

TDK Biológia szekció

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és

Informatikai Kar

Genetikai Tanszék

SZEGEDI BIOLÓGIAI

KUTATÓKÖZPONT

Genetikai Intézet

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

**Az ER-fágia és a kanonikus makroautofágia utak
kapcsolata *Drosophila melanogaster*-ben**

Béres Csaba Bence

Biológia Bsc 3. évfolyam

Témavezető:

Dr. Jipa András

Belső konzulens:

Dr. Sinka Rita

Szeged

2024. 11. 09.

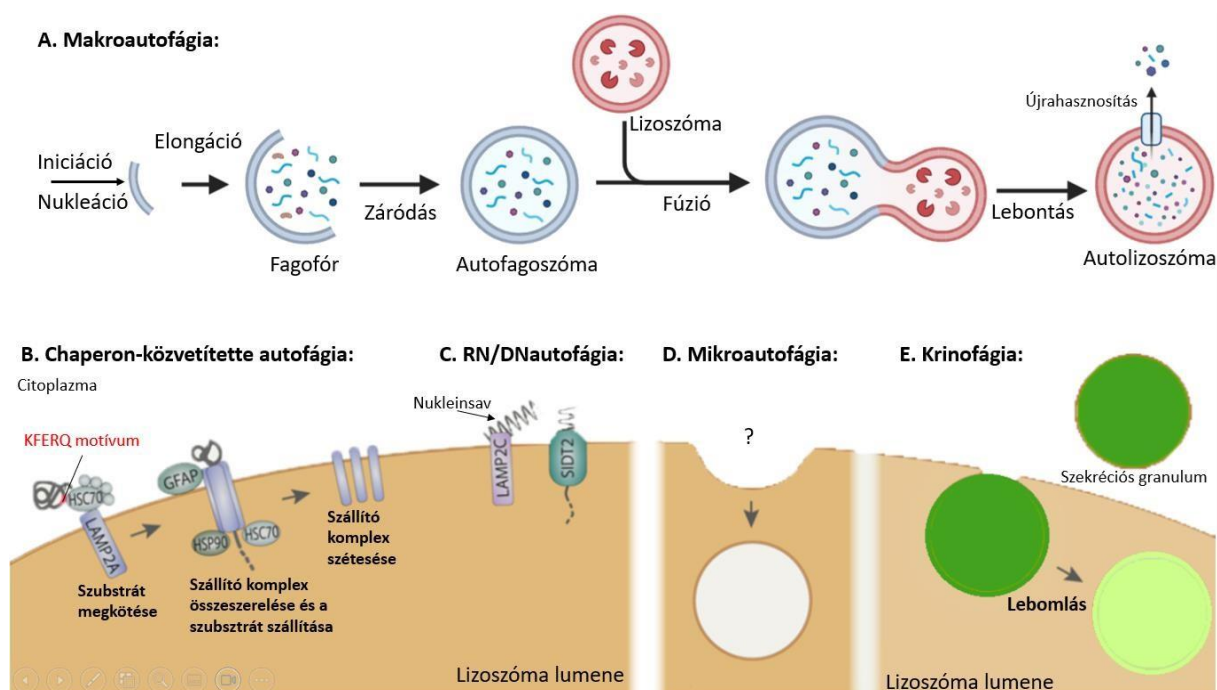
Tartalomjegyzék

1. BEVEZETŐ	3
1.1 Autofágia általános jellemzői, molekuláris mechanizmusai és élettani hatásai	3
1.2 Makroautofágia molekuláris mechanizmusait szabályozó gének	5
1.3 A szelektív autofágia típusai és molekuláris mechanizmusai.....	8
1.4 ER-fágia általános működése, élettani hatásai	9
2. Célkitűzések	10
3. Anyagok és módszerek	11
3.1 Felhasznált Drosophila törzsek, fenntartása és kezelése.....	11
3.2 Éhezés indukálta autofágia, boncolás és mikroszkópia	11
3.3 Eredmények kvantifikálása és statisztikai kiértékelése	11
4. Eredmények és kiértékelésük.....	12
4.1 Az éhezés indukálta ER-fágia modell létrehozása.....	12
4.2 Az Atg1 kináz komplex szerepének vizsgálata az ER-fágiában	13
4.3 A Vps34 kináz komplex szerepe az ER-fágiában	15
4.4 Az Atg9 vezikulák szerepe az ER-fágiával.....	16
4.5 Atg8 konjugációs komplex szerepe az ER-fágiában.....	17
4.6 SNARE komplex kapcsolata az ER-fágiával	18
4.7 A LIR és az LDS motívumok szerepe az ER-fágiában.....	19
5. Diskusszió.....	20
6. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS	22
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	23
8. IRODALOMJEGYZÉK	24

1. BEVEZETŐ

1.1 Autofágia általános jellemzői, molekuláris mechanizmusai és élettani hatásai

Az autofágia egy általában éhezésre és egyéb stressz hatására bekövetkező intracelluláris lebontó sejt folyamat. Ez a folyamat nélkülözhetetlen a homeosztázis fenntartásához, fejlődési folyamatok lebonyolításához, az éhezési stresszhez való alkalmazkodáshoz és a hibás, illetve fölösleges sejtorganellek, makromolekulák lebontásához (Glick és mtsai, 2010). A folyamat mechanizmusa szerint öt autofágia típust különíthetünk el. A legjelentősebb típusa a makroautofágia (**1. ábra A**), amely egy duplamembránú cisztán: az autofagoszómán keresztül szállít bekebelezett sejtalkotókat egy lizoszómához, mellyel fuzionálva autolizoszómává egyesül és a lizoszóma lebontó enzimei segítségével bontja a bekebelezett sejtalkotókat (Yim és mtsai, 2020).



1. ábra. A különböző autofágia típusok. (A) A makroautofágia áttekintése: Fiziológiai stressz hatására a citoszolikus anyagok bekebelezésre kerülnek egy duplamembránú cisztérna által, amit fagofórnak hívnak, amely végül egy membráncisztává zárul, amit autofagoszómának hívunk. Az autofagoszóma később fuzionál egy lizoszómával amely során kialakul az úgynevezett autolizoszóma aminek savas kémhatáson működő enzimei lebontják a bekebelezett anyagokat amelyek később újra hasznosulnak ezzel fenntartva a sejt homeosztázisát (Hansen és mtsai, 2018). (B) A chaperon-mediált autofágia (CMA) magában foglalja a KFERQ-szerű motívummal rendelkező fehérjék közvetlen felvételét a lizoszómákba egy transzlokációs komplexum révén, amely LAMP2A monomerekből áll a lizoszomális membránon, és amelyet a GFAP és a luminalis HSP90 stabilizál. A CMA szubsztátokat a citoszolikus HSC70 és más citoszolikus chaperonok szállítják a LAMP2A-hoz. A szubsztát transzlokációját a lizoszomális HSC70 segíti. (C) Az RN/DN autofágia a nukleinsavak közvetlen szállítását jelenti a

lizoszómákba a nukleinsav szállító, SIDT2 révén. A LAMP2C kötődik a nukleinsavakhoz, és potenciálisan átadja őket a SIDT2-nek, hogy azok transzlokálódjanak a lizoszomális lumenbe. **(D)** A mikroautofágia a citoszolikus anyagok felvétele a lizoszomális membrán behúzódása révén. Bár a lizoszómákban megfigyelték a felfedezésük óta, a mechanikai részletek még mindig szűkösek. A mikroautofágia az endoszómákban jobban ismert. Az endoszomális mikroautofágia szubsztátjai KFERQ(-szerű) motívumokat tartalmaznak, és a citoszolikus HSC70 ismeri fel őket, hogy az endoszómákhoz szállítsák, ahol az HSC70 kötődik a foszfatidil-szerinhez. A membrándéformációt és végül az intralumenális vezikulum elválasztását az endoszomális membrántól az ESCRT mechanizmus végzi (Yim és mtsai, 2020). **(E)** A krinofágia során az előregedett, vagy a kiürítésre nem kerülő szekréciós granulumok kerülnek lebontásra lizoszóma fúzió révén (Csizmadia és mtsai, 2018).

A chaperon-mediált autofágia során a célzott fehérjék, chaperon fehérjék segítségével transzlokálódnak a lizoszóma membránhoz, ahol a LAMP2 (lysosomal-associated membrane protein) felismerik és ennek hatására megkezdődik a fehérjék szétcsavarodása és degradációja **(1. ábra B)**. Az autofág útvonalak meghibásodásának bizonyított betegségei közé tartoznak: mellrák, prosztatara, petefészekrák, Parkinson kór, Danon-szindróma és Crohn-szindróma (Saftig és mtsai, 2008).

Az RN/DN autofágia során a lizoszóma közvetlenül nukleinsavakat bont **(1. ábra C)**. Ennek feltételes oka a vírusok ellen való védekezés, amire okot ad az RDA és a SIDT2 jelenléte. A SIDT2 egy duplaszálú RNS-transzporter (Aizawa és mtsai, 2016), míg az RDA részt vesz a nukleinsavak lebontásában (Nguyen és mtsai, 2017).

A mikroautofágia **(1. ábra D)** során a lizoszómába jutnak a sejtalkotók a lizoszóma membrán invaginációja során. Ezt a folyamatot ESCRT komplex és a TORC1 szabályozza (Oku és mtsai, 2017). A folyamat részt vesz a mitokondrium, ER és akár a sejtmag részleges lebontásában (Yim és mtsai, 2020).

A krinofágia **(1. ábra E)** során az előregedett, illetve kiürítésre nem kerülő szekréciós granulumok kerülnek lebontásra lizoszómával való fúzió során. A létrejött autolizoszóma-szerű de egyszeres membránnal rendelkező struktúra savas kémhatása révén bontja le a granulumokat (Csizmadia és mtsai, 2018).

1.2 Makroautofágia molekuláris mechanizmusait szabályozó gének

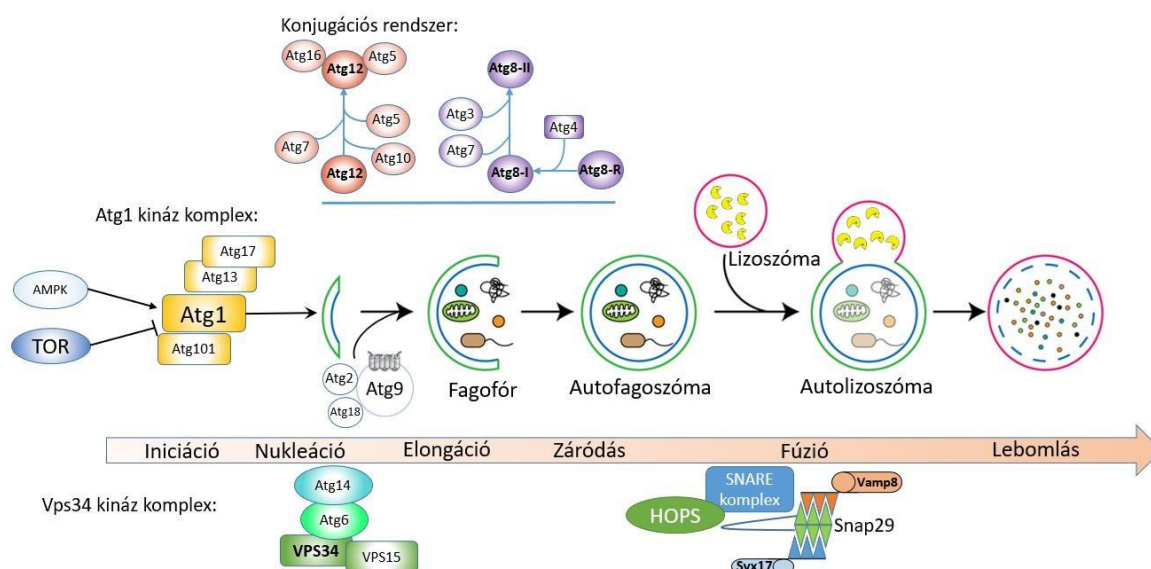
A makroautofágia (ezentúl csak autofágia) működése az úgynevezett Atg (Autophagy related genes) -nek köszönhetően valósul meg. A gének termékei 5 funkcionális komplexbe csoportosíthatóak, amelyek segítségével létrejön az autolizoszóma.

Az egész folyamat iniciációjáért a TOR (target of rapamycin) -kináz komplex felelős, amely érzékeny az éhezésre és az oxigénhiányra. Ideális körülmények között gátolja az Atg1 kináz komplexet, aminek hatására az Atg1 nem tud kapcsolatba lépni az Atg13-mal. Ez a komplex segít az alárendelt Atg gének toborzásában (Zachari és mtsai, 2017). Eltérő fehérjéket tartalmaz a komplex a különböző eukarióta élőlényekben. Ez a komplex emlősökben ULK1, ULK2, Atg13, FIP200 és Atg101. Ahol az ULK1 és ULK2 az Atg1 homológja, a FIP200 az Atg17 vagy Atg11 homológja (Tsuboyama és mtsai, 2016). *Drosophila melanogaster*-ben az Atg1, Atg17, Atg13, Atg101 töltik be az iniciációs komplex szerepét. Valószínű, hogy az Atg17-hez képes kötődni az Atg9, amelynek feladata, hogy serkentse a fehérje toborzást a kialakuló fagofórnál (Sekito és mtsai, 2009).

A Vsp34 kináz komplex felelős a folyamat nukleációjában, ilyenformán jelentősen részt vesz a fehérje toborzásban és a fagofór membránjának kiterjesztésében, ami eukariótákban általában ER membránból vagy mitokondrium membránból származik. Ha a TOR-kináz gátlásra kerül a Vsp34 kapcsolatba léphet a Beclin-1-el (*Drosophilában* és élesztőben Atg6 néven ismert), ennek köszönhetően a Vsp34 a komplex foszfatidil-inozitolt foszforilál, ezzel foszfatidil-inozitol-3foszfát (PI3P) keletkezik, amely későbbi faktorok számára biztosít kötőfelületet és ilyenformán hozzájárul a membránciszta identitásához (Cao és mtsai 2007). A PI3P egy jelmolekula, amin keresztül az autofagoszóma membrán kialakulhat, ami elengedhetetlen a többi Atg fehérje toborzásához a fagofórhoz (Backer és mtsai, 2008). Emellett, hogy a komplexnek a membránhoz kihorgonyozó tulajdonságai is vannak érdemes kihangsúlyozni az Atg14 szerepét, ami a membrán specifikusságáért felelős. Emellett, serkenti az Atg8a-foszfatidiletanolamin kötést. Az Atg6 toborzásában is részt vesz és gátolja a Vsp34- kináz komplex foszforilációját az AMP-kinázok által. Ha ennek a komplexnek valamelyikét elcsendesítjük akkor szintén nem lesz képes a sejt az autofagoszóma kialakítására, valamint drasztikusan csökkenti a sejt életképességeit is (Matsunaga és mtsai, 2009).

Az Atg9 egy ER-ből és Golgi-apparátusból származó transzmembrán fehérje, amelynek feladata, hogy a növekedő autofagoszóma membrán alkotóit szállítsa és reciklizálja. Azokat a vezikulumokat, ahol jelen van az Atg9 az Atg2 és az Atg18 komplexe képes szállítani (Reggiori és mtsai, 2004). Mikor az autofágia indukálódik az Atg9 a preautofagoszómális struktúra (PAS) felé

szállítódik, ahol biztosítja a lipidforrását az izolációs membránnak (IM). Az IM érése alatt a külső membránhoz csatlakozik az Atg2 és az Atg18, amelyek az autolizoszóma létrejöttének végéig a membránhoz kötődnek. Miután kialakult az autolizoszóma a két Atg fehérje leválik, csak az Atg9 marad transzmembrán fehérjeként az autolizoszómának (Yamamoto és mtsai, 2012).

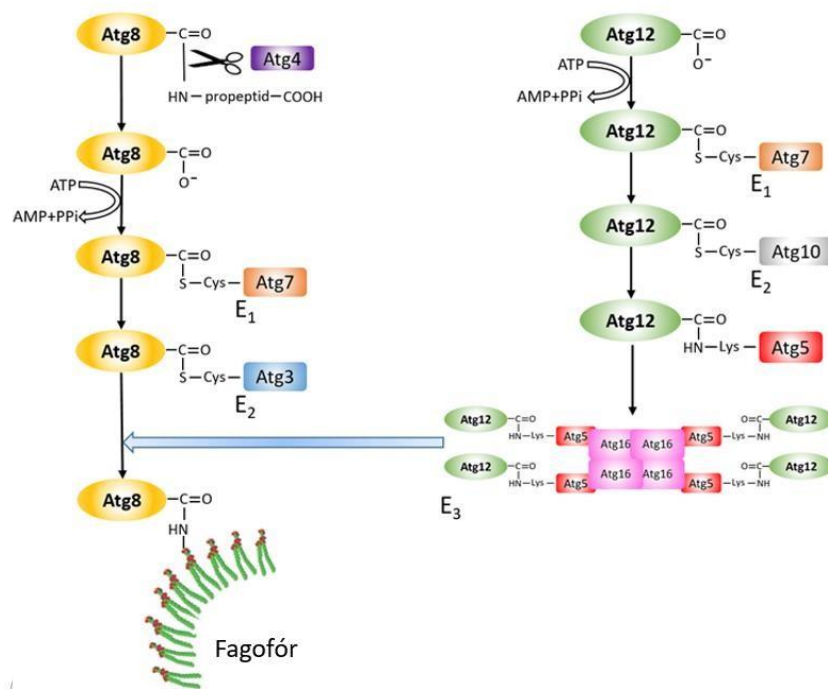


2. ábra. A makroautofágia folyamata és legfontosabb szabályzó fehérjei. A folyamat a TOR kináz komplex gátlásával kezdődik, utána az Atg1 magához tudja toborozni az Atg13, Atg17 és Atg101 fehérjéket. Ha létrejön az Atg1 kináz komplex megkezdődhet a Vps34 kináz komplex toborzása, amely fehérje alapanyagot szállít a kezdetleges autofagoszóma membránjához. A membrán összeszerelésében tovább segítenek még a konjugációs komplexek. A lizoszóma fúzióban a SNARE komplex vállal kulcsfontosságú szerepet, hogy létrejöjjön az autolizoszóma. Az ábra Nakamura és mtsai, 2018, valamint Hansen és mtsai, 2018 munkája alapján készült.

A fagofór éréséért két ubikvitin szerű rendszer felelős: az első rendszer alapja három fehérjéből áll: Atg7, Atg10, Atg5, Atg12 és az Atg16 (**3. ábra**). A két ubikvitin szerű fehérje aktiválásáért az Atg7 felel, amelyet ATP bontása révén biztosítja. Az Atg5-Atg12 konjugátum kialakulása az Atg10 által katalizált reakció révén történik, amelynek során az Atg12 peptidkötéssel kapcsolódik az Atg5-höz. Az Atg16 fehérje ezt a komplexet stabilizálja, és segít a fagofór membránjának növekedésében (Backer és mtsai, 2008).

Ezen kívül a második, ubikvitin-szerű rendszer, amely az Atg8/LC3 fehérjék köré épül, szintén kulcsszerepet játszik a fagofór érésében. Az Atg8 (vagy LC3) lipidációja az Atg7 (aktiváló) és Atg3 (konjugáló funkciója) által katalizált reakciók során zajlik, amely a lipid membránhoz való kötődést teszi lehetővé. Ez a lipidációs folyamat elengedhetetlen a fagofór stabilitásához és az autolizoszóma képződéséhez (Noda és mtsai, 2011). Így a két konjugációs rendszer ki tudja terjeszteni a fagofórt az Atg8-ak beépülésével. Viszont az Atg8-nak ezen felül számos autofágiával kapcsolatos szerepe van. Az autofágia gének expressziójában is szerepet

játszik és a szelektivitásért is felelős. Az Atg8 sokrétű szerepének oka a szerkezetében rejlik, ugyan is rendelkezik egy úgynevezett LDS (LIR docking site) motívummal. Számos szabályozási módja mellett képes acetilálódni, amit a Sir2 enzim végez, a LIR motívuma segítségével képes kötni az Atg8-at, amely így aktiválja a Sequoia nevű transzkripció faktorot. Ha pedig nem éheznek a sejt, acetilálódik amit a YL-1 enzim katalizál gátolva a transzkripció faktorhoz való kötést (Jacomin és mtsai, 2020). Valamint számos autofág receptorhoz (például p62) képes kötni és ezáltal célolni a makroautofágiát.



3. ábra. A konjugációs komplexek kialakulása és szerepe. Az Atg12 irreverzibilisen konjugálódik az Atg5-höz az Atg7 és Atg10 által, az Atg12 Atg5 konjugátum pedig további komplexet képez az Atg16-nal. Az Atg8 reverzibilisen konjugálódik a PE-hez az Atg3, Atg4, Atg7 és az Atg12-Atg5-Atg16 komplex által. A konjugációs reakciók molekuláris mechanizmusát az Atg8 és Atg12 rendszerekben analóg az ubiquitinációval (Noda és mtsai, 2011). Az illusztráció (Nakatogawa és mtsai, 2013) munkája alapján készült.

És végül az érett autofagoszóma és egy lizoszóma fuzionál és létrehozza az autolizoszómát. Ez a lépés egy energiaigényes folyamat, amelyet az ATP hidrolízise biztosít SNARE komplex katalizálásával. A SNARE komplex Syx17-Snap29-Vamp7/Vamp8 vagy a Syx17-Snap29-Ykt6 tagokból áll (Takáts és mtsai, 2013; Takáts és mtsai, 2018). Ezeknek a fehérjéknek a komplexé alakulását úgynevezett állvány fehérjék biztosítják, mint például a HOPS komplex, amely kapcsolatot teremt a lizoszóma és a SNARE komplex közt (**2. ábra**). A lizoszómán a Arl8bGTP -hez köt míg a SNARE fehérjék közül a Syx17 az autofagoszómákhoz kötődik, nem transzmembrán módon. A fúzió folyamatában fontos szerepet töltenek be továbbá

számos Rab-fehérjék (például Rab2) és citoszkeleton motor fehérjék is, mint a dinein (Kriegenburg és mtsai, 2018). Miután megtörtént a fúzió az autolizoszóma beltartalma degradálódásnak indul a lizoszóma hidrolitikus lebontó enzimeit által. A Syx17 a SNARE komplex tagjaként kapcsol a két vezikula fúziójában, ezért ennek hiánya miatt nem tud kialakulni az autolizoszóma (Jiang és mtsai, 2014).

1.3 A szelektív autofágia típusai és molekuláris mechanizmusai

A szelektív autofágia a makroautofágia azon formája, ahol a sejt célzottan bontja le a bizonyos sejtszervecskéket vagy káros molekulákat sejttermelékeket. A legtöbb szelektív autofágiánál a folyamat során a lebontandó fehérjék poliubikvitinálódnak amiket felismernek a különféle autofágia receptorok amik rendelkeznek egy úgynevezett UBD (ubiquitin-binding domain) -nel amivel képesek hozzákötni a lebontani kívánt fehérjéhez de emellett rendelkeznek egy LIR (LC3-interacting Region) motívummal amivel az autofagoszómában lévő Atg8 (emlősben LC3) -hoz tud kötni és így képes bekebelezni az autofagoszóma a degradálható fehérjéket (Gatica és mtsai, 2018).

A mitofágia során a sérült mitokondriumok kerülnek lebontásra a PINK1 kináznak köszönhetően, ami a mitokondrium külső membránjába köt és ubikvitint foszforilál valamint Parkin E3 ligázt, amely a mitokondrium ubikvitinálásaért felel (Narendra és mtsai, 2010). Az ubikvitinált mitokondriumot számos receptor is fel tudja ismerni pl: p62, NBR1, OPTN, NDP52 és TAX1BP1 (Wang és mtsai, 2019). Az aggregáció során fehérje-aggregátumok kerülnek lebontásra melyeket a SQSTM1, NBR1, OPTN receptorok ismernek fel. E folyamat jelentős neurodegeneratív betegségekhez köthető, mint az: Alzheimer-kór és a Parkinson-kór. (Gatica és mtsai, 2018)

A szelektív autofágiához sorolandó a lipofágia is, amely bár nem ubikvitinációon keresztül kerül felismerésre, sőt még dedikált receptorral sem rendelkezik. A zsírcseppeket perilipin fehérjék veszik körül és a chaperon mediált autofágiához hasonlóan kerül bekebelezésre (Kaushik és mtsai, 2015).

Továbbá még számos szelektív autofágia típus létezik, ilyen a pexofágia ahol peroxisómák bomlanak le, xenofágia ahol különféle patogéneket (főleg baktériumokat) bont a sejt és a ferritinofágia ahol a sejt a vashiányát pótolja a ferritin bontásával (Gatica és mtsai, 2018).

1.4 ER-fágia általános működése, élettani hatásai

Az ER-fágia egy szelektív makroautofágia típus, aminek célja az ER membránjának és annak ciszternáiban található lumenális proteinek lebontása. Ez a folyamat éhezés során indukálható és a szelektivitását az ER-fágia receptorok adják. Számos ER-fágiában szerepet játszó receptort ismerünk, mint a FAM134B, RTN3L, TEX264, ATL3, SEC62, CALCOCO1, és CCPG115. Ezek a receptorok elengedhetetlenek a folyamat szelektivitásában, valamint a COPII vezikula szubkomplex a SEC24C/Lst1-SEC23 az Lpn1 a VSP13 és az UVARAG (ultraviolet radiationresistance-associated gene) is hozzáköthető az ER-fágia regulálásában (Mou és mtsai 2024). Valamint muslica modellben még a főleg mitofágiát reguláló PINK1(PTEN-induced kinase 1) olyan formán, hogy regulálja a Keap1 nevű fehérjét, aminek feladata az RTNL1 receptor ubikvitinálása ezzel elindítva a ER-fágia folyamatát (Wang és mtsai, 2023).

Az ER-fágia receptorok hiánya vagy hibás működése számos rendellenességhez vezethet például rák vagy neurodegeneratív betegségek, de fejlődésbéli rendellenességeket is okoz, mint például a motorneuronok és szenzoros neuronok hibás fejlődése (Iavarone és mtsai, 2024). A FAM134b mutációja a HSAN (hereditary sensory and autonomic neuropathy) kettes típusához köthető az ATL3 mutációja pedig az egyes típushoz, míg a RTN3 receptor mutációja pedig az Alzheimer-kórhoz kapcsolható (Mou és mtsai, 2024).

2. Célkitűzések

Az ER-fágia egy kevésbé ismert formája a szelektív autofágiának és a folyamat megértése megoldást nyújthat számos neurodegeneratív rendellenesség és rákos elváltozások kezelésében. Továbbá a szelektív autofágia ezen formájának még kevés kifinomult modellje van *Drosophila melanogaster*-ben.

Ezért célul tűztük ki, hogy:

1. Egy új éhezés indukálta *in vivo* ER-fágia modellt fejlesztünk
2. Ezt a modellt felhasználva teszteljük le az összes autofágiában szerepet játszó fehérje komplex egy-egy tagját, úgy, hogy elcsendesítjük az ER-fágiában játszott szerepüket
3. Továbbá szeretnénk megvizsgálni, hogy az ER lebontásában a szelektív autofágia, vagy a nem szelektív autofágia játszik erősebb szerepet.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Felhasznált *Drosophila* törzsek, fenntartása és kezelése

A muslicákat 25°C-on tartottuk a kísérletek során. A táptalaj kukoricadarát, élesztőt, agart és dextrózt tartalmazott, valamint nipagént, egy antifungális tartósítószert. A kísérletek során a következő törzseket használtuk fel: Atg17 RNAi (VDRC ID: 10486), Atg14 RNAi (VDRC: ID: 108559), Sec61-GFP (VDRC ID: 318343) Bécsi *Drosophila* Törzsközpontból származik. Az Atg9 RNAi (BL ID: 901246), Atg8a RNAi (BL ID:34340) Syx17 RNAi (BL ID:25896) pedig a Bloomington *Drosophila* Törzsközpontból származik. LAMP1-3xmCherry- Atg8a Hegedűs és mtsai 2016-ban írtuk le korábban, valamint az Atg8a^{LDS} Nezis csoportjától kaptuk ajándékba (Ashrafur és mtsai, 2022). A hsFlip; +/+; UAS-Cherry, act>CD2>Gal4, Sec61>Sec61-GFP törzset (Lőrincz és mtsai, 2017) alapján készítettük el.

3.2 Éhezés indukálta autofágia, boncolás és mikroszkópia

Az éheztetés indukálta autofágiát Scott és mtsai, 2004 alapján végeztük három napos L3-as stádiumú ecetmuslica lárvákon. A kísérlet során a lárvákat 20%-os szacharóz oldatba helyeztük és 4 óráig az oldatban tartottuk. A cukoroldat kiváló szénhidrát forrás, ugyanakkor nem tartalmaz aminosavat, ezért éhezést vált ki a táplálkozó lárvákban, ráadásul a cukoroldat magas denzitása miatt a lárvák a folyadék felszínén maradnak, így nem fulladnak meg. Az éheztetett lárvák zsírtesteit 50 µl PBS (Phosphate-Buffered Saline) -ben oldott 300 nM DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) oldatban boncoltuk ki. A DAPI kék színű sejtmagfesték segít a sejtek elkülönítésében. A felesleget leszívtam és a mintára 30 µl VECTASHIELD fedő oldatot pipettáztam. Ennek szerepe az, hogy a fény hatására ne halványuljon a fluoreszcens fehérjék fénye. A mintára tárgylemezt tettem és Zeiss Axio Imager M2 mikroszkópon vizsgáltuk, amely fel van szerelve egy konfokális képességeket adó ApoTome 2 ráccsal. A képek elkészítését ORCA-Flash4.0 LT sCMOS (Hamamatsu) kamerával végeztük. A képek feldolgozását és szerkesztését egyrészt a Zeiss mikroszkóp saját programjával, a ZEN Lite 3.1-gyel, másrészt a Photoshop CS3 (Adobe), és ImageJ (NIH) programokkal végeztük.

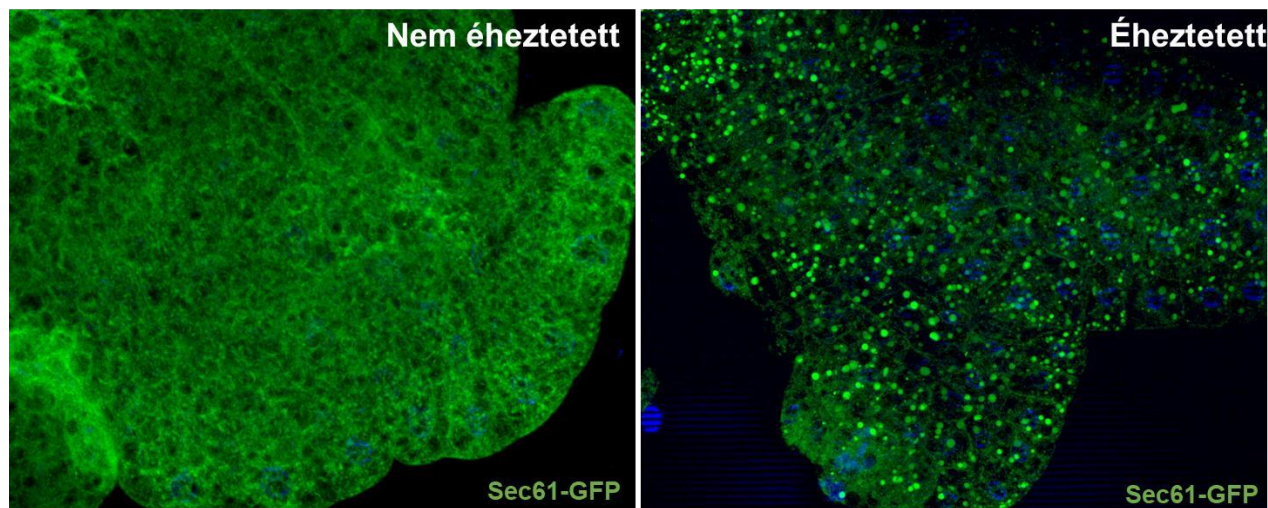
3.3 Eredmények kvantifikálása és statisztikai kiértékelése

Az adatok számszerűsítését mindig az eredeti képeken végeztük. Az összes kísérletünket legalább háromszor megismételtük az elegendő adat érdekében. A mikroszkópos képeket az ImageJ (NIH) program segítségével dolgoztuk fel. A statisztikai kiértékeléseket a Prism 8.0.1 (GraphPad) programmal végeztük. Az adatsorok normalitását szimpla t-tesztel határoztuk meg. Az adatsorok eloszlása nem mutatott normál eloszlást ezért Mann-Whitney U-teszt módszert alkalmaztunk.

4. Eredmények és kiértékelésük

4.1 Az éhezés indukálta ER-fágia modell létrehozása

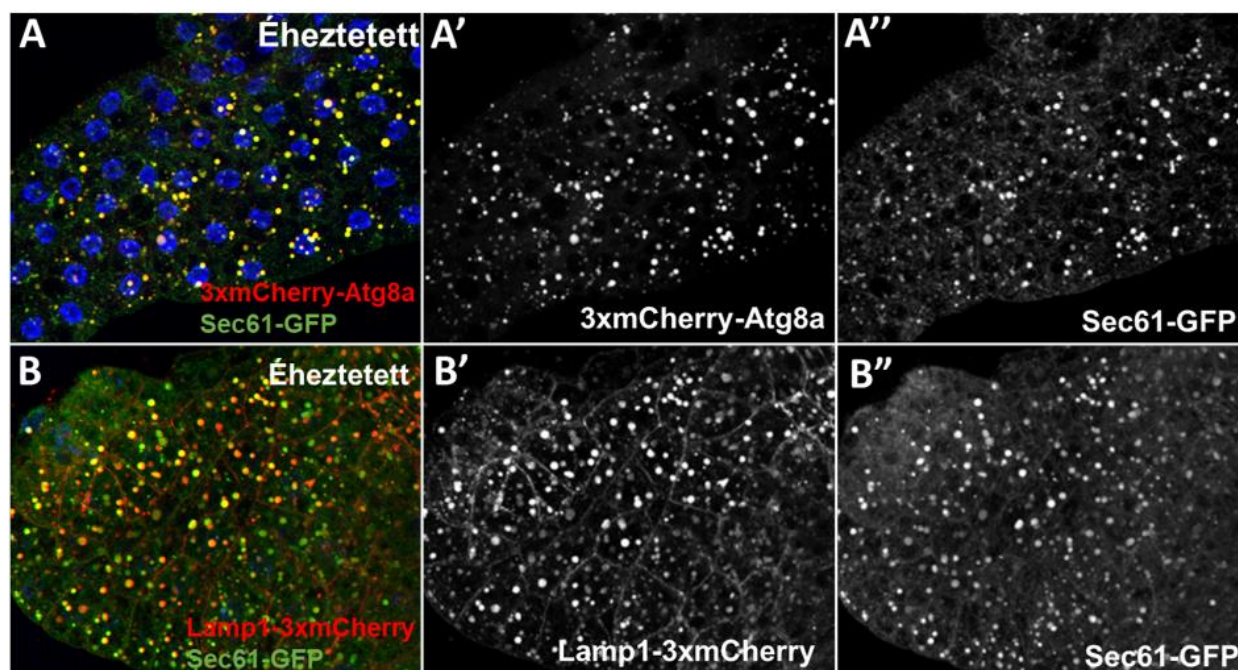
Szerettünk volna kialakítani egy olyan *Drosophila* modellt, amely segítségével nyomon tudjuk követni az ER-fágiát. Szükségünk volt ehhez egy ER-hoz köthető fehérjére, aminek meg tudjuk figyelni a mintázatát. A Sec61 α fehérje mellett döntöttünk mert ez egy ER transzmembrán fehérje, ezért, ezért funkcionális és autofagoszóma által bekebelezve is megvizsgálható a mintázata fénymikroszkópon. Bécsi *Drosophila* Törzsközpontból elérhetővé vált egy *in situ* GFP-vel jelölt Sec61-es vonal. Az *in situ* jelölés előnye az, hogy sokkal autentikusabb módon lehet megfigyelni vele a gén kifejeződési mintázatát, mivel a jelmolekulát kódoló gén (esetünkben GFP) közvetlenül a jelölendő fehérje az azt kifejező génhez van inszertálva, valamint riporterként funkcionálhat így immunfestés nélkül, közvetlenül boncolás után vizsgálható. Annak érdekében, hogy meggyőződjünk róla, hogy alkalmas ER-fágia riporterként, 4 órás cukoroldatban éheztetett három napos lárvákat vizsgáltunk. Bár a cukoroldat elegendő szénhidrátot biztosít, de aminosavakat nem tartalmaz, ezért a folyamatosan növekvő lárvákban éhezést okoz, amely ilyen módon indukálja az autofágiát. A boncolás után a két minta között jelentős mintázat béli különbséget figyeltünk meg. A nem éheztetett lárvák esetén egyenletes és hálózatos elrendeződést mutat, viszont az éheztetett lárvák esetén jól megfigyelhető volt a GFP jelölt struktúrák koncentrációja granuláumokba (4. ábra).



4. ábra. A Sec61-GFP eloszlása az etetett és éheztetett lárvákban. Jól látható az aggregáció az éheztetett lárvák esetében, ami arra ad következtetést, hogy végbe ment az autofágia és az autofagoszómák bekebeleztek az ER-membránját.

Hogy kétséget kizárólag meggyőződjünk a Sec61-GFP ER-fágia riporterként való működésében, a következő lépés az volt, hogy igazoljuk valóban autofágia és lizoszóma

markerekkel kolokalizálnak-e. Ennek vizsgálatára együtt fejeztettük ki a 3xmCherry-Atg8a autofagoszóma markert a Sec61-GFP markerrel. Megfigyeltük, hogy a két marker nagy mértékben kolokalizál az ER és az autofagoszóma marker (5. ábra A). Hasonlóan együtt fejeztettük ki a Sec61-GFP markert a Lamp1-3xmCherry lizoszóma markerrel. Az előző kísérlethez hasonlóan ez a két marker is markáns kolokalizációt mutatott (5. ábra B). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az éheztetés által kiváltható az ER-fágia zsírtestben és erre a Sec61-GFP alkalmas riporter, mert bejut és megfigyelhető az autolizoszómális struktúrákba.

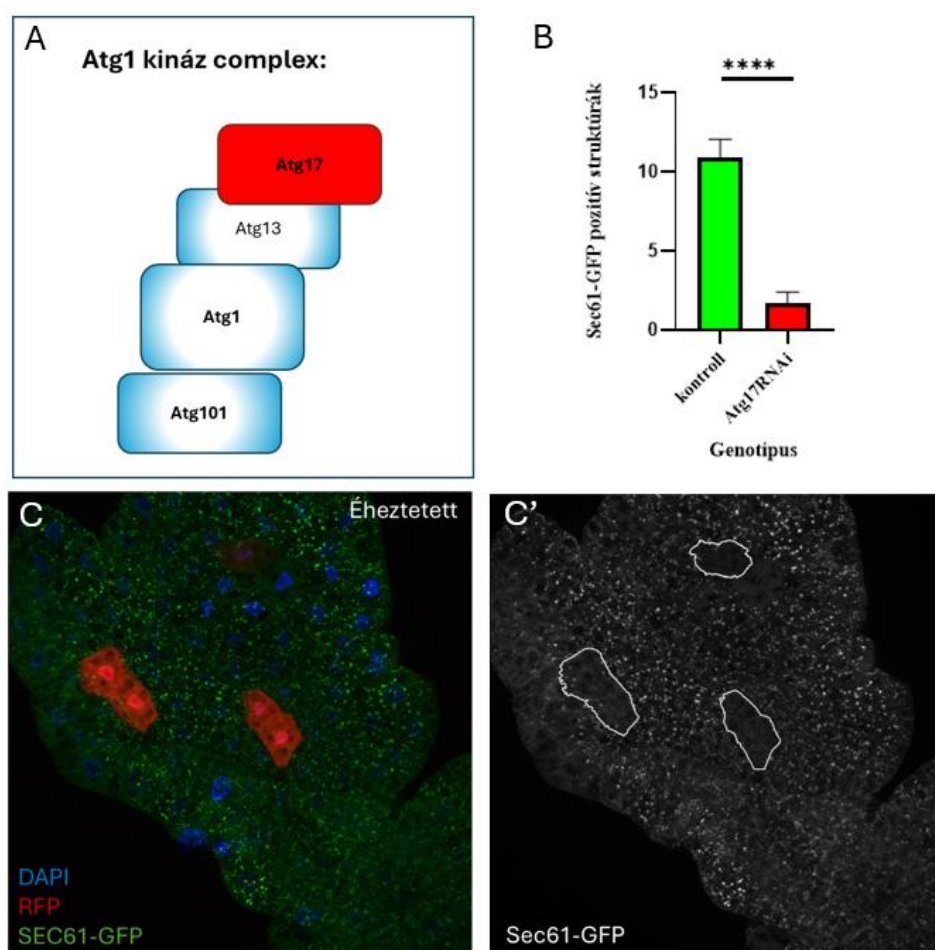


5. ábra. A Sec61-GFP kolokalizál az autofág és lizoszómális markerekkel. A felső sorban (A) az Atg8a-3xmCherry Sec61-GFP konstrukció figyelhető meg. A sárga színből látszik, hogy a két jelmolekula egy helyre lokalizálódott egy nagy méretű pont formájában, ami az ER-fágia jelenségére utal. Az alsó sorban (B) a Lamp1-3xmCherry és a Sec61-GFP konstrukció látható. Itt is hasonló jelenség történt, de ebben az esetben arra ad bizonyítékot a sárga szín, hogy az autofagoszóma lizoszómával fuzionált és megkezdte az ER lebontását.

4.2 Az Atg1 kináz komplex szerepének vizsgálata az ER-fágiában

A kísérleteink során ki szeretnénk volna deríteni, hogy mennyire játszanak fontos szerepet az ER fágiában az mTOR mediálta makroautofágia utak fehérjéi. Köztudott, hogy az adott komplexek tagjai közül mind szükséges ahhoz, hogy a komplex működni tudjon, ezért elég volt csupán egyetlen reprezentatív tagot kiválasztani és RNS interferencia segítségével elcsendesíteni a géntermékét. A kísérlet során Atg géntermékek elleni RNS interferencia transzgénikus törzset kereszteztük a *hsFlip*; +/+; *UAS-Cherry*, *act>CD2>Gal4*, *Sec61>Sec61-GFP* törzsszel. A konstrukció a legyekben genetikai mozaikot okoz, ami remek módja a sejtbioológiai folyamatok megfigyelésének, ugyanis csak néhány Cherry-vel jelölt sejtben aktiválódik majd az RNAi, így lesznek olyan sejtetek is ugyan

abban a szövetben, amelyek alkalmasak kontrollnak mivel ott nem történt meg a gén elcsendesítése. Ezt a rendszert arra használtunk, hogy a már bemutatott 4 órás aminosav éhezés modellben vizsgáljuk az ER-fágiát. Az első komplex, amit megvizsgáltunk az Atg1 kináz komplex volt **(6. ábra A) amelyet az Atg17 fehérjével reprezentáltunk**. A komplex feladata a makroautofágia iniciációja és a többi autofágia komplex tagjainak a toborzása. Megfigyeltük a Sec61-GFP pozitív granulomokat lecsökkent számát és méretét **(6. ábra B, C), amely arra utal, hogy a Sec-61-GFP pozitív autolizoszómák nem keletkeznek**. Ennek az az oka, hogy az Atg17 hiánya miatt az Atg1 kináz komplex nem tudja magához toborozni a Vps34 kináz komplex tagjait, amin keresztül megkezdődhetne az autofagoszóma membrán kialakulása és az ER-membrán bekebelezése.

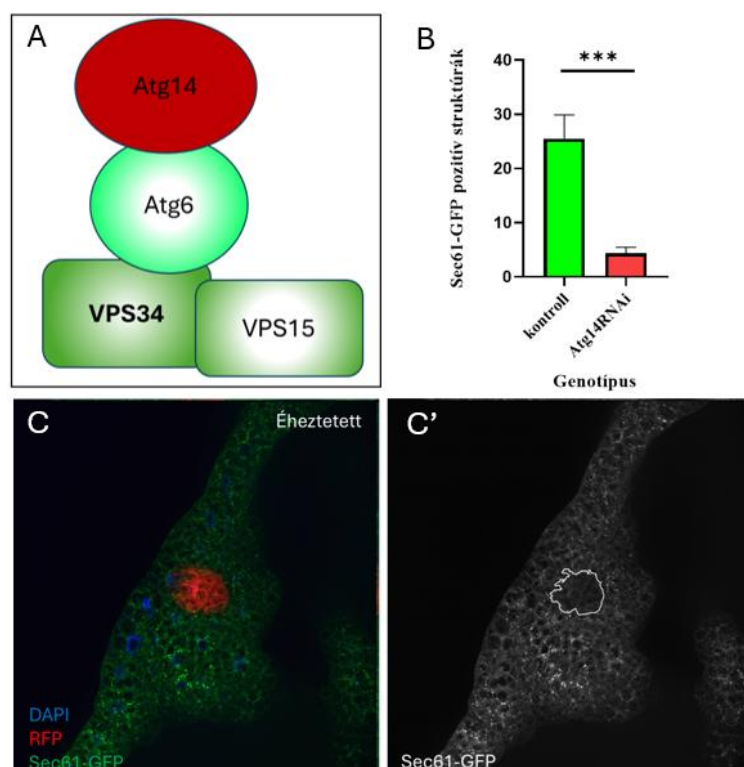


6. ábra. Az iniciációs komplex szerepe az ER-fágiában. (A) Az Atg1 kináz komplex sematikus ábrája. (B) Az Atg17 kontroll és Atg17RNSi sejtek Sec61-GFP pozitív autolizoszómák számszerűsített ábrája. A statisztikai analízist Mann-Whitney U-tesztel végeztük. A hibasávok a szórást jelölik, a középvérték az átlag. $n=15/\text{genotípus}$ * $p = 0.0172$, ** $p = 0.0039$, **** $p < 0.0001$.

< 0.0001. (C) A képeken *Drosophila melanogaster* zsírtest preparátumok szerepelnek. A kék színnel (DAPI) sejtmagok látszódnak. Pirossal a klónsejtek (Atg17RNAi) látszanak. Zöld színnel a Sec61 ER transzmembrán fehérje látható. A képek 400x-os nagyításon készültek. Jól látható a kontrollsejtekben, hogy a Sec61 felhalmozódott az autolizoszómákban, míg a klón sejtekben nem.

4.3 A Vps34 kináz komplex szerepe az ER-fágiában

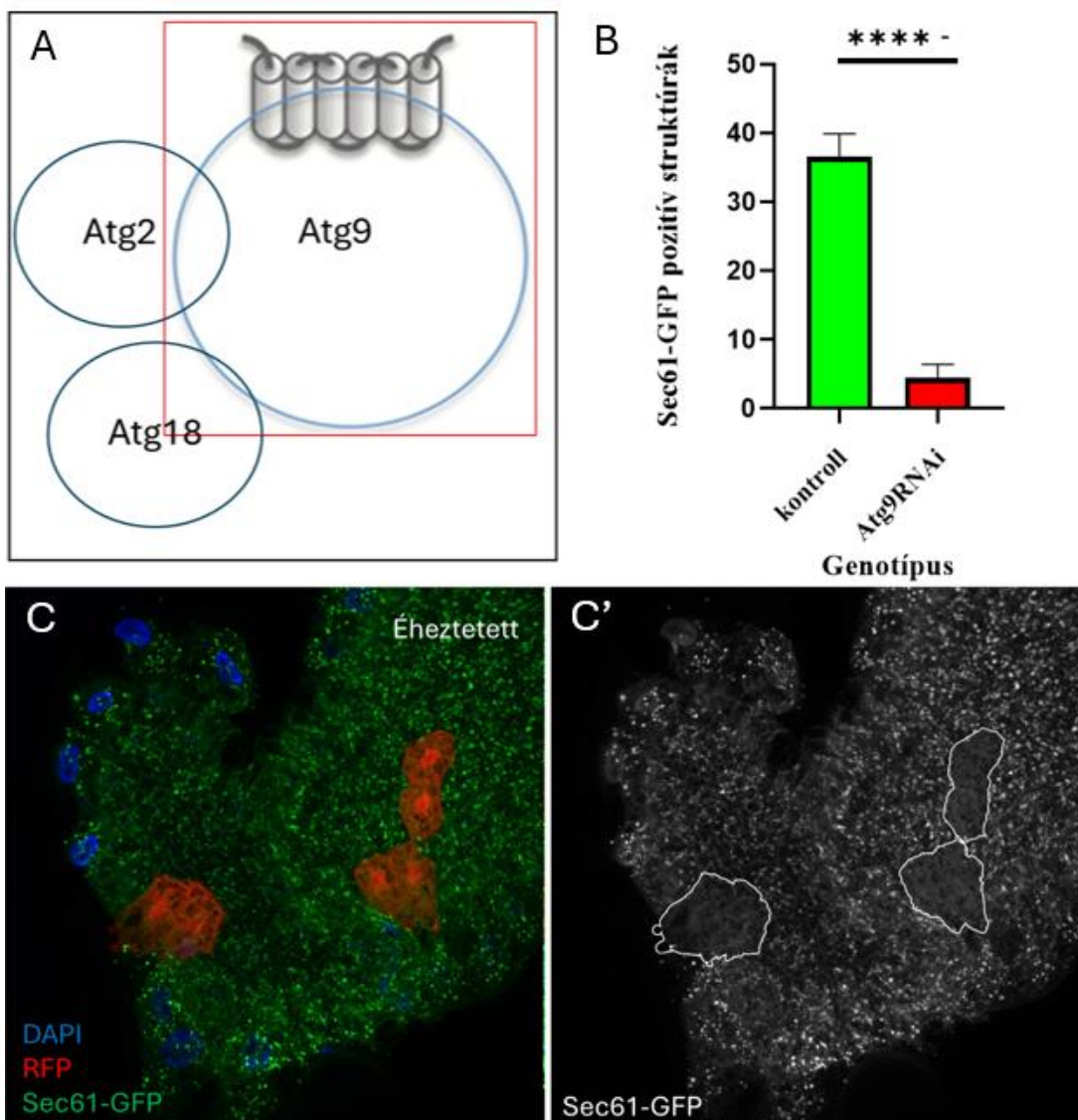
Ezután azt kellett kideríteni, hogy a Vps34 kináz komplex, amelynek feladata a kezdetleges fagofór kialakításához szükséges Atg9 toborzásához és a folyamatn nukleációjához (**7. ábra A**), milyen szerepet játszik az ER-fágiában. Ehhez a már bemutatott ER-fágia megfigyelésére alkalmas törzset alkalmaztuk és az Atg14 elleni RNS interferencia törzset használtuk. Az Atg14 felelős a komplex autofágia specifikusságáért. Ha valóban szükség van az ER lebontásához a komplexre, akkor nem kellene jelen lennie a Sec61 pozitív struktúráknak a mutáns sejtekben. A 4 órás éheztetés után kiderült, hogy a következtetéseink helyesek voltak és valóban alacsony volt a Sec61 aggregáció a klón sejtekben (**7. ábra B**). A mikroszkópos felvételekből észrevehető, hogy a mutáns sejtben nem keletkezett autolizoszóma, ezáltal az ER-membrán sem tudott aggregálódni (**7. ábra C**). Ebből az következtethető, hogy ez a komplex is kulcsfontosságú szerepet játszik az ER-fágiában



7. ábra. A nukleációs komplex szerepe az ER-fágiában. (A) A VPS34 kináz komplex sematikus ábrája. kináz komplex sematikus ábrája **(B)** Az Atg14 kontroll és Atg14RNAi sejtek Sec61-GFP pozitív autolizoszómák számszerűsített ábrája. A statisztikai analízist Mann-Whitney U-tesztel végeztük. A hibasávok a szórást jelölik, a középpérték az átlag. $n=10/\text{genotípus}$ $*p = 0.0172$, $**p = 0.0039$, $****p < 0.0001$. **(C)** Az Atg14 csendesítésének hatása az ER-fágiára. A kék szín a sejtmag a piros a klón sejt (Atg14RNAi) a zöld pedig a Sec61. A képet 400x nagyításon készítettük.

4.4 Az Atg9 vezikulák szerepe az ER-fágiával

Az Atg9-nek fontos szerepe van a növekvő fagofor lipid utánpótlásában a komplex többi tagjával együtt (8. ábra A). Ebben az esetben is jelentősen lecsökkent az autolizoszómák száma a klón sejtekben (8. ábra B, C). Abból kifolyólag alakulhatott, hogy az Atg9 hiányában nem tud kialakulni az izolációs membrán az autolizoszóma alapja, amivel be tudná kebelezni az ER membránját.

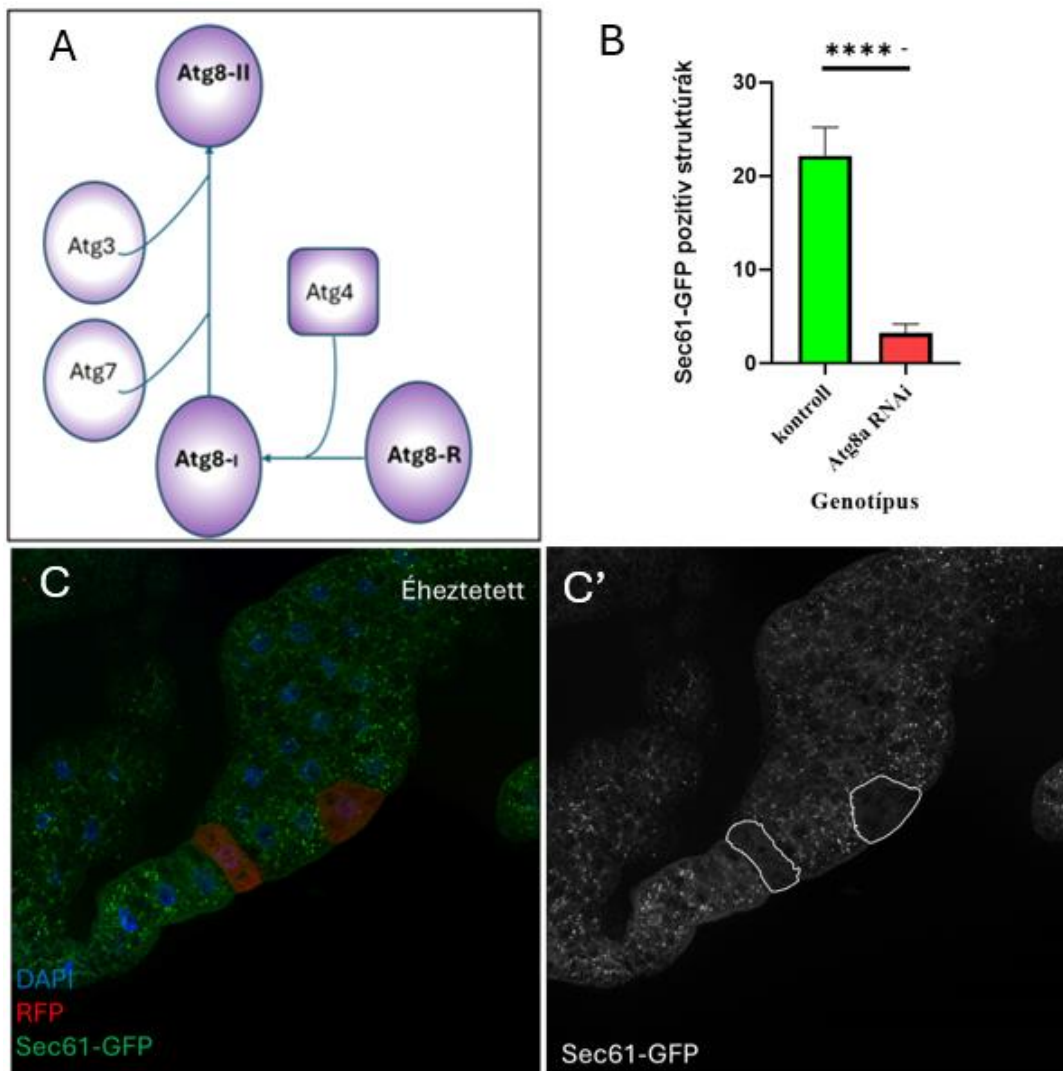


8. ábra. A reciklizációs komplex szerepe az ER-fágiában. (A) A reciklizációs komplex sematikus ábrája. **(B)** Az Atg9 kontroll és Atg14RNSi sejtek Sec61-GFP pozitív autolizoszómák számszerűsített ábrája. A statisztikai analízist Mann-Whitney U-tesztel végeztük. A hibaszávok a szórást jelölik, a középpérték az átlag. $n=11/\text{genotípus}$ $*p = 0.0172$, $**p = 0.0039$, $***p < 0.0001$.

(C) Az Atg9 csendesítése jelentősen gátolja az ER-fágia folyamatát. A kék szín a sejtmag a piros a klón sejt (Atg9RNAi) a zöld pedig a Sec61. A képet 400x nagyításon készítettük.

4.5 Atg8 konjugációs komplex szerepe az ER-fágiában

Az Atg8a konjugációs komplex kulcsszerepet játszik az autofágia működésében, ugyanis ez a komplex felelős az autofagoszóma elongációjáért (9. ábra A). A modellünkben megfigyelhető, hogy az Atg8a csendesítése jelentősen lecsökkenti a Sec61-GFP pozitív struktúrák számát és méretét (9. ábra B, C). Összességében elmondható, hogy az összes Atg komplexekre szükség van az ER-fágia folyamatához.

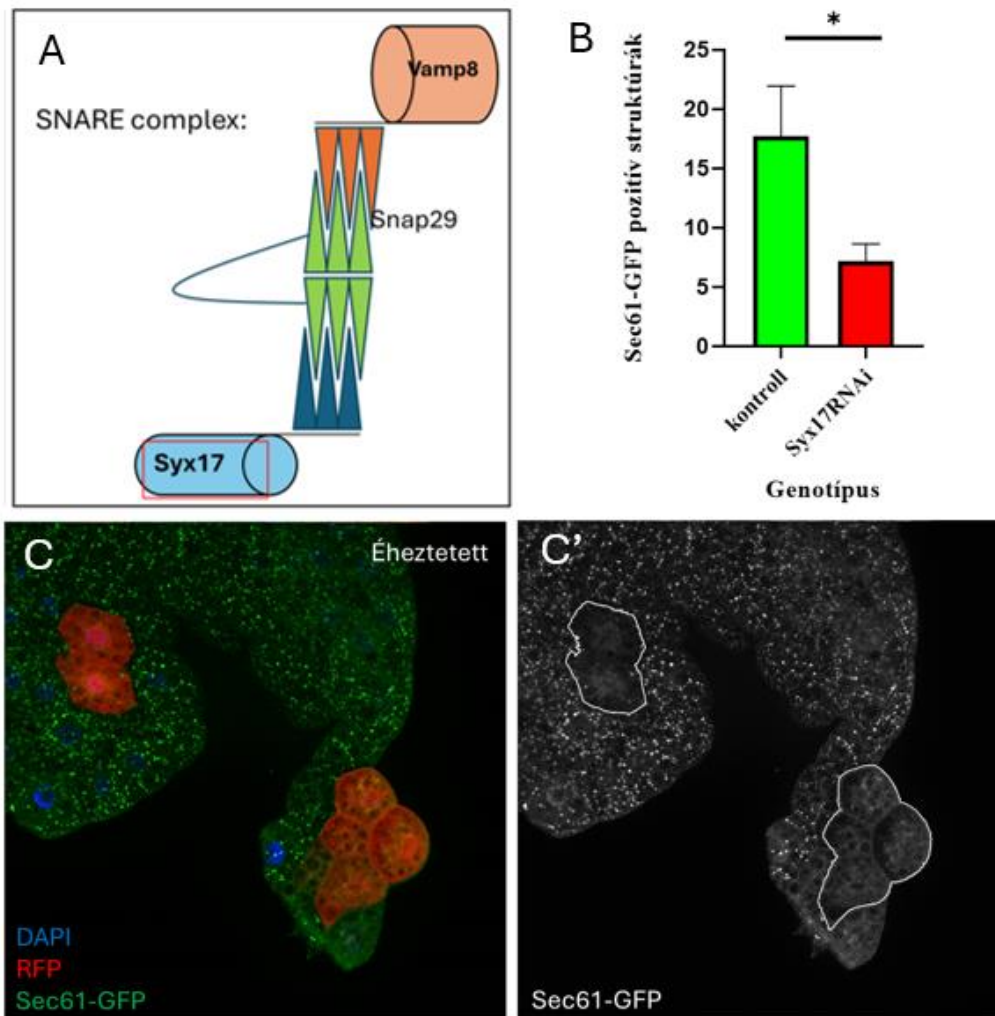


9. ábra. Konjugációs komplex szerepe az ER-fágiában. (A) A konjugációs komplex sematikus ábrája. (B) Az Atg8a kontroll és Atg14RNAi Sec61-GFP pozitív autolizoszómák számszerűsített ábrája. A statisztikai analízist Mann-Whitney U-tesztel végeztük. A hibasávok a szórást jelölik, a középvérték az átlag. $n=27/\text{genotípus}$ $*p = 0.0172$, $**p = 0.0039$, $****p < 0.0001$.

(C) Az Atg8a csendesítése az ER-fágia gátlását okozza. A kék szín a sejtmag a piros a klón sejt (Atg8aRNAi) a zöld pedig a Sec61. A képet 400x nagyításon készítettük.

4.6 SNARE komplex kapcsolata az ER-fágiával

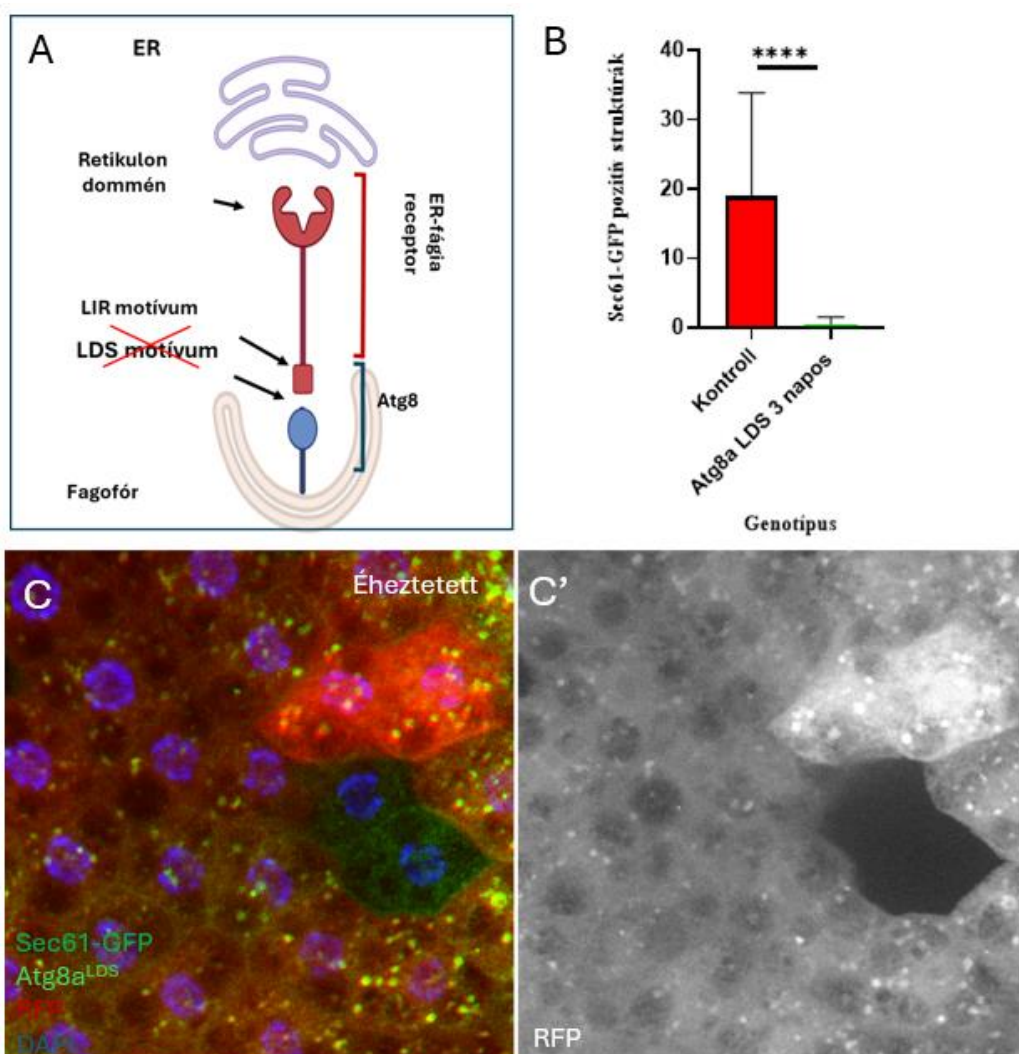
Végül az utolsó a SNARE komplexet is megvizsgáltuk, amelynek feladata, hogy segítse a fúzióját a kialakult autofagoszómának és egy lizoszómának (**10. ábra A**). A komplexet a Syx17 elcsendesítésével vizsgáltuk meg. Ebben az esetben is megfigyeltük, hogy lecsökkent a Sec61 pozitív struktúrák száma, viszont nem olyan nagy mértékben (**10. ábra B, C**). Ennek oka az lehet, hogy ez az utolsó lépése az autofágiának, ahol bár kialakul az autofagoszóma, benne a Sec61-GFP pozitív struktúrákkal, amely képes bekebelezni az ER-t és így megfigyelhető, ellenben a lizoszóma fúzió nélkül nem kerül majd lebontásra a bekebelezett Sec61-GFP-vel jelölt ER. A komplexek közül itt volt a legkisebb eltérés a kontroll és mutáns sejtek között, de így is megfigyelhetőek és a statisztikai elemzésből is lesűrhető, hogy ez a komplex is kulcsfontosságú az ER-fágia folyamatában.



10. ábra. SNARE komplex szerepe az ER-fágiában. (A) A SNARE komplex sematikus ábrája. (B) Az Syx17 kontroll és Atg14RNAi Sec61-GFP pozitív autolizoszómák számszerűsített ábrája. A statisztikai analízist Mann-Whitney U-tesztel végeztük. A hibaszávok a szórást jelölik, a középvérték az átlag. $n=10/\text{genotípus}$ * $p = 0.0172$, ** $p = 0.0039$, **** $p < 0.0001$. (A) A Syx17 csendesítése csökkenti az ER-fágia pozitív struktúrák számát. A kék szín a sejtmag a piros a klón sejt (Syx17RNAi) a zöld pedig a Sec61. A képet 400x nagyításon készítettük

4.7 A LIR és az LDS motívumok szerepe az ER-fágiában

Kíváncsiak voltunk, hogy az autofágia szelektivitását mennyire befolyásolja az Atg8a LDS motívumának a hiánya. Az LDS motívum ahhoz szükséges, hogy kössön a fehérje a különböző autofágia receptorok LIR motívumaival, ezzel garantálva a szelektivitást. A vizsgálathoz létrehoztunk egy olyan konstrukciót, ahol csak az LDS motívum van kiütve és az Atg8 többi része intakt maradt (**11. ábra A**). Ez azért volt fontos, mert így a konjugációs komplexben betöltött szerepét ellátja, de a szelektivitását nem. Ez esetben szomatikus klónanalízist végeztünk, ahol az Atg8a^{LDS} allél negatívan van jelölve. Látható, hogy a Sec61 struktúrák száma jelentősen lecsökkent a mutáns klónsejtekben (**11. ábra B, C**). Ez arra enged következtetni, hogy a szelektív autofágiát nem képes kompenzálni a nem szelektív, tömeges autofágia.



11. ábra. A szelektív és nem szelektív autofágia szerepe az ER-fágiában. **(A)** Az ER fágia sematikus ábrája, benne az ER-fágia receptorok részei és az Atg8a fontos motívuma. **(B)** A statisztikai analízist Mann-Whitney U-tesztel végeztük. A hibásávok a szórást jelölik, a középvérték az átlag. $n=10/\text{genotípus}$ $*p = 0.0172$, $**p = 0.0039$, $****p < 0.0001$. **(C)** Az LDS motívum hiánya az Atg8a fehérjében erősen csökkenti az ER-fág struktúrák számát. A. A képet 400x nagyításon készítettük.

5. Diszkusszió

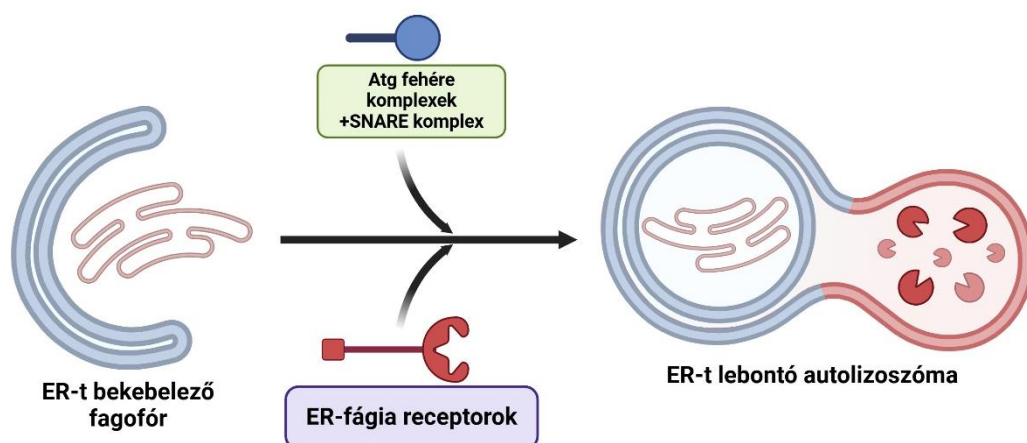
Éhezés hatására bekapcsol a makroautofágia úgy, hogy az mTOR kináz gátlás alá kerül így az Atg1 és egyéb Atg gének mTOR kináz általi foszforilációja és ezen keresztüli gátlása megszűnik. Majd az Atg1 hozzáköt az Atg13-hoz, amely magához toborozza az Atg101-et és az Atg17-et. Továbbá hozzáköt az Atg9-hez, párhuzamosan a Vps34 és az Atg6 kapcsolódik egymáshoz, magához toborozva a Vps15-öt és az Atg14-et. Az utóbbi magához toborozza az Atg9-et, ami a kezdeti membrán alapját képezi. A membrán stabilitásában és a lipidforrás biztosításához az Atg2 és Atg18 is részt vesz. A kezdeti autofagoszóma elongációját az Atg12 és Atg8a konjugációs komplexe végzi. Az érés közben a membránba beépült Atg8a-k az LDS motívuma révén hozzákapcsolódnak egy autofágia receptorhoz, amely rendelkezik LIR motívummal és ezen keresztül fizikailag összekapcsolja a lebontandó szubsztátot a növekvő és bezáródó fagoforral. Miután bezárul az autofagoszóma a kettős membrán külső részéről lehasítódnak az Atg8 fehérjék, valamint leválik a többi Atg komplex is. A SNARE komplex, a HOPS komplex és a dinein motorfehérje összehúzza az autofagoszómát egy lizoszómával, hogy fuzionáljanak. A folyamat végén az autofágia tartalma és belső membránja megemésztődik az autolizoszóma hidrolitikus enzimeit által. Bár a legtöbb jól jellemzett szelektív autofágia típus főleg a makroautofágia folyamatát használja, az ER szelektív lebontásáról még nem készült átfogó vizsgálat, amely ezt igazolná. Ebben a dolgozatban olyan kísérleteket végeztünk el, amelyek a makroautofágia minden fontos komplexének egy-egy képviselőjén keresztül mutatja meg, hogy a makroautofágia és annak kanonikus útvonalán keresztül zajlik az éhezés indukálta ER-fágia (Lőrincz és mtsai, 2017).

A kísérletek nem csak az ER-fágia vizsgálatában nyújtott eredmények miatt voltak sikeresek, hanem egyúttal sikerült először egy *in vivo* több sejtű modellrendszert is létrehozni. Munkánk során egy olyan genetikai konstrukciót hoztunk létre témavezetőm felügyelete alatt, amely segítségével élő állatban vizsgálhattuk meg ezt a folyamatot. A módszer nagy erőssége, hogy a különböző gének elcsendesítésének a hatását úgy tudjuk vizsgálni, hogy közben a kontroll sejtek ugyanabban a szövetben szerepelnek, így ténylegesen a géncsökkentés hatását lehet vizsgálni, kizárva minden egyéb környezeti hatást.

A tömeges autofágia jellemzője, hogy aktivitását valamilyen éhezési inger, vagy esetleg egy egyedfejlődéssel összefüggő jelátviteli útvonal váltja ki, amelynek célja a kifejezetten intenzív lizoszóma általi lebontása a citoplazma tartalmának. Ugyanakkor az is ismert, hogy erős külső, vagy belső készleteseiktől mentes időszakban is lejátszódik különböző formája az autofágiának, főleg a sejt homeosztázisának a fenntartása folytán (Rogov és mtsai, 2014). Ebből

az következik, hogy a szelektív autofágia során lebomló szubsztrátok általában tömeges autofágia során is lebomlanak, kiváltva a szelektív autofágiát is. Ezt a régi vitát úgy tisztáztuk, hogy a szelektív autofágiában fontos szerepet játszó Atg8a-nak az autofágia receptorokhoz kötéséért felelős motívumot kiütve vizsgáltuk az ER lebomlását tömeges autofágiába sorolható éhezés indukálta autofágia során. Mivel az ER lebontása erősen korlátozódott ezen mutáns sejtekben, ezért kijelenthetjük, hogy a tömeges autofágia nem képes helyettesíteni a szelektív autofágiát, ami egy nagyon érdekes új fejlemény a témában. Ezen eredményeket egy grafikus absztraktban foglaltuk össze (12. ábra).

Az ER-fágia megértése több okból is fontos ugyanis Mou és munkatársai 2024-ben olyan kísérleteket publikáltak, amelyek alapján az ER-fágia szorosan köthető az Alzheimer-kórhoz és Parkinson-kórhoz mivel lebontja a neuronokban az aggregálódott törmelékeket és megnöveli az élőlények élettartamát. Szintén egy aktuális cikkben igazolták, hogy egér alkohol okozta májmegbetegedés modellben az ER-fágia rendkívül aktív és patogén folyamat, amely csökkentése redukálja az alkoholmérgezés során keletkező szervi károsodást (Zhu és mtsa, 2024). Szintén egérben mutatták ki, hogy ER-fágiában érintett receptorok kiütése axon degradációt okoz és ezáltal szenzomotoros meghibásodásoktól szenvedtek a mutáns egerek (Iavarone és mtsai, 2024). Ezen eredmények közelebb vezethetnek bennünket nem csak a neurodegeneratív betegségek, de az öregedés megértése és kezelése felé. Továbbá az ER-fágia közelebb vezethet különféle fejlődés béli rendellenességek megértésében is ezért a jövőben is szeretnénk vizsgálni a jelenséget.



12. ábra. Az ER-fágia folyamatához szükség van egyaránt az Atg fehérjekomplexekre, SNARE komplexre és a különböző ER-fágia receptorokra, ami arra utal, hogy nélkülözhetetlen a folyamat során a szelektív autofágia. Biorender felhasználásával szerkesztve.

6. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott Béres Csaba Bence nyilatkozom, hogy a 38. TDK-ra benyújtott „Az ER-fágia és a kanonikus makroautofágia utak kapcsolata *Drosophila melanogaster*-ben” című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Részfeladat	A részvétel mértéke (öt fokozatú skálán jellemezve)
Stabil <i>Drosophila</i> törzs elkészítése	2
Szűzek gyűjtése, vonalak fenntartása	3
Keresztezések összeállítása a kísérletekhez	3
Aminosav éhezés indukálás	5
Boncolás	5
Mikroszkópos vizsgálatok	5
Adatok kiértékelése és statisztikai feldolgozása	4

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Jipa Andrásnak a tudományos munkával kapcsolatos folytonos segítségért és útmutatásért. Továbbá köszönettel tartozok Dr. Juhász Gábor csoportvezetőnek és a Lizoszómális Degradáció Kutatócsoport többi tagjának a technikai megvalósítás kivitelezésében. Valamint köszönettel tartozom a páromnak Makra Zsófiának és jó barátomnak Miriszlai Márknak a TDK-dolgozat írása során nyújtott segítségben.

8. IRODALOMJEGYZÉK

Aizawa, S. F.-5. (2016). Lysosomal putative RNA transporter SIDT2 mediates direct uptake of RNA by lysosomes. *Aizawa, S., Fujiwara, Y., Contu, V. R., Hase, K., Takahashi, M., Kikuchi, H., ... & Kabuta, T. (2016). Autophagy*, 12(3), 565-578.

Backer, J. M.-1. (2008). The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34.

Biochemical Journal, 410(1), 1-17.

Csizmadia, T. L.-3. (2018). Molecular mechanisms of developmentally programmed crinophagy in *Drosophila*. *Journal of Cell Biology*, 217(1), 361-374.

Gatica, D. L.-2. (2018). Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nature cell biology*, 20(3), 233-242.

Glick, D. B.-1. (2010). *Autophagy: cellular and molecular mechanisms*.

<https://doi.org/10.1002/path.2697>: The Journal of pathology.

Hansen, M. M.-t.-1. ((2018)). Hansen, M. M., Wen, W. Y., Ingberman, E., Razooky, B. S., Thompson, C. E., Dar, R. D., ... & Weinb A post-transcriptional feedback mechanism for noise suppression and fate stabilization. *Hansen, M. M., Wen, W. Y., Ingberman, E., Razooky, B. S., Thompson, C. E., Dar, R. D., ... & Weinberger, L. Cell*.

Kaushik, S. & -a.-m.-7. (2015). Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. *Nature cell biology*, 17(6), 759-770.

Kriegenburg, F. U.-l.-R. (2018). Coordination of autophagosome–lysosome fusion by ATG8 family members. *Current Biology*, R512-R518.

Narendra, D. P. (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS biology*, 8(1), e1000298.

Nguyen, T. A.-5. (2017). SIDT2 transports extracellular dsRNA into the cytoplasm for innate immune recognition. *Immunity*, 47(3), 498-509.

- Noda, N. N.-r.-R. (2011). Crystallographic studies on autophagy-related proteins. *Current Trends in X-Ray Crystallography*.
- Oku, M. M.-a.-d.-3. (2017). Oku, M., Maeda, Y., Kagohashi, Y., Kondo, Evidence for ESCRT- and clathrin-dependent microautophagy. *Oku, M., Maeda, Y., Kagohashi, Y., Kondo, T., Yamada, M., Fujimoto, T., & Sakai, Journal of Cell Biology*, 216(10), 3263-3274.
- Pankiv, S. C.-2. (2007). p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy. 282 (33): 24131–24145. M702824200.
- Saftig, P. B.-2.-5. (2008). LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation. *Autophagy*, 4(4), 510-512.
- Sekito, T. K.-a.-5. (2009). Atg17 recruits Atg9 to organize the pre-autophagosomal structure. *Genes to Cells*, 14(5), 525-538.
- Tsuboyama, K. K.-H.-1. (2016). The ATG conjugation systems are important for degradation of the inner autophagosomal membrane. *Science*, 354(6315), 1036-1041.
- Wang, Y. L.-8. (2019). Mechanisms and roles of mitophagy in neurodegenerative diseases. *CNS neuroscience & therapeutics*, 25(7), 859-875.
- Yim, W. W. (2020). Lysosome biology in autophagy. *Cell discovery*, 6(1), 6.
- Zachari, M. & -5. (2017). The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays in biochemistry*, 61(6), 585-596.
- Lőrincz, P., Mauvezin, C., & Juhász, G. (2017). Exploring autophagy in Drosophila. *Cells*, 6(3), 22.
- Zhu, Y. Q., Wang, L. L., Li, Z. H., Qian, S. S., Xu, Z., Zhang, J., ... & Huang, Y. (2024). Acid-sensing ion channel 1a promotes alcohol-associated liver disease in mice via regulating endoplasmic reticulum autophagy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 1-13.

Iavarone, F., Zaninello, M., Perrone, M., Monaco, M., Barth, E., Gaedke, F., ... & Settembre, C. (2024). Fam134c and Fam134b shape axonal endoplasmic reticulum architecture in vivo. *EMBO reports*, 25(8), 3651-3677.

Takeshige K. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J. Cell Biol.* 1992;119(2):301–311. doi: 10.1083/jcb.119.2.301.

Rogov V. Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol. Cell.* 2014;53(2):167–178. doi: 10.1016/j.molcel.2013.12.014.