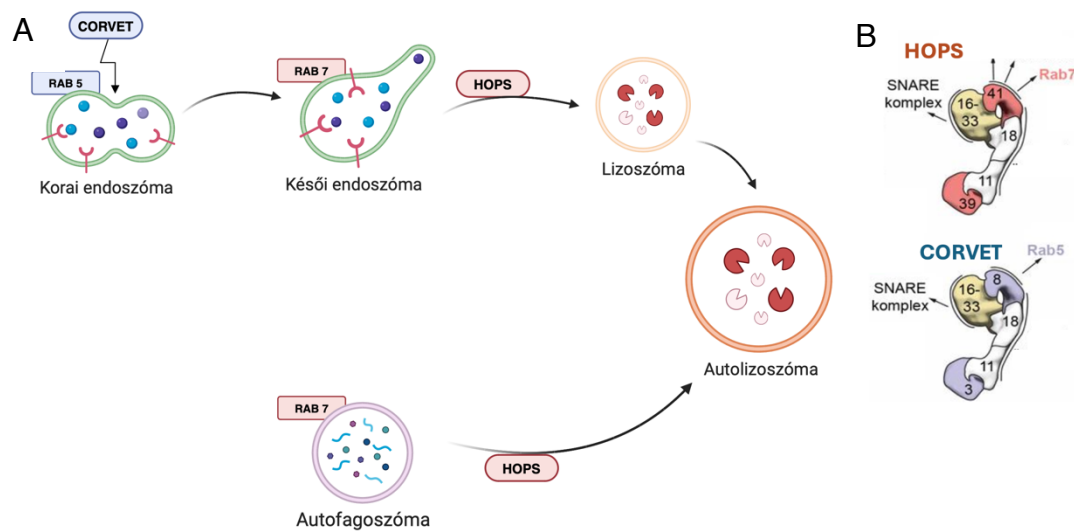
Mivel mind az autofágia, mind az endocitózis fontos szerepet játszik a sejtek anyagcseréjében, működésében és más sejtekkel való kommunikációjában, ezen útvonalaknak a sérülése drasztikus hatással lehet az adott sejtre és a szervezetre. A lizoszómális útvonalak sérülése számos betegséggel hozható összefüggésbe, mint például a neurodegeneráció és a rák [3, 4].

Az autofágia folyamatát rengeteg különböző gén és komplex segíti és irányítja. Az első lépéshez a fagofór képződéséhez és növekedéséhez, nélkülözhetetlen az Atg fehérjék által alkotott funkcionális komplexek (Atg1 kináz komplex, Vps34 lipidkináz komplex, Atg8 konjugációs komplex és Atg9 membrán ciklizációs komplex) működése. Az autofagoszómák

érésében és a lizoszómákkal való fúziójában több különböző fehérje komplex is részt vesz. A HOPS pályvázó komplex (Vps11, Vps16A, Vps18, Vps33A, Vps39, Vps41) **(1.ábra)** az autofagoszómák és lizoszómák membránjához kapcsolódó kis GTPázokhoz (Rab2, Rab7 és Arl8) kapcsolódva tartja közel egymáshoz a két membránt, hogy ezután az e fúziós folyamatra jellemző SNARE komplex (Syx17, Snap29 Vamp7, Ykt6) végrehajtsa a membránfúziót. A fúzió megtörténte után, kialakulnak az autolizoszómák, melyekben a savas környezet hatására megkezdődik a lebontás.

Bár mind az endocitózist, mind pedig az autofágiát számos különböző komplex és fehérje segíti, érdekes módon létezik több, elsősorban a membránfúziót segítő faktor, például a Rab7 kis GTPáz vagy a HOPS komplex, amelyek mindkét folyamat működéséhez nélkülözhetetlenek. A HOPS azért is különösen érdekes mert egyes alegységei átfedést mutatnak az endocitózisban szereplő CORVET pályvázó komplexszel. A két komplex szerepe az endocitózis során elkülönül egymástól, a CORVET (Vps8, Vps3, Vps16A, Vps18, Vps33A) **(1.ábra)** elsősorban a korai endoszómák egymással való fúzióját segíti, míg a HOPS az autofagoszómák mellett, a késői endoszómák lizoszómákkal történő fúziójához is szükséges. A két komplex struktúráis felépítése nagyon hasonló és a C típusú Vps fehérjéik azonosak (tehát Vps11, Vps16, Vps18, Vps33 alegységeik megegyeznek). A CORVET specifikus alegységein (Vps8, Vps3) keresztül a korai endoszómákon található Rab5, ezzel szemben a HOPS specifikus alegységei (Vps41, Vps39) pedig az autofagoszómákra és késői endoszómákra jellemző Rab2 és Rab7 kis GTPázokkal képes kölcsönhatásba lépni [5].

Bár mind az autofágia, mind az endocitózis folyamatáról ismert, hogy nagy jelentőséggel bír a daganatok fejlődésében [1, 6], a két folyamat során kiemelten fontos a CORVET és a HOPS komplexek tumornövekedésre, illetve az ezt szabályozó jelátviteli folyamatokra gyakorolt hatása egy kevésbé feltárt terület.



1.ábra: A HOPS és a CORVET komplex funkciója (A) és felépítése (B).
A panell: a szerző saját ábrája, B panell: Balderhaar HJ ábrája alapján [7].

1.3 A rákos elváltozások vizsgálata Drosophilában

A *Drosophila melanogaster* szaporasága, gyors generációs ideje, olcsó fenntarthatósága, és a rendelkezésre álló páratlan genetikai eszköztár (mutációk, transzgének) miatt a molekuláris genetika/sejtbológia kedvelt modellállata. Az emberi betegségekben érintett gének 75 %-ának van ismert homológja az ecetmuslinca genomjában, így a muslinca kutatásokból nyert adatok jelentős része átvihető humán kutatásokba is [8]. Emellett a *Drosophilában* létrehozott betegségmodellek vizsgálata előnyös az egyszerűbb genetikai felépítésük, a gének alacsonyabb száma és így a kisebb genetikai redundancia miatt.

A *Drosophila* a daganatfejlődés genetikai hátterének vizsgálatára is kiváló modellként szolgál, számos különböző ecetmuslinca tumormodellt ismerünk. Ilyen például a Ras^{V12} onkogént túltermelő és a Scribble tumorsuppresszorra mutáns sejtekből létrejövő daganat is [9]. A Ras jelátviteli útvonal az egyik fő serkentője a sejtosztódásnak; így ha a Ras egy funkciónyeréses mutáció (Ras^{V12}) miatt hiperaktívvá válik az a sejtosztódás túlműködéséhez fog vezetni. Ezzel párhuzamosan a Scribble gén funkcióvesztéses mutációja a sejtek polaritásának elvesztését okozza. A Ras^{V12} túltermelése és a Scribble mutációjának egyidejű bekövekezése esetén a sejtek korlátlanul képesek a tér bármely iránya felé osztódni és az alaphártyát átlépve invazívvá válni. Összességében tehát a Ras^{V12} funkciónyeréses formájának

túltermelése és a Scribble gén funkcióvesztése együttesen, egymás hatását erősítve a sejtek rosszindulatú daganatos túlnövekedését eredményezik [9].

A Ras^{V12}; Scrib^{-/-} tumormodell rendkívül alkalmas az autofágia és az endocitózis molekuláris genetikai vizsgálatára, hiszen ebben a rendszerben könnyen inaktíválni tudjuk az adott komplexeket és géneket. Emellett korábbi kutatások már vizsgálták az autofágia kezdeti lépéseinek hatását e tumortípus növekedésére. E kutatások azt mutatják, ha a fagofor képződését irányító Atg13 gént gátoljuk a Ras[V12]; Scrib^{-/-} tumorokban (innenről RS tumorként hivatkozunk rá) akkor szignifikánsan kisebb daganatok keletkeznek [1]. Ugyanakkor az autofágia későbbi lépéseiben például az autofagoszóma-lizoszóma fúzióban keletkezett zavarok hatása az RS tumorokra még nem ismert.

Az RS daganatokban a JNK jelátviteli útvonal aktivitásának jelentőségét is igazolták [9]. A JNK egyrészt hozzájárul az MMP1 (mátrix metallo-proteáz 1) expressziójához, ami a tumoros sejtek invazivitását képes fokozni az alaphártya degradációján keresztül [10], továbbá számos publikáció igazolta, hogy a JNK az RS tumorokban képes támogatni a tumorprogressziót a JAK/STAT jelátvitel aktiválásán keresztül [11]. Végül a JNK-ről jól ismert, hogy adott esetekben képes indukálni az autofágiát [12] és a kaszpázfüggő sejthalált is [13]. A JNK jelátvitelt az endocitózis folyamatával is kapcsolatba hozták már, hiszen megállapították, hogy a Toll-7 jelátvitel elősegíti az TNF-szerű citokin, az Eiger endocitózist és a korai endoszómákban való lokalizációját. A JNK útvonal igazoltan Eiger-függő folyamat [14], így Eiger jelenlétében aktiválódik, és így támogatni tudja az RS tumorok tumorprogresszióját [15].

A kutatásunk során szeretnénk volna jobban feltárni az endocitózis és az autofágia együttes hatását a daganatképződés során, illetve megvizsgálni, hogy a lizoszomális lebontó útvonalak sérülése milyen sejtbioológiai folyamatok és jelátviteli útvonalak aktivitását befolyásolja az RS tumorokban.

2. Célkitűzések:

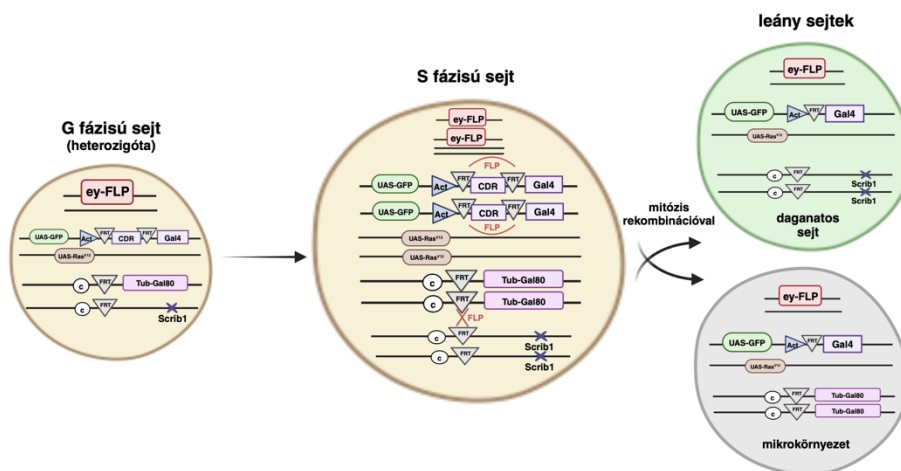
Kutatásunk fő célja volt, hogy megértsük a lizoszomális útvonalak, így az autofágia és az endocitózis különböző lépéseinek szerepét a rákos daganatok fejlődésében. Részletes célkitűzéseink az alábbiak voltak:

- Az autofagoszóma képződés, valamint az autofágia és az endocitózis folyamatának a HOPS és CORVET által szabályozott lépéseinek a tumornövekedésben betöltött szerepének vizsgálata.
- Az így vizsgált mutáns daganatok méretkülönbségei mögött álló okok (sejthalál és a sejtosztódás mértéke) feltérképezése.
- A JNK jelátviteli útvonal működésének vizsgálata HOPS és CORVET hiányos tumorokban.
- Az endolizoszomális kompartmentek elhelyezkedésének és arányának vizsgálata HOPS és CORVET hiányos daganatokban.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Genetikailag indukált tumorigenezis:

A modellszervezetünk a kísérleteink során a *Drosophila melanogaster* volt. A muslincákat agar-kukoricaliszt-élesztő tápon tartottam fenn állandó hőmérsékleten (25°C).



2.ábra: A kutatás során használt MARCM technika sematikus ábrája. Az ábrán csak a rekombináns sejteket eredményező esetek láthatóak, nem daganatos sejteket létrehozó esetek az ábrán nem szerepelnek, a jobb áttekinthetőség érdekében. (a szerző saját ábrája)

A rosszindulatú daganatokat MARCM (Mosaic Analysis with Repressible Cell Marker) technikával hoztuk létre. A folyamat során egy *ey-Flp*; *Act-FRT-CD2-FRT-Gal4*, *UAS-GFP*; *FRT82B* *tub-Gal80* genotípusú (MARCM) törzset használtunk, amelyet a később ismertetett effektor törzsekkel kereszteztünk, hogy a számunkra megfelelő mutációkkal rendelkező egyedeket kapjunk (**2.ábra**). Az így létrejövő lárvák osztódó sejtekből álló, szemkorongnak is nevezett, fejlődő szemében a tumorfejlődést szomatikus rekombinációval indukáltuk az *FLP/FRT* helyspecifikus rekombináza és *Gal4/UAS/Gal80* irányított expressziós rendszer segítségével. A módszer eredményeként *Gal4*-et expresszáló *GFP* pozitív sejtklónok jönnek létre, amelyek rosszindulatú daganattá fejlődnek. Az autofág flux vizsgálatához használt tumorok esetében, egy módosított MARCM törzset használtunk, amelyben a tumoros sejtek az *UAS-GFP* helyett egy *UAS-mCherry-GFP-Atg8a* riportert expresszáltak.

A kontroll rosszindulatú daganatok indukálásához *UAS-Ras^{V12}*; *FRT82B* *Scrib^{d1}* genotípusú (*Ras Scrib/RS*) effektor törzs egyedeit kereszteztük a MARCM-hez. Ezen daganatok sejteiben a *Ras^{V12}* túltermelődése túlzott sejtosztódáshoz vezet, emellett ugyanezen sejtek

homozigótává válnak a Scribble (Scrib) sejt polaritás gén funkcióvesztéses alléljére is, így a sejtek az alaphártyát átlépve képesek lesznek osztódni és terjedni.

Az autofágia és az adott C típusú Vps komplexek tumorspecifikus funkcióvesztésének vizsgálatára további, az adott gént csendesítő vagy homozigóta mutáns tumorokat létrehozó effektor törzseket használtunk. Mivel az Atg13, a Vps16A és Vps39 gének ugyanazon kromoszóma karon helyezkednek el, mint a Scrib, így mutáns alléljeiket rekombinációval a Scrib^{d1} és az FRT82B mellé bevive, olyan effektor törzseket hoztunk létre, amelyek a Scrib-re és az Atg13^{d81} [16], Vps16A^{d32} [17] vagy a Vps39^{d1} [18] mutációjára homozigóta tumorokat hoztak létre. A Vps8 funkcióvesztését egy UAS-Vps8^{KK100319} RNSi (Vienna Drosophila Resource Center) transzgén túltermelésével érték el. A kutatás során az alábbi szelekciót segítő

Felhasznált törzsek		
Genotípus	Szövegben használt rövidítés (törzsekre)	Szövegben használt rövidítés (adott mutációval rendelkező daganatokra)
ey-FLP; Act-FRT-CD2-FRT-Gal4, UAS-GFP; FRT82B tub- Gal80	<i>MARCM törzs</i>	–
ey-FLP; Act-FRT-CD2-FRT-Gal4, UAS-mCherryAtg8a; FRT82B tub- Gal80	<i>MARCM flux</i>	–
+/+; UAS-Ras[V12]; FRT82B Scrib[d1]	<i>RS effektor törzs</i>	<i>RS</i>
+/+; UAS-Ras[V12]; Atg13, FRT82 Scrib[d1]	<i>RS13 effektor törzs</i>	<i>RS13</i>
+/+; UAS-Ras[V12]; FRT82B, Vps39[d1] Scrib[d1]	<i>RSVps39 effektor törzs</i>	<i>RS Vps39</i>
+/+; UAS-Ras[V12], Vps8KK; FRT82B Scrib[d1]	<i>RSVps8 effektor törzs</i>	<i>RS Vps8</i>
+/+; UAS-Ras[V12]; FRT82B, Vps16a d32, Scrib[d1]	<i>RSVps16 effektor törzs</i>	<i>RS Vps16a</i>
+/+; UAS-Ras[V12, Vps8KK]; FRT82B, Vps39, Scrib[d1]	<i>RSVps8; Vps39 effektor törzs</i>	<i>RS Vps8; Vps39</i>

1.táblázat: A kutatás alatt felhasznált törzsek listája

domináns markereket és balancer kromoszómákat használtuk: Sp; Cyo; TM6c. A felhasznált törzsek pontos genotípusát az **1. táblázat** tartalmazza.

3.2 Tumor térfogat analízis:

A mutáns daganatok méretbeli különbségének vizsgálata során késői stádiumú tumort hordozó 8 napos lárvákat gyűjtöttünk. A tumorokat PBS pufferben boncoltuk ki, majd 4%-os formaldehid-PBS-ben fixáltuk 20 percig. A fixálás után a mintákat kétszer öblítettük, majd 15 percig billegtetve mostuk PBS-sel. Ezt követően a mintákat tárgylemezen 100%-os glicerinbe helyezve lefedtük. A minták valós térfogatának megőrzéséhez a tárgylemez és a fedőlemez közé kétoldalú ragasztószalaggal távtartó „hidacskákat” képeztünk.

A tumorok teljes térfogatának megméréséhez, Apotome 2.0 konfokális egységgel felszerelt Zeiss Axiomager M2 fluoreszcens mikroszkópot alkalmaztunk, amellyel Z-stack funkciót (3 μ m szeletvastagság) alkalmazva, 10x-es nagyításon a tumor teljes térfogatát végigszeletelő képeket készítettünk. Az elkészült képek alapján a tumorok méretét számszerűsítettük (lásd 3.5 fejezet).

3.3 Immuncitokémia:

Genotípusonként 5-6 db, korai stádiumú tumort hordozó, 6 napos lárvából boncoltam ki tumorokat, majd 20 percig fixáltam őket 4%-os formaldehid-PBS oldatban. A fixálót 3x5 perces 0,5%-os Triton X100-PBS oldatban (PBT) való mosással távolítottam el, majd a mintákat 5%-os szarvasmarha magzat szérumot (FBS) tartalmazó PBT-ben (FBS PBT) feloldott elsődleges ellenanyag (**2. táblázat**) oldatban inkubáltam 4°C-on egy éjszakán át. A következő napon a mintákat 3x5 percig mostam PBT-ben, majd FBS PBT-ben oldott másodlagos ellenanyag (**2. táblázat**) oldatban inkubáltam őket 3 órán át szobahőn. Ezt 2x5 perces PBT-ben, majd 2x5 perces PBS-ben történő mosás követte. Végül a mintákat 100%-os glicerinben fedtem le, és mindegyikből fluoreszcens mikroszkóppal egy 7-7 szeletből álló képsorozatot készítettem (Z-stack) a már említett Zeiss Axiomager M2 mikroszkópot alkalmazva. A 8.ábrán látható képeket 40x-es (0.35 μ m-es szeletvastagság) az 5. és a 6.ábrán láthatóakat pedig 10x-es (2 μ m-es szeletvastagság) nagyítással fotóztam.

3.4 Western blot:

A western blot kísérleteket megelőző mintaelőkészítés során 8 napos daganatokat (5-10 db/genotípus) gyűjtöttünk, jégen tartott lízis puffert (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, és 5 mM EDTA) tartalmazó Eppendorf csövekbe. A lízis puffer proteáz (PMSF 1:100, leupeptin 1:1000, aprotinin 1:1000) és foszfatáz (NaF 1:100, Na_3VO_4 1:100) inhibitort is tartalmazott. Ezután a mintákat műanyag kézi homogenizáló pálca segítségével homogenizáltuk, majd Bradford reagenssel megmértük a fehérjetartalmukat. Végül 6xLaemmli mintafelvívő puffer hozzáadását követően a mintákat 5 percig forraltuk, majd felhasználásig -20°C -os fagyasztóban tároltuk.

A western blot kísérlet során 10%-os poliakrilamid gélen mintánként 10 μg fehérjét tartalmazó mennyiséget futtattunk meg (Mini-Protean Tetra Cell, gélfutató berendezés, Bio-Rad), majd a lefutott gélből a fehérjét Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) berendezés segítségével vittük át PVDF membránokra. A membránt ezt követően 0,1% Tween-20 detergenst tartalmazó TBS pufferben (TBST) mostuk 3x5 percig, majd egy órán át blokkoltuk 0,5%-os kazeinben. Ezután a membránokat elsődleges ellenanyagokat (**2. táblázat**) tartalmazó 1:1 TBST-Kazein oldatban inkubáltuk egy éjszakán át 4°C -on billegtetve. Másnap a membránokat 3x10 percig mostuk TBST-vel, majd egy órán át inkubáltuk őket tormaperoxidáz (HRP) konjugált másodlagos ellenanyagot (**2. táblázat**) tartalmazó Kazein-TBST-ben, szobahőn. Ezt egy 3x10 perces TBST mosás követte, majd a membránokat Immobilon Western Chemiluminescent HRP szubsztrát (Merck) oldattal kezelve hívtuk elő Chemidoc Imaging System (Bio-Rad) berendezés segítségével. A kísérleteket denzitometrálassal értékeltük ki. Ennek során az adott band-ek intenzitását mértük meg az ImageJ szoftver Gels funkciójának használatával.

Az autofág flux kísérletek során a fentiekkel alapvetően megegyező mintagyűjtési és western blot eljárást alkalmaztunk, csak ez esetben az mCherry-GFP-Atg8a riportert hordozó MARCM törzsszel való keresztezéséből származó, 8 napos lárvákból gyűjtöttünk tumormintákat.

3.5 Statisztika:

A tumortérfogat mérés során genotípusonként 10-10 tumor méretét számszerűsítettem a Fiji ImageJ képfeldolgozó program segítségével, egy általunk írt makró segítségével. A GFP+ területeken mindig az „Otsu” maszkolási modellt alkalmazva jelöltem a modellben meghatározott közöbérték feletti intenzitású részeket. A tumortérfogat mérések összterfogat-értékei alapján a Prism (GraphPad Software) programban végeztem statisztikai

elemzést, miután Shapiro-Wilk tesztel ellenőriztem az adatok eloszlását. Ha az adatok normál eloszlásúak voltak, egymintás t-tesztet alkalmaztam. Ha az adatok nem normál eloszlásúak voltak, Mann-Whitney tesztet alkalmaztam. A statisztikai elemzéseket bemutató diagramokon a szignifikancia értékeket a következőképpen tüntettük fel: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

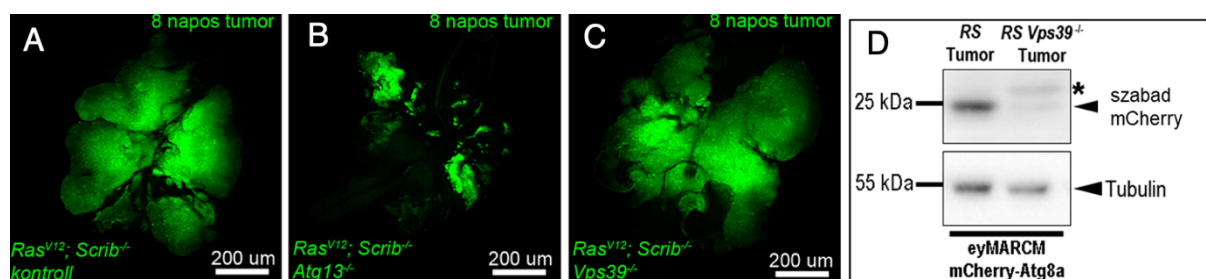
Immuncitokémia				
Elsődleges ellenanyagok	Ellenanyag típusa	Hígítás	Gyártó	Azonosító
nyúl anti-PH3	poliklonális	1:500	Merck	#06-570
nyúl-anti-cleaved-Dcp1	poliklonális	1:200	Cell Signaling Technologies	#9578
nyúl-anti-Rab5	poliklonális	1:100	abcam	ab31261
egér-anti-Rab7	monoklonális	1:10	DSHB	AB2722471
Másodlagos ellenanyagok	Ellenanyag típusa	Hígítás	Gyártó	Azonosító
anti-nyúl	Alexa 568-konjugált	1:1000	LifeTechnologies	-
anti-egér	poliklonális	1:1000	LifeTechnologies	-
Western blot				
Elsődleges ellenanyagok	Ellenanyag típusa	Hígítás	Gyártó	Azonosító
egér anti-MMP-1	monoklonális	1:250	DSHB	3B8D12, 3A6B4, 5H7B11
nyúl anti-JNK	monoklonális	1:1000	Cell Signaling Technologies	4668
egér anti-Tubulin E7	monoklonális	1:1000	Developmental Studies Hybridoma Bank	#AA4.3
Másodlagos ellenanyagok	Ellenanyag típusa	Hígítás	Gyártó	Azonosító
anti- egér HRP	poliklonális	1:10000	Sigma	AP124
anti-nyúl HRP	poliklonális	1:2500	DAKO	P5100

2. táblázat: Az immuncitokémiai és a Western blot során alkalmazott ellenanyagok listája.

4. Eredmények és megvitatásuk

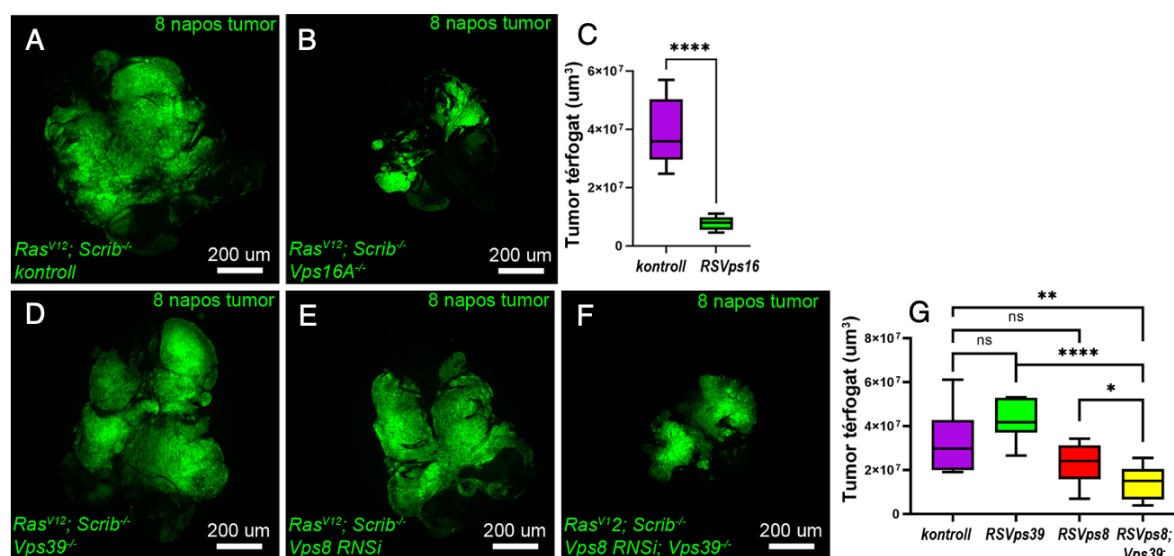
4.1 Az autofágiában és az endocitózisban résztvevő C típusú Vps komplexek szerepe a tumornövekedésben

Az autofágia és a Ras^{V12};Scrib^{-/-} tumormodellben végzett korábbi kísérletek alapján [1] tudjuk, hogy ha az autofágia kezdeti lépését, a fagofór képződését gátoljuk (Atg13 gén mutációjával) a daganatok növekedése leáll **(3.ábra)**. Az autofágia későbbi lépéseinek hatása kevésbé kutatott terület, ezért kíváncsiak voltunk, hogy ezek megzavarása milyen hatást fejthet ki az RS daganatokra. Kísérletünkhöz olyan tumorokat hoztunk létre, melyekben a HOPS komplex specifikus, Vps39 alegységének mutációjával gátoltuk az autofagoszóma-lizoszóma fúziót és érdekes módon ez nem okozott tumorméret csökkenést a kontrollhoz képest **(3.ábra)**. Ez azért meglepő, mert a HOPS komplex hiányában az autofág lebontás is gátolt kell legyen. Annak megerősítésére, hogy az RS Vps39 daganatokban valóban nem zajlik autofág lebontás, autofág flux esszét végeztünk, mely során mCherry-Atg8a riportert kifejező tumorok lizátumát vizsgáltuk western blottal [19], **(3.ábra)**. Az autofágia megfelelő működése során a lizoszómákban az Atg8a és az mCherry közötti kötés a lizoszóma hidrolázai által elhasítódik, így a szabad mCherry mennyiségéből kimutatható az autofág lebontás mértéke. Azon eredményünk, hogy az RS Vps39 mutáns dagantokból szinte hiányzott a szabad mCherry, megerősíti az eddigi feltételezésünket, hogy bennük ténylegesen gátolt az autofág lebontás. Ez alapján, az RS daganatok növekedéséhez nem szükséges az autofagoszómák és a késői endoszómák lizoszómákkal való, HOPS- függő fúziója és így a lizoszómális lebontás. Ez pedig arra utal hogy az RS Atg13 tumorok kis mérete nem az autofág lebontás hibája miatt alakul ki, vagyis az autofágia lebontó funkciója nem esszenciális a tumor növekedéséhez.



3.ábra: A 8 napos RS (A), az RSAtg13 (B) és az RSVps39 (C) dagantok tumortérfogatbeli összehasonlító ábrája. Emellett az RS és a RSVps39-ben végzett autofág flux kísérlethez tartozó Western blot ábrája (D). A Tubulin töltési kontrollként szolgál. *: aspecifikus band

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a HOPS komplex más alegységei milyen hatással lehetnek a daganatok növekedésére. Némileg váratlan módon az RS daganatokban a Vps16A alegység tumorspecifikus hiánya során szignifikánsan kisebb tumorok keletkeztek **(4.ábra)**. Ennek lehetséges magyarázata, hogy a Vps16A nemcsak a HOPS része, hanem az endocitózis korai lépéseiben szereplő CORVET komplex tagja is lehet. Így a Vps16A mutációja során, nemcsak az autofágia folyamatában okozunk zavart, hanem az endocitózisban is. Ezt vizsgálándó, a CORVET komplex specifikus Vps8 alegységét csendesítő daganatokat (RS Vps8) hoztunk létre, ezek mérete azonban a kontrollokhoz (RS) képest nem csökkent **(4.ábra)**. Eredményeink alapján felmerült, hogy a CORVET és a HOPS együttes hiánya során keletkezhetnek csak szignifikánsan kisebb daganatok, ahogy ezt az RS Vps16 tumoroknál megfigyeltük. Ennek vizsgálatára a Vps39-re mutáns (HOPS) és ezzel párhuzamosan a Vps8-at (CORVET) is csendesítő tumorokat hoztunk létre (RS Vps8; Vps39), amelyek az RS Vps16 fenotípusához hasonlóan szignifikánsan kisebbre nőttek **(4.ábra)**. Összességében az Atg13 és a különböző HOPS és CORVET alegységekre hiányos tumorokon végzett vizsgálataink eredménye arra utal, hogy az RS Vps16 és az RS Vps8; Vps39 daganatok kis mérete valószínűleg a HOPS és a CORVET komplex endocitózisban ellátott funkciójának köszönhető, és nem az autofagoszóma-lizoszóma fúzióban betöltött szerepének kieséséhez köthető.

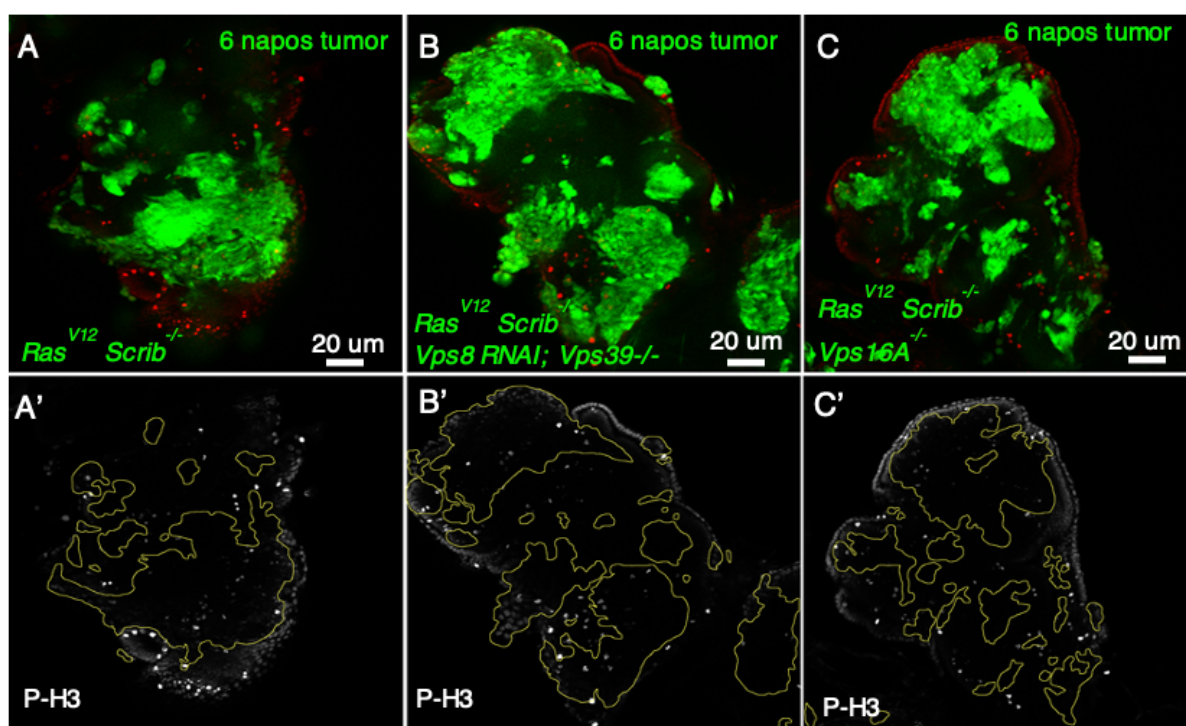


4.ábra: A 8 napos RS (A), RSVps16 (B), RSVps39 (D), RSVps8 (E), RSVps8;Vps39 (F) daganatok (GFP+ területek) a térfogatbeli összehasonlítása. Statisztikai analízis az A és B (C), illetve a D-F (G) paneleken látható kísérletekhez.

4.2 A HOPS és CORVET komplex tumornövekedésre gyakorolt lehetséges sejtbiológiai okai

Mivel a HOPS és a CORVET komplex együttes zavara kisebb tumorméretet okozott, felmerült a kérdés, hogy ennek milyen sejtbiológiai háttere lehet. Ezért immunfestést végeztünk az RS, az RS Vps8; Vps39 és az RS Vps16 funkcióvesztéses mutáns daganatokban, amely során a sejtosztódás (P-H3) és az apoptózis (Dcp-1) mértékét vizsgáltuk.

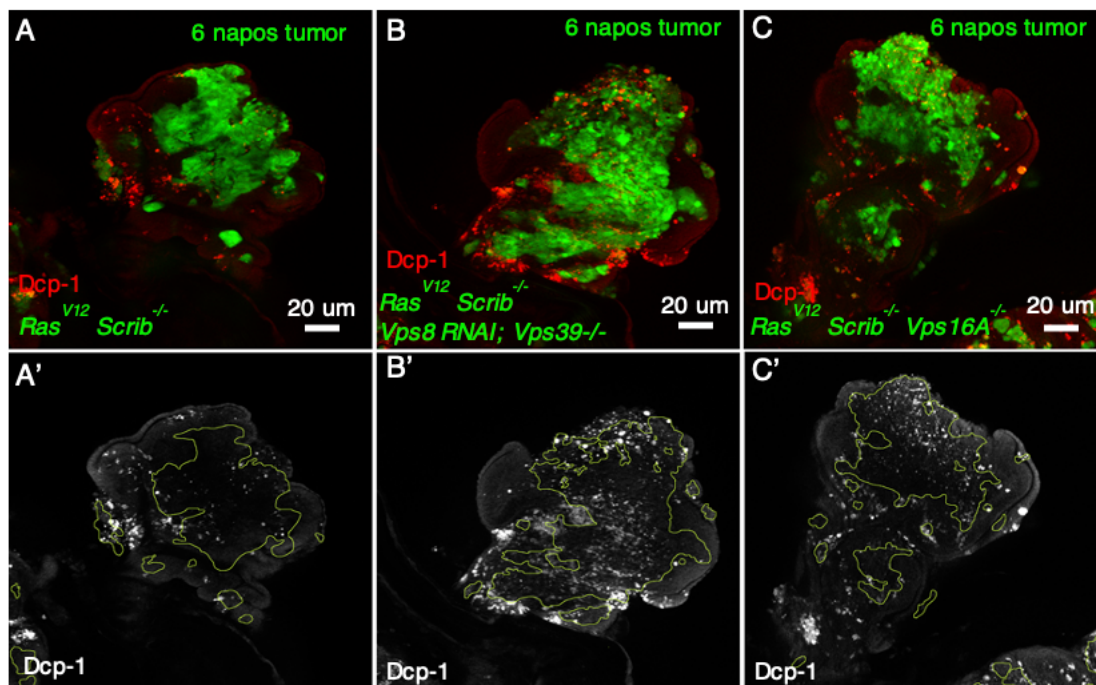
Az osztódó sejteket jelölő P-H3 festés során, mind az RS, az RS Vps8; Vps39 és az RS Vps16 daganatok hasonló eredményeket mutattak (**5.ábra**). A mikrokörnyezetben és a daganatos szövetekben (GFP+) egyaránt megfigyelhetők osztódó sejtek, de nagyobb eltérés nem észlelhető a különböző genotípusok között.



5.ábra: Az RS (A), az RSVps8; Vps38 (B) és az RSVps16 (C) 6 napos mutáns daganatok immunfestése az osztódó sejteket jelölő anti-P-H3-al. A GFP a tumoros sejteket (A'-C' paneleken sárgával keretezve), a GFP hiánya pedig a mikrokörnyezetet jelöli.

Az apoptózissal pusztuló sejtekre jellemző aktív kaszpázt (Death caspase-1/Dcp-1) jelölő festést is elvégeztük ugyanerre a három genotípusra (**6.ábra**). Az RS kontroll daganatban nagyobb mennyiségben a mikrokörnyezetben láthatunk pusztuló sejteket. Ezzel szemben az RS Vps8; Vps39 és az RS Vps16 funkcióvesztéses a daganatokban a tumoros területeken láthatunk több apoptotikus sejtet (**6.ábra**).

Összességében tehát eredményeink arra utalnak, hogy a HOPS és CORVET kettős funkcióvesztéses daganatok (RS Vps8; Vps39 és RSVps16) kisebb tumor mérete a fokozott apoptózisnak tudható be.

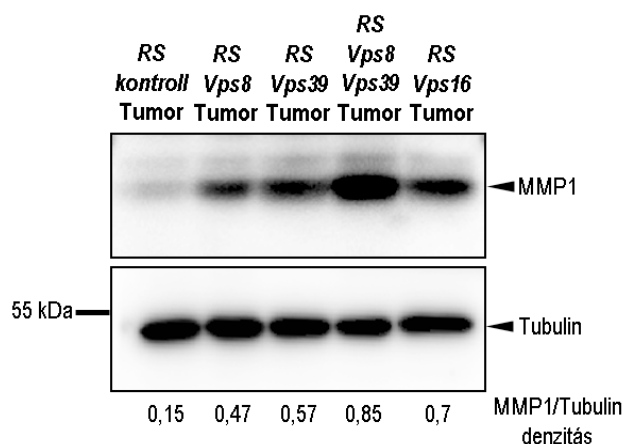


6.ábra: Az RS (A), az RSVps8; Vps38 (B) és az RSVps16 (C) daganatok immunfestése az apoptózissal pusztuló sejteket jelölő anti-Dcp1-gyel. A GFP a tumoros sejteket (A'-C' paneleken sárgával keretezve), a GFP hiánya pedig a mikro környezetet jelöli.

4.3 A JNK jelátviteli útvonal vizsgálata fúzió mutáns daganatokban

Mivel úgy gondoltuk, hogy a HOPS és CORVET kettősen hiányos tumorokban megnövekedő apoptózis vélhetően valamelyik jelátviteli folyamat hibás működésének volt betudható, meg akartuk vizsgálni e tumorokban a sejthalált indukáló jelátviteli folyamatok működését. Kutatások alapján a JNK jelátviteli útvonal képes kaszpázfüggő sejthalált indukálni adott szövetekben [13], emellett az is ismert, hogy a JNK jelátvitel aktivitása magas az RS daganatokban [20], így fontosnak tartottuk a JNK útvonal vizsgálatát.

Korábban már bemutatták, hogy az általunk használt tumormodellben a mátrix metalloproteáz 1 enzim (MMP1) expressziója nagymértékben függ a JNK aktivitásától. Így western blottal teszteltük az MMP1 szintjét RS, RS Vps8, RS Vps39, RS Vps8;39 és RS Vps16 daganatokban (**7.ábra**). A kísérlet alapján, bár a HOPS és a CORVET egyszeres funkcióvesztéses tumorokban is nőtt az MMP1 szintje, mint kontrollhoz képest, a legnagyobb emelkedést mégis a kettős funkcióvesztéses RS Vps8; Vps39 és az RS Vps16 daganatok mutatták (**7.ábra**). Ez arra utal, hogy a HOPS és CORVET együttes hiányában megnövekedő apoptózis valószínűleg a JNK jelátvitel túlműködésének tudható be.



7.ábra: A JNK jelátvitel aktivitásának kimutatására szolgáló Western blot kísérlet ábrája. A tubulin töltési kontrollként szolgál. A denzitometráls során az MMP1 band-ek intenzitását hasonlítottuk az azonos geneotípus Tubulin-jának intenzitásához.

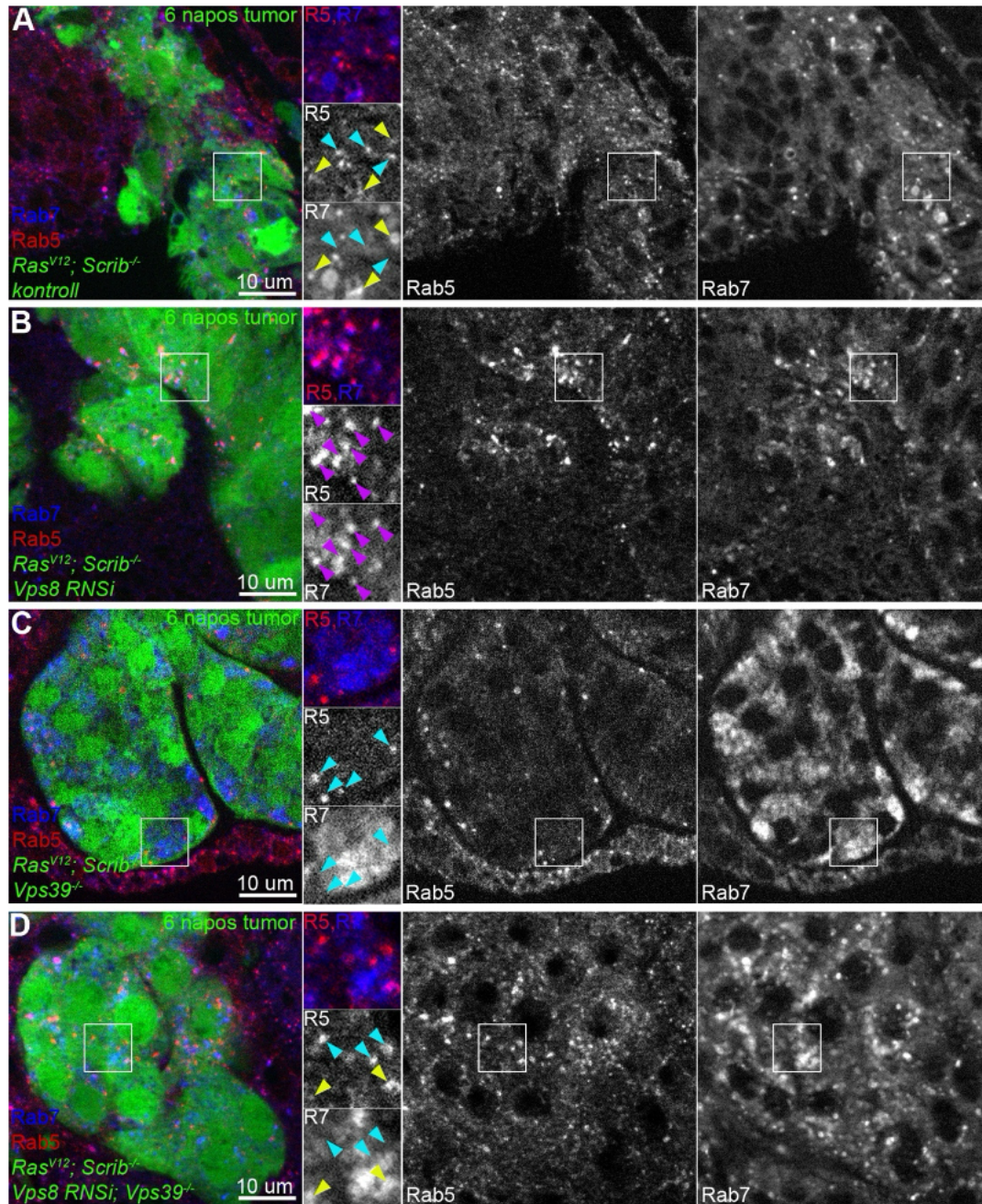
4.4 Az endoszómális kompartmentek vizsgálata HOPS és CORVET hiányos daganatokban

Mivel az endocitózis fontos szerepet játszik a jelátviteli folyamatok szabályozásában, fontosnak tartottuk, hogy megvizsgáljuk a HOPS és CORVET hiányának hatását az endoszómális kompartmentek méretére és eloszlására. Ehhez immunfestést végeztünk amely során a korai endoszómákat anti-Rab5-tel, a késői endoszómákat és autofagoszómákat pedig anti-Rab7-tel jelöltük a tumorokban és azok mikrokörnyezetében **(8.ábra)**.

Az RS kontroll daganatokban a Rab5 és Rab7 pozitív struktúrák többsége jól elkülönült egymástól, és a Rab7 és a Rab5 jel között csak helyenként volt megfigyelhető részleges átfedés **(8.ábra)**. Ezzel szemben a CORVET hiányos daganatok (RS Vps8) rákos sejtjeiben a Rab5 és Rab7 kolokalizációja megnő, és a két markerre egyaránt pozitív nagyméretű struktúrák halmozódnak fel **(8.ábra)**. E korai (Rab5) és késői (Rab7) endoszómális fehérjékre kettősen pozitív struktúrák vélhetően kóros endoszómák lehetnek, amelyek késő endoszómává érése csak részben zajlik le, a CORVET-függő kori endoszómális fúziók elmaradása miatt. A HOPS mutáns daganatokban (RS Vps39) elsősorban az apró Rab7 pozitív struktúrák jelentős mértékű halmozódását figyelhetjük meg **(8.ábra)**. Emellett e tumorokban kisebb mennyiségben a Rab5 pozitív korai endoszómák is megfigyelhetők, de ezek nem fednek át a Rab7 pozitív struktúrákkal **(8.ábra)**. A HOPS és a CORVET kettős funkcióvesztéses daganatokban (RS Vps8;Vps39), a kontrollhoz (RS) képest Rab5 és a Rab7 pozitív struktúrák egyaránt nagy mértékben halmozódnak, de ezek csak alkalmi, részleges átfedést mutatnak egymással **(8.ábra)**.

A fenti kísérlet alapján, az alábbi következtetést vontuk le a daganatokban a HOPS és a CORVET működéséről: A HOPS a lizoszómális fúziókért felel, így a HOPS mutáns daganatokban nem fuzionált Rab7 pozitív autofagoszómák és késői endoszómák halmozódnak fel. Ezzel szemben a CORVET a korai endoszómák késői endoszómává éréséért felel, hiányában pedig kóros hibrid endoszómák keletkeznek, amelyek korai és késői endoszómákra utaló jegyeket is mutatnak. Érdekes, hogy bár a HOPS és CORVET kettős funkcióvesztéses tumorokban a két komplex hiányában tapasztalt fenotípusok összeadódnak – a Rab7 pozitív struktúrák felhalmozódása (HOPS fenotípus) mellett a Rab5 pozitív endoszómák mennyisége is megnő (CORVET fenotípus) – ugyanakkor a CORVET csendesítésre jellemző hibrid endoszómák eltűnnek. Ez arra utal, hogy a CORVET hiányában részben megrekedt endoszóma érése a kettős funkcióvesztés hatására ellehetetlenül, így utóbbiakban éretlen korai endoszómák halmozódhatnak fel. Ez azért bír különös jelentőséggel, mert a korai endoszómákban található ligand-receptor komplexekről még történhet jelátvitel. Fontos megjegyezni, hogy a RS

tumorkokban leírták, hogy a JNK-t aktiváló ligand, az Eiger a korai endoszómákba kerülve kezd el szignalizálni, e jelátvitel túlműködése pedig apoptózishoz vezet [14, 15]. Így eredményeink felvetik annak lehetőségét, hogy a HOPS és CORVET kettős funkcióvesztéses tumorokban felhalmozódó éretlen korai endoszómák állhatnak az ugyanezen tumorokban megfigyelt felerősödő JNK jelátvitel és apoptózis hátterében.



8.ábra: A korai endoszómák (Rab5), illetve a késői endoszómák és autofagoszómák (Rab7) eloszlását jelölő immunfestés RS (A), RS Vps8 (B), RS Vps39 (C) és RS Vps8;Vps39 (D) tumorokon. CORVET és a HOPS komplex mutáns daganatokban. A GFP a tumoros sejteket, a GFP hiánya pedig a mikrokörnyezetet jelöli. A bekeretezett részek a kis panelekben felnagyítva láthatóak. A nyílhegyek a Rab5 és Rab7 kolokalizációjának mértékét mutatják: lila: teljes; sárga: részleges; cián: nincs kolokalizáció.

Összefoglalás

Kutatásunk rámutat a lizoszomális lebontó folyamatokban keletkező zavarok és a rák progressziója közötti összetett kölcsönhatásra. Az Atg13 és Vps39 mutáns tumorok vizsgálatával megállapítottuk, hogy az autofagoszóma képződést szabályozó Atg13 az autofág lebontástól független funkciót ellátva segíti a tumornövekedést. Ezzel szemben az autofagoszóma- és késői endoszóma-lizoszóma fúziót szabályozó HOPS komplex funkciójának kiesése a korai endocitózist szabályozó CORVET hiányával kiegészülve az endocitózis és részben az autofágia együttes zavarán keresztül szintén hatással van a daganatok növekedésére.

A HOPS CORVET kettős funkcióvesztéses tumorokat továbbvizsgálva azt is megállapítottuk, hogy a fokozott sejthalálnak tudható be a daganatok térfogatbeli regressziója. Western blot eredményünk pedig azt mutatta ki, hogy ugyanezen daganatokban az MMP-1 szintje a legmagasabb a többi vizsgált genotípushoz képest. Az MMP1 emelkedő mennyisége, a sejthalált is indukálni képes JNK jelátvitel felerősödő aktivitására utal, s ez magyarázhatja a kettős funkcióvesztéses tumorokban észlelt fokozott apoptózist.

Az elvégzett Rab5-Rab7 immunfestés során megállapítottuk, hogy HOPS és CORVET kettős funkcióvesztéses daganatokban mind a korai mind pedig a késői endoszómák halmozódása megfigyelhető volt. A kóros korai endoszómák feldúsulásának különös jelentősége lehet. Más kutatásokból megtudtuk, hogy ebben a tumortípusban a TNF-szerű Eiger citokin endocitózissal felvevődve épp a korai endoszómákba lokalizálva [15] aktiválja a JNK jelátvitelt [14]. Így összességében azt feltételezzük, hogy a HOPS és CORVET hiányos daganatok tumorsejtjeiben, a kóros korai endoszómák halmozódása a JNK jelátvitel fokozódásán keresztül az apoptózis túlzott mértékű indukciójához vezet, amely végül csökkenti a daganatok méretét.

Mindent összevéve kutatásunk rámutat lizoszomális lebontó folyamatok kiemelkedő jelentőségére a daganatos megbetegedésekben. A HOPS és CORVET komplexek, illetve a JNK jelátviteli útvonal közötti kapcsolat feltárásán keresztül munkánk hozzájárulhat a folyamat molekuláris hátterének jobb megértéséhez és így jövőbeli tumor terápiás stratégiák és gyógyszerek fejlesztésének kiindulópontja lehet.

Szerzői nyilatkozat

Alulírott Neuhauser Natali Julianna nyilatkozom, hogy a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül az alábbiakat magam végeztem el:

1. A kísérletek során felhasznált *Drosophila* törzseket kereszteztem, illetve tartottam fenn.
2. Az RS Vps8, az RS Vps39 és az RS Vps8;Vps39 vonalakat meiotikus rekombinációval hoztam létre.
3. Fluoreszcens mikroszkópiával kimutattam, hogy az autofágiát és az endocitózist segítő struktúrák mely alegységeinek csendesítése van hatással a tumortérfogat változására.
4. Rab5 és Rab7 immunfestékekkel kimutattam, hogy az RS, az RSVps8, az RSVps8; Vps39 és az RSVps16 mutáns daganatokban a Rab5 és a Rab7 pozitív struktúrák, hogy helyezkednek el, és ezzel képet mutatva az endolizoszómális kompartmentek elhelyezkedéséről.
5. P-H3, illetve Dcp-1 immunfestékekkel kimutattam az osztódó és az apoptotikus sejtek arányát az RS, az RSVps8;39 és az RSVps16 mutáns daganatokban, és ezzel megállapítottam, hogy a fúzió mutáns daganatok méretbeli különbségéért feltehetőleg a fokozott sejthalál felelős.
6. Az MMP-1 Western blot teljes folyamatát én végeztem és ezzel megállapítottam, hogy a fúzió mutáns daganatokban az MMP-1 szintje magasabb, az egyszeres mutáns és kontroll daganathoz képest is.
7. Az ImageJ illetve GraphPad programok segítségével kiértékeltem az eredményeinket.

A Western-blot analízist és annak az igazolására szolgáló Western blot kísérletet, melyből megtudjuk, hogy az RSVps39 mutáns daganatokban nem zajlik autofág lebontás Dr. Takáts Szabolcs végezte.

Ezúton nyilatkozom, hogy TDK konferencián korábban nem értem el helyezést. Ha a jelen BTDK Konferencia előtt másik TDK konferencián helyezést érek el, arról a BTDK szervezőit még a konferencia előtt értesítem, a nyertes pályamunkát eljuttatom hozzájuk.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek dr. Takáts Szabolcsnak és Szenci Győzőnek a TDK dolgozatom elkészítése alatt nyújtott segítségükért és mérhetetlen türelmükért, illetve a közös munkáért is. Emellett köszönöm az Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék munkatársainak a támogatás, kiemelten Károlyi Dorottya szakdolgozó kollégámnak.

Köszönöm a méhecskéimnek, akik a nehezebb időkben is meghallgattak és segítettek átvészelni ezt az időszakot és nem utolsó sorban hálával tartozom a családomnak és a páromnak is a rengeteg támogatásért és törődésért. Köszönöm, hogy vagytok!

Irodalomjegyzék

1. E. Meel, J. Klumperman, Imaging and imagination: understanding the endo-lysosomal system. *Histochemistry and Cell Biology*. 129, 253–266 (2008).
2. J. New, S. M. Thomas, Autophagy-dependent secretion: mechanism, factors secreted, and disease implications. *Autophagy*. 15, 1682–1693 (2019).
3. N. S. Katheder, R. Khezri, F. O’Farrell, S. W. Schultz, A. Jain, M. M. Rahman, K. O. Schink, T. A. Theodossiou, T. Johansen, G. Juhász, D. Bilder, A. Brech, H. Stenmark, T. E. Rusten, Microenvironmental autophagy promotes tumour growth. *Nature*. 541, 417–420 (2017).
4. R. A. Frake, T. Ricketts, F. M. Menzies, D. C. Rubinsztein, Autophagy and neurodegeneration. *Journal of Clinical Investigation*. 125, 65–74 (2015).
5. T. Tang, Z. Yang, D. Wang, X. Yang, J. Wang, L. Li, Q. Wen, L. Gao, X. Bian, S. Yu, The role of lysosomes in cancer development and progression. *Cell & Bioscience*. 10 (2020), doi:<https://doi.org/10.1186/s13578-020-00489-x>.
6. L. D’Agostino, Y. Nie, S. Goswami, K. Tong, S. Yu, S. Bandyopadhyay, J. Flores, X. Zhang, I. Balasubramanian, I. Joseph, R. Sakamori, V. Farrell, Q. Li, C. S. Yang, B. Gao, R. P. Ferraris, G. Yehia, E. M. Bonder, J. R. Goldenring, M. P. Verzi, Recycling endosomes in mature epithelia restrain tumorigenic signaling. *Cancer research*. 79, 4099–4112 (2019).
7. H. J. k. Balderhaar, C. Ungermann, CORVET and HOPS tethering complexes - coordinators of endosome and lysosome fusion. *Journal of Cell Science*. 126, 1307–1316 (2013).
8. U. B. Pandey, C. D. Nichols, Human Disease Models in *Drosophila melanogaster* and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery. *Pharmacological Reviews*. 63, 411–436 (2011).

9. C. Dillard, J. G. T. Reis, T. E. Rusten, RasV12; scrib^{-/-} Tumors: A Cooperative Oncogenesis Model Fueled by Tumor/Host Interactions. *International Journal of Molecular Sciences*. 22, 8873 (2021).
10. M. Uhlirova, D. Bohmann, JNK- and Fos-regulated Mmp1 expression cooperates with Ras to induce invasive tumors in *Drosophila*. *The EMBO Journal*. 25, 5294–5304 (2006).
11. M. Wu, J. C. Pastor-Pareja, T. Xu, Interaction between RasV12 and scribbled clones induces tumour growth and invasion. *Nature*. 463, 545–548 (2010).
12. H. Wu, M. C. Wang, D. Bohmann, JNK protects *Drosophila* from oxidative stress by transcriptionally activating autophagy. *Mechanisms of Development*. 126, 624–637 (2009).
13. M. Li, S. Sun, J. Priest, X. Bi, Y. Fan, Characterization of TNF-induced cell death in *Drosophila* reveals caspase- and JNK-dependent necrosis and its role in tumor suppression. *Cell Death & Disease*. 10 (2019), doi:<https://doi.org/10.1038/s41419-019-1862-0>.
14. T. Igaki, J. C. Pastor-Pareja, H. Aonuma, M. Miura, T. Xu, Intrinsic Tumor Suppression and Epithelial Maintenance by Endocytic Activation of Eiger/TNF Signaling in *Drosophila*. *Developmental Cell*. 16, 458–465 (2009).
15. X. Ding, Z. Li, G. Lin, W. Li, L. Xue, Toll-7 promotes tumour growth and invasion in *Drosophila*. *Cell Proliferation*. 55 (2022), doi:<https://doi.org/10.1111/cpr.13188>.
16. Y.-Y. Chang, T. P. Neufeld, An Atg1/Atg13 Complex with Multiple Roles in TOR-mediated Autophagy Regulation. *Molecular Biology of the Cell*. 20, 2004–2014 (2009).
17. S. Takáts, K. Piracs, P. Nagy, Á. Varga, M. Kárpáti, K. Hegedűs, H. Kramer, A. L. Kovács, M. Sass, G. Juhász, Interaction of the HOPS complex with Syntaxin 17 mediates autophagosome clearance in *Drosophila*. *Molecular Biology of the Cell*. 25, 1338–1354 (2014).
18. V. K. Lund, K. L. Madsen, O. Kjaerulff, *Drosophila* Rab2 controls endosome-lysosome fusion and LAMP delivery to late endosomes. *Autophagy*. 14, 1520–1542 (2018).

19. Rojyar Khezri, P. Holland, T. A. Schoborg, I. Abramovich, Szabolcs Takáts, C. Dillard, A. Jain, Fergal O'Farrell, S. W. Schultz, W. M. Hagopian, Eduardo Martín Quintana, R. Ng, Nadja Sandra Katheder, Mohammed Mahidur Rahman, G. Teles, A. Brech, H. Jasper, N. M. Rusan, A. Hope Jahren, E. Gottlieb, Host autophagy mediates organ wasting and nutrient mobilization for tumor growth. *The EMBO Journal*. 40 (2021),
doi:<https://doi.org/10.15252/emboj.2020107336>.

20. J. C. Pastor-Pareja, M. Wu, T. Xu, An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage in *Drosophila*. *Disease Models and Mechanisms*. 1, 144–154 (2008).