

XXXII. OTDK Biológia Szekció

***A DROSOPHILA* ATG6 SZEREPE A NOTCH
JELÁTVITEL SZABÁLYOZÁSÁBAN**

Lakatos Zsolt

Biológia BSc IV. évfolyam

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Témavezető:
Lőrincz Péter



Tartalomjegyzék

Összefoglaló	3
Bevezetés.....	4
Anyagok és módszerek	7
Eredmények.....	9
<i>Az Atg6 csendesítésének vizsgálata felnőtt szárnyon.....</i>	9
<i>Atg6 RNSi menekítése</i>	10
<i>A receptor-mediált endocitózis vizsgálata fénymikroszkóppal</i>	12
<i>Az endocitózis vizsgálata elektronmikroszkóppal</i>	14
<i>A Notch és a Delta lokalizációjának vizsgálata.....</i>	15
<i>A Wingless lokalizációjának vizsgálata</i>	17
<i>A Notch jelátvitel vizsgálata.....</i>	17
<i>Genetikai interakció az Atg6 és a Notch között</i>	18
<i>Az Atg6 nullmutáns vonal vizsgálata</i>	20
<i>Az UVRAG és az Atg14 vizsgálata.....</i>	21
Diskusszió.....	23
Szerzői hozzájárulás.....	26
Irodalomjegyzék.....	26

Összefoglaló

A receptor-mediált endocitózis fontos szerepet játszik jelátviteli folyamatok, köztük a Notch jelátvitel szabályozásában, a receptor és ligand molekulák internalizálásának, lebontásának és reciklizálásának a segítségével.

Munkám során az Atg6 szerepét vizsgáltam a Notch jelátvitel szabályozásában, amelynek az endocitózis szabályozásáért felelős szerepe az eddigi vizsgálatok alapján ellentmondásos.

A vizsgálatokhoz olyan *D. melanogaster* Atg6 RNSi és mutáns törzseket használtam, melyekben a mutációt illetve csendesítést csak az állatok szárnyában fejeztettük ki. Az állatok szárnya a csendesítés hatására látványosan torzul.

Az Atg6 csendesített fejlődő szárnyepidermisz sejtekben abnormális multivezikuláris és lamelláris testek találhatók, amelyekről plazmamembrán-lokalizált HRP és DAB reakció segítségével megállapítottam, hogy azok endocitotikus eredetűek, tehát a késői endoszómák szintjén az endocitózis megreked. Ezt fluoreszcens markerek segítségével is igazoltam. Imaginális szárnykorongokban immunhisztokémiai eljárással megfestettem a Notch intra- és extracelluláris doménjét, valamint a Notch egy ligandját, a Deltát. Az Atg6 csendesített sejtekben ezeknek a fehérjéknek a mennyisége felszaporodik. Mivel ez utalt a jelátvitel felerősödésére is, ezért ezt Notch Responsive Element GFP transzgént is hordozó törzs segítségével is igazoltam.

Ezek alapján arra a következtetésre jutottam, hogy az Atg6 a Notch és a Delta felvételén és lebontásán keresztül szabályozza a Notch jelátvitelt.

Bevezetés

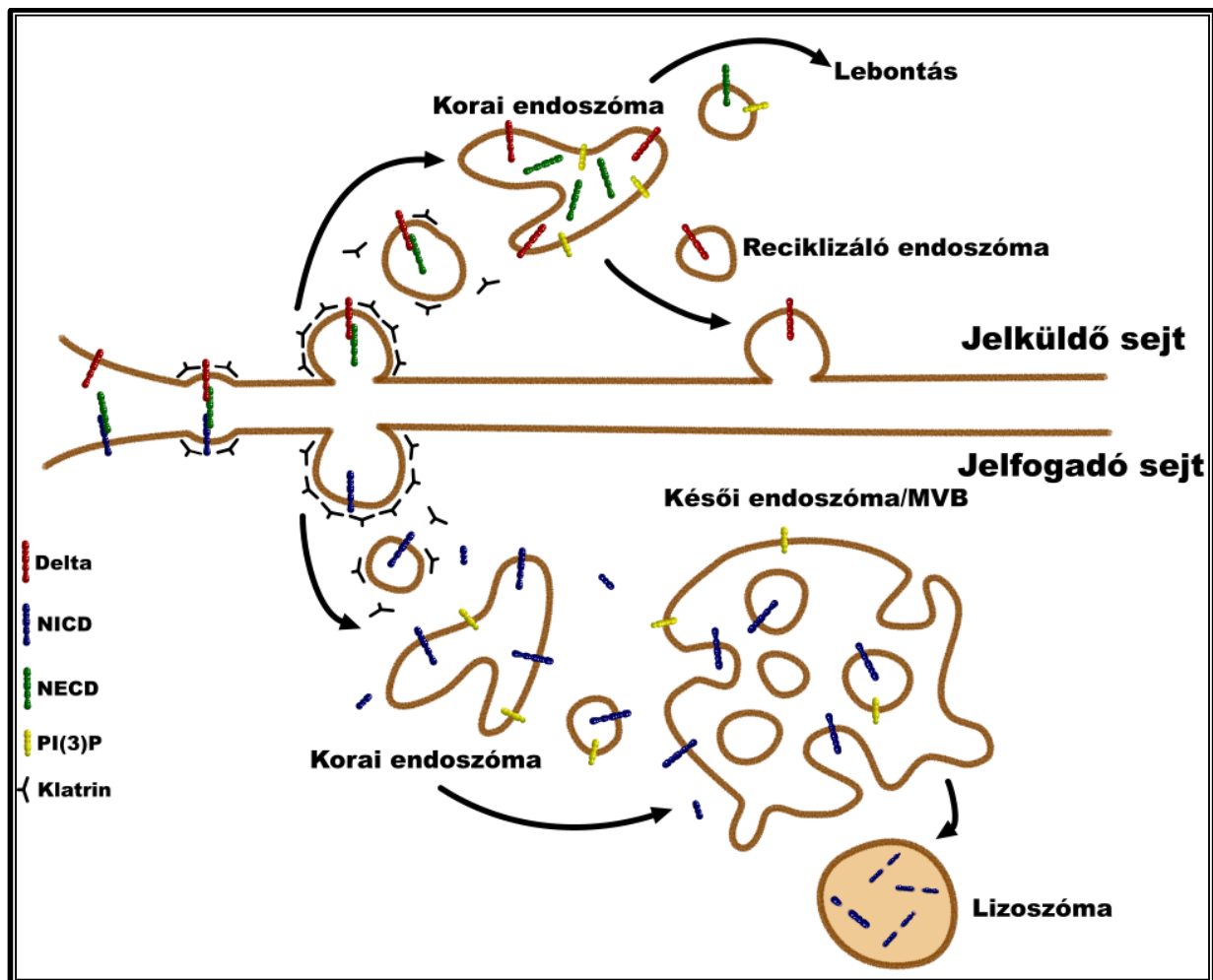
Az endocitózis olyan evolúciósan konzervált transzportmechanizmus, melynek során a sejt membránlefűződéssel bekebelezi a sejt környezetében található anyagokat. Négy fő típusát különböztetik meg. A fagocitózis során a sejt szilárd anyagokat, más sejteket kebelez be. A makropinocitózis során szelekció nélkül vesz fel a sejt folyadékot és benne oldott anyagokat. A klatrin függő (receptor-mediált) endocitózis során a sejt szelektíven a receptorokhoz kötődő makromolekulákat vesz fel. A klatrin független (lipid raft-/kaveóla-mediált) endocitózis esetében a membránban jelen lévő lipid raftok vagy fehérjék indukálják az endocitózist (Mukherjee et al. 1997).

A receptor-mediált endocitózis során a plazmamembránba ágyazott receptorfehérjék specifikusan kötnek bizonyos ligandumokat, melyeket a sejt internalizál úgy, hogy először kialakít egy klatrin köpenybe burkolt mélyedést a plazmamembránban, mely mélyedés ezután méginkább betüremkedik és végül lefűződik, kialakítva egy klatrin-burkolt vezikulumot. Ez elvesztítve klatrin-burkát képessé válik a korai endoszómákkal történő fúzióra (Doherty and McMahon 2009). A korai endoszóma lumenébe és membránjába kerülő molekulák számos helyre szállíthatnak, többek között a sejt a lebontás irányába vagy a reciklizáló endoszómákba küldheti őket. Amennyiben a molekulákat lebontás céljából vette fel a sejt, először késői endoszómákba vagy multivezikuláris testekbe kerülnek, amely ezután primer lizoszómával egyesül és a kialakult szekunder lizoszóma lumenében a lebontandó anyag savas környezetben a lizoszómális enzimek működése következtében degradálódik (Gruenberg and Stenmark 2004; McPhee and Baehrecke 2009; Jovic et al. 2010).

A sejtek közötti kommunikáció egyik módja, hogy a jelátvitel első lépéseként egy sejtfelszíni receptorhoz kötődik egy arra specifikus jelmolekula. Ez a kapcsolódás olyan molekuláris folyamatokat indukál, melyek hatására a célsejt valamilyen specifikus válaszreakciót fejez ki (Alberts et al. 2008). Ezenél a jelátviteli folyamatoknál az endocitózis fontos szerepet játszik abban, hogy felvegye a receptor és ligandum molekulákat a sejt felszínéről és lebontásukkal szabályozza a jelátvitel intenzitását vagy a jelküldő sejt reciklizáló endoszómákkal kisebb membránterületre koncentrálja a ligandumokat (Le Roy and Wrana 2005; Kandachar and Roegiers 2012).

A Notch jelátvitel sok más jelátviteli mechanizmussal együtt fejlődési folyamatok sokaságát (differenciáció, proliferáció, apoptotikus folyamatok) szabályozza számos állati szövetben. Hibája többek között rákos elváltozásokat okozhat, ezért a jelátvitel molekuláris

mechanizmusának és szabályozásának feltárása és megértése rendkívül fontos (Artavanis-Tsakonas et al. 1999; Bray 2006). A jelátvitel iniciáló lépése, hogy a Notch egyik liganduma, a Delta vagy a Serrate (emlősökben Jagged) kapcsolódik a Notch extracelluláris doménjéhez (NECD). Ekkor a Notch extra- és intracelluláris doménje enzimatikusan elhasad, és mivel a ligandumok is membránhoz kapcsolt fehérjék, a ligandummal együtt a NECD-t is felveszi a jelküldő sejt endocitózissal. A Notch intracelluláris doménjét (NICD) pedig a jelfogadó sejt veszi fel, és először korai endoszómába küldi, majd onnan késői endoszómába vagy multivezikuláris testekbe, majd lizoszómákba (1. ábra). A γ -szekretáz enzim proteolízissal lehasítja a NICD-t bármelyik kompartment membránjáról, aktiválja és a citoplazmába juttatja, ahonnan a sejtmagba szállítódik, ahol DNS-kötő fehérjékhez kapcsolódik és Notch cél-géneket aktivál (Fortini and Bilder 2009; Andersson et al. 2011).



1. ábra: A Notch intra- és extracelluláris doménje és a Delta receptor-mediált endocitózissal kerül a sejtekbe, ahol azok lebontás irányába, illetve a Delta reciklizáló endoszómákban újra a sejtmembránba kerülhet (Fortini and Bilder 2009, nyomán módosítva).

Mivel a Notch jelátvitel nagyban függ az endocitózistól, olyan állatokban, ahol gátolt a molekulák korai endoszómákba kerülése, a jelátvitel erőssége csökken, ahol azonban az endocitózis egy későbbi állapotában reked meg, ott felerősödik a jelátvitel (Vaccari et al. 2008).

A foszfatidilinozitol 3-kináz (III) (PI3K(III)) komplex feladata, hogy egy membránköthető lipidet, a foszfatidilinozitol-t annak foszforilációjával foszfatidilinozitol-3-foszfáttá (PI(3)P) alakítsa, ezáltal olyan autofágiát illetve endocitózist szabályozó fehérjéket toboroz a membránhoz, melyek specifikusan kötik ezt a lipidet FYVE vagy Phox doménjük segítségével (Burman and Ktistakis 2010). Az Atg6 (AuTophagy related gene 6, élesztőben Vps30 (Vacuolar protein sorting 30)/Atg6, emlősökben Beclin1) a PI3K(III) komplex egyik központi tagja, mely számos fehérjével képezhet komplexet és fontos biológiai folyamatokat szabályoz, mint az autofágia és az apoptózis, így szerepe van az öregedésben, a fejlődésben, neurodegeneratív és érrendszeri betegségekben (He and Levine 2010; Kang et al. 2011). Míg az Atg6 szerepe az autofágiában vitathatatlan, addig szerepe az endocitózis és más folyamatok szabályozásában ellentmondásos (Zeng et al. 2006; Funderburk et al. 2010). Csupán néhány újabb munka érvelt amellett, hogy az Atg6-nak endocitotikus folyamatokban ugyanúgy fontos szerepe van magasabbrendű eukariótákban, mint ahogy élesztőben (Seaman et al. 1997; Thoresen et al. 2010; Ruck et al. 2011).

Munkám során azt vizsgáltam, hogy az Atg6 a Notch jelátvitelt az endocitózis szabályozásán keresztül befolyásolja-e, és ha igen, akkor hogyan. Ehhez elsőként olyan *Drosophila melanogaster* törzseket használtam, melyek szárnyepidermisz sejtjeiben az Atg6-ot csendesíteni lehet RNS interferencia (RNSi) segítségével, és a csendesítés hatására ezeknek az állatoknak a kifejlett szárnya erősen torzult. Az ilyen állatokról elektron- és fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokkal megállapítottam, hogy az endocitózis hibásan működik. A fejlődő szárnyepidermisz sejtekben abnormális denz multivezikuláris és lamelláris testek halmozódtak fel, melyekről bebizonyosodott, hogy késői endoszómák. Fluoreszcens endoszómális markerekkel is bizonyítottam, hogy az endocitózis késői szakaszában, a késői endoszómák szintjén szenved zavart. Mivel az endocitózis zavara a Notch jelátvitelre is hatással lehet, ezért olyan lárvális szárnykorongban, amelyben az Atg6-ot csak a szárnykorong poszterior felében csendesítettem, immunhisztokémiai eljárással megfestettem a Notch intra- és extracelluláris doménjét, és a Notch egyik ligandját, a Deltát, és azt tapasztaltam, hogy a csendesített sejteken belül látványosan felhalmozódtak ezek a fehérjék, míg a kontroll sejtekben ez a hatás elmaradt. Mivel ezek az eredmények arra utalhatnak, hogy

a Notch jelátvitel ezekben a sejtekben felerősödhet, fluoreszcens riporter (Notch Response Element-GFP (NRE-GFP)) segítségével sikerült kimutatnom, hogy a vártan megfelelően az Atg6 csendesítés valóban a Notch jelátvitel felerősödésével jár.

Élesztőben és emlős sejttenyészetben kimutatták, hogy a PI3K(III) komplex magkomplexe (Vps34, Vps15, Atg6) kétféle komplexet (PI3K (III) Komplex 1 és 2) alakít ki, a Komplex 1-et az Atg14 fehérjével, amely az endocitotikus folyamatokat nem, de az autofágiát szabályozza, a Komplex 2-t pedig az UVRAG (UV-resistance associated gene, vélhetően az élesztő Vps38 ortológja) fehérjével, ez a komplex pedig főként az endocitotikus folyamatokat szabályozza (Kihara et al. 2001; Itakura et al. 2008; Itakura and Mizushima 2009). Ez alapján kíváncsi voltam, hogy egy eukarióta szövetes rendszerben, az ecetmuslicában melyik fehérjével együttműködve lehet az Atg6 felelős a fentebb látott fenotípusokért, ezért megvizsgáltam Atg14 és UVRAG csendesített állatok szárnyát is, és azt találtam, hogy míg az UVRAG-csendesített sejtekben az endocitózis és a Notch jelátvitel az Atg6-csendesített állatokhoz hasonlóan torzul, addig az Atg14-csendesített sejtekben ezek a folyamatok nem változnak a normális sejtekhez képest.

Anyagok és módszerek

Az állatok tartása: Az állatokat 21 °C-os hőmérsékleten, 75%-os páratartalom és 12 órás megvilágítás mellett standard táptalajon tartottuk.

Kifejlett állatok szárnyának vizsgálata: A menekítésnél és a genetikai interakciónál vizsgált vonalakat 25 °C-on tartottuk és a kifejlett állatokat sztereomikroszkóp alatt fényképeztük kereskedelemben is kapható digitális kompakt fényképezőgéppel.

Immunhisztokémiai vizsgálatok: Az imaginális szárnykorongokat 25 °C-on tartott 110-120 órás vándorló lárvákból boncoltam sztereomikroszkóp alatt 30 µl hideg PBS (phosphate buffered saline, 0,01 M, Sigma P4417) oldatban. A szárnykorongokat boncolás után jégen 1,5 ml fixálóoldatba (4%-os formaldehid (Sigma 25,254-9) és 0,1% Triton X-100 (Sigma T8787) PBS-ben) gyűjtöttem, majd az összes korong kiboncolása után ugyanebben az oldatban 1,5 órát fixáltam őket szobahőmérsékleten. Fixálás után leszívtam a fixálóoldatot, és kétszer 1,5 ml PBS-sel kiöblítettem a mintákat. Ezután szobahőmérsékleten 0,5 órát permeabilizáltam a mintákat 1,5 ml 0,1% PBTX-ben (0,1% Triton X-100 (Sigma T8787) PBS-ben). A permeabilizáló leszívását követően 0,5 órát 1,5 ml blokkolóban (5% FCS (Sigma F4135) 0,1%-os PBTX-ben) szobahőmérsékleten inkubáltuk a mintákat. A blokkoló leszívása után

200 µl elsődleges ellenanyag blokkolóban (Developmental Studies Hybridoma Bank: mouse anti-NICD (C17.9C6) – 1:100x, anti-NECD (C458.2H) – 1:100x, anti Delta(C594.2B) – 1:100x, anti-Wingless (4D4) – 1:100x, Abcam: Rabbit polyclonal anti-GFP (ab290-50) – 1:500x) került a mintákra és 12 órát 4 °C-on inkubáltuk őket. Ezután 1,5 ml 0,1%-os PBTX-oldattal háromszor öblítettem a mintákat, majd 15 percig 1,5 ml megemelt sókoncentrációjú PBTX-ben (234 mg NaCl 10 ml 0,1%-os PBTX-ben) mostam. Ezután egyszer 1,5 ml 0,1%-os PBTX-szel öblítettem és kétszer 15 percig 1,5 ml ugyanilyen oldattal mostam a mintákat, majd 1,5 ml blokkolóban 0,5 órát szobahőmérsékleten inkubáltuk a mintákat. Ezután 500 µl másodlagos ellenanyag (Vector: DyLight®594 anti-Mouse IgG (DI-2594) – 1:500x, Invitrogen: Alexa Fluor® 488 Goat anti-Rabbit IgG – 1:500x, blokkolóban oldva) került rájuk 3 órára, ezután az elsődleges antitest utáni mosási lépéseket ismételtam meg azzal a különbséggel, hogy az első mosási lépésnél a megemelt sókoncentrációjú PBTX 0,01 mg/ml koncentrációban sejtmagfestéket is (Invitrogen-Hoechst 33342) tartalmazott, amelyet PBTX-es öblítés két mosás követett. Legvégül tiszta PBS-es mosás után a mintákat Vectashield-ben (Vector H-1000) fedtük le és a mintákat AxioCam MRm Rev. 3 kamerával és szemi-konfokális ApoTome 1 feltétellel felszerelt AxioImager Z1 epifluoreszcens mikroszkóppal AxioVision 4.82 szoftver segítségével fotóztuk le.

Notch endocitózis esszé: Ehhez a vizsgálathoz is 25 °C-on tartott 110-120 órás vándorló lárvákból boncoltam imaginális szárnykorongokat sztereomikroszkóp alatt 30 µl hideg M3 médium (Sigma S8398-1L) oldatában (0,394 g granulátum 10 ml deszt. vízben oldva) jégen tartva a korongokat, majd 4 °C-on 15 percig az elsődleges ellenanyag M3-oldatában (anti-NECD, 1:25x) álltak, majd egyszeri M3 öblítés után 3 órát álltak szobahőmérsékleten M3-ban, majd egyszeri M3-as öblítés és 10 perces M3-as mosás után 1 órát fixáltuk a mintákat (4% formaldehid PBS-ben), majd három 10 perces PBTX-es mosás után 0,5 órát 1,5 ml blokkolóban szobahőmérsékleten inkubáltuk a mintákat. Ezután 500 µl másodlagos ellenanyag (1:500x, blokkolóban oldva) került rájuk 12 órára 4 °C-on. Az ezt követő lépések megegyeztek az immunhisztokémiai vizsgálatnál leírtakkal.

NRE-GFP-s minták vizsgálata: Azokat az állatokat, melyekben a Notch jelátvitelt riporter segítségével vizsgáltuk, 25 °C-on tartottuk és a 110-120 órás lárvák szárnykorongját 30 µl PBS-ben kiboncoltam, majd 0,01 mg/ml koncentrációban sejtmagfestéket tartalmazó glicerines fedőoldatban (80% glicerin, 20% PBS) lefedtem és azonnal fényképeztük őket.

Elektronmikroszkópos vizsgálatok és DAB reakció: A PBS cseppben kiboncolt szövetet 1,5 ml fixáló oldatban (összetétel: 2% paraformaldehid (TAAB) és 0,5% glutáraldehid

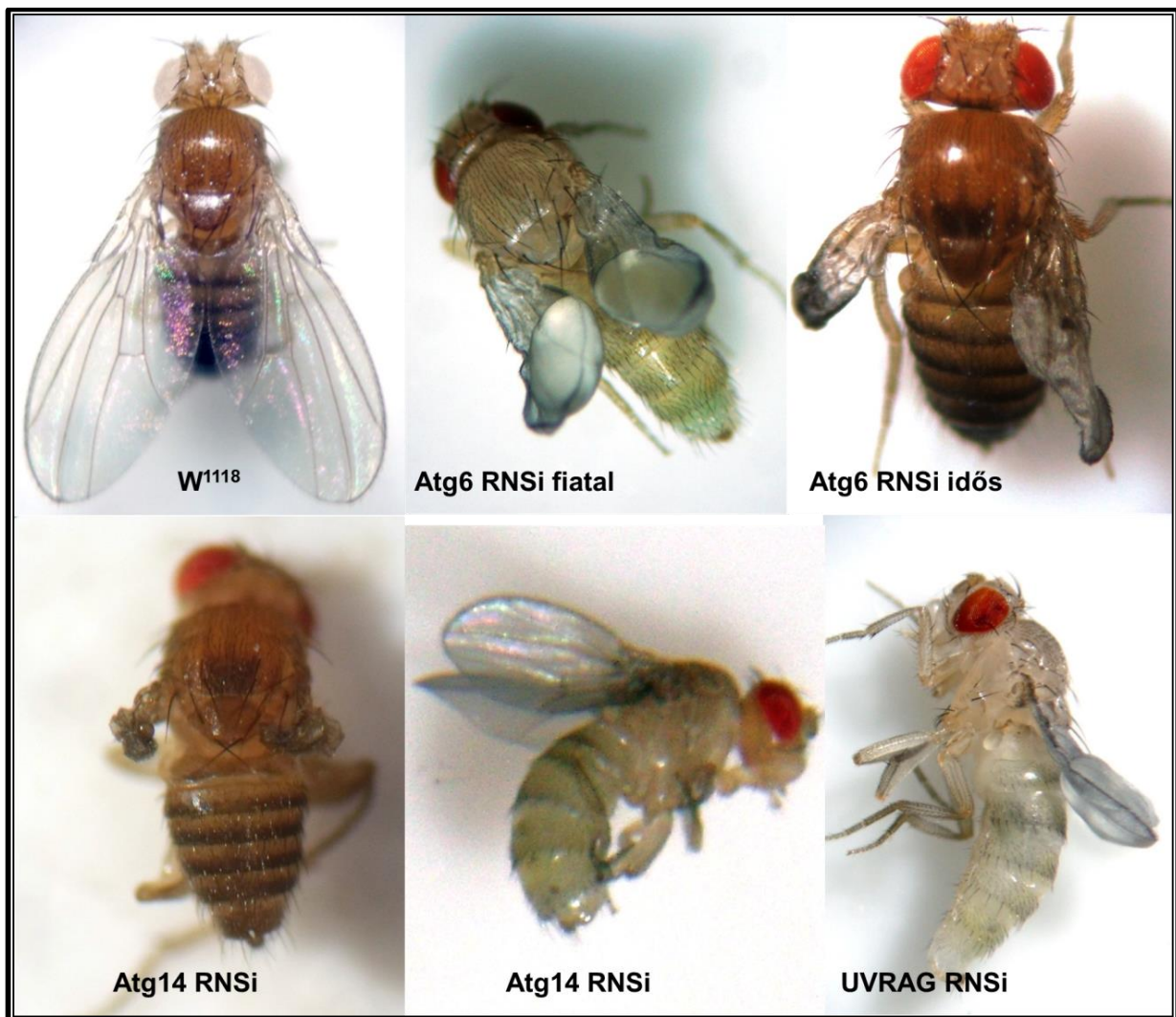
(TAAB) valamint 0,029 g $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ és 0,8 g szukróz 80 ml 0,1 M kakodilát pufferben (Fluka 20840)) 12 órán át 4 °C-on tartottuk. Következő lépésként 0,1 M kakodilát pufferrel kimostuk a főlösleges fixálót, ezután 30 percig *quenching* oldatban (50 mM glicin és 50 mM NH_4Cl Tris pufferben (TB, 0,05 M, pH=7,6)) inkubáltuk őket, ezután 10 percig TB oldatban mostuk a mintákat, majd 10 percig hidrogénperoxidos (Sigma H1009) TB-ben (1% H_2O_2 TB-ben) inkubáltunk, majd miután 3x10 percig TB oldattal kimostuk a mintákat, 10 percig 0,5 mg/ml DAB (diaminobenzidin, Sigma D5637)-TB oldattal előinkubáltunk. Ezután 20 percig 0,01% H_2O_2 -os DAB-TB oldattal hívtuk elő a mintákat és többszöri TB oldatcserével leállítottuk a reakciót, majd a mintát a műgyanta gyártója által előírt protokoll alapján LR White (Sigma 62661) műgyantába ágyaztuk, aminek szilárdulása után ultravékony metszeteket készítettünk. Az elkészült mintákat JEOL TEM 1011 transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

Statisztika: A statisztikai kiértékeléseknél a p-értékeket Kruskal-Wallis-, valamint Mann-Whitney-féle nem-paraméteres próba alapján Past program segítségével határoztam meg. N a minták elemszáma, p annak a valószínűsége, hogy a két-két minta ugyanazokból az alapsokaságokból származik (*: $p < 0,05$; Ns: $p > 0,05$).

Eredmények

Az Atg6 csendesítésének vizsgálata felnőtt szárnyon

Az Atg6 funkciójának elemzéséhez TRIP kollekcióból származó UAS-Atg6-RNSi törzset kereszteztem $\text{Bx}^{\text{MS1096}}$ -Gal4 (MS-Gal4); UAS-Dicer-t tartalmazó törzzsel, így a csendesítés az egész szárnyban megtörtént. Az ilyen állatok kifejlett szárnya erősen gyűrött és az állatok fiatal korában (néhány órával a kikelés után) hólyagos volt. A hólyagok a fejlődés során a külső váz megszilárdulását követően összeestek. Nagyon hasonló fenotípust mutattak azok az állatok is, melyek ugyancsak TRIP kollekcióból származó UAS-UVRAG RNSi és MS-Gal4, UAS-Dicer törzsek keresztezéséből születtek. VDRC kollekcióból származó UAS-Atg14 RNSi törzset és MS-Gal4, UAS-Dicer törzset keresztezve az állatok szárnya sokszor csökevényes volt, ám hólyagokat soha nem figyeltünk meg rajtuk, sőt egészséges szárnyak is előfordultak (2. ábra). Ezek alapján feltételezhető, hogy a PI3K(III) komplex kritikusabb szerepet játszik a szárnyfejlődésben, amikor UVRAG-ot tartalmaz, mint amikor Atg14-et.

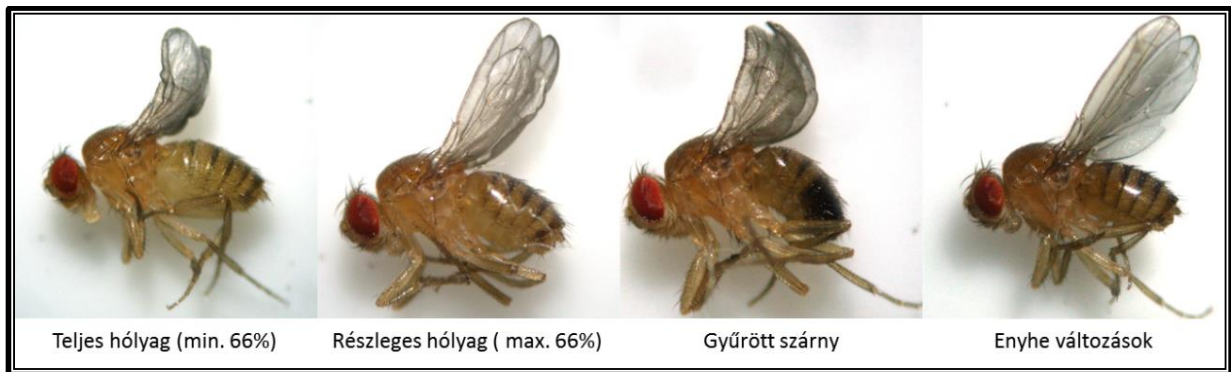


2.ábra: Felnőtt állatok, melyek szárnyában az Atg6, az Atg14, illetve az UVRAG csendesítve lett. (A genotípusok sorban: W^{1118} , MS-Gal4/+;UAS-DCR/+;UAS-Atg6 RNSi/+, MS-Gal4/+;UAS DCR/+;UAS-UVRAG RNSi/+, MS-Gal4/+;UAS-DCR/Atg14 RNSi)

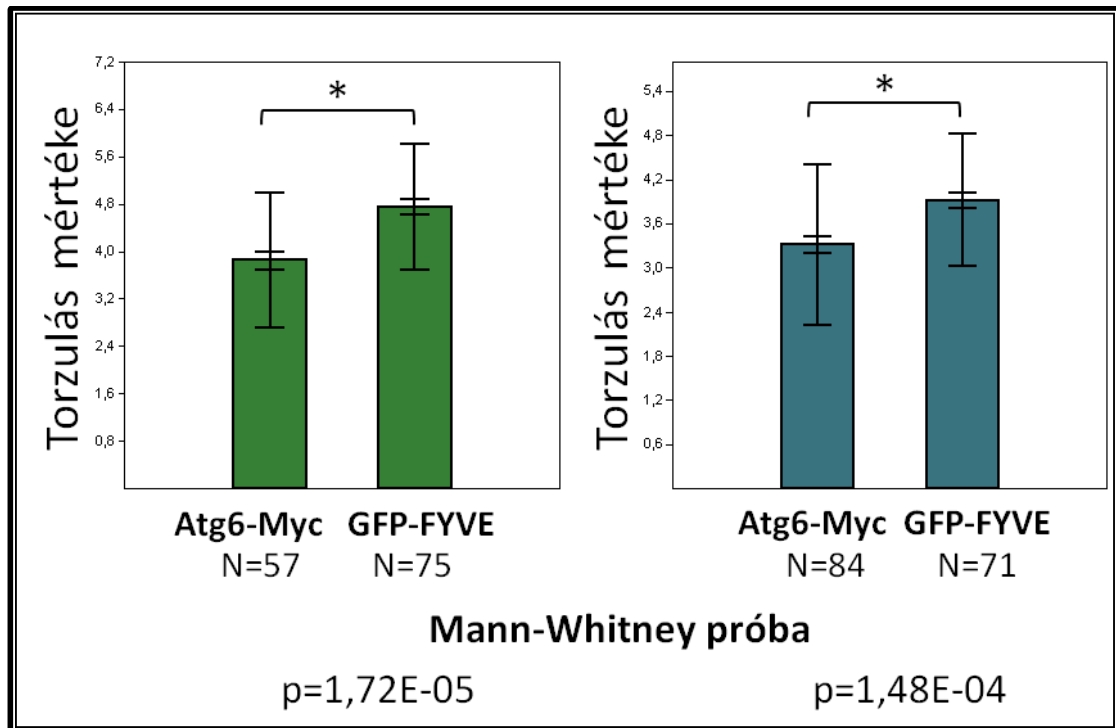
Atg6 RNSi menekítése

Hogy megnézzem, valóban az Atg6 fehérje hiánya felelős-e a fenti fenotípusért, létrehoztam egy olyan törzset, mely az MS-Gal4, UAS-Dicer, UAS-Atg6 RNSi transzgénekén kívül egy UAS-Atg6-myc transzgént is tartalmaz, mely tulajdonképpen egy myc-tag-gel megjelölt Atg6 fehérjét kódol, így alkalmas a menekítésre. Kontrollként MS-Gal4/+; UAS-Dicer/UAS-GFP-2xFYVE; UAS-Atg6 RNSi törzset használtam, mely nem Atg6 transzgént tartalmaz, hanem egy menekítésre alkalmatlan transzgént (UAS-GFP-2xFYVE), így benne ugyanannyi UAS van, mint a menekített törzsben. Az Atg6 transzgént kifejező állatok szárnya

szignifikánsan javult (3. ábra, és 1. diagram), így elmondható, hogy a hibás fenotípust valóban az *atg6* gén csendesítése okozza.



3. ábra: Felnőtt állatok, melyek a menekítésnél vizsgált állatok közül származnak és szárnyukon a menekítésnél elkülönített fenotípusok láthatóak.

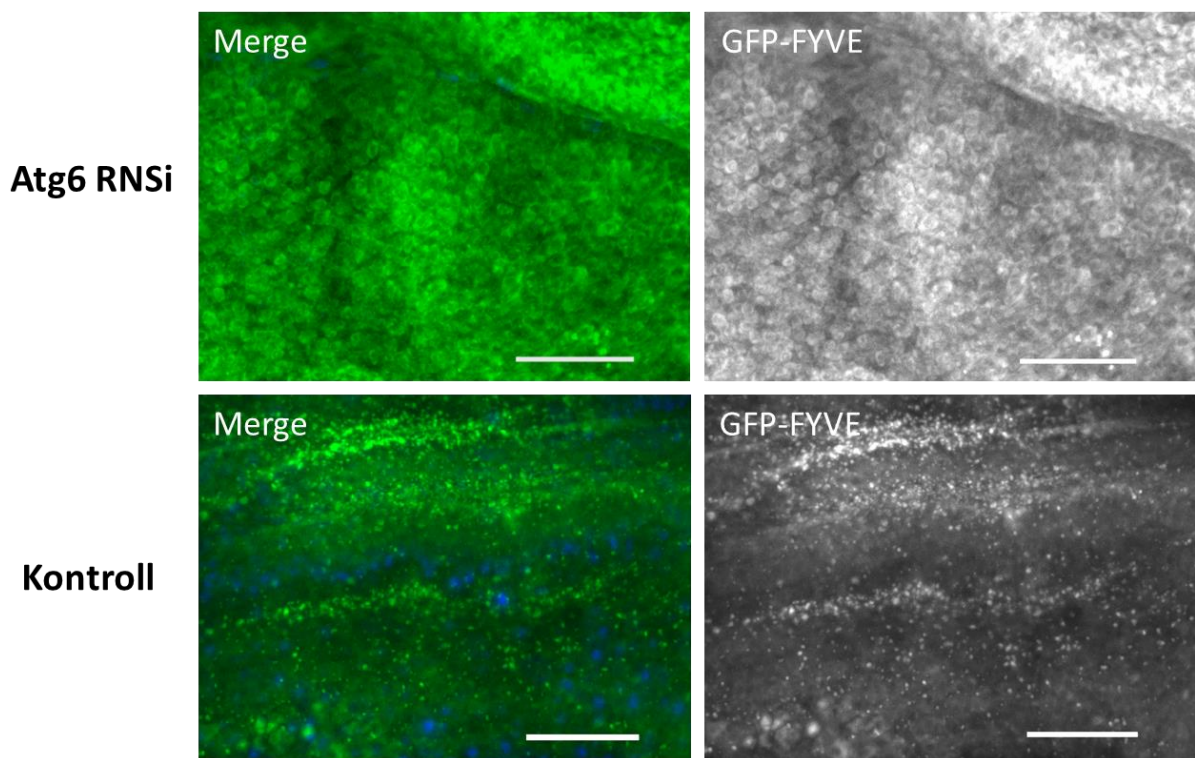


1. diagram: A bal oldali diagram a hímek, a jobb oldali diagram a nőstények esetében kapott kiértékelés eredményét mutatja. A szárnyak fenotípusához értékeket rendelttem a torzulás mértéke szerinti növekvő sorrendben (1: enyhe változások; 6: 2 teljes hólyag), és a skálák ezek átlagát mutatják, az átlaghoz közeli vonalak az átlagos hibát, az átlagtól távoli vonalak az átlagos szórást mutatják. (Genotípusok: *MS-Gal4/+* v. *Y;UAS-DCR/UAS-Atg6-myc;UAS-Atg6 RNSi/+*, *MS-Gal4/+* v. *Y;UAS-DCR/UAS-GFP-2xFYVE;UAS-Atg6 RNSi/+*)

A receptor-mediált endocitózis vizsgálata fénymikroszkóppal

Ahhoz, hogy eldöntsem, a receptor-mediált endocitózis melyik fázisában okoz hibát az Atg6 csendesítése, fluoreszcens marker fehérjék segítségével a különböző endoszómális kompartmenteket vizsgáltam.

Először azt vizsgáltam, hogy az Atg6-csendesített sejtekben működik-e a PI3K(III) komplex. Ehhez olyan törzseket használtam, melyekben GFP fehérjéhez tandem FYVE-doméneket fűzionáltak (GFP-2xFYVE), így a PI(3)P-tartalmú membránokat GFP jelöli. Az Atg6 csendesített szárnykorongban diffúz GFP jelet kaptunk, míg a kontroll szárnykorongban diszkrét vezikulákat. Ebből arra következtettünk, hogy Atg6 hiányában a komplex kináz funkciója nem működik, és a GFP ezért diffúzan a sejtplazmában marad (4. ábra).

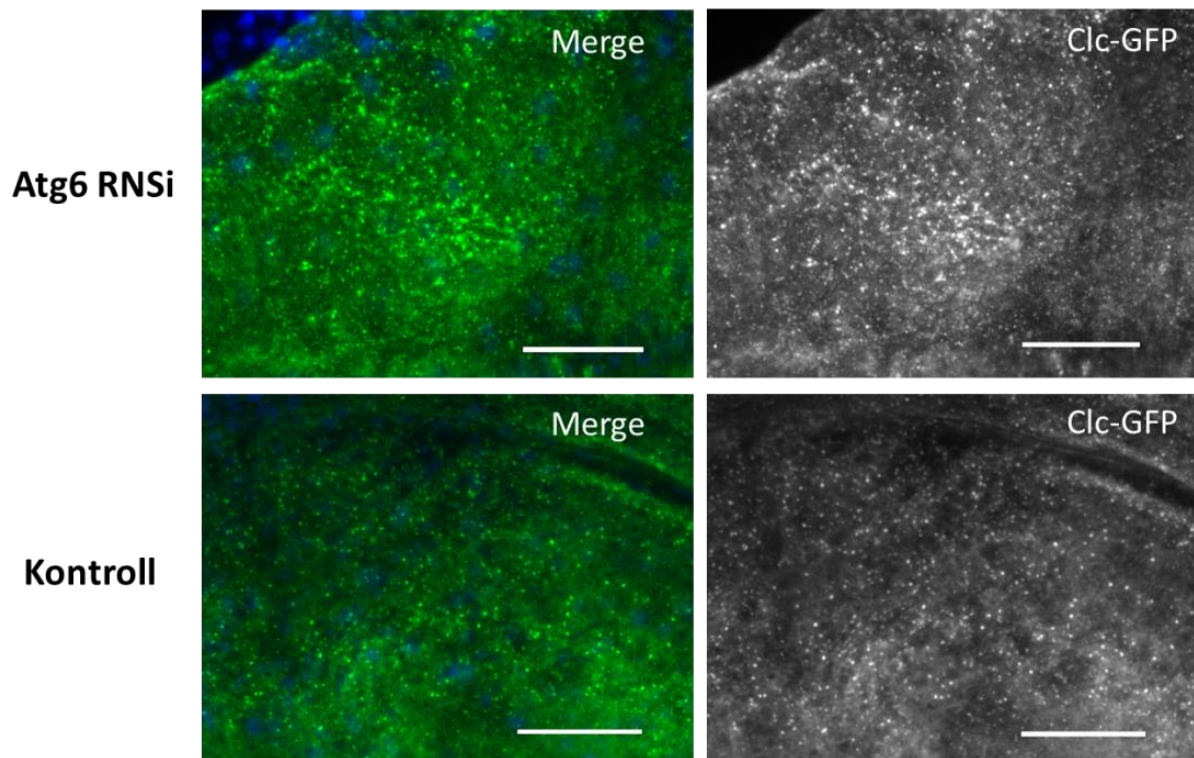


4. ábra: Az Atg6 csendesített sejtekben a GFP-2xFYVE diffúzan található meg, míg a kontroll sejtekben diszkrét vezikulákhoz asszociálva.

(Genotípusok: *MS-Gal4/+;UAS-DCR/UAS-GFP-2xFYVE*; *UAS-Atg6 RNSi/+*, *MS-Gal4/+;UAS-DCR/UAS-GFP-2xFYVE*) Mérce: 20 μ m

Az UAS promóterhez kapcsolt Clc-GFP-t (Clathrin light chain-GFP) kifejező törzsekben látszik, hogy a GFP jel lokalizációja vad típusú állat szárnykorongjában és MS-

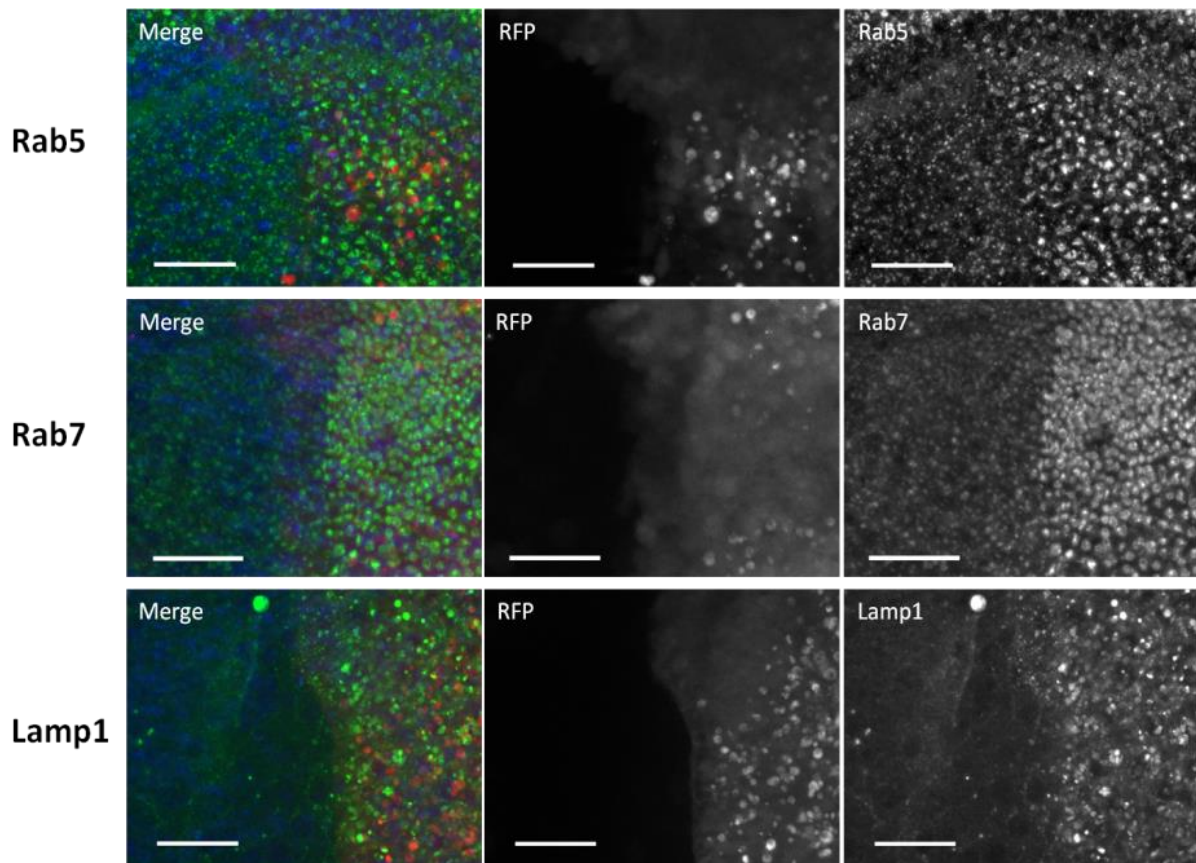
Gal4-et tartalmazó Atg6 csendesített szárnykorongban nem mutatott különbséget, így a legkorábbi endoszómális struktúrák kialakulásához még nem szükséges az Atg6 (5. ábra).



5. ábra: Az Atg6 csendesített sejtekben a Clc-GFP lokalizációja nem tér el a kontroll sejtektől. (Genotípusok: *MS-Gal4/+;UAS-DCR/ UAS-Clc-GFP*; *UAS-Atg6 RNSi/+;MS-Gal4/+; UAS-DCR/UAS-Clc-GFP*) Mércse: 20 μ m

A fluoreszcens endocitotikus markerek vizsgálatához általában engrailed vezérelt Gal4-forrást (enGal4) és UAS-RFP-t kifejező törzseket használtam, melyekben az Atg6 csendesítése csak a szárny poszterior felében történt meg, ezt a területet az RFP jelölte ki, és a szárny anterior fele tökéletes kontrollként szolgált a kísérletek során.

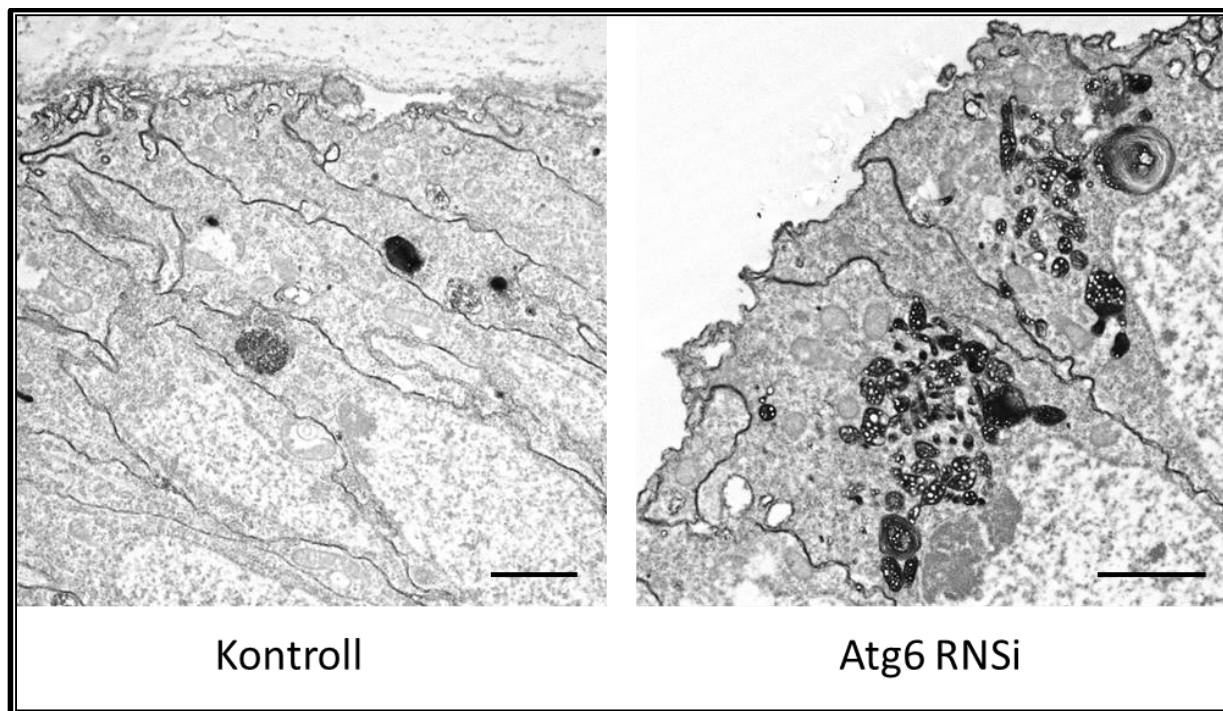
A tubulin promóterhez kapcsolt endoszómális markerek (a Rab5 a korai, a Rab7 a késői endoszómák, a Lamp1 (Lysosomal associated membrane protein 1) a késői endoszómák és a lizoszómák membránjában található (Novick and Zerial 1997; Eskelinen 2006)) lokalizációját enGal4-et hordozó állatok imaginális szárnykorongjában vizsgáltam és azt találtam, hogy a fluoreszcens jel mindegyik marker esetében erősebb volt a szárny poszterior területén, tehát az endoszómák látványosan felhalmozódtak az Atg6 csendesített régióban (6. ábra). Mivel mindegyik marker abnormális felhalmozódást mutat, ezért ez alapján az Atg6 szükséges az endoszómák éréséhez és normális működéséhez.



6. ábra: Mind a három vizsgált esetben a korongok csendesített felében az endoszóma markerek felhalmozódnak. (Genotípusok: **Rab5**: *enGal4, UAS-RFP/UAS-DCR; UAS-Atg6 RNSi/tubRab5-YFP*; **Rab7**: *enGal4, UAS-RFP/UAS-DCR; UAS-Atg6 RNSi/tubRab7-YFP*; **Lamp1**: *enGal4, UAS-RFP/tubLamp1-GFP; UAS-Atg6 RNSi/UAS-DCR*) Mércse: 20 μ m

Az endocitózis vizsgálata elektronmikroszkóppal

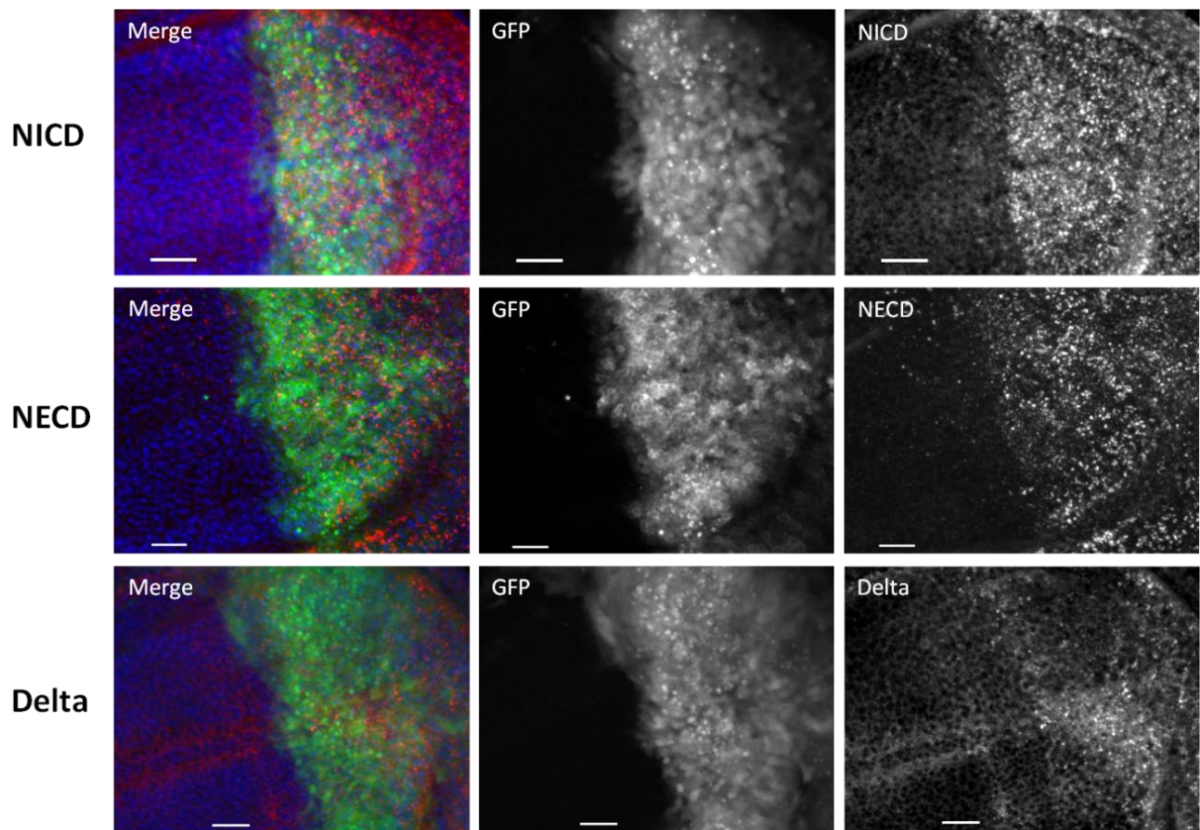
Az *Atg6* csendesített állatok fejlődő bábszárnyának morfológiáját elektronmikroszkóppal vizsgálva a sejtek apikális részén számos denz és lucens multivezikuláris- és multilamelláris testet talált a témavezetőm, melyekről azt feltételeztük, hogy felhalmozódott késői endoszómák. Hogy ezt igazoljam, UAS vezérelt, plazmamembránba lokalizált torna-peroxidáz (CD2-Horseradish peroxidase/CD2-Hrp) és DAB (diaminobenzidin) reakció segítségével megjelöltem a plazmamembránt és a belőle származó struktúrákat. Az *Atg6* csendesített szárnyban lévő összes multivezikuláris- és multilamelláris test DAB-pozitív volt, így azt a következtetést vontam le, hogy az összes említett abnormális struktúra hibásan működő felszaporodott késői endoszóma és nem valamely egyéb sejtorganelum elfajult változata, megerősítve ezzel a fluoreszcens markerekkel kapott eredményeket (7. ábra).



7. ábra: Az *Atg6* csendesített sejtekben a sejtek apikális oldalán DAB-pozitív, tehát plazmamembrán-eredetű abnormalis multilamelláris és vezikuláris testek halmozódnak fel. (Genotípusok: *MS-Gal4/+;UAS-DCR/UAS-CD2-HRP*, *MS-Gal4/+;UAS-DCR/ UAS-CD2-HRP; UAS-Atg6 RNSi/+*) Mérce: 500 nm

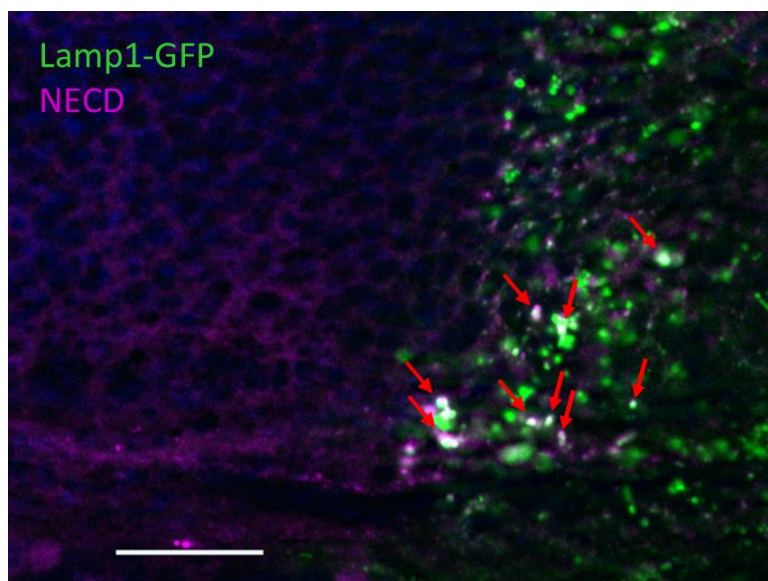
A Notch és a Delta lokalizációjának vizsgálata

Mivel az endocitózis a membránkötött fehérjék turnover-e során nélkülözhetetlen, ezért feltételeztük, hogy ha az *Atg6* csendesítés hatására az endocitózis megreked a késői endoszómák szintjén, akkor a Notch és a Delta, lévén membránkötött fehérjék, felhalmozódnak a sejtben. Ennek bizonyítására immunhisztokémiai eljárással *UAS-Dicer/+;enGal4,UAS-GFP/+;UAS-Atg6 RNSi/+* genotípusú 110-120 órás vándorló lárvák imaginális szárnykorongjaiban néztem a Notch extra- és intracelluláris doménjének, illetve a Deltának a lokalizációját, és azok a csendesített területen valóban felhalmozódtak a sejtekben (8. ábra).



8. ábra: A Notch intra- és extracelluláris doménje és a Delta is felhalmozódik a szárnykorongok csendesített sejtjein belül. Mércé: 20 μ m

Azért, hogy igazoljam, a Notch abnormalis lokalizációja valóban az endocitózis hibájából ered, *ex vivo* Notch endocitózis esszét (felvételi és szállítási próbát) végeztünk kiboncolt élő imaginális szárnykorongon, amiből kiderült, hogy a NECD felvétele megtörtént, ám azok egy része Lamp1-pozitív vezikuláris struktúrákban maradt 3 órás felvétel után is, míg a kontroll sejtek felvették és lebontották a NECD-t (9. ábra).

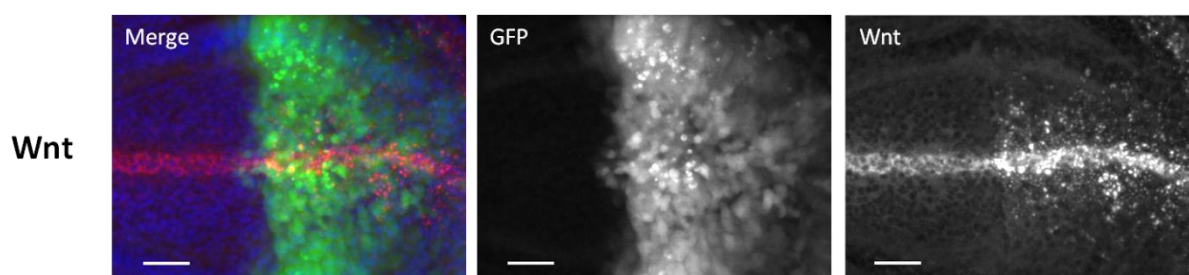


9. ábra: A NECD (magenta) a csendesített sejtekben nem képes lebomlani és egy részük zöld Lamp1-pozitív vezikulákban található, ezek a struktúrák a képen fehér színűek és piros nyilak mutatják őket.

(Genotípus: *enGal4/UAS-Lamp1-GFP; UAS-Atg6 RNSi/UAS-DCR*) Mércse: 20 μ m

A Wingless lokalizációjának vizsgálata

A Wingless (Wnt/Wg) jelátvitel vizsgálata két szempontból is fontos volt munkám során. Az egyik, hogy a Wnt-t annak receptorával, a Frizzled-del együtt a sejtek endocitózissal veszik fel a felszínükről (Gagliardi et al. 2008). A másik szempont, hogy a Wnt jelátvitel a Notch jelátvitellel szorosan összefügg, a Notch ugyanis növeli a Wnt molekulák számát a *Drosophila* imaginális szárnykorongjának középső vonalában, mely vonal a későbbi szárny dorzális és ventrális oldalának határa (DV-határ) (Herranz and Milán 2008). UAS-Dicer/+;enGal4,UAS-GFP/+;UAS-Atg6 RNSi/+ genotípusú állatok imaginális szárnykorongjait vizsgálva valóban azt láttam, hogy a Wnt jel a DV-határon felerősödött a csendesített régióban és a csendesített sejtekben intracellulárisan a Wnt fehérje a Notch-hoz hasonlóan fel is halmozódott (10. ábra).

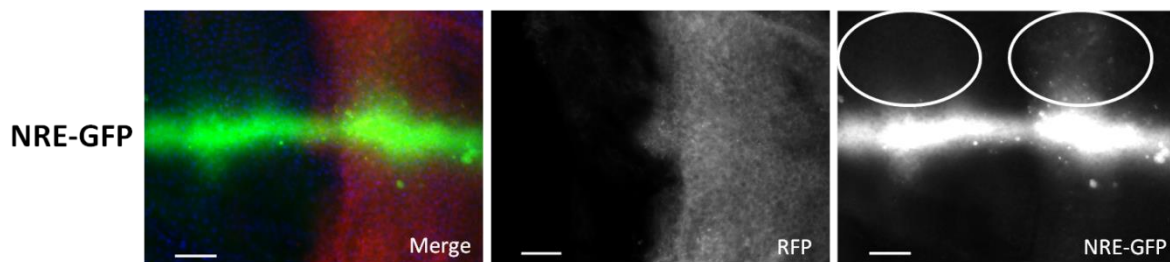


10. ábra: A szárnykorongok Atg6 csendesített felében a Wnt jel felőrősödik és a Wnt fehérje a csendesített sejteken belül fel is halmozódik. Mércse: 20 μ m

Ezek alapján azokat a következtetéseket vontam le, hogy a Notch jelátvitel az Atg6 csendesítés hatására felerősödik, és hogy az Atg6 működése nemcsak a Notch és a Delta endocitotikus lebontásához szükséges, hanem más jelátviteli folyamatok fehérjéinek a degradációjához is elengedhetetlen.

A Notch jelátvitel vizsgálata

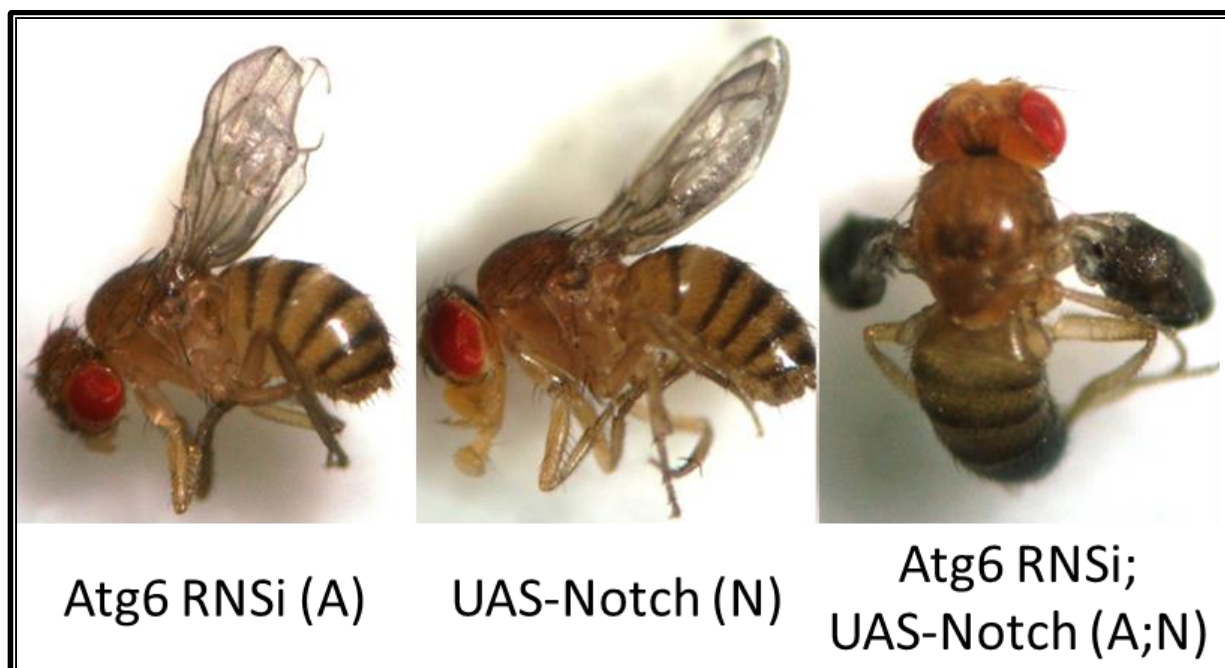
A Notch és a Delta felhalmozódásából feltételeztük, hogy a Notch jelátvitel felerősödik, ennek további bizonyítására *enGal4*, *NRE-GFP*, *UAS-Dicer*, *UAS-RFP*, *UAS-Atg6 RNSi* géneket kifejező állatok imaginális szárnykorongjait vizsgáltuk, és a csendesített régióban látványosan kiszélesedett az a tartomány, ahol a jelátvitel aktívan zajlott (11. ábra).



11. ábra: A Notch jelátvitel intenzitását jelző NRE-GFP-jelölt terület a szárnykorongok Atg6 csendesített felében kiszélesedik. (Genotípus: *UAS-DCR/+;enGal4,UAS-RFP,NRE-GFP/+;UAS-Atg6 RNSi/+*) Mérce: 20 μ m

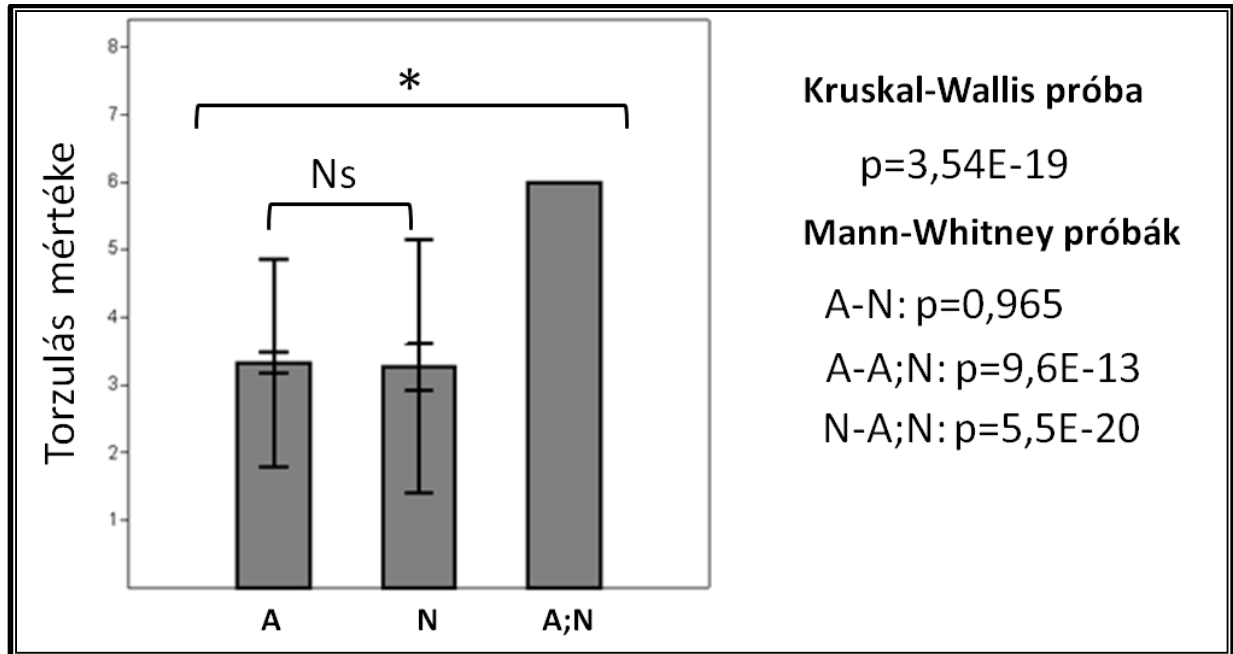
Genetikai interakció az Atg6 és a Notch között

A fenti eredmények nem feltétlenül támasztják alá, hogy az Atg6 csendesítése közvetlenül a Notch felhalmozódása miatt okozza a Notch jelátvitel felerősödését, hiszen az eredmények alapján ezek lehetnének párhuzamos következményei is az Atg6 csendesítésnek. Ennek vizsgálatára genetikai interakciós kísérletet végeztem el, mely során összehasonlítottam a torzulás mértékét Atg6 csendesített állat szárnyában, a vad típusú Notch fehérjét overexpresszáló szárnyban és olyan szárnyban, amelyben egyszerre fejeződik ki az Atg6 csendesítés és a Notch overexpresszió. Eredményeink azt mutatják, hogy a két transzgént együttesen kifejező állatok szárnya szignifikánsan erősebben torzult, mint a transzgéneket egyenként kifejező állatok szárnya (12. ábra, 2. diagram).



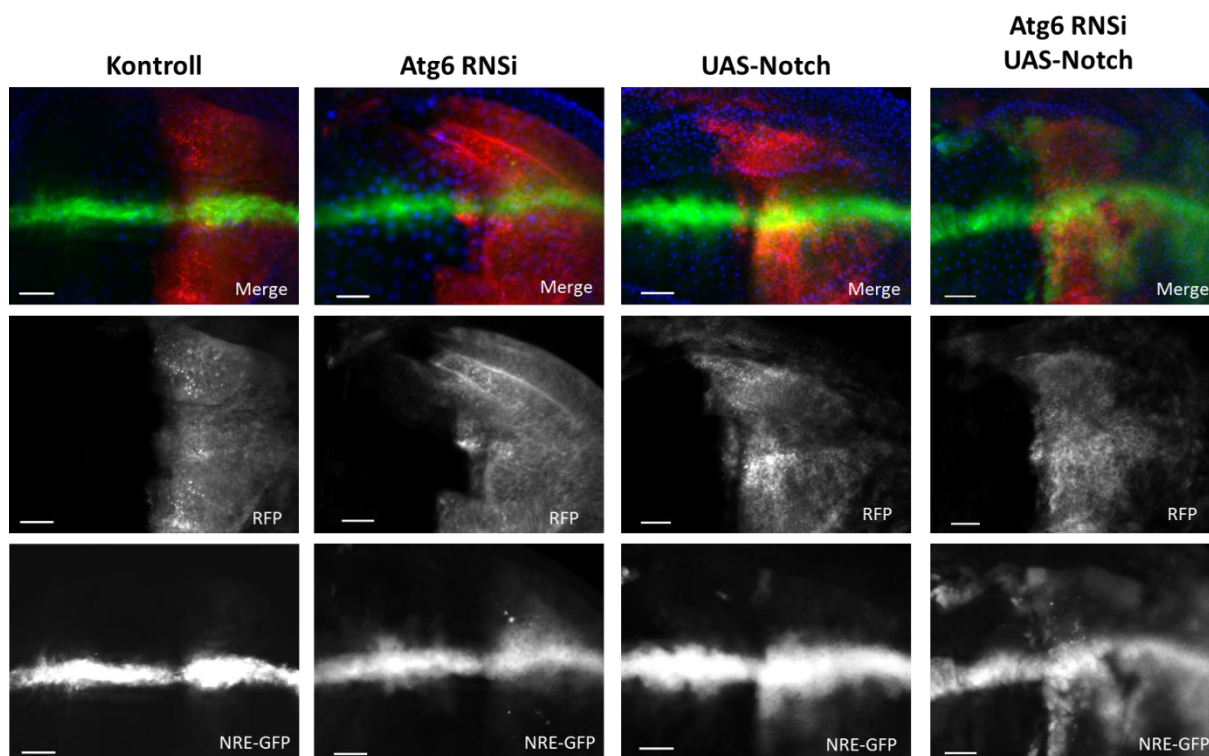
12. ábra: A genetikai interakciós kísérlet során vizsgált két transzgént együttesen kifejező állatok szárnya láthatóan erősebben torzult, mint a transzgéneket egyenként kifejező állatok

szárnya. (Genotípusok: (A):MS-Gal4/+;UAS-DCR/UAS-GFP-2xFYVE; UAS-Atg6 RNSi/+, (N): MS-Gal4/+ ;UAS-DCR/+;UAS-Notch/+ (A;N): MS-Gal4/y ;UAS-DCR/+;UAS-Notch/UAS-Atg6 RNSi)



2. diagram: A torzulás mértékének összehasonlításához a menekítéses vizsgálatához hasonlóan értékeket rendelttem a szárnyak fenotípusához a torzultság mértéke szerinti növekvő sorrendben (1: enyhe változások; 6: 2 teljes hólyag), és a skálák ezek átlagát mutatják, az átlaghoz közeli vonalak az átlagos hibát, az átlagtól távoli vonalak az átlagos szórást mutatják.

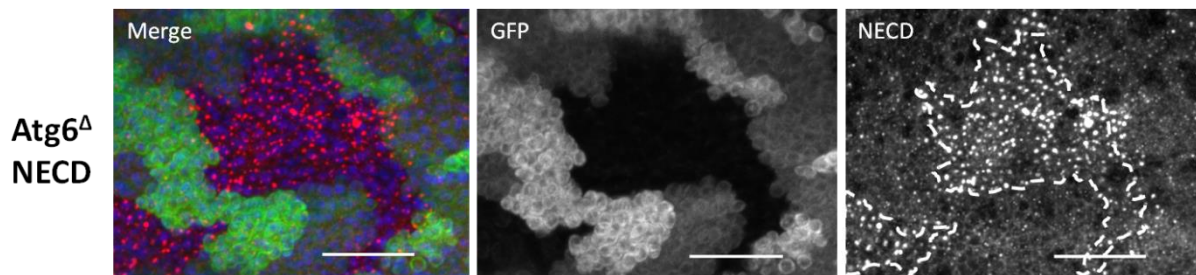
A genetikai interakció vizsgálatát a fentebb említett Notch jelátvitel riportert expresszáló muslicákon, fluoreszcens mikroszkópia alkalmazásával is elvégeztük. Eredményeink megerősítették az adult állatokon kapott eredményeket, ugyanis jól láthatóan a Notch overexpressziója és az Atg6 csendesítése egyaránt a jelátvitel erősödését és a jelátvitel területének kiszélesedését okozta, amely hatás a két transzgén együttes kifejezésével látványosan erősebbé vált.(13. ábra).



13. ábra: Az NRE-GFP mennyisége *Atg6* csendesítés és *Notch* overexpresszió hatására is megnövekedett a kontrollhoz képest, ám a két transzgént együttes kifejeződése méginkább növeli a mennyiségét. Az adott transzgéntek kifejező sejtet RFP jelöli. (Genotípusok: *UAS-Dcr-2/+; enGal4, UAS-myr-mRFP,NRE-EGFP/+; +/+*, *UAS-Dcr-2/+; enGal4, UAS-myr-mRFP,NRE-EGFP/+; UAS-Atg6-RNAi/+*, *UAS-Dcr-2/+; enGal4, UAS-myr-mRFP,NRE-EGFP/+; UAS-Notch/+*, *enGal4,UAS-myr-mRFP,NRE-EGFP/UAS-Dcr-2;UAS-Atg6-RNAi/UAS-Notch*) Mércse: 20 μ m

Az Atg6 nullmutáns vonal vizsgálata

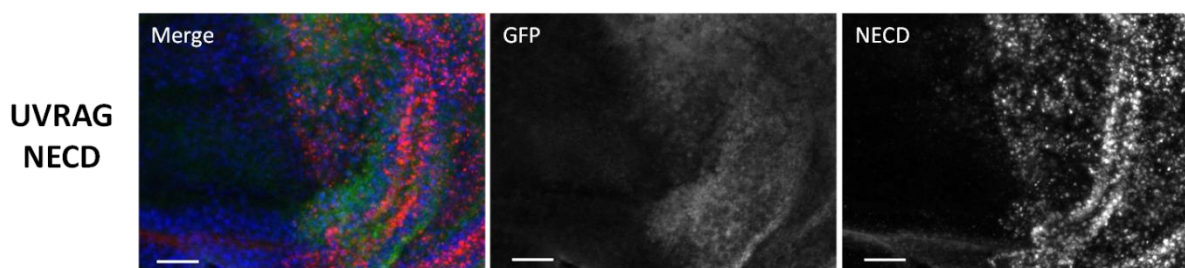
RNSi vizsgálataink során kapott eredményeinket szeretnénk volna nullmutáns állatok (*Atg6^Δ*) segítségével is megerősíteni. Ezért *hsFLP/+;+/+;FRT82bAtg6^Δ/FRT82b,ubi-GFP* genotípusú állatok 65-75 órás lárváiban 2 óra 37 °C-os hőszokk segítségével mitotikus rekombinációt indukáltam, ugyanis a hőszokk hatására néhány sejtben Flip rekombináza (FLP) enzim fejeződik ki, ami a homológ kromoszómákon lévő FRT (FLP target) helyek között rekombinációt idéz elő. Az így képződött homozigóta nullmutáns sejtekben GFP nem fejeződik ki, ezért azok könnyen azonosíthatóak. Bennük az RNSi sejtekhez hasonlóan az NECD látványosan felhalmozódott (14. ábra).



14. ábra: A GFP-t nem kifejező szárnykorong sejtek Atg6 nullmutációt tartalmaznak homozigóta formában, és bennük a NECD mennyisége szembetűnően megnövekedett. Mércse: 20 μ m

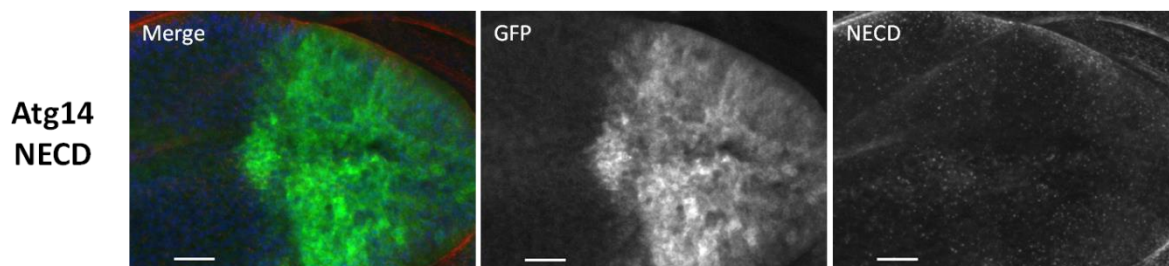
Az UVRAG és az Atg14 vizsgálata

Mivel az Atg6 az UVRAG-gal és az Atg14-gyel két különböző komplexet alkothat, ezért ezeknek a fehérjéknek a vizsgálatát is fontosnak tartottuk. Lee és mtsai. azt tapasztalták, hogy UVRAG nullmutáns sejtekben a NECD abnormálisan felhalmozódik (Lee et al. 2011), ezért megvizsgáltam, hogy az UVRAG csendesítés hatása hasonlít-e az Atg6 csendesítés hatásaihoz. Ehhez UAS-Dicer/+;enGal4,UAS-GFP/+;UAS-UVRAG RNSi/+ genotípusú állatok imaginális szárnykorongjait néztem, és az Atg6 csendesítéshez nagyon hasonló eredményt kaptam, a NECD látványosan felhalmozódott az UVRAG csendesített régióban (15. ábra).



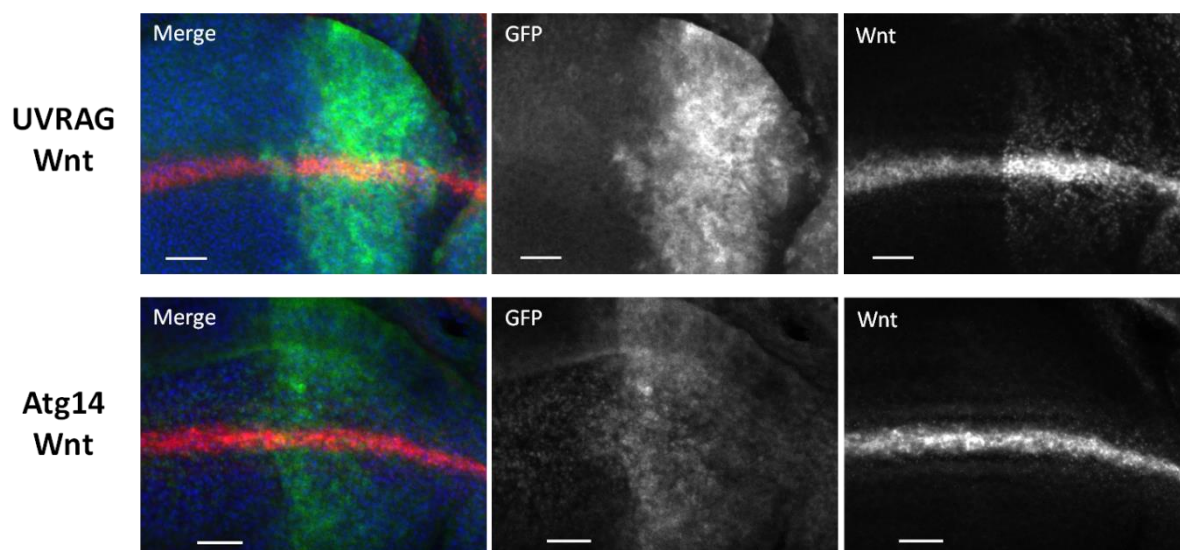
15. ábra: A szárnykorongok UVRAG csendesített felében a NECD felhalmozódott a csendesített sejteken belül. Mércse: 20 μ m

Ezzel ellentétben az UAS-Dicer/+;enGal4,UAS-GFP/UAS-Atg14 RNSi genotípusú állatok imaginális szárnykorongjaiban a csendesített és a kontroll régió között nem volt különbség a NECD lokalizációjában (16. ábra).



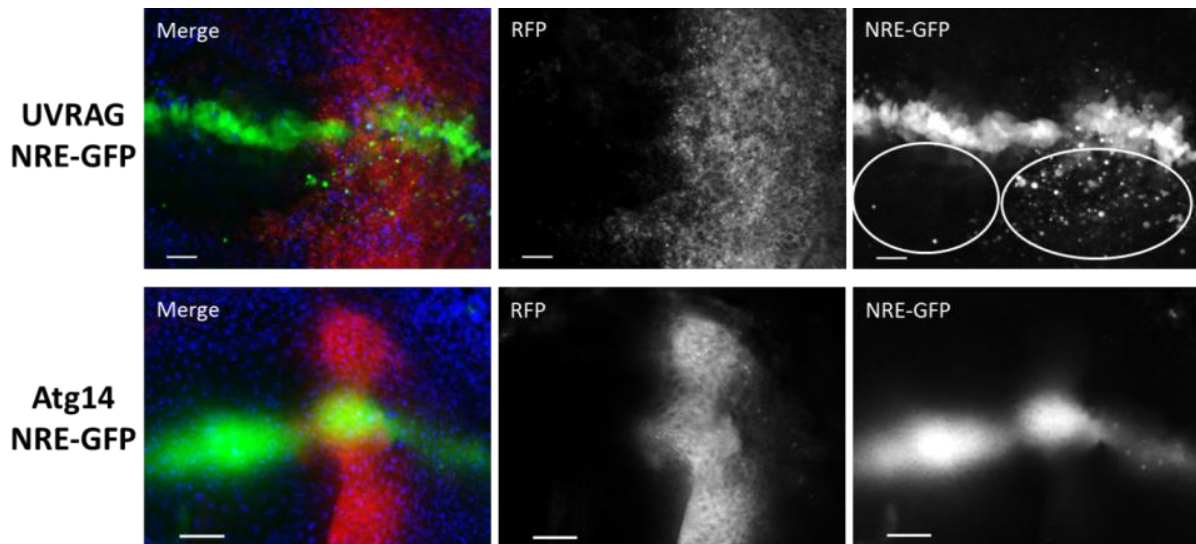
16. ábra: A szárnykorongok Atg14 csendesített sejtjeiben a NECD mennyisége nem tért el a kontroll sejtekben lévőőtől . Mércse: 20 μ m

A Wnt lokalizációjánál ismét az Atg6 csendesítéshez nagyon hasonló fenotípust mutatott az UVRAG csendesített imaginális szárnykorong is, ám az Atg14 csendesített szárnykorongban a Wnt jel nem mutatott különbséget a kontroll és a csendesített oldal között (17. ábra).



17. ábra: Az UVRAG csendesített sejtekben a Wnt felhalmozódott és a Wnt jel felerősödött a csendesített területen, ám az Atg14 csendesített korongok esetében nem figyelhető meg különbség a csendesített és a kontroll régió között.

Az Notch jelátvitel vizsgálatánál is az Atg6 csendesítéshez hasonló képet mutatott az UVRAG csendesítése, az Atg14 csendesítése azonban nem okozott jelentős változást a jelátvitelben, a kontroll és a csendesített régióban ugyanolyan mértékben volt jelen a GFP-jel (18. ábra).



18. ábra: Az *Atg6* csendesítéshez hasonlóan az *UVRAG* csendesített korongokban a csendesített régióban az *NRE-GFP* pozitív terület kiszélesedett, ám az *Atg14* csendesített korongokban ez a hatás elmaradt. Genotípusok: *UVRAG*: *UAS-DCR/+;enGal4,UAS-RFP,NRE-GFP/+;UAS-UVRAG RNSi/+*; *Atg14*: *UAS-DCR/+;enGal4,UAS-RFP,NRE-GFP/UAS-Atg14 RNSi*

Mérce: 20 μ m

Ezek alapján feltételezhető, hogy valóban az *UVRAG*-ot tartalmazó PI3K(III)-Komplex-2 felel az endocitózis és ezen keresztül a Notch jelátvitel szabályozásáért, és az *Atg14*-et tartalmazó PI3K(III)-Komplex-1 az endocitózis szabályozását nem és így a Notch jelátvitelt sem szabályozza.

Diszkusszió

Az endocitózis szabályozásában részt vevő fehérjék közül az *Atg6* szerepe az eddigi munkák alapján ellentmondásos (Zeng et al. 2006; Thoresen et al. 2010), ezért ennek vizsgálatát és a fehérje szerepének tisztázását egy szövetségi élőlényben, az ecetmuslicában fontosnak tartottuk.

Az endocitózis fontos szerepet játszik a Notch jelátvitel szabályozásában (Fortini and Bilder 2009), így azt a hipotézist állítottuk fel, hogy amennyiben az *Atg6* valóban szükséges az endocitózis megfelelő működéséhez, úgy a Notch jelátvitel az *Atg6* hibája során torzulni fog. Továbbá arra is kíváncsiak voltunk, hogy az élesztőben és emlős sejtenként megfigyelt két különböző PI3K(III)-komplex létezik-e muslicában és ha igen, melyik

komplex szabályozza az endocitotikus folyamatokat (Itakura et al. 2008; Itakura and Mizushima 2009).

A kísérletek során megfigyeltük, hogy az Atg6 illetve az UVRAG csendesítésének hatására a kifejllett állatok szárnya erősen torzult és hólyagos, míg az Atg14 csendesített kifejllett állatok szárnya kevésbé torzult és rajtuk soha nem figyeltünk meg hólyagokat. Ezek alapján feltételeztük, hogy az Atg14 a szárnyfejlődés során kevésbé játszik fontos szerepet, mint az Atg6 és az UVRAG.

Az Atg6 csendesítést Atg6 transzgénnel menekíteni tudtuk, ugyanis a menekített állatok szárnya szignifikánsan kevésbé torzult, mint egy értelmetlen transzgént kifejező állatoké, így bebizonyosodott, hogy a TRIP kollekciónból származó Atg6-RNSi törzs segítségével valóban az Atg6 működését csökkentettük.

A szakirodalom alapján még senki nem vizsgálta, hogy az Atg6 különböző endoszómapopulációkra milyen hatással van. Ezért ez utáni vizsgálataink ennek a feltárására fókuszáltak. Fluoreszcens riporterfehérjével azt az eredményt kaptuk, hogy az Atg6 az endocitózis korai szakaszát nem szabályozza, mert a klatrin lokalizációja látványosan nem tér el a csendesített és a kontroll fejlődő szárnyakban. Kimutattuk, hogy a PI3K(III) komplex hibásan működik, mert az Atg6 csendesített sejtekben a GFP-2xFYVE lokalizációja erősen torzult, diffúz a kontroll sejtekben látható jelhez képest. Az endocitózist fluoreszcens marker fehérjékkel (Rab5, Rab7, Lamp1) vizsgálva bizonyítottuk, hogy az Atg6 csendesítése az endoszómák felhalmozódását okozza a csendesített sejtekben. Ezt elektronmikroszkópos vizsgálatokkal is igazoltuk. Eredményink alapján arra következtethetünk, hogy az Atg6 szükséges az endocitózis megfelelő működéséhez, csendesítése endoszómák felhalmozódását okozza, megzavarja azok érését és a lizoszómák működését.

A fenti kísérletek után megvizsgáltuk a Notch, a Delta lokalizációját Atg6 csendesített állatok szárnykorongjában, és azt találtuk, hogy mindegyik fehérje felhalmozódik a csendesített sejteken belül, ez alapján azt feltételeztük, hogy a jelátvitel intenzitása is megnő a csendesített sejtekben. Egy fluorerszcens riporter fehérje, az NRE-GFP segítségével közvetlenül tudtuk vizsgálni a Notch jelátvitel intenzitását. Az NRE-GFP a fejlődő szárnyak Atg6 csendesített felében felhalmozódik, a GFP-pozitív terület kiszélesedik, ezzel igazoltuk, hogy a Notch jelátvitel valóban felerősödik az Atg6 csendesítés hatására. Genetikai interakciós vizsgálataink is azt erősítik meg, hogy az Atg6 csendesítés közvetlenül a Notch felhalmozódásán keresztül erősíti a Notch jelátvitelt. A Wnt lokalizációs vizsgálatok során kapott eredményeink alapján úgy vélem, hogy az Atg6 az endocitózis szabályozásán

keresztül, nem csak a Notch, hanem általánosan több jelátviteli folyamatok szabályozásához is szükséges lehet.

Megvizsgálva UVRAG és Atg14 csendesített fejlődő szárnyakban a NECD, a Wnt és az NRE-GFP lokalizációját az UVRAG csendesítése mutatott hasonló fenotípust az Atg6 csendesítéséhez, így azt a következtetést vontuk le, hogy az UVRAG-ot tartalmazó PI3K(III) Komplex-2 felelős az endocitózis és ezen keresztül a Notch és más jelátvitel szabályozásáért, míg az Atg14-et tartalmazó Komplex-1 nem szabályozza ezeket a folyamatokat.

Az UVRAG és az Atg6 egyaránt fontos tumorsuppresszorok, de az Atg6 tumorelles feladatának az autofágiát gondolják (Yue et al. 2003, Liang et al. 2006). Ezzel együtt vizsgálataink alapján igazoltuk, hogy az Atg6 valószínűleg az UVRAG-gal együttműködve olyan fontos jelátviteli folyamatokat szabályoz, melyekről már bizonyították, hogy hibájuk összefüggésbe hozható tumoros elváltozásokkal (Garcia and Kandel 2012), ezért véleményem szerint az Atg6 és az UVRAG tumorsuppresszív feladatai közül az autofágia szabályozása mellett nem szabad figyelmen kívül hagyni egyéb sejtélettani folyamatokat sem, úgy mint az általam vizsgált receptor-mediált endocitózist.

Szerzői hozzájárulás

1. A kísérletek során vizsgált törzseket és vonalakat témavezetőmmel közösen állítottuk elő.
2. A fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok során az állatok boncolását és a festésüket a Clc-GFP és a GFP-FYVE vizsgálatán kívül minden esetben én végeztem, a fluoreszcens mikroszkópot pedig témavezetőm kezelte és az említett két vizsgálatnál a mintákat együtt készítettük elő.
3. Az elektronmikroszkópos vizsgálatoknál az állatokat én boncoltam, a DAB reakciót is én végeztem el, a beágyazást témavezetőmmel közösen végeztük és az elektronmikroszkópot ő kezelte.
4. A statisztikai kiértékeléseknél az állatokat Maruzs Tamás számolta meg és ő sorolta be őket a különböző fenotípusos kategóriákba, ám a statisztikai kiértékeléseket én végeztem.

Irodalomjegyzék

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Walter P (2008) Molecular Biology of the Cell 5th ed. New York (USA) : Garland science, Taylor & Francis Group, Chapter 15, Mechanisms of Cell Communication; p879-964
- Andersson ER, Sandberg R, Lendahl U (2011) Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. Development 138:3593–3612.
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. Science 284:770–776.
- Bray SJ (2006) Notch signaling: a simple pathway becomes complex. Nature reviews Molecular cell biology 7:678–689.
- Burman C, Ktistakis NT (2010) Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. FEBS letters 584:1302–1312.
- Doherty GJ, McMahon HT (2009) Mechanisms of endocytosis. Annual review of biochemistry 78:857–902.
- Eskelinen E-L (2006) Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. Molecular aspects of medicine 27:495–502.
- Fortini ME, Bilder D (2009) Endocytic regulation of Notch signaling. Current opinion in genetics & development 19:323–328.

- Funderburk SF, Wang QJ, Yue Z (2010) The Beclin 1-VPS34 complex-at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends in cell biology* 20:355–362.
- Gagliardi M, Piddini E, Vincent J-P (2008) Endocytosis: a positive or a negative influence on Wnt signalling? *Traffic* 9:1–9.
- Garcia A., Kandel J. J. (2012). Notch: a key regulator of tumor angiogenesis and metastasis. *Histol. Histopathol.* 27 151–156
- Gruenberg J, Stenmark H (2004) The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nature reviews Molecular cell biology* 5:317–323.
- He C, Levine B (2010) The beclin 1 interactome. *Current opinion in cell biology* 22:140–149.
- Herranz H, Milán M (2008) Signalling molecules, growth regulators and cell cycle control in *Drosophila*. *Cell Cycle* 7:3335–3337.
- Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N (2008) Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Molecular biology of the cell* 19:5360–5372.
- Itakura E, Mizushima N (2009) Atg14 and UVRAG: mutually exclusive subunits of mammalian Beclin 1-PI3K complexes. *Autophagy* 5:534–536.
- Jovic M, Sharma M, Rahajeng J, Caplan S (2010) The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histology and histopathology* 25:99.
- Kandachar V, Roegiers F (2012) Endocytosis and control of Notch signaling. *Current opinion in cell biology* 24(4): 534–540
- Kang R, Zeh H, Lotze M, Tang D (2011) The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death & Differentiation* 18:571–580.
- Kihara A, Noda T, Ishihara N, Ohsumi Y (2001) Two Distinct Vps34 Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes Function in Autophagy and Carboxypeptidase Y Sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology* 152:519–530.
- Lee G, Liang C, Park G, et al. (2011) UVRAG is required for organ rotation by regulating Notch endocytosis in *Drosophila*. *Developmental biology* 356:588–597.
- Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaani D, Oh BH et al. (2006) Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin 1-binding protein UVRAG. *Nat. Cell Biol.*; 8: 688–699.
- McPhee CK, Baehrecke EH (2009) Autophagy in *Drosophila melanogaster*. *Biochimica et biophysica acta* 1793:1452.

- Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR (1997) Endocytosis. *Physiological reviews* 77:759–803.
- Novick P, Zerial M (1997) The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Current opinion in cell biology* 9:496–504.
- Le Roy C, Wrana JL (2005) Clathrin-and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6:112–126.
- Ruck A, Attonito J, Garces KT, et al. (2011) The Atg6/Vps30/Bec1 1 ortholog BEC-1 mediates endocytic retrograde transport in addition to autophagy in *C. elegans*. *Autophagy* 7:386–400.
- Seaman MN, Marcusson EG, Cereghino JL, Emr SD (1997) Endosome to Golgi retrieval of the vacuolar protein sorting receptor, Vps10p, requires the function of the VPS29, VPS30, and VPS35 gene products. *The Journal of cell biology* 137:79–92.
- Thoresen SB, Pedersen NM, Liestøl K, Stenmark H (2010) A phosphatidylinositol 3-kinase class III sub-complex containing VPS15, VPS34, Beclin 1, UVRAG and BIF-1 regulates cytokinesis and degradative endocytic traffic. *Experimental cell research* 316:3368–3378.
- Vaccari T, Lu H, Kanwar R, et al. (2008) Endosomal entry regulates Notch receptor activation in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of cell biology* 180:755–762.
- Yue Z, Jin S, Yang C, et al. (2003) Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:15077–15082.
- Zeng X, Overmeyer JH, Maltese WA (2006) Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. *Journal of cell science* 119:259–270.