

SEMMELWEIS EGYETEM  
DOKTORI ISKOLA

**Ph.D. értekezések**

**2558.**

**Holczer Marianna**

**Patobiokémia**

című program

Programvezető: Dr. Csala Miklós, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Mészáros-Kapuy Orsolya, egyetemi docens

# Az autofágia indukciójában szerepet játszó mTORC1 és AMPK szabályozási kapcsolatainak rendszerszintű vizsgálata celluláris stressz esetén

Doktori értekezés

**Holczer Marianna**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Mészáros-Kapuy Orsolya Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Törőcsik Beáta Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Lőw Péter Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Varga Gábor D.Sc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Káldi Krisztina Ph.D., egyetemi docens

Dr. Wunderlich Lívius Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest  
2021

## Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék .....	5
Ábrák és táblázatok jegyzéke .....	7
1. Irodalmi háttér .....	9
1.1. Az autofágia .....	9
1.1.1. Az autofágia indukciója és nukleációja .....	10
1.1.1.1. Az ULK komplex és az autofágia indukciója .....	10
1.1.1.2. A VPS34 komplex és az autofágia nukleációja .....	10
1.1.2. A fagofór membránjának meghosszabbítása, az elongáció .....	11
1.1.3. Szállító receptorok .....	13
1.1.4. Az autofagoszóma fúziója a lizoszómával .....	13
1.2. Az ULK1 .....	13
1.2.1. Az ULK komplex .....	14
1.2.2. Az ULK komplex szabályozása .....	14
1.2.3. Az ULK1 szerepe az autofágia szabályozásában .....	15
1.3. Az mTOR .....	16
1.3.1. Az mTOR komplexek felépítése .....	16
1.3.2. Az mTORC1 működése és szabályozása .....	17
1.3.3. Az mTORC1 szerepe az autofágia szabályozásában .....	19
1.4. Az AMPK .....	20
1.4.1. Az AMPK felépítése .....	21
1.4.2. Az AMPK szabályozása .....	21
1.4.3. Az AMPK szerepe az autofágia szabályozásában .....	22
1.4.3.1. Az AMPK hatása az ULK komplexre és az mTORC1-re .....	22
1.1.1.1. Az AMPK hatása VPS34 komplexre .....	22
1.4.3.1. Az AMPK autofágiára gyakorolt további hatásai .....	22
1.5. Az AMPK-ULK1-mTORC1szabályozási háromszög .....	23
1.6. Az AMPK-ULK1-mTORC1szabályozási háromszög működésének vizsgálata	
	25

1.6.1.	A matematikai modell jellemzői.....	25
1.6.2.	Bistabilitás .....	27
1.6.3.	Oscilláció .....	28
1.7.	Az endoplazmás retikulum stressz és az autofágia .....	29
1.7.1.	Az endoplazmás retikulum stressz .....	30
1.7.1.1.	Az UPR, avagy a „rosszul feltekeredett fehérje” válasz .....	30
1.7.1.2.	A GADD34 .....	32
1.8.	Az UPR és az mTORC1 közötti kapcsolat .....	32
1.8.1.	A GADD34 és az mTORC1 közötti kapcsolat.....	34
1.9.	A vizsgált szabályozási rendszer működését befolyásoló exogén vegyületek	35
1.9.1.	Rapamycin .....	36
1.9.2.	Resveratrol.....	36
1.9.3.	Epigallokatekin-gallát (EGCG) .....	37
2.	Célkitűzések .....	38
3.	Anyagok és módszerek.....	40
3.1.	Sejtvonal fenntartása .....	40
3.2.	RNAi alapú géncsendesítés és tranziens transzfekció .....	40
3.3.	A sejtek kezelése.....	40
3.4.	Életképességi vizsgálat .....	41
3.5.	Sejtszámolás Bürker-kamrával és Luna típusú automata sejtszámlálóval.....	42
3.6.	Fehérje-izolálás és a fehérje koncentrációjának mérése .....	42
3.7.	Western blot analízis.....	43
3.8.	Az egyes fehérjék mennyiségi meghatározása .....	45
3.9.	RNS-izolálás és PCR-analízis.....	45
3.10.	Immunfluoreszcens festés .....	46
3.11.	Statisztika .....	47
3.12.	Modellezés .....	48
4.	Eredmények.....	49

4.1. Az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási háromszög dinamikai viselkedésének vizsgálata.....	49
4.1.1. Az ULK1 csendesítésének vizsgálata.....	51
4.1.2. Az mTORC1 $\downarrow$ AMPK kapcsolattal kiegészített modell vizsgálata.....	54
4.1.3. Az AMPK aktivációs profiljának vizsgálata az mTORC1 gátlása esetén	56
4.1.4. Az ULK1 csendesítés kombinálása az mTORC1 gátlásával.....	57
4.1.5. Az AMPK gátlásának kombinálása az mTORC1 gátlásával .....	59
4.2. Az AMPK és az ULK1 közötti negatív visszacsatolási hurok dinamikai vizsgálata .....	61
4.2.1. Az AMPK és az ULK1 közötti direkt negatív visszacsatolás vizsgálata .	61
4.2.2. A tartós éhezés és rapamycin-kezelés hatásának vizsgálata.....	63
4.2.3. Az AMPK és az ULK1 közötti negatív visszacsatolás időbeni késleltetése	65
4.3. Az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási háromszög és az ER-stressz folyamatok közötti kapcsolat vizsgálata.....	69
4.4. Az autofágiás túlélési folyamatok időbeni kitolása .....	72
4.4.1. Az EGCG hatásának vizsgálata az autofágiára és az apoptózisra.....	72
4.4.2. Az EGCG-indukált autofágia vizsgálata .....	75
4.4.3. EGCG-kezelés hatásának vizsgálata ULK1-csendesítés esetén.....	77
4.4.4. Az EGCG-kezelés kombinálása intenzív ER-stresszrel .....	79
4.5. A GADD34-hiány negatív hatásainak kiküszöbölése.....	81
4.5.1. A GADD34 működésének gátlása inhibitorral.....	81
4.5.2. A GADD34 csendesítése siRNS-sel.....	83
4.5.2.1. Resveratrol-előkezelés GADD34 csendesítés esetén.....	84
4.5.2.2. EGCG-előkezelés a GADD34 csendesítése esetén.....	86
5. Megbeszélés.....	90
6. Következtetések.....	98
7. Összefoglalás .....	100
8. Summary.....	101
9. Irodalomjegyzék.....	102

10.	Saját közlemények.....	131
11.	Köszönetnyilvánítás .....	132
12.	Mellékletek jegyzéke:.....	133
1.	melléklet .....	134
2.	melléklet .....	137
3.	melléklet .....	139
4.	melléklet .....	142
5.	melléklet .....	145
6.	melléklet .....	147
7.	melléklet .....	150
8.	melléklet .....	157
9.	melléklet .....	170

## Rövidítésjegyzék

4E-BP1	eIF4E-binding protein 1
AMBRA1	autophagy/beclin 1 regulator 1
AMP, ADP, ATP	adenozin-monofoszfát, adenozin-difoszfát, adenozin-trifoszfát
AMPK	AMP-aktivált proteinkináz
ASK1	apoptosis signal-regulating kinase 1
ATF4	activating transcription factor 4
ATF6	activating transcription factor 6
ATG101	autophagy-related protein 101
ATG13	autophagy-related protein 13
BiP/GRP78	glucose-regulated protein78
CAMKK2	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2
CHOP	transcription factor C/EBP homologous protein
DFCP1	double FYVE containing protein 1
Drs	down-regulated by v-src
EGCG	epigallokatekin-gallát
eIF2 $\alpha$	eukaryotic transcription factor 2 $\alpha$
ER	endoplazmás retikulum
FIP200	focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa
FKBP12	12-kDa FK506-binding protein
FOXO3	forkhead box O3
GADD34	growth arrest and DNA damage-inducible 34
GB	guanabenz
GSK3	glycogen synthase kinase 3
HBZ	HTLV-1 basic leucine-zipper factor
HEK293	humán embrionális vese eredetű sejtvonat
HTLV-1	human T-cell leukemia virus type-1
IRE1	inositol requiring kinase 1
LKB1	liver kinase B1
mLST8	mTOR associated protein, LST8 homolog
mTORC1	mTOR komplex 1

mTORC2	mTOR komplex 2
p70S6K1	ribosomal protein S6 kinase beta-1 (S6K1)
PERK	protein kinase R-like ER kinase
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PI3P	foszfolipid foszfatidilinozitol 3-foszfát
PP1	protein phosphatase 1
PRKAA	5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha
PRKAB	5'-AMP-activated protein kinase subunit beta
PRKAG	5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma
REDD1	DNA damage response 1
RSK1	Ras/Erk/p90 riboszómális S6-kináz 1
S1P, S2P	site-1 protease, site-2 protease
Ser	szerin
STK36	szerin/treonin-kináz 36
TAK1	transforming growth factor beta-activated kinase 1
TAK1/MAP3K7	transforming growth factor beta-activated kinase 1/ mitogen-activated protein kinase 7
TFEB	transcription factor EB
TG	thapsigargin
Thr	treonin
TIP60	60-kDa Tat-interactive protein
TM	tunicamycin
TRAF6	TNF receptor associated factor 6
TSC1	hamartin
TSC1/TSC2	tuberous sclerosis (TSC) tumor suppressor complex
TSC2	tuberin
ULK1	unc-51-like kinase 1
UPR	unfolding protein response, „rosszul feltekeredett fehérje” válasz
VPS34	vacuolar protein sorting 34
VSV	vesicular stomatitis virus
WIPI2B	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2
XBP-1	X-box binding protein-1



## Ábrák és táblázatok jegyzéke

1. ábra. A makroautofágia folyamata. ....	9
2. ábra. Az autofagoszóma képződése. ....	11
3. ábra. A fagofór membránjának hosszabbítását végző konjugációs rendszerek, az ATG5-ATG12-ATG16L1 komplex és az LC3 II-es formájának képződése (4). ....	12
4. ábra. Az ULK komplex poszttranszlációs módosításai. ....	15
5. ábra. Az mTOR szabályozási hálózat. ....	18
6. ábra. Az autofágia mTORC1 általi szabályozása. ....	19
7. ábra. Az autofágia szabályozása az AMPK által. ....	23
8. ábra. Az autofágia szabályozása az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási háromszög által. ....	24
9. ábra. A modell sematikus hálózati ábrája. ....	26
10. ábra. A rendszer egyensúlyi (bifurkációs) vizsgálata, ha az ULK1 és az AMPK között hiányzik a negatív visszacsatolás. ....	27
11. ábra. Az AMBRA1 és az EIF4EBP1 foszforiláció idő-függése különböző stimulusok hatására. ....	29
12. ábra. Az endoplazmás retikulum stressz hatására aktiválódó UPR jelzés. ....	31
13. ábra. Az UPR és az mTORC1 közötti kapcsolat. ....	33
14. ábra - A rapamycin, a resveratrol és az epigallokatekin-gallát szerkezeti képlete. ...	35
15. ábra. Az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási háromszög. ....	49
16. ábra. A reprodukált modellel végzett időbeni szimulációk eredményei. ....	50
17. ábra. Az ULK1-csendesítés hatásának vizsgálata. ....	52
18. ábra. Az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási háromszög kiegészítése a feltételezett kapcsolattal. ....	53
19. ábra. Az általunk felépített modellel végzett időbeni szimulációk. ....	55
20. ábra. Az AMPK aktivációjának vizsgálata az mTORC1 gátlása esetén. ....	56
21. ábra. Az ULK1 csendesítésének kombinálása az mTORC1 gátlásával. ....	58
22. ábra. Az AMPK gátlásának kombinálása az mTORC1 gátlásával. ....	60
23. ábra. A felépített modellünkben az AMPK és az ULK1 közötti direkt negatív visszacsatolási hurok vizsgálata. ....	62
24. ábra. A tartós éhezés és rapamycin-kezelés hatásának vizsgálata. ....	63
25. ábra. A tartós rapamycin-kezelés hatásának további vizsgálata. ....	65

26. ábra. Az AMPK és az ULK1 közötti negatív visszacsatolási hurok időbeni késleltetésének lehetséges módjai. ....	66
27. ábra. Az AMPK és az ULK1 közötti kapcsolatnak egy köztes fehérjével való kiegészítése.....	67
28. ábra. Az ULK1 több lépcsőben történő foszforilációja az AMPK által.....	68
29. ábra. A GADD34 gátlás kombinálása intenzív ER-stresszel. ....	71
30. ábra. Az EGCG-kezelés hatásának vizsgálata.....	74
31. ábra. Az EGCG-kezelés hatásának vizsgálata mTORC1- és PKA-gátlószerekkel történő kombináláson keresztül.....	76
32. ábra. Az EGCG-kezelés kombinálása az ULK1 csendesítésével.....	78
33. ábra. Az EGCG-kezelés kombinálása TG-indukált intenzív ER-stresszel.....	80
34. ábra. Az EGCG-kezelés kombinálása TG-indukált intenzív ER-stresszel a GADD34 gátlása esetén. ....	82
35. ábra. A resveratrol-kezelés kombinálása TG-indukált intenzív ER-stresszel a GADD34 csendesítése esetén (I.).....	84
36. ábra. A resveratrol-kezelés kombinálása TG-indukált intenzív ER-stresszel a GADD34 csendesítése esetén (II.).....	85
37. ábra. Az EGCG-előkezelés kombinálása TG-indukált intenzív ER-stresszel a GADD34 csendesítése esetén (I.).....	87
38. ábra. Az EGCG-előkezelés kombinálása TG-indukált intenzív ER-stresszel a GADD34 csendesítése esetén (II.).....	88
39. ábra. A munkánk során vizsgált szabályozási hálózat felépítése. ....	93
1. táblázat. A kezelésekhez használt stresszorok, a kezelési koncentrációk és időtartamok.....	41
2. táblázat. A Western blothoz használt elsődleges antitestek és alkalmazásuk körülményei.....	44

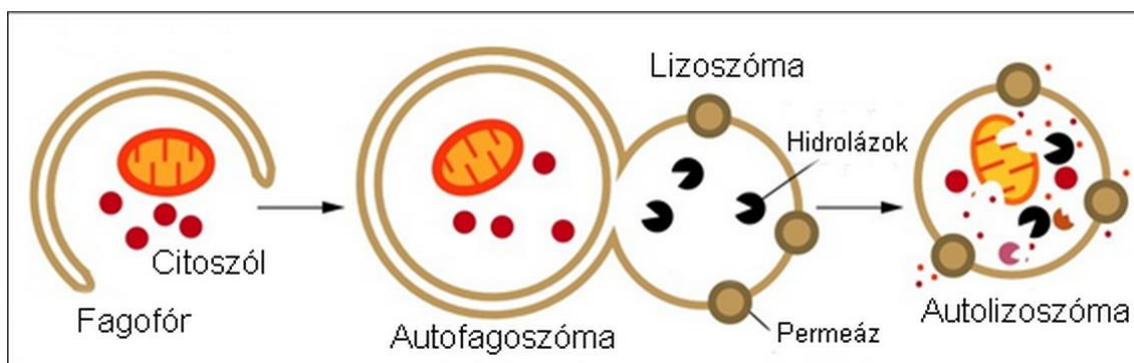
## 1. Irodalmi háttér

A sejt homeosztázisának fenntartását, a fehérjeszintézis és lebontás közötti egyensúlyt (proteosztázis) számos szabályozási hálózat összehangolt működése teszi lehetővé. Különböző környezeti hatásokra vagy stresszre reagálva a sejtek megpróbálnak egy korábbi homeosztatis állapotba kerülni, de ha ez nem lehetséges, akkor sejthalál folyamatok indukálódnak.

A sejt önfenntartó folyamatait specializált sejt szervecskék működési zavarai is befolyásolhatják, így például az endoplazmás retikulum stressz. A stressz-válasz során a sejtek élet és halál közötti döntését az autofágia és az apoptózis folyamatainak összehangolása, azaz az ezeket szabályozó fehérjekomplexek (mTORC1, AMPK) és jelátviteli utak (UPR – nem feltekeredett fehérje válasz) közötti kölcsönhatások határozzák meg.

### 1.1. Az autofágia

A makroautofágia (a továbbiakban autofágia) az eukarióta sejtekben egy evolúciósan konzervált dinamikus folyamat, mely során a citoplazma komponenseit tartalmazó, kettős membránnal határolt vezikulák jönnek létre. A folyamat végén a vezikulák a lizoszómákkal történő fúziót követően lebontásra kerülnek (1-3) (1. ábra).



1. ábra. A makroautofágia folyamata.

A citoszólban létrejön a kettősmembrán határolt vezikula, ami a lizoszómával történő egyesülést követően autolizoszómává alakul (4).

Az autofágia fontos szerepet játszik a sejtek homeosztázisának fenntartásában (1), illetve hozzájárul a sejtek túléléséhez a citoplazma komponenseinek lebontásával és azok újbóli felhasználásával (5). Az éhezés és más stresszfolyamatok során prekursorokat és energiát biztosíthat a sejt számára (3, 6).

Az autofágia szabályozási zavara számos humán kórkép kialakulásában megfigyelhető, mint például a neurodegeneratív és metabolikus betegségek (6, 7), a rák (7), az öregedés (8), és különböző fertőzések (6) esetén.

### *1.1.1. Az autofágia indukciója és nukleációja*

Az autofágia indukciója és nukleációja bonyolult folyamatok, amelyeket két fehérjekomplex az ULK és a VPS34 irányít (1).

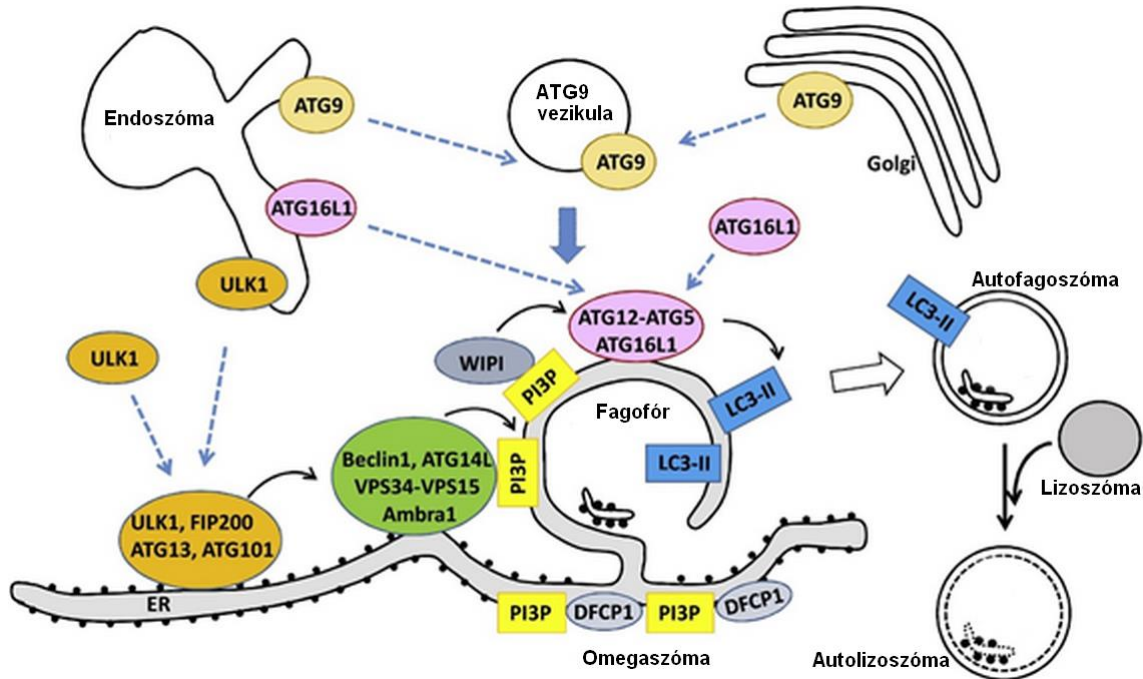
#### *1.1.1.1. Az ULK komplex és az autofágia indukciója*

Az autofágia az ULK komplex képződésével és aktiválódásával kezdődik. Az ULK komplex tagjai az ULK1 (unc-51-like kinase 1), az ATG13 (autophagy-related protein 13), a FIP200 (focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa) és az ATG101 (autophagy-related protein 101). Az autofágia indukciója során az ULK komplex az autofágia iniciációs helyére szállítódik, mely az endoplazmás retikulum (ER) foszfatidilinozitol 3-foszfát (PI3P) gazdag régiója, más néven az omegaszóma (1). A kialakult ULK komplex szabályozza a VPS34 (vacuolar protein sorting 34) komplex felépülését (1) (2. ábra).

#### *1.1.1.2. A VPS34 komplex és az autofágia nukleációja*

A nukleáció során a fagofór membránjának növekedéséhez szükséges molekulák szállítódnak az omegaszóma felé, amiben kulcs szerepe van a VPS34 komplexnek. A VPS34 komplex tartalmazza a VPS34-et, a Beclin-1-et, a VPS15-öt és az ATG14L-t. A létrejött komplex foszfatidilinozitolból képez PI3P-t az autofagoszóma képződés helyén (9) (2. ábra).

A létrehozott PI3P szükséges a PI3P-kötő fehérjék megfelelő lokalizációjához, mivel ezek a fehérjék (WIPI2B, DFCEP1) segítik a későbbiekben a fagofór membránjának meghosszabbítását (9) (2. ábra).



2. ábra. Az autofagoszóma képződése.

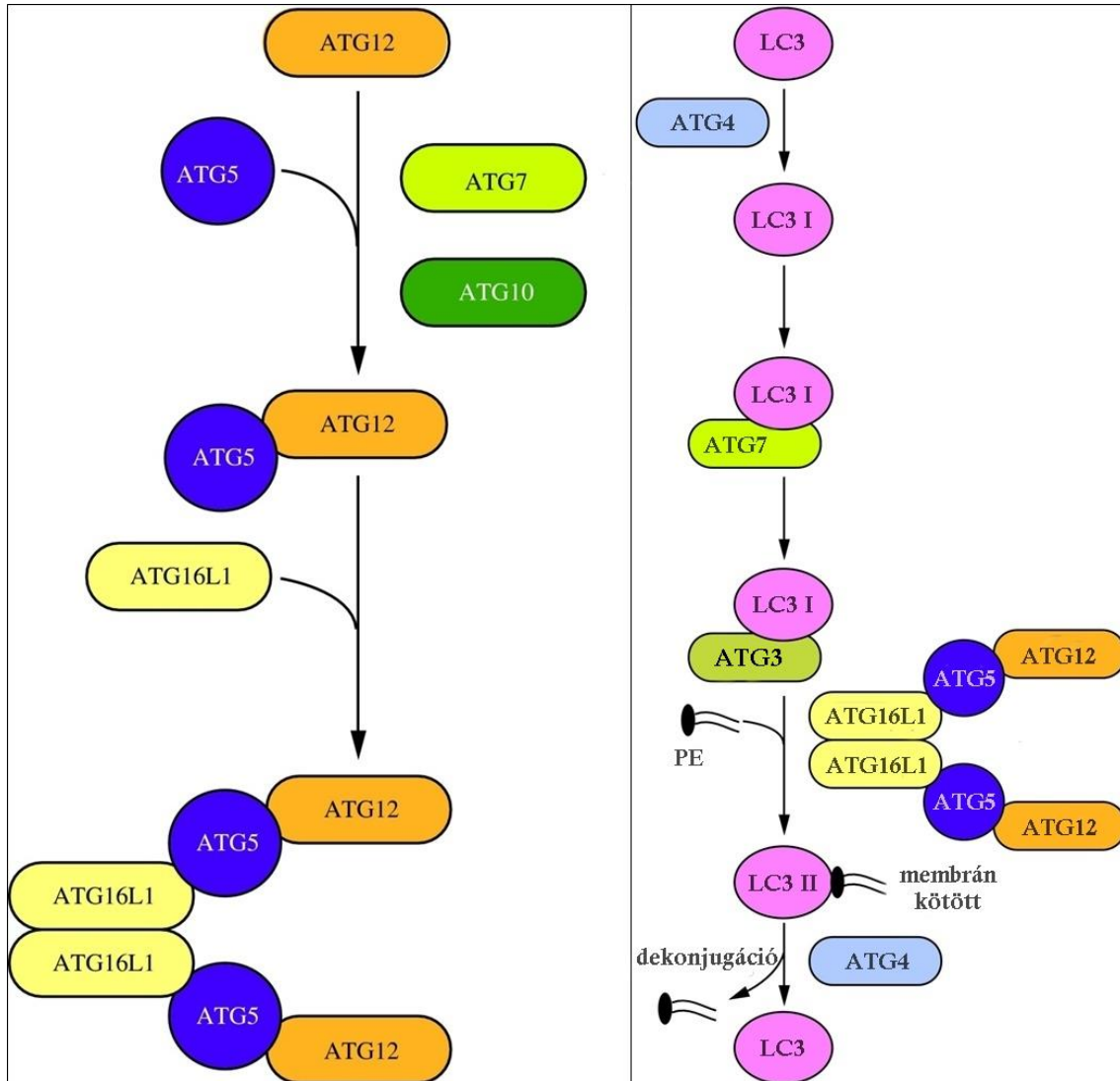
Az autofagoszóma képződésében résztvevő fehérjék, fehérjekomplexek és organellemek (1).

### 1.1.2. A fagofór membránjának meghosszabbítása, az elongáció

Emlősökben a fagofór membránjának hosszabbítását két konjugációs rendszer végzi. A folyamat során először az ATG12-ATG5-ATG16L1 komplex jön létre. Az ATG7 aktiválja az ATG5-öt, ezt követően az ATG10 konjugálja hozzá az ATG12-t, végül pedig az ATG16L1 köt az ATG5-höz nem-kovalens módon (4) (3. ábra).

A membrán hosszabbításához szükséges másik rendszer az LC3 konjugációját végzi. Az ATG4 hasítja az LC3-at, melynek hatására az LC3 C-terminálisán egy glicin jelenik meg, így létrejön az LC3 I-es formája. Az ATG7 aktiválja az LC3 I-et és az ATG3-hoz szállítja. Ezután az ATG16L1-ATG5-ATG12 komplex ligázként konjugálja az LC3 I-et a membránban levő foszfatidil-etanolaminhoz, és így létrejön az LC3 II-es formája (4). Az ATG4 felelős az LC3 II LC3 I-é történő átalakításáért is, mivel képes levágni az LC3 II-t a membránról (10) (3. ábra).

Az emlős ATG8 fehérjecsalád tagjai (LC3A, LC3B, LC3C, GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2) fontos szerepet játszanak a lebontandó komponensek felismerésében, az autofagoszóma membránjának bezáródásában és a lizoszómával történő fúzióban (1). Az LC3-at széles körben használják autofagoszóma markerként molekuláris biológiai kísérletek során (9).



3. ábra. A fagofór membránjának hosszabbítását végző konjugációs rendszerek, az ATG5-ATG12-ATG16L1 komplex és az LC3 II-es formájának képződése (4).

Az ATG9 az egyetlen olyan emlős transzmembrán fehérje, amely részt vesz az autofágiában, de pontos szerepe még nem teljesen tisztázott. Az ATG9 a Golgi komplexből és az endoszómákból az autofagoszóma képződés helyére szállítódik, majd az ATG9 tartalmú vezikulák fuzionálnak az ATG16L1 tartalmú vezikulákkal, ezzel is növelve az autofagoszómák membránjának méretét (3, 9).

### 1.1.3. Szállító receptorok

Az autofágiával lebontani kívánt működésképtelen mitokondriumok, peroxiszómák, aggregálódott fehérjék és különböző fertőző ágensek autofágia receptorokon keresztül szelektíven bontódnak le. Ilyen autofágia-receptorfehérje például a p62. A receptorfehérjék egyrészt hozzákapcsolódnak a szállítmányukhoz, gyakran ubiquitinált helyeken keresztül, másrészt egy másik doménjükön keresztül az autofagoszóma membránjához is kötődnek. Az autofagoszóma membránjához kapcsolódó domén leggyakrabban a LIR domén, amely az LC3 fehérjével képes kölcsönhatásba lépni (11).

### 1.1.4. Az autofagoszóma fúziója a lizoszómaival

Miután kialakult az autofagoszóma, fuzionálnia kell a lizoszómaival és/vagy egy endoszómaival, hogy autolizoszómává váljon és a benne levő tartalom lebontásra kerüljön (4, 9). Ennek az időzítése nagyon fontos, mert csak akkor történhet meg, ha a fagofór membránja már bezáródott. Emiatt a fúziót szabályozó faktoroknak csak az érett autofagoszómat szabad felismerniük (9).

Emlősökben az autofagoszóma lizoszómaival történő fúziójának előfeltételei még nem teljesen ismertek, de az már biztos, hogy néhány fehérje, mint például az ATG16L1 és az ULK komplex, ami a fagofór képződéséhez szükséges, hiányzik az érett autofagoszómaiból (9).

## 1.2. Az ULK1

A *S. cerevisiae*-ben megtalálható Atg1 szerin/treonin kináz emlős ortológja az ULK1. Az ULK1 fehérje kináz doménjének homológjai az ULK2, az ULK3, az ULK4 és a STK36 (szerin/treonin kináz 36) (12).

Az autofágiás folyamatokban az ULK1 mellett az ULK2 is szerepet játszik. Az ULK1 és az ULK2 fehérjék szekvenciája megközelítőleg 52%-ban, míg a kináz doménjük 78%-ban egyezik meg (12). A legtöbb sejtvonalban, például HEK293 (humán embrionális vese-sejtek) sejtekben az autofágia nem aktiválódott ULK1 hiány esetén (13).

Azonban egerekben az ULK1 és az ULK2 kiütése egyaránt szükséges volt ahhoz, hogy ugyanazt az újszülöttkori letalitást tudják megfigyelni, mint más autofágiás gének (ATG5 és ATG7) kiütése esetén (14, 15). Ezért valószínű, hogy bizonyos mértékben az ULK2 képes helyettesíteni az ULK1-et az autofágiás folyamatokban (13).

Az ULK1 kináz aktivitása elengedhetetlen az autofágia iniciációjához, mivel az ULK1 kináz hiánymutásokban vagy az ULK1 enzimatis aktivitásának kémiai ágenssel való gátlásakor nem figyeltek meg autofágia aktiválódását (16-18).

### *1.2.1. Az ULK komplex*

Az ULK komplexet az ULK1, az ATG13, a FIP200 és az ATG101 fehérjék alkotják (19-22). Az ULK1 kináz aktivitása és stabilitása növekszik az ATG13-mal és a FIP200-zal kialakított kapcsolat hatására (20-22). A komplexhez az ATG101 az ATG13-on keresztül kapcsolódik, ami szükséges a megfelelő autofágiához (19, 23).

### *1.2.2. Az ULK komplex szabályozása*

Az ULK komplex több útvonal csomópontjaként számos stresszhatás nyomán képes az autofagoszómák képződését beindítani (12).

Megfelelő tápanyag-ellátottság esetén az mTORC1 foszforilálja az ULK1 és az ATG13 több aminosavát is (20-22) (4. ábra). A foszforiláció hatására az ULK1 elveszti katalitikus aktivitását és így az autofágia gátódik. Ezzel párhuzamosan az ATG13 foszforilációja is negatívan hat az ULK1 aktivitására (24).

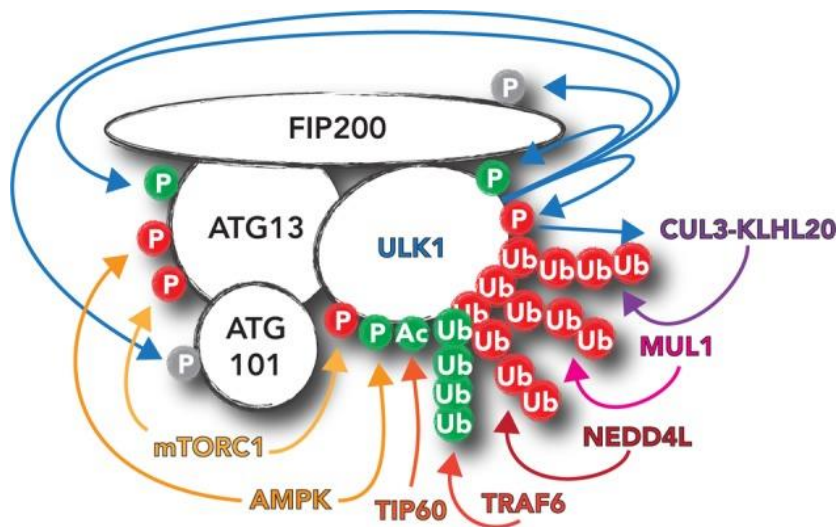
Az mTORC1 indirekt módon, az AMBRA1 foszforilációjával is képes szabályozni az ULK1 fehérje aktivitását. Az AMBRA1 szállítja a TRAF6-ot (TNF receptor associated factor 6), ami ubiquitinálja az ULK1-et a Lys63-as aminosavon, ezzel hozzájárulva az ULK1 önasszociációjának, stabilitásának és aktivitásának fokozásához (25).

Aminosav megvonás esetén azonban az mTORC1 inaktiválódik, ennek hatására pedig mind az ULK1, mind az ATG13 gyorsan defoszforilálódik (12). Az aktiválódó AMPK foszforilálja az ULK1 több aminosavát; ez a foszforiláció lehet aktiváló és gátló hatású is (24, 26) (4. ábra). Az AMPK eddig azonosított foszforilációs helyei az ULK1-en a következők: Ser317, Ser467, Ser555, Thr574, Ser637 és Ser777 (12).



Az AMPK az ATG13-at a Ser224-es aminosavon foszforilálja és ezzel csökkenti az ULK komplex aktivitását (24). Ezeknek a foszforilációs eseményeknek az időzítése döntő jelentőségű lehet az autofágiás folyamatok lefolyásának szempontjából (12), és az AMPK szerepe az ULK komplex szabályozásában nélkülözhetetlen „finomhangolást” biztosít az autofágia pontosabb és hatékonyabb irányításában (24).

Növekedési faktorok megvonása esetén a GSK3 (glycogen synthase kinase 3) foszforilációval aktiválja az acetiltranszferáz TIP60-at (60-kDa Tat-interactive protein). Az aktiválódott TIP60 acetilálja az ULK1-et, ezzel is segítve az ULK1 aktiválódását (27) (4. ábra).



4. ábra. Az ULK komplex poszttranszlációs módosításai. Az ULK komplex számos módosításon megy keresztül: foszforiláció (P), acetiláció (Ac) és ubiquitináció (Ub). A zölddel jelölt módosítások aktivációt, míg a pirossal jelöltek gátlást jelentenek (12).

### 1.2.3. Az ULK1 szerepe az autofágia szabályozásában

Az autofágia indukálódásakor az ULK1 autofoszforilálja saját magát több aminosavon, úgymint a Thr180-on, a Ser1042-n és a Thr1046-on keresztül. Ezután az ULK1 foszforilálja az ULK komplex tagjait, az ATG13-at a Ser318-as, a FIP200-at a Ser943-as, a Ser986-os, a Ser1323-as és az ATG101-et a Ser11-es, a Ser203-as aminosavakon (12, 18, 20-22) (4. ábra).

Az autofágiás folyamatok további „finomhangolását” és a folyamat robusztusságát az biztosítja, hogy az ULK1 több szinten is szabályozza a VPS34 komplex működését (28). Az autofágia iniciációja során az ULK1 foszforilálja a VPS34 komplex tagjait, a Beclin-1-et a Ser14-es, az ATG14L-et a Ser29-es, és a VPS34-et a Ser249-es aminosavakon, ami a VPS34 komplex megnövekedett aktivitásához és PI3P termelődéséhez vezet (18, 29, 30). Az ULK1 az AMBRA1 fehérje foszforilációján keresztül is szabályozza a VPS34 komplexet. A Beclin-1-hez kötött AMBRA1 segíti a Beclin-1 citoskeletonhoz való kötését. Az AMBRA1 foszforilációjának hatására azonban a Beclin-1 disszociálódik a citoskeletonról és a VPS34 komplex az autofágia iniciációs helyére kerül át (31). A VPS34 pedig pozitív visszacsatolással hat az ULK komplexre, mivel a megnövekedett PI3P termelés megnövekedett ULK1 termeléshez vezet (28).

Az ATG9 az ULK1 hatására helyeződik át az autofagoszóma képződés helyére, ahol részt vesz a membrán meghosszabbításában (32).

Az ULK1-nek szerepe van az ubiquitin-szerű konjugációs mechanizmus szabályozásában, mivel az ATG4 proteáz foszforilálásán keresztül hozzájárul az LC3 átalakítási folyamatok szabályozásához (10).

### 1.3. Az mTOR

Az mTOR szerin/treonin-kináz a sejtanyagcsere egyik legfontosabb szabályozója. Az mTOR irányítja a sejt növekedését, a proliferációt és fontos szerepe van az autofágia szabályozásában is (33, 34).

Az mTOR szabályozási hálózat számos humán kórkép esetén érintett, mint a cukorbetegség, a neurodegeneratív és a daganatos megbetegedések, ezért ezekben a betegségekben az őt gátló szereknek terápiás jelentősége lehet (33, 34).

#### *1.3.1. Az mTOR komplexek felépítése*

Az mTOR több fehérjével kapcsolódva, két különböző komplexet képezhet: az mTOR komplex 1-et (mTORC1) és az mTOR komplex 2-t (mTORC2) (5. ábra).

Az mLST8, a DEPTOR és a Tti1/Tel2 komplex egyaránt megtalálható az mTORC1-ben és az mTORC2-ben (35-38). Ezeken kívül az mTORC1 tartalmazza a RAPTOR és a PRAS40 fehérjéket (39-44), míg az mTORC2 a RICTOR, az mSin1 és a PROCTOR1/2 fehérjékből épül fel (43, 45-49) (5. ábra).

A továbbiakban csak az autofágia szabályozásában fontos mTORC1 működését és szabályozását tekintjük át részletesen.

### *1.3.2. Az mTORC1 működése és szabályozása*

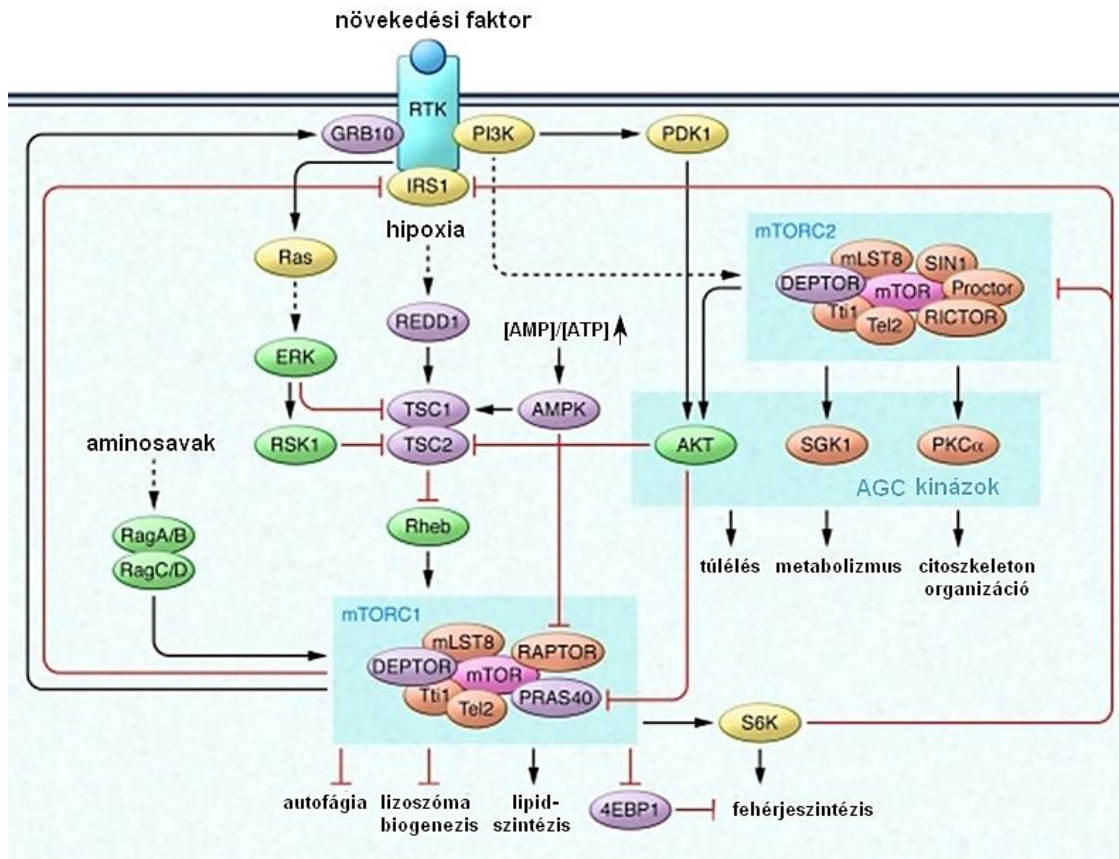
Az mTORC1 elősegíti a sejtben a felépítő folyamatokat azáltal, hogy biztosítja a szükséges építőanyagokat a sejt növekedéséhez és proliferációjához. Hozzájárul a fehérjék, lipidek és nukleotidok felépítéséhez, valamint transzkripciós és poszttranszlációs szinten is gátolja a lebontó folyamatokat, beleértve az autofágiát (50, 51).

Az mTORC1 által szabályozott legfontosabb fehérjék a 4E-BP1 (eIF4E-binding protein 1) és a p70S6K1 (ribosomal protein S6 kinase beta-1 (S6K1)). A 4E-BP1 gátolja a transzláció elindulását azzal, hogy köt az eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4E-hez (eIF4E). Az mTORC1 általi foszforiláció hatására a 4E-BP1 leválik az eIF4E-ről és a fehérjeszintézis elindul. Az mTORC1 foszforilációval aktiválja a p70S6K1-et. A p70S6K1 egy szerin/treonin kináz, amely foszforilálja az S6 riboszómális fehérjét, ezáltal indukálja a fehérje és a riboszóma bioszintézisét (52) (5. ábra).

A celluláris stresszorok, mint az alacsony energiatöltöttség vagy a hipoxia hatására aktiválódó TSC1/TSC2 (tuberous sclerosis (TSC) tumor suppressor complex) komplex a GAP aktivitása révén gátolja az mTORC1-et aktiváló Rheb GTPáz működését (5. ábra) (53, 54). A Rheb kis G-fehérje, GTP kötött aktív állapotában köt az mTORC1-hez, aminek hatására az mTORC1 konformációja megváltozik ezáltal pedig allosztérikusan segíti elő az aktiválódását (55). A TSC1 (hamartin) és a TSC2 (tuberin) mutációja számos szövetben tumorok képződését okozta, míg a TSC1 és TSC2 hiány mutánsokban az mTORC1 kóros aktivációját figyelték meg, ami szabályozatlan növekedéshez vezetett (53, 54). Az AMPK képes foszforilálni a TSC2-t és növelni a TSC1/2 komplex GAP aktivitását (56), így hozzájárul a TSC1/2 komplex hatásához az mTORC1-en.

Emellett az AMPK az mTORC1 komplex RAPTOR alegységét is foszforilálja, így közvetlen negatív hatást is gyakorol a komplex működésére (57) (5. ábra).

Az alacsony celluláris oxigén szint a REDD1-en (DNA damage response 1) keresztül aktiválja a TSC2-t és így gátolja az mTORC1 működését (58, 59) (5. ábra).



5. ábra. Az mTOR szabályozási hálózat.

Az mTOR két különálló komplexet képez az mTORC1-et és az mTORC2-t. Az mTORC1-re a növekedési faktorok és a tápanyagok hatnak, aktiválja a felépítő folyamatokat, mint a fehérje- és lipidszintézis és gátolja a lebontó folyamatokat, mint az autofágia (33).

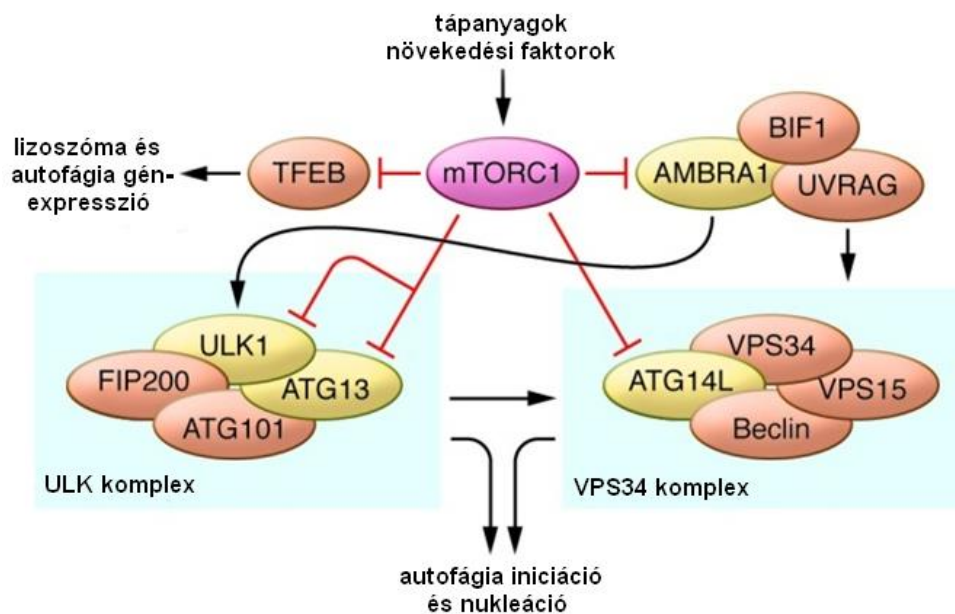
A növekedési faktorok, mint az inzulin és az IGF, indukálják a növekedési faktor receptorokat, aminek hatására aktiválódik a PI3K/AKT útvonal. Az AKT foszforilációval gátolja a TSC1/2 fehérjéket (53, 60, 61), így a TSC1/2 komplex nem jön létre, ez pedig elősegíti a Rheb kis G-fehérje aktiválódását (62-64). Mivel a Rheb aktiválja az mTORC1-et, ezért a TSC1/2 komplex működésének AKT-függő gátlása hozzájárul az mTORC1 aktiválódásához (65, 66). Emellett az AKT foszforilációval gátolja a PRAS40 működését, ami az mTORC1 komplexet gátolná (41-44) (5. ábra). Az mTORC2 foszforilálja az AKT-ot, így hozzájárul az aktiválódásához. Ezzel az AKT kapcsolatot teremt az mTORC1 és az mTORC2 komplexek között (67) (5. ábra).

A növekedési faktor receptor indukálja a Ras/Erk/p90 riboszómális S6 kináz 1 (RSK1) jelátviteli útvonalat is, ami szintén hozzájárul a TSC2 GAP aktivitásának gátlásához (68, 69) (5. ábra).

Tápanyag-ellátottságtól függően a jelenlevő aminosavak a Ragulator GTPázokon keresztül (Rag A, B, C, D) közvetlenül aktiválhatják az mTORC1 működését (70, 71) (5. ábra).

### 1.3.3. Az mTORC1 szerepe az autofágia szabályozásában

Az mTORC1 (élesztőben TORC1) genetikai vagy farmakológiai ágensekkel történő gátlása az autofágia indukálódását okozza, amit először élesztőben (72), majd később ecetmuslicában mutattak ki (73).



6. ábra. Az autofágia mTORC1 általi szabályozása.

A tápanyagok és növekedési faktorok hatására aktiválódó mTORC1 több fehérje foszforilációján keresztül (ULK1, ATG13, ATG14L, AMBRA1) gátolja az autofágiát, amelyek az autofágia iniciációjához és nukleációjához járulnak hozzá. Ezenkívül az mTORC1 foszforilálja a transzkripciós faktor TFEB-et megakadályozva a sejtmagba történő transzlokációját (33).

Három kutatócsoport egymástól függetlenül azt figyelte meg, hogy az mTORC1 az ATG13 és az ULK1/2 foszforilációján keresztül gátolja az ULK komplex működését (6. ábra). Abban az esetben, amikor gátolták az mTORC1 működését, az ULK1/2 kináz aktivitása növekedett (20-22).

Az mTORC1 az ULK1 foszforilációjával megakadályozza, hogy az AMPK és az ULK1 között kapcsolat alakuljon ki, azáltal pedig az ULK1 aktiválódjon (26). Emellett az mTORC1 csökkenti az ULK1 fehérje stabilitását az AMBRA1 foszforilációján keresztül (25) (6. ábra).

Ezzel párhuzamosan az mTORC1 foszforilálja az ATG14L fehérjét és gátolja a VPS34 lipid kináz aktivitását, ezáltal megakadályozza az autofágiát (74) (6. ábra).

A TFEB (transcription factor EB) a lizoszómális és autofágiás gének transzkripciós szabályozója (75). Transzkripciós aktivitása a sejt tápanyag-ellátottságától és a citoplazma és a sejtmag közötti megoszlásától függ (76). Az mTORC1 a Ser142-es és a Ser211-es aminosavakon foszforilálja a TFEB-et. Ennek nyomán a TFEB inaktív állapotba kerül és ez megakadályozza a sejtmagból a citoplazmába történő transzlokációját (77). Így az mTORC1 a TFEB-en keresztül transzkripciós szinten is szabályozza az autofágiát (75) (6. ábra).

Az mTORC1 az autofágiás folyamatok aktiválódása esetén gátlódik, azonban a lebontó folyamatokból származó energia- és tápanyag-felszabadulás hatására képes újra aktiválódni, ami szükséges az új lizoszómák képződéséhez (78).

#### 1.4. Az AMPK

Eukarióta sejtekben az AMPK a fő energia-érzékelő kináz, amely számos folyamatot szabályozva képes hatni a metabolikusan releváns fehérjékre és azok expressziójára (79, 80).

A sejt energiaszintjének csökkenésekor az AMPK képes aktiválni és szabályozni különböző metabolikus enzimeket és energiatermelő útvonalakat, mint például a lipid- és szénhidrát-anyagcserét és a mitokondriumok biogenezisét. Annak érdekében, hogy a sejt ATP-felhasználása csökkenjen, az AMPK gátolja a felépítő útvonalakat, így a szénhidrátok, lipidek és fehérjék szintézisét is (79, 80). Ezzel ellentétesen az AMPK fokozza a lebontó folyamatokban résztvevő transzkripciós faktorok aktivitását, hogy elősegítse az ATP-termelést (79, 80).

### 1.4.1. Az AMPK felépítése

Az AMPK evolúciósan konzervált, heterotrimer szerkezetű szerin/treonin-kináz, amely emlős sejtekben a katalitikus  $\alpha$  és a szabályozó  $\beta$  és  $\gamma$  alegységekből épül fel (81).

Az alegységeket három különböző gén kódolja:

- PRKAA (5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha),
- PRKAB (5'-AMP-activated protein kinase subunit beta),
- PRKAG (5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma) (82).

Minden alegységnek több izoformája is létezik, így az  $\alpha$  katalitikus alegységnek kettő ( $\alpha 1$  és  $\alpha 2$ , a PRKAA1 és a PRKAA2 géneken kódolva), a  $\beta$  alegységnek kettő ( $\beta 1$  és  $\beta 2$ , a PRKAB1 génen kódolva), míg a  $\gamma$  alegységnek három ( $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  és  $\gamma 3$ , a PRKAG1, a PRKAG2 és a PRKAG3 géneken kódolva) (82).

Az  $\alpha$  katalitikus alegység N-terminális régiója tartalmaz egy szerin/treonin-kináz domént, valamint egy kitüntetett foszforilációs helyet, a Thr172-t. Ezt a konzervált foszforilációs helyet számos különböző kináz képes foszforilálni, és ezen keresztül szabályozni az AMPK aktivitását (83).

### 1.4.2. Az AMPK szabályozása

Az LKB1 (Liver kinase B1) energiaszresszek esetén, míg a CAMKK2 (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2) az intracelluláris kalciumszintek megváltozásának hatására képes foszforilálni az AMPK-on a Thr172-es aminosavat (84, 85). Ezeken kívül kimutatták, hogy a MAPKKK család egyik tagja, a TAK1/MAP3K7 (Transforming growth factor beta-activated kinase 1/ Mitogen-activated protein kinase 7) is foszforilálja az AMPK-t (86, 87).

Az AMP képes önmagában aktiválni az AMPK-t és allosztérikus modulációval fokozni a Thr172-es pozíció autofoszforilációját (88, 89). Ha a foszforiláció már megtörtént a Thr172-es aminosavon, az AMP allosztérikusan tovább fokozza az AMPK aktivitását és megakadályozza ennek a pozíciónak a defoszforilálódását (90, 91).

A  $\gamma$  alegység az AMP/ATP vagy az ADP/ATP arány megváltozását érzékeli, függetlenül az  $\alpha$  alegység foszforilációjától (92).

### *1.4.3. Az AMPK szerepe az autofágia szabályozásában*

#### *1.4.3.1. Az AMPK hatása az ULK komplexre és az mTORC1-re*

Az AMPK pro-autofágiás stimulusok hatására számos aminosav-oldalláncon foszforilálja az ULK1-et, ezáltal aktiválja az ULK komplexet és pozitívan hat az autofágiás folyamatok iniciációjára (93) (7. ábra).

Emellett az AMPK az mTORC1 aktivitását több módon is gátolni képes, így megszünteti az ULK komplexen az mTORC1 gátló hatását (93). Egyrészt az AMPK aktiválja a TSC2 fehérjét a Thr1227-es és a Ser1345-ös aminosavak foszforilációjával és elősegíti a TSC1/TSC2 heterodimer képződését (56). Másrészt az AMPK gátolja a RAPTOR fehérjét a Ser722-es és a Ser792-es aminosavakon történő foszforiláción keresztül (57) (7. ábra).

#### *1.1.1.1. Az AMPK hatása VPS34 komplexre*

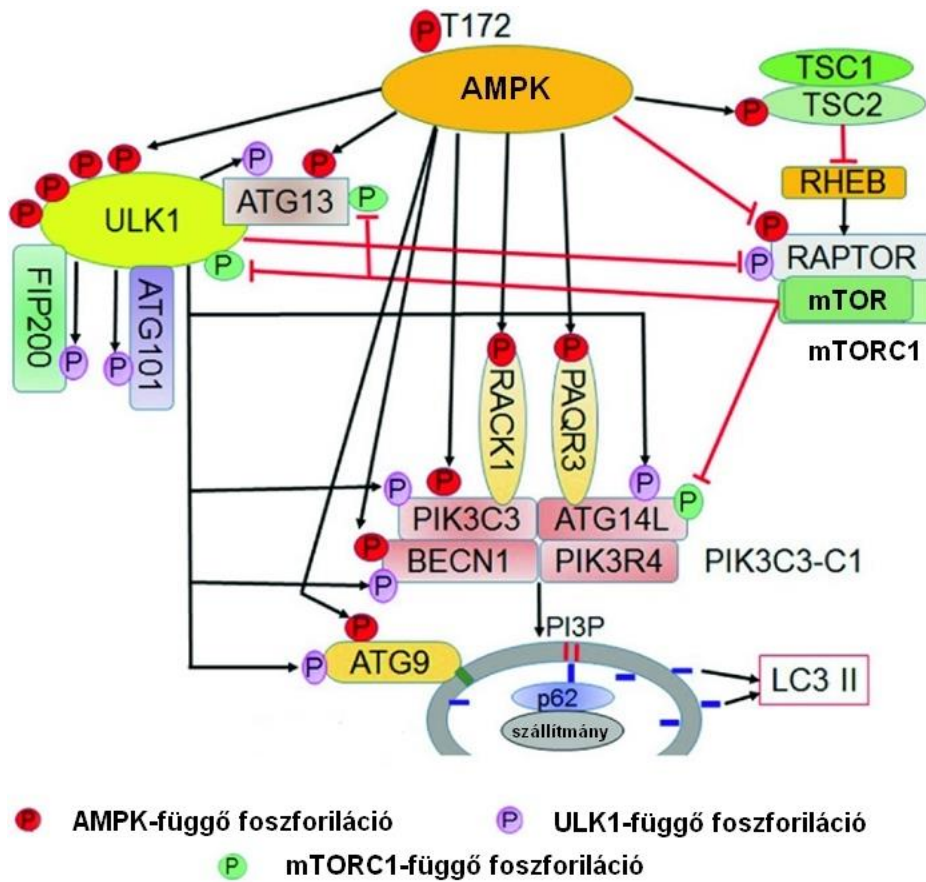
Az AMPK képes a VPS34 komplex különböző alegységeinek működését foszforiláción keresztül is befolyásolni. A sejt energia állapotának függvényében az AMPK szabályozza a VPS34 tartalmú komplexek mennyiségét a VPS34 foszforilációján keresztül, ezáltal módosítva a komplex tagjainak egymáshoz való affinitását. Autofágiát aktiváló körülmények között az AMPK a Beclin-1 foszforilációjával fokozza a VPS34 és a pro-autofágiás VPS34 komplexek aktivitását (94). A Beclin-1 Thr388-as aminosavon történő foszforilációjával növeli a Beclin-1 kötődését a VPS34 és az ATG14 fehérjékhez, ami erősebb autofágiás aktivitást eredményez (94, 95) (7. ábra).

#### *1.4.3.1. Az AMPK autofágiára gyakorolt további hatásai*

Az AMPK képes foszforilálni az ATG9-et a Ser761-es aminosavon, ezáltal elősegítve az ATG9 tartalmú vezikulák LC3-tartalmú vezikulákká való átalakulását (96) (7. ábra). Stressz hatására az AMPK foszforilálja a FOXO3 (Forkhead box O3) és a TFEB/TFE transzkripciós faktorokat és egyéb, a transzkripciót szabályozó fehérjéket is (81).



Ezek a transzkripciós faktorok és szabályozó fehérjék a lizoszómák képződésében és az autofágia végrehajtásában részt vevő génekre hatnak (81).

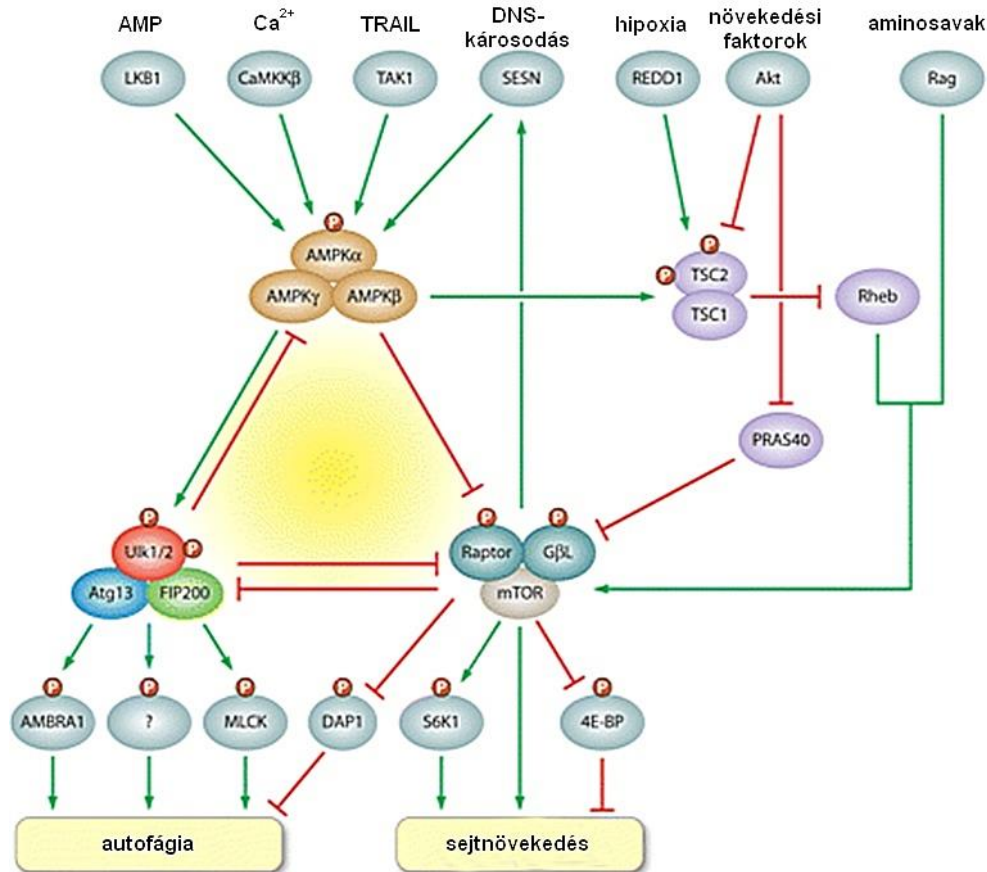


7. ábra. Az autofágia szabályozása az AMPK által. Az ULK komplexet az AMPK és az mTORC1 egymással ellentétesen szabályozza. Az AMPK aktiválja az ULK komplexet és gátolja az mTORC1-et. Az AMPK képes fokozni a VPS34 komplex pro-autofágiás hatását és segíti a komplex kialakulását. Az AMPK foszforilálja az ATG9-et, amelynek hatására megnő az ATG9 szállítás az autofagoszóma képződés helyére (97).

### 1.5. Az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási háromszög

A sejtek homeosztázisának fenntartásában kulcsfontosságú a „jóllakottságot” figyelő mTORC1 és az energiahányt érzékelő AMPK közötti egyensúly. Ez a két fehérje ellentétesen szabályozza az ULK1-et, ami az ULK komplex részeként nélkülözhetetlen az autofágia inicializálásához (26, 93) (8. ábra).

Míg az AMPK az aktuális energiaszinteknek megfelelően továbbítja a szignálokat az ULK1 és az mTORC1 felé, addig az mTORC1 és az ULK1 ellentétesen működnek a tápanyag-ellátottság függvényében (98).



8. ábra. Az autofágia szabályozása az AMPK-ULK1-mTORC1szabályozási háromszög által.

Az AMPK és az mTORC1 ellentétesen hatnak az autofágiát indukáló ULK komplexre. Az ULK komplex ugyanakkor mindkét kináz működését gátolja. A zöld nyilak aktiváló, míg a pirosak gátló hatást jelölnek (93).

Megfelelő tápanyagellátottság esetén az mTORC1 gátolja az ULK komplex működését az ULK1 és az ATG13 foszforilációján keresztül (26, 93). Azonban az energiaszegény körülmények között aktiválódó AMPK indukálja az önemésztő folyamatokat az ULK1 foszforilációjával és az mTORC1 gátlásával (26, 93) (8. ábra). Az ULK1 mTORC1 általi foszforilációja a Ser757-en szabályozza az ULK1 és az AMPK közötti kölcsönhatást. Azonban ez nem teljesen egyértelmű az egymással ellentétes irodalmi adatok alapján (98). Az egyik esetben a rapamycin-kezelés fokozta az ULK1 és az AMPK közötti kölcsönhatást (26), míg a másik esetben az ULK1 és az AMPK közötti kölcsönhatás csak éhezés során jött létre (99).

Éhezés során a Ser757-es aminosav defoszforilációja az ULK1 és az AMPK kapcsolódásához vezet, ami az ULK1 és ezáltal az autofágia aktivitásának fokozódását teszi lehetővé (98, 99).

Az autofágiás válasz „finomhangolását” két ULK1-függő negatív visszacsatolási hurok segíti (100). Egyrészt az ULK1 képes negatívan visszahatni az AMPK-ra, vagyis foszforilálja az AMPK mindhárom alegységét és ezzel csökkenti az aktivitását. Tehát az AMPK és az ULK1 közötti kapcsolat nem maradhat fenn hosszútávon. Másrészt az ULK1 foszforilálja az mTORC1 komplex RAPTOR alegységét, ami tartós tápanyaghiány esetén az mTORC1 gátlását eredményezi (101, 102) (8. ábra).

A tranziens visszacsatolási mechanizmusok jelenlétének köszönhetően az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási háromszög képes visszaállni az alapértelmezett „beállítási értékekre” a sejt mindenkori állapotának megfelelően. Ezen átfogó szabályozási mechanizmus segítségével a sejt hosszútávon se nem aktiválja, se nem gátolja az mTORC1 és az ULK1 útvonalakat (98).

## 1.6. Az AMPK-ULK1-mTORC1szabályozási háromszög működésének vizsgálata

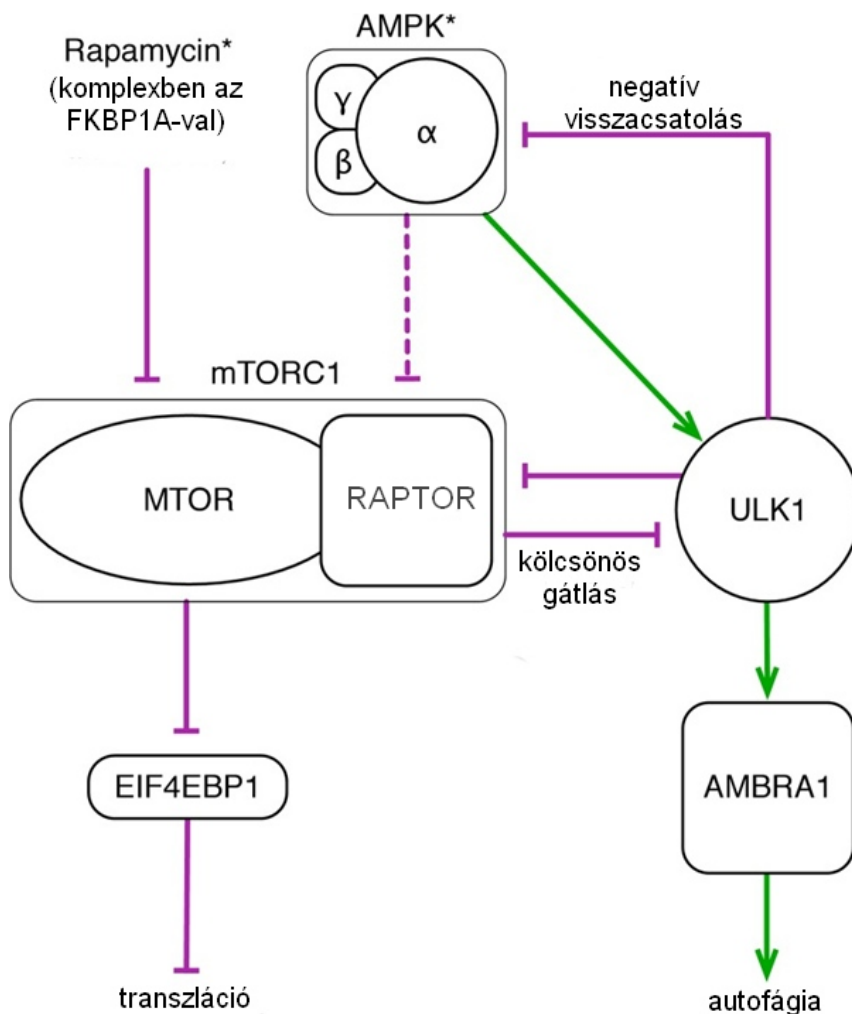
Szymańska és munkatársai készítettek egy mechanisztikus matematikai modellt az autofágiás lebontó és a felépítő folyamatok közötti kapcsolat leírására (103).

### *1.6.1. A matematikai modell jellemzői*

A modell az alábbi fehérjék közötti kölcsönhatásokat foglalja magába:

- az AMPK aktiválja az ULK1-et és gátolja az mTORC1-et,
- az mTORC1 és az ULK1 közé dupla negatív visszacsatolási hurok van beépítve,
- az ULK1 és az AMPK között negatív visszacsatolási hurok található,
- az mTORC1 gátolja az EIF4EBP1 fehérjét, így annak gátló hatása a transzláción megszűnik,
- az ULK1 aktiválja az AMBRA1-et, aminek hatására az autofágia aktiválódik (103) (9. ábra).

Az elméleti modell a szabályozási rendszerben leírt fehérje-fehérje kölcsönhatásokon alapul. Kidolgozása során figyelembe vették az egyes fehérjefoszforilációk specifikus helyét, a fehérjék lineáris motívumait és a kötések kialakításáért és a katalitikus interakciókért felelős fehérjedoméneket [103]. A modell bemeneti, szabadon változtatható paraméterei a rapamycin mennyisége és az AMPK alfa alegységének foszforiláltsága, ami megfeleltethető a sejt AMP:ATP arányának. A modellel végzett szimulációk eredménye (kimenete) az EIF4EBP1 (mTORC1 szubsztrát) transzlációs represszor és az AMBRA1 foszforilációjának a szintje (103) (9. ábra).

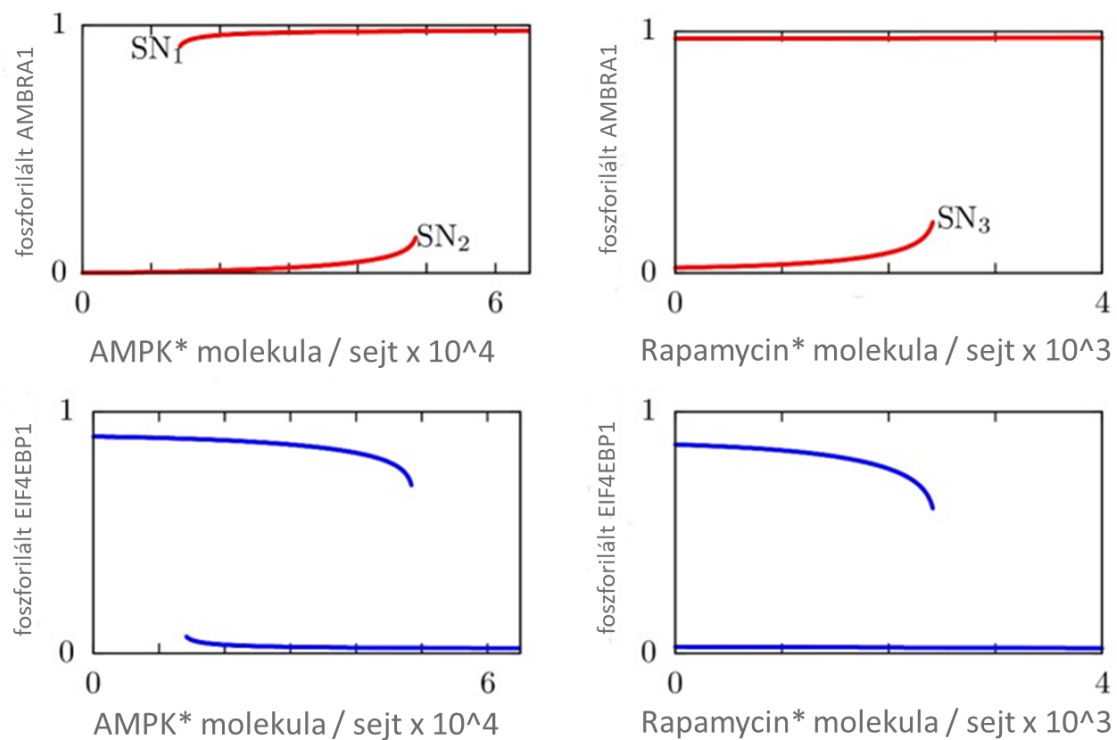


9. ábra. A modell sematikus hálózati ábrája.

Az ábra a modellben definiált fehérjéket és az azok közötti kapcsolatokat tünteti fel. A modell két bemenete a csillaggal (\*) jelölt rapamycin és az AMPK szintje. Míg a szimulációk eredménye a transzláció és az autofágia mértéke. A zöld nyilak aktiváló, míg a lila nyilak gátló hatást jelölnek (103).

### 1.6.2. Bistabilitás

A matematikai modell paraméterezését úgy állították be, hogy az ULK1 és az AMPK közötti negatív visszacsatolás sebessége lassabb a többi interakcióhoz képest, emiatt a rendszer úgy viselkedik, mintha ez a negatív visszacsatolás nem is létezne. Így a modell segítségével meg tudták vizsgálni, hogy milyen hatással van a rendszer működésére ennek a kapcsolatnak a hiánya. Ebben az esetben a szimulációk egy stabil egyensúlyi állapot kialakulását mutatták ki (103).



10. ábra. A rendszer egyensúlyi (bifurkációs) vizsgálata, ha az ULK1 és az AMPK között hiányzik a negatív visszacsatolás.

A diagramok az AMBRA1 (piros) és az EIF4EBP1 (kék) foszforilált, stabil állapotát mutatják az AMPK-aktivitás\* vagy a rapamycinszint\* függvényében. Az SN<sub>1</sub>, SN<sub>2</sub>, SN<sub>3</sub> a bifurkációs/egyensúlyi pontokat jelzi (103).

Amennyiben az AMPK szintjét adták meg bemeneti paraméterként, akkor két stabil régió jött létre (10. ábra, bal oldali panelek). Alacsony AMPK-aktivitás esetén az AMBRA1 foszforilációs szintje és ennek megfelelően az autofágia szintje is alacsony volt (10. ábra, bal oldali, felső panel), míg a transláció mértéke magas maradt (10. ábra, bal oldali, alsó panel).

Ezzel szemben magas AMPK aktivitás esetén az AMBRA1 foszforilációja megnőtt (10. ábra, bal oldali, felső panel), az EIF4EBP1 foszforilációja lecsökkent (10. ábra, bal oldali, alsó panel) (103).

Ha bemeneti paraméterként magas rapamycinszintet adtak meg, akkor csak egy stabil régió jött létre (10. ábra, jobb oldali panelek). Ebben a régióban az AMBRA1 foszforilációja magas (10. ábra, jobb oldali, felső panel), míg az EIF4EBP1 foszforiláció szintje alacsony (10. ábra, jobb oldali, alsó panel) (103).

Az mTORC1 és az ULK1 közötti dupla negatív visszacsatolás okozhatja azt, hogy az AMBRA1 és az EIF4EBP1 magas és alacsony foszforilációs szint esetén is kölcsönösen kizárják egymás aktivitását, aminek következtében a transzláció és az autofágia sem működik egyszerre (103).

Megfigyelték, hogy ha az AMBRA1 a rapamycin vagy az AMPK hatására aktiválódott, akkor az aktivitása már nem csökkent le. Vagyis az AMPK és az ULK1 közötti negatív visszacsatolásnak elengedhetetlen szerepe van az autofágia szabályozásában és gátlásában, azaz a túlzott mértékű autofágia megakadályozásában (103).

### *1.6.3. Oszcilláció*

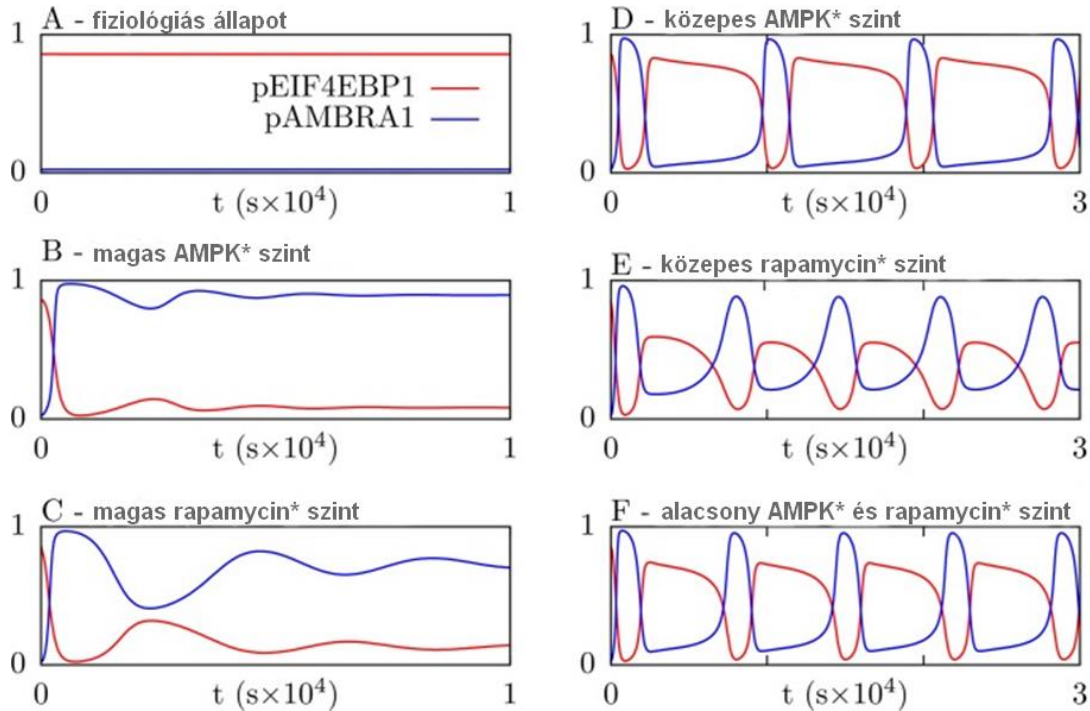
A modellel végzett elemzések alapján az ULK1 és az AMPK közötti késleltetett negatív visszacsatolás következménye az mTORC1 aktivitás oszcillációja, ami az autofágia és a fehérje transzláció váltakozását idézi elő (103).

Azt tapasztalták, hogy mind az AMPK aktivitásának, mind a rapamycin mennyiségének magas szintje az autofágia tartós fennmaradását és a transzláció tartós gátlását okozza (11. ábra, B, C). A bemeneti paraméterek közepes (kevésbé súlyos) szintre emelése az autofágia és a transzláció periodikus váltakozását idézte elő (103) (11. ábra, D, E, F).

Az oszcilláció amplitúdója és az autofágiás fázis hossza független a stressz mértékétől, ezzel szemben a transzláció hossza a stressz növekedésével lecsökken (103).

Az mTORC1 és az ULK1 közötti dupla negatív visszacsatolás teszi lehetővé a rendszer kapcsolószerű viselkedését, míg az AMPK és az ULK1 közötti lassú negatív visszacsatolás váltja ki az oszcillációs viselkedést (103).

Az AMPK és az ULK1 közötti negatív visszacsatolás megszűnése esetén a rendszer nem képes oszcillálni, emiatt alakul ki a bistabilitás, amelyet kapcsolószerű, igen vagy nem típusú válasz jellemez (103) (10. ábra).



11. ábra. Az AMBRA1 és az EIF4EBP1 foszforiláció idő-függése különböző stimulusok hatására.

A piros vonal az AMBRA1 foszforilációs szintjét, míg a kék vonal az EIF4EBP1 foszforilációját jelöli. Minden panelen a stimulus egy „nem stresszelt” / fiziológias állapotból indul, ahol a rapamycin szintje 0, az AMPK szintje pedig 30000 db/sejt. Az (A) diagramon nincs stimulus, a (B) diagramon az AMPK szintje 150000 db/sejt, a (C) diagramon a rapamycin szintje 9000 db/sejt, a (D) diagramon az AMPK szintje 90000 db/sejt, az (E) diagramon a rapamycin szintje 6000 db/sejt, az (F) diagramon a rapamycin szintje 3000 db/sejt, míg az AMPK-é 60000 db/sejt (103).

### 1.7. Az endoplazmás retikulum stressz és az autofágia

Az endoplazmás retikulum (ER) minden eukarióta sejtben megtalálható organelum, melynek egyik legfontosabb feladata a membrán- vagy szekrécióra kerülő fehérjék szintézise, poszttranszlációs módosítása és natív szerkezetük kialakulásának elősegítése. Funkció és szerkezet alapján megkülönböztethetünk durva felületű ER-ot (DER) és sima felületű ER-ot (SER).

A DER felületén nagy mennyiségű riboszóma található, amely a fehérjeszintézisért felelős, míg a SER felszínén kisebb számban vagy egyáltalán nem találhatóak riboszómák, és feladata főleg a lipidszintézis. (104).

### 1.7.1. Az endoplazmás retikulum stressz

Ha az endoplazmás retikulum lumenében bármilyen ok miatt felhalmozódnak a rossz térszerkezetű fehérjék (például tápanyag hiány,  $\text{Ca}^{2+}$  metabolizmus egyensúlyának felborulása, toxinhatás, oxidatív stressz, vírusfertőzés, mutáns szerkezetű fehérje) az organelum homeosztázisa felborul és a túlélés érdekében számos önvédelmi folyamat indukálódik, melyek összességét ER-stresszválasznak nevezzük. Az ER-stressz hatására a „rosszul feltekeredett fehérje” válasz, vagy más néven az UPR (unfolded protein response) jelátviteli útvonal aktiválódik (104). Az UPR elősegíti a fehérjék újbóli feltekeredését vagy lebontását dajkafehérjék és a foldingban résztvevő enzimek indukcióján keresztül és csökkenti az organelumra jutó terhelést a *de novo* fehérjeszintézis leállításával. Az ER és a sejt egyensúlyának visszaállítása érdekében az autofágiás folyamatok is beindulnak, a citoplazmába történő  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadítással, mivel ilyenkor a  $\text{Ca}^{2+}$  a CaMKK- $\beta$ -n keresztül aktiválja az AMPK-t (104).

Hosszantartó vagy intenzív ER-stressz esetén azonban még ez sem elegendő a sejt homeosztázisának helyreállításához, ezért ilyenkor elindulnak a sejthalált aktiváló folyamatok (104).

#### 1.7.1.1. Az UPR, avagy a „rosszul feltekeredett fehérje” válasz

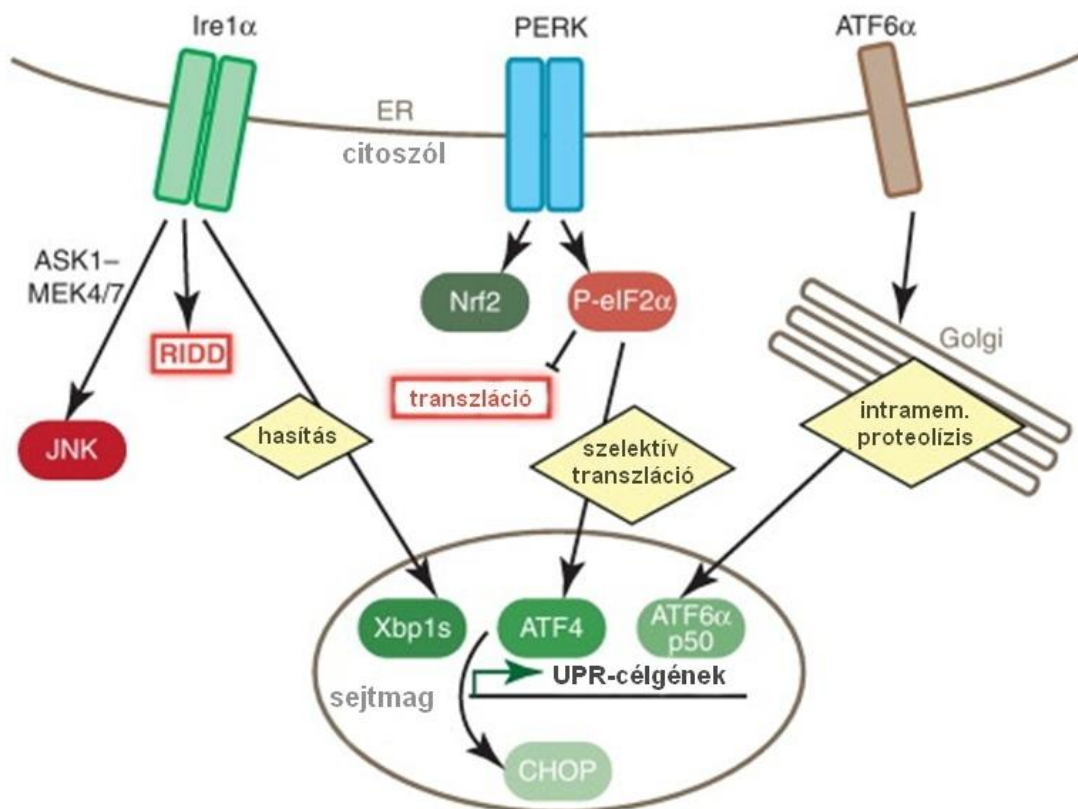
A „rosszul feltekeredett fehérje” válasz (UPR) egy védelmi mechanizmus, ami az ER homeosztázisának helyreállítása érdekében aktiválódik ER-stressz esetén. Az UPR az ER felszínén lévő transzmembrán fehérjéket aktiválja, amelyek számos intracelluláris útvonalat indítanak be a sejt túlélésének elősegítése érdekében. Az UPR által indukált transzmembrán fehérjék a PERK (protein kinase R-like ER kinase), az IRE1 (inositol requiring kinase 1) és az ATF6 (activate transcription factor 6). Fiziológias körülmények között a GRP78/Bip köt ehhez a három fehérjéhez, ezáltal inaktív állapotban tartva őket.



A túlzott mennyiségben felhalmozódó, nem megfelelő szerkezetű fehérjék elvonják a GRP78/Bip-et a fenti komplexből, a szabadon maradt PERK, IRE1 és ATF6 pedig homodimereket képezve aktiválódik (104).

Az aktiválódott PERK, IRE1 és ATF6 olyan jelátviteli útvonalakat aktivál, amelyek serkentik a gének átíródását a sejtmagban, fokozzák a dajka fehérjék szintézisét, növelik a felhalmozódott fehérjék degradációját és csökkentik a fehérje-szintézis sebességét (104) (12. ábra).

Az ER-stressz során aktiválódó PERK először dimerizálódik, majd alegységei kölcsönösen foszforilálják egymást és az eIF2 $\alpha$ -t a Ser51-es aminosavon, aminek hatására a fehérjék szintézise leáll, így csökkentve a fehérjeprocesszáló apparátusra nehezedő nyomást (104). Ezzel párhuzamosan a foszforilálódott eIF2 $\alpha$  szelektíven serkenti az ATF4 transzkripciós faktor szintézisét, amely további két célgén, a CHOP (transcription factor C/EBP homologous protein) és a GADD34 (growth arrest and DNA damage-inducible 34) átírását fogja aktiválni (104-106) (12. ábra).



12. ábra. Az endoplazmás retikulum stressz hatására aktiválódó UPR jelzés. Az ER-stresszt érzékelő fehérjék, az IRE1, a PERK és az ATF6 az ER membránjában helyezkednek el, aktiválódva pedig további fehérjéket indukálnak (107).

Az IRE1 is dimerizálódik, majd kereszt-foszforilálódik az ER-stressz hatására, így az endonukleáz aktivitása aktiválódik. Az IRE1 hasítja az XBP-1 (X-box binding protein-1) mRNS prekursorát, amely számos, az ER-stressz leküzdéséhez szükséges fehérje promóteréhez képes kötődni, elősegítve azok átíródását (104-106).

ER-stressz hatására az ATF6 transzportvezikulumok segítségével a Golgi-apparátusba helyeződik át, ahol két proteáz a S1P és az S2P (Site-1 protease, Site-2 protease) hasítja. A hasítás hatására az ATF6 citoszólikus fragmentuma felszabadul és a sejtmagba szállítódik, ahol közvetlenül az UPR-célgének átírását serkenti (104-106) (12. ábra).

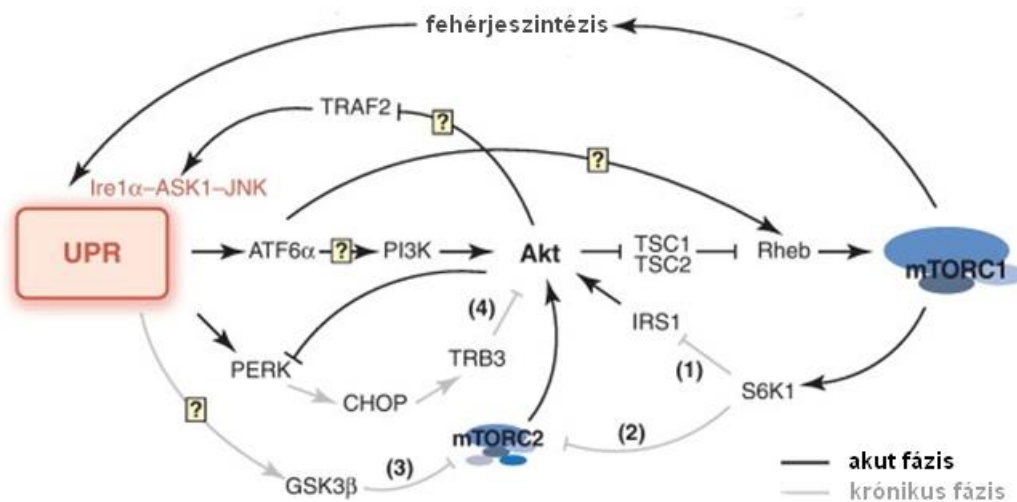
#### 1.7.1.2. A GADD34

A GADD34 expresszióját számos stresszfaktor képes indukálni, többek között a DNS-károsodás, UV-sugárzás, tápanyagmegvonás, vírusfertőzés és az ER-stressz (108). A sejt stresszre adott válasza során kikapcsolja a fehérjeszintézist az eIF2 $\alpha$  foszforilációján keresztül, majd a foszforilált eIF2 $\alpha$  indukálja az ATF4 által a GADD34 expresszióját. A GADD34 funkcionális komplexet képez a PP1-gyel (protein phosphatase 1) és defoszforilálja az eIF2 $\alpha$ -t, ami a fehérjeszintézis helyreállításához vezet (109, 110). Így a GADD34 elősegíti a sejt túlélését és az ER-stressz által indukált fehérjeszintézis gátlásának helyreállítását (111).

### 1.8. Az UPR és az mTORC1 közötti kapcsolat

Az UPR elsődleges feladata a sejt belső homeosztázisának és az ER állapotának helyreállítása különböző mechanizmusokon keresztül. Azonban az UPR képes elősegíteni az apoptotikus sejthalál aktiválódását intenzív vagy hosszantartó stressz esetén. Patológias esetekben, például neurodegeneratív betegségek esetén, kimutatták, hogy az ER-stressz indukálta apoptózisban fontos szerepet játszik az UPR, ami az mTORC1 krónikus aktivációjával párosul (107, 112). Tehát az mTORC1 a sejtnövekedés és proliferáció szabályozása mellett képes a sejt halálát is indukálni (107). Az mTORC1 képes aktiválni az IRE1-JNK útvonalat anélkül, hogy a másik két UPR-ág (ATF6, PERK) is aktiválódna, ami végül a sejt halálához vezet (112, 113) (13. ábra).

A Rheb túlermelletése fokozta, míg kiütése gátolta az apoptotikus stimulusokat ASK1-függő módon, ami megerősíti az mTORC1-IRE1-ASK1-JNK apoptotikus jelzés létezését (114). A TSC1/2 gátló hatása nélkül az mTORC1 aktivitása hosszan fennmarad, ami szintén indukálja a JNK-t és ezen keresztül apoptózist vált ki (107) (13. ábra). Tovább növeli a rendszer komplexitását, hogy az UPR és az mTORC1 közötti jelátviteli útvonalakat az ATF6 is szabályozza. Az ATF6 az AKT aktiválásán keresztül gátolja a PERK-et, a Rheb aktiválásán keresztül pedig elősegíti az mTORC1 indukálódását (115, 116) (13. ábra). Az UPR aktiválása farmakológiai szerekkel indukálta az ATF6-on keresztül a PI3K-AKT-mTORC1 jelátviteli útvonalat (112). Az ER-stressz hatására indukálódó AKT aktiválja az mTORC1-et, azonban krónikus stressz esetén az UPR legátolja az AKT-ot, ami így az IRE1-ASK1-JNK útvonal és vele együtt a sejthalál aktiválódásához vezet (107, 112) (13. ábra).



13. ábra. Az UPR és az mTORC1 közötti kapcsolat.

Az ismert útvonalak, amik összekötik az UPR-t és az mTORC1-et. A fekete nyilak az akut fázisban, míg a szürke nyilak a krónikus fázisban aktiválódó folyamatokat jelzik (107).

Az UPR és az mTORC1 bizonyos folyamatokat közösen szabályoznak fiziológias és patológias állapotokban egyaránt (107). Az UPR és az mTORC1 egyformán aktiválólag hatnak a májban történő lipidszintézisre, az NF- $\kappa$ B jelzésre és az inzulin-rezisztenciára, azonban ellentétesen szabályozzák a riboszómák biogenezisét, az autofágiát és az apoptózist (107).

### 1.8.1. A GADD34 és az mTORC1 közötti kapcsolat

A GADD34 és az mTORC1 közötti kapcsolat hozzájárul a fehérjeszintézis megfelelő szabályozásához a különböző környezeti stresszek során, mint az éhezés és a vírusfertőzés.

Az éhezés hatására aktiválódó GADD34 az mTORC1-et gátolja azáltal, hogy stabil komplexet képez a TSC1/TSC2-vel, ami hozzájárul a sejtek túléléséhez és megakadályozza az apoptózist (108). A GADD34 a Thr1462-es aminosavon képes defoszforilálni a TSC2-t, ami a TSC1/2 komplex aktiválódásához vezet (117). A GADD34 hiányos sejtekben az mTORC1 aktivitása fennmarad és a sejtek halálát okozza (108).

VSV (vesicular stomatitis virus)-fertőzés hatására is hasonló jelenségeket tudtak megfigyelni. A fertőzéskor aktiválódó GADD34 csökkentette a vírus replikációját, míg GADD34- és TSC2-hiányos sejtekben a replikáció fokozottabb volt. A GADD34 ebben az esetben is kölcsönhatásba lépett a TSC1/2 fehérjékkel, majd a TSC2-n az Akt által foszforilált Thr1462-es aminosavat defoszforilálta. Az így aktiválódott TSC1/2 komplex stabilabbá vált és gátolta az mTORC1 működését. Emellett GADD34-hiányos sejtek rapamycinnel történő kezelése esetén a vírus replikációja hasonlóan lecsökkent, mint a GADD34 jelenléte során (109).

A Drs fehérje (down regulated by v-src) apoptózist indukáló tumorszupresszor, amely vírusos megbetegedés esetén részt vesz a védekezési mechanizmusokban. VSV-vel fertőzött *drs*-génkiütött sejtekben a vírus replikációja fokozottabb volt, míg a p70S6K1, az S6, a 4E-BP1 és a TSC2 foszforilált formájának szintje megemelkedett. A Drs fehérje képes kölcsönhatást kialakítani a GADD34-gyel és elősegíteni annak komplexképzését a TSC1/2-vel. A vírusfertőzés során a Drs- és a GADD34-hiányos sejtek válaszai hasonlóak voltak, vagyis a Drs is részt vesz az mTORC1-útvonal szabályozásában. A rapamycinnel történő kezelés Drs- és GADD34-hiány esetén is csökkentette a vírus replikációját (118).

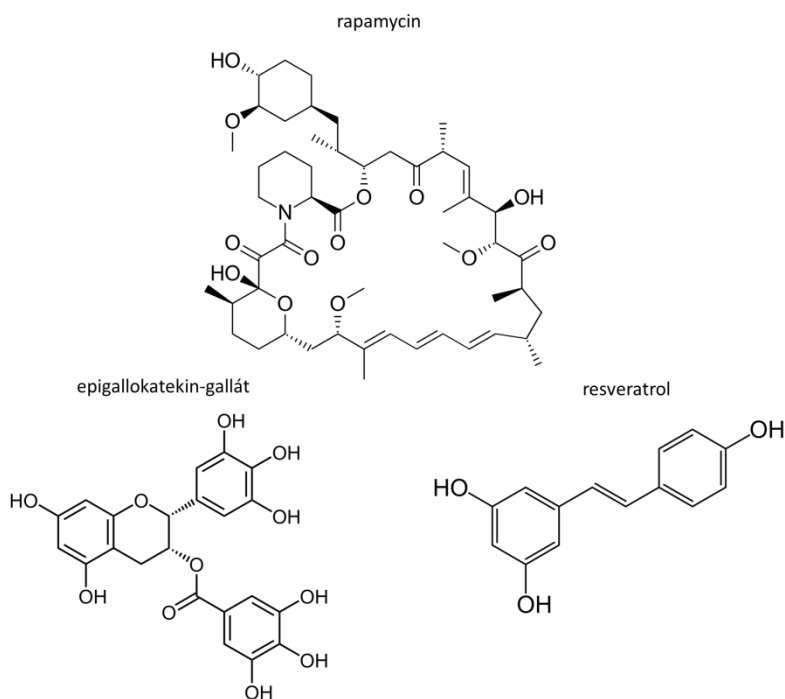
Neurodegeneratív megbetegedések esetén a fehérje-aggregátumok kialakulása stresszhez vezet. Mutáns huntingtin fehérjét termelő PC6.3 idegsejtekben 24 óra elteltével az autofágia aktiválódott, míg az mTORC1 inaktiválódott (111).

Ez annak köszönhető, hogy a huntingtint expresszálo sejtekben a TSC1/2 fehérje kölcsönhatásba lépett a GADD34-gyel, aminek hatására a TSC2 defoszforilálódott és az autofágia aktiválódott (111).

A HBZ fehérje (HTLV-1 basic leucine-zipper factor) HTLV-1 fertőzés során (human T-cell leukemia virus type-1) a sejtmagból a citoplazmába kerül, ahol a GADD34-hez való kapcsolódásán keresztül aktiválja az mTORC1-et. A GADD34 túltermelés a sejtekben csökkentette, míg a GADD34 és a HBZ együttes kifejezése visszaállította a p70S6K1 foszforilációs szintjét. A HBZ-t kifejező sejtekben az LC3 II-es formájának szintje is szignifikánsan csökkent, azaz a HBZ gátolta a GADD34 által indukált autofágiás folyamatokat (119).

Bakteriális fertőzés (LPS kezelés) hatására aktiválódó makrofágok tirozinnal és ciszteinnel való éheztetése is indukálta a GADD34 működését. A GADD34 az mTORC1 gátlásával elnyomta a makrofágok aktivációjának hatására bekövetkező sejthalált és indukálta az autofágiát (120).

### 1.9. A vizsgált szabályozási rendszer működését befolyásoló exogén vegyületek



14. ábra - A rapamycin, a resveratrol és az epigallokatekin-gallát szerkezeti képlete.

### 1.9.1. Rapamycin

A rapamycin (más néven sirolimus) egy makrolid antibiotikum, melyet a *Streptomyces hygroscopicus* baktérium termel. A rapamycint először a Húsvét-szigetről származó földmintákban mutatták ki. Kezdetben gombaellenes szerként használták, de csakhamar felfedezték, hogy immunszuppresszáns aktivitása is van, emellett gátolja a T-sejtek proliferációját és a fehérjeszintézist (121, 122). A rapamycin funkciós komplexet képez az FKBP12-vel (12-kDa FK506-binding protein) és allosztérikus inhibitoroként kötődik az mTORC1 mTOR alegységéhez, amivel a p70S6K1 aktivációját gátolja, és a 4E-BP1-et aktiválja (34, 121).

Jobb oldhatóságuk és kedvezőbb farmakokinetikájuk miatt számos rapamycin-analógot (rapalog) fejlesztettek (121). A rapamycint és a rapalogokat széles körben használják immunszuppresszánsként vese- és májátültetéseket követően, daganatos megbetegedések és a tuberous sclerosis (az mTORC1 rendellenes aktivációja) szövődményeinek kezelése során. Azonban ezen vegyületek hosszú távú alkalmazása során számos negatív mellékhatást figyeltek meg, mint hiperlipidémia, glukóz-intolarenia, inzulin-rezisztencia, gyomor- és bélrendszeri rendellenességek, valamint légúti és húgyúti fertőzések (121).

### 1.9.2. Resveratrol

A növények gyökerében, bogyós gyümölcsökben és szőlőben megtalálható resveratrol (transz-3,5,4'-trihidroxisztilbén) egy természetes polifenol-vegyület. A resveratrol védi a növényeket az ultraibolya (UV) sugaraktól és szerepet játszik a kórokozók elleni védekezésben, sérülések és abiotikus stresszek kivédésében (123).

A resveratrolt használják gyógyszerekben és táplálék-kiegészítőként; a szervezetre gyakorolt pozitív hatásait már számos tanulmányban igazolták. Enyhíti a gyulladást, elősegíti a tumorsejtek halálát (antikarcinogén aktivitása van) és véd az oxidatív stressz ellen. A vegyület jótékony tulajdonságai összefüggésben állnak azzal, hogy indukálja az autofágiás önmésző folyamatokat (123-125).

A resveratrol az AMPK működésének aktiválásán keresztül képes gátolni az mTORC1-et, valamint képes az mTORC1-et közvetlenül, ATP kompetáló módon gátolni is, így hatást gyakorol az mTORC1-ULK1 útvonalra és az autofágia aktiválódására is (124, 125).

### *1.9.3. Epigallokatekin-gallát (EGCG)*

A zöld tea az egyik legnépszerűbb ital a világon. Epidemiológiai tanulmányok alapján a zöld tea fogyasztása összefüggésbe hozható számos krónikus betegség kockázatának csökkenésével, mint például kardiovaszkuláris betegségek, diabétesz és különböző daganatos megbetegedések. A zöld tea egészségre gyakorolt jótékony hatásaiért a benne levő bioaktív komponensek, a katekinek felelősek. Több katekint is azonosítottak a zöld teában: a katekint (C), az epikatekint (EC), az epigallokatekint (EGC), az epikatekin-gallátot (ECG) és az epigallokatekin-gallátot (EGCG). Ezen vegyületek közül a legaktívabb az EGCG (126, 127).

Az EGCG egy flavon-3-ol fenolos vegyület, nyolc szabad hidroxil-csoporttal, amelyek a bioaktivitását és sokoldalú biológiai funkcióit adják. Az EGCG gátolja az oxidatív stressz és a gyulladás kialakulását, csökkenti a plazma lipid- és cukorszintjét, valamint szabályozza a génexpressziót és számos molekuláris útvonalat (126, 127).

Megfigyelték, hogy a teában levő polifenolok különböző mechanizmusokkal aktiválják az autofágiát, például az mTORC1 gátlásán és a PI3K vagy a Beclin-1 aktiválásán keresztül. A zöld tea katekinek az autofágia indukciójával segítettek megelőzni a hipoxia által indukált oxidatív stresszt és a sejthalált. Az EGCG magasabb koncentrációja viszont gátolta az autofágiát és apoptózishoz vezetett (127).

## 2. Célkitűzések

A sejtek homeosztázisát számos szabályozási hálózat összehangolt működése tartja fenn. Ezen folyamatok közül fontos az AMPK és az mTORC1 közötti egyensúly, mivel ez a két kináz közösen szabályozza az autofágia induktorát, az ULK1-et. Az AMPK energiaszegény körülmények között gátolja az mTORC1 működését és az ULK1 fehérjén keresztül aktiválja az autofágiás önemésztő folyamatokat. Megfelelő tápanyag-ellátottság esetén azonban az mTORC1 az ULK1 gátlásán keresztül megakadályozza ezeket az önemésztő folyamatokat. A rendszer működésének „finomhangolását” az ULK1 biztosítja azáltal, hogy képes gátolni mind az AMPK, mind az mTORC1 működését.

I. Munkánk során szeretnénk volna megvizsgálni az AMPK-mTORC1-ULK1 szabályozási háromszögben levő kapcsolatok dinamikai működését. Korábban egy másik kutatócsoport kidolgozott egy matematikai modellt a hálózat működésére, de viszonylag kevés fenotípust tanulmányoztak. Ezért az alábbi vizsgálatokat terveztük elvégezni:

- a korábban leírt modell reprodukálása és működésének további tesztelése elméleti módszerekkel, különböző stressz-hatások segítségével;
- a modell működésének és a szimulációk eredményeinek ellenőrzése az irodalomban már leírt, molekuláris biológiai technikák segítségével is bizonyított eredményekkel;
- amennyiben az elvégzett szimulációk eredményei nem egyeznek meg az irodalmi adatokkal, akkor az elkészített modell kiegészítése a megfelelő kapcsolatokkal és/vagy visszacsatolási hurkokkal;
- a feltételezett új szabályozási kapcsolatok vizsgálata elméleti és molekuláris biológiai technikák segítségével.



II. Amennyiben egy rendszerben negatív visszacsatolási hurok található, akkor az a rendszer képes lehet oszcillálni. A vizsgált szabályozási hálózatban két negatív visszacsatolási hurok is megtalálható egyrészt az AMPK és az ULK1 között, valamint az AMPK-ULK1-mTORC1 háromszögben. Ezek közelebbi jellemzése érdekében az alábbi célokat tűztük ki:

- az AMPK és az ULK1 közötti negatív visszacsatolási hurok dinamikai működésének vizsgálata, miközben az AMPK és az ULK1 közötti szabályozásra különböző lehetőségeket (úgy mint direkt vagy késleltetett kapcsolat) tételezünk fel;
- az autofágia és a szabályozási hálózat tagjainak vizsgálata mind szimulációk, mind molekuláris biológiai technikák segítségével hosszantartó celluláris stressz esetén, illetve annak vizsgálata, hogy az egyes tagok képesek-e egy időben ismétlődő, periodikus aktiválódásra;
- amennyiben a szimulációk alapján az AMPK és az ULK1 közötti kapcsolat időben késleltetett, akkor biológiailag releváns késleltetési módok keresése.

III. Ha a sejtben valamilyen celluláris stressz hatására nem megfelelő térszerkezetű fehérjék halmozódnak fel, akkor az ER-stresszválasz, az UPR aktiválódik. Ilyenkor az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási háromszög és az UPR különböző folyamatokon keresztül megpróbálják a sejt állapotát a korábbi, vagy egy új homeosztatisz állapotba visszaállítani, de ha ez már nem lehetséges, akkor a sejthalál folyamatát aktiválják. Már bizonyított, hogy az UPR és az mTORC1 között szabályozásbeli keresztkapcsolatok vannak és számos celluláris stressz esetén az UPR által aktivált GADD34 képes gátolni az mTORC1 működését, így elősegítve a sejtek túlélését. Ezért az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási háromszög ER-stresszfolyamatokkal való kapcsolatát is szeretnénk volna feltérképezni:

- a GADD34 szerepének vizsgálata az mTORC1 gátlásában ER-stressz esetén;
- olyan, természetben előforduló hatóanyagok keresése, amelyekkel ennek a rendszernek a működése befolyásolható és az autofágiás túlélési folyamatok időben kitolhatók, az ER-stressz pedig késleltethető.

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. Sejtvonal fenntartása

Kísérleteinkhez humán embrionális vesesejteket (HEK293T) használtunk. A sejteket 1% antibiotikumot és antimikotikumot (100 egység/ml penicillin, 100 µg/ml sztreptomicin, 0,25 µg/ml amfotericin B; GIBCO) valamint 10% magzati borjú szérumot (GIBCO) tartalmazó DMEM médiumban (GIBCO) 37 °C hőmérsékletet és 5% CO<sub>2</sub>-koncentrációt biztosító inkubátorban tenyésztettük.

#### 3.2. RNAi alapú géncsendesítés és tranziens transzfekció

A sejteket a csendesítéshez antibiotikum-mentes médiumban gyűjtöttük be, majd hatlyukú lemezekre oltottuk őket (200.000 db sejt/well). Egy éjszakán át hagytuk a sejteket letapadni, majd másnap elvégeztük a transzfekciót.

A transzfekcióhoz Lipofectamine RNAi Max (Invitrogen) reagenst, GIBCO™ Opti-MEM I (GlutaMAX™-I) redukált szérum médiumot (Invitrogen) és 20 pmol/ml koncentrációban alkalmazott siRNS-t használtunk. Kísérleteink során siRNS-sel csendesítettük a GADD34-et (ThermoFisher), az ULK1-et (Ambion), a TSC1-et (Ambion) és a TSC2-t (Ambion).

Az összemért transzfekciós reagens lyukanként 500 µl OPTIMEM-et, 6 µl lipofektamint és 1 µl 100 µM-os siRNS-t tartalmazott. A reagenst cseppenként adtuk hozzá a sejtekhez, majd 24 órán át inkubáltuk őket, ezt követően pedig elvégeztük a kezeléseket.

A csendesítés hatékonyságát fehérje- és/vagy RNS-szinten vizsgáltuk.

#### 3.3. A sejtek kezelése

A kezeléshez a sejteket hígítás után 6-, illetve 12-lyukú lemezekre raktuk le, majd egy éjszakát vártunk, hogy a sejtek megfelelően letapadjanak.

A kezelések során a sejteket egy stresszornak vagy a stresszorok kombinációjának tettük ki (1. táblázat), illetve glukóz-mentes médiumban éhezettük őket.

*1. táblázat. A kezelésekhez használt stresszorok, a kezelési koncentrációk és időtartamok.*

<b>Stresszor</b>	<b>Kezelési koncentrációk</b>	<b>Kezelési idő</b>
<b>rapamycin</b>	100 nM	előkezelésként: 2 h kezelésként: 2,5 h és 5 h
<b>Compound C</b>	2,5 $\mu$ M	2 h
<b>thapsigargin</b>	10 $\mu$ M	2 h
<b>guanabenz</b>	5 $\mu$ M	1 h
<b>resveratrol</b>	10 $\mu$ M	24 h
<b>EGCG</b>	10, 20, 40 és 80 $\mu$ M előkezelésként: 20 $\mu$ M	24 h
<b>H-89</b>	2,5 $\mu$ M	2 h

A kezelésekhez használt koncentrációkat korábbi kísérleti eredmények és/vagy irodalmi adatok alapján, előzetes beállítást követően választottuk ki. Az előzetes koncentráció-beállítások során Cell Titer Blue reagenssel vizsgáltuk a koncentráció és az idő hatását a sejtek életképességére, valamint Western blotlalt követtük nyomon a fontosabb fehérjemarkerek expresszióját.

### 3.4. Életképességi vizsgálat

A sejteket hígítást követően 100  $\mu$ l térfogatú médiumban osztottuk ki a 96-lyukú lemezekre, hagytuk őket letapadni, majd következő nap végeztük el a kezelést.

A kezelést követően minden lyukhoz 20  $\mu$ l Cell Titer Blue (Promega) reagenst mértünk, majd az abszorbanciát fotométer segítségével 590 és 600 nm hullámhosszúságú referencia-szinten félóránként mértük. A mérés során használt vak oldatot 100  $\mu$ l sejtmentes médium és 20  $\mu$ l Cell Titer Blue reagens összekeverésével állítottuk elő.

A módszer kémiai alapja az, hogy a Cell Titer Blue spektrális tulajdonságai változnak a resazurinnak resorufinná történő redukcióját követően. A resazurin sötétkék színű, míg redukált terméke rózsaszínű.

Az életképes sejtek képesek a resazurint resorufinná alakítani, míg a nem életképes sejtek redukáló ekvivalensek hiányában elvesztik ezt a metabolikus kapacitást, és nem képesek átalakítani az indikátor festéket, így kék festődést mutatnak.

### 3.5. Sejtszámolás Bürker-kamrával és Luna típusú automata sejtszámlálóval

A kezeléseket követően leszívjuk a sejtekről a médiumot, majd a sejteket 1 ml 1x koncentrált steril PBS-sel (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7,4) mostuk, majd 250 µl tripszinnel (tripszin-EDTA 0,25%; GIBCO) szedtük fel őket és 1-2 ml friss médium segítségével vittük át őket centrifuga csövekbe.

A sejtes médiumot 1:1 térfogatarányban kevertük tripánkék festékkel, majd a sejtszámolásra alkalmas tárgylemezek mindkét felébe 10-10 µl-t mértünk. Az élő sejteket fénymikroszkóp vagy az automata készülék (Logos Biosystems) használatával számoltuk, több párhuzamos mérést végezve.

### 3.6. Fehérje-izolálás és a fehérje koncentrációjának mérése

A kezeléseket után a begyűjtött sejteket 1000 rpm-en 4°C-on 5 percig centrifugáltuk és 1x hideg PBS-sel mostuk őket. A mosást követően újra centrifugáltuk a sejteket (1000 rpm-en 4°C-on 5 perc). A PBS eltávolítása után a sejtekhez hozzáadtuk a lizáló RIPA-puffert. A lizáló puffer, RIPA puffer (150 mM NaCl, 50 mM Trisz-HCl, 1% NP40, 0,1% SDS) és proteáz-inhibitor-koktél (Sigma) keveréke. A mintákat jégen hűtve 45 percig állni hagytuk, majd a 45 perc letelte után 14000 rpm-en 4°C-on, 15 percig centrifugáltuk őket. A centrifugálás után a felülúszót felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

A minták fehérje-koncentrációját Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) segítségével határoztuk meg.

A méréshez különböző koncentrációjú marha szérumalbumin (BSA) kalibrációs sort használtunk, melyek koncentrációi rendre: 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 és 0,6 mg/ml voltak. Ezeket a kalibrációs oldatokat 2 mg/ml-es BSA törzsoldatból 1x PBS-sel hígítottuk.

A fehérje-koncentráció meghatározásához szükséges reagenst az A- és B-oldatok 50:1 térfogatarányban való összekeverésével állítottuk elő.

Ezután a 96-lyukú lemez lyukaiba 200 µl-t mértünk a pufferból, majd ebbe a kalibrációs fehérje oldatokból és a saját fehérje mintánkból 10 µl-t pipettáztunk. A fehérje mintákat a mérés előtt 1x PBS-oldattal húszszorosára hígítottuk. A minták és a kalibrációs oldatok esetén is három párhuzamos mérést végeztünk.

A reagens és a fehérje minták összekeverését követően a mintákat szobahőmérsékleten 30 percig állni hagytuk, hogy a színreakció lejátszódhasson, majd 562 nm-en fotometráltunk.

### 3.7. Western blot analízis

A fehérje mintákat a koncentráció mérése után a következőképpen készítettük elő a Western blot analízishez. 100 µl mintához 20 µl 5x töménységű minta puffert (25 mM Trisz-HCl (pH=7,5), 50 tf% 100%-os glicerin, 10% SDS, 0,75 mM brómfenolkék) és 3 µl merkaptóetanolt adtunk. A gélbe történő bemérés előtt 95°C-on 5 percig melegítettük a mintákat, majd összekevertük és maximális fordulatszámon lecentrifugáltuk őket. A gél zsebeibe minden mintából egyforma mennyiséget, 10-20 µg-ot vittünk fel.

A gélelektroforézishez a kísérletek során 10 vagy 15%-os elválasztó és 5%-os tömörítő SDS-poliakrilamid géllemezeket használtunk.

A gélből a fehérjéket nedves transzfer segítségével PVDF-membránra transzferáltuk.

A transzfer után a membránt 5% tej oldatban (4 g zsírszegény száraz tejpor, 80 ml TBS-Tween-ben – 950 ml desztillált víz, 50 ml 20x töménységű TBS, 850 µl Tween-20), zselatin pufferben (1,53 tf% 1 M Trisz (pH=7,5), 0,13 M NaCl, 0,2 tf% 0,5 M EDTA, 0,1 % zselatin, 0,1 tf% TritonX, 0,2 tf% 10% NaN<sub>3</sub>) vagy 1%-os BSA oldatban (0,1 g BSA-t tartalmaz 10 ml TBS-Tween) blokkoltuk.

A fehérjék jelöléséhez az elsődleges antitesteket egy éjszakán keresztül inkubáltuk a membránon 1%-os tej oldatában, 1%-os BSA oldatban vagy zselatin pufferben, enyhe keverés közben.

Az antitestek pontos koncentrációi és az antitesteknek megfelelő inkubáló oldatok a 2. táblázatban találhatóak meg.

2. táblázat. A Western blothoz használt elsődleges antitestek és alkalmazásuk körülményei.

A táblázatban a használt antitesteket, az antitestek hígításához használt inkubáló oldatokat, az antitestek koncentrációját, az antitestekhez használt másodlagos antitesteket és az antitestek gyártóit tüntettük fel.

<b>Marker</b>	<b>Antitest</b>	<b>Inkubáló oldat</b>	<b>Koncentráció</b>	<b>Másodlagos antitest</b>	<b>Gyártó</b>
<b>mTOR</b>	4E-BP1-P	tej	1:1000	nyúl-ellenes	CellSignaling
	4E-BP1	tej	1:1000	nyúl-ellenes	CellSignaling
	p70S6K-P	tej	1:750	nyúl-ellenes	CellSignaling
	p70S6K	tej	1:750	nyúl-ellenes	SantaCruz
<b>AMPK</b>	AMPK-Thr172-P	BSA	1:750	nyúl-ellenes	CellSignaling
	AMPK	BSA	1:750	nyúl-ellenes	CellSignaling
<b>ULK1</b>	ULK1-Ser555-P	BSA	1:1000	nyúl-ellenes	CellSignaling
	ULK1	tej	1:750	nyúl-ellenes	CellSignaling
<b>Autofágia</b>	LC3	tej	1:750	egér-ellenes	SantaCruz
	p62	tej	1:1000	nyúl-ellenes	CellSignaling
<b>Apoptózis</b>	PARP	tej	1:1000	nyúl-ellenes	CellSignaling
	prokaspáz-3	tej	1:1000	egér-ellenes	SantaCruz
<b>UPR: PERK ág</b>	GADD34	tej	1:750	nyúl-ellenes	SantaCruz
	eIF2 $\alpha$ -P	zselatin	1:750	nyúl-ellenes	CellSignaling
	eIF2 $\alpha$	tej	1:750	nyúl-ellenes	CellSignaling
<b>Háztartási gén</b>	GAPDH	tej	1:16000	egér-ellenes	SantaCruz

Másnap háromszor 15 percen át TBS-Tween oldattal mostuk a membránokat, majd 1 órát inkubáltuk őket az elsődleges antitesteknek megfelelő másodlagos antitestekkel, úgymint HRP (tormaperoxidázal (HRP)) konjugált nyúl-ellenes antitest (1:1000, CellSignaling) vagy egér-ellenes antitest (1:1000, CellSignaling). A másodlagos antitesttel történő inkubálás után a membránokat újból mostuk, majd a detektálást megnövelt kemilumineszcenciával, SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) előhívó folyadék segítségével végeztük.

### 3.8. Az egyes fehérjék mennyiségi meghatározása

A Western blot során detektált és azonosított fehérjéink mennyiségi kiértékelését denzitometráls segítségével végeztük. A denzitometrálsához az ImageJ ingyenesen elérhető szoftvert használtuk, amelyet a következő honlapról töltöttünk le:

<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>.

A denzitometriás ábrákon a fehérjék relatív denzitásait ábrázoltuk, amihez az adott fehérje denzitását vagy az adott fehérje összmennyiségével vagy a GAPDH fehérjével szemben normalizáltuk.

### 3.9. RNS-izolálás és PCR-analízis

A GADD34 csendesítés hatékonyságát PCR-módszer segítségével ellenőriztük. A kezelések végén a sejtek egy részéből RNS-t izoláltunk TRIzol RNS-izoláló reagens segítségével (Invitrogen). A kezelés után a felszedett sejteket kétszer mostuk 1x töménységű PBS-sel (1000 rpm, 4°C, 5 perc), majd hozzáadtuk a mintákhoz a sejtek számával arányos mennyiségű, 250 µl - 1 ml TRIzol reagenst. Ebben alaposan homogenizáltuk a mintákat, majd hozzámértük az adott térfogatú kloroformot (1 ml TRIzol reagenshez 200 µl kloroform). Homogenizációt és 3 perc inkubációt követően a mintákat 10000 rpm-en, 4°C-on 15 percig centrifugáltuk. Ennek nyomán a keverék egy felső vizes, egy középső és egy alsó pirosas fenol fázisra vált szét. A felső vizes fázis tartalmazza az RNS-t, ezért azt egy új csőbe mértük át. Ehhez hideg izopropanol adtunk (1 ml TRIzol reagenshez 500 µl izopropanol) és 10 perc inkubációt követően 10000 rpm-en, 4°C-on 10 percig centrifugáltuk.

Az RNS gél-szerű csapadékot képez a cső aljában, amiről a felülúszót óvatosan eltávolítjuk. Ezután az RNS-t hideg etanolban mostuk (1 ml TRIzol reagenshez 1 ml etanol) és 8000 rpm-en 4°C-on 5 percig centrifugáltuk. Az etanolt nagyon alaposan leszívtuk az RNS-mintákról és elszívó fülkében teljesen kiszárítottuk őket. A szárítást követően 30 µl RNáz-mentes vízben oldottuk fel az RNS-eket.

Az RNS koncentrációját és minőségét NanoDrop1000 készülékkel határoztuk meg. Az RNS átírása cDNS-sé SuperScriptII First-Strand Synthesis System (Invitrogen) segítségével történt.

A cDNS íráshoz az RNS-mintákat azonos koncentrációjúra hígítottuk RNáz-mentes vízzel. A PCR-csővekbe mintánként 1 µl random hexamer primert, 1 µl 10 mM dNTP-keveréket és 11,5 µl RNáz-mentes vizet mértünk össze. Keverés után ehhez 1 µl hígított RNS-t adtunk, és 65°C-os vízfürdőn melegítettük 5 percig, majd a melegítést követően 1 percen át jégen hűtöttük a mintákat. A hűtés után minden PCR-csőhöz 4 µl 5x töménységű puffert, 1 µl 0,1 M-os DTT-t és 0,5 µl SuperScript RTIII enzimet mértünk, majd kevertük és centrifugáltuk őket. A PCR-hez használt termociklus a következő fázisokból állt: 50°C – 50 perc, 85°C – 5 perc.

A GADD34 mennyiségét Invitrogen Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG segítségével és QuantStudio 12K Flex real-time PCR-készülékkel mértük meg. Mintánként a PCR-hez használt lemez megfelelő pozícióiba 10 µl 2x töménységű SYBR Green mixet, 2-2 µl-t a 10 µM primerekből és 4 µl vizet mértünk, és ehhez egyesével adtuk hozzá a 2 µl cDNS-t (4x hígítás). A PCR-hez használt termociklus a következő volt: 95°C – 10 perc, 40 ciklus: 95°C – 15 másodperc, 60°C – 1 perc.

A GADD34 gén amplifikálásához használt primerpár szekvenciái:

Forward: 5'-GACCTGTGATCGCTTCTGG-3',

Reverse: 5'-TAGCCTGATGGGGTGCTT-3'.

A GAPDH gén amplifikálásához használt primerpár bázissorrendje:

Forward: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3',

Reverse: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'.

### 3.10. Immunfluoreszcens festés

A fluoreszcens mikroszkópos vizsgálathoz a sejteket megfelelő hígítás után 8 kamrás (Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System, Thermo Scientific) vagy 16 kamrás (CultureWell™ Chambered Coverglass for cell culture, Invitrogen) lemezekre vittük fel. A lemezeket használat előtt poli-D-lizinnel (Sigma) vontuk be, a HEK293 sejtek megfelelő tapadása érdekében.

A kezeléseket követően a sejteket 4% paraformaldehidet tartalmazó PBS-oldatban fixáltuk 15 percig. A fixálást követően háromszor mostuk őket hideg 1x töménységű PBS-sel.



Ezután a sejteket 0,25% Triton-X-et tartalmazó 1x töménységű PBS-oldatában 10 perces kezeléssel permeabilizáltuk, majd újból mostuk őket háromszor 5 percig 1x töménységű PBS-ben. A permeabilizálás után a sejteket 5% kecske szérumot és 0,3% Triton-X-et tartalmazó PBS-oldatban 1 órán át blokkoltuk. Az elsődleges antitesteket (p62 és LC3, CellSignaling) 5% kecske szérumot és 0,3% Triton-X-et tartalmazó PBS-oldatban 1:100 arányban hígítottuk, majd ezzel egy éjszakán keresztül 4°C-on inkubáltuk a sejteket. Másnap a sejteket újból mostuk háromszor 5 percig 1x töménységű PBS-ben, majd az Alexa Fluor 488-cal konjugált másodlagos nyúl-ellenes antitesttel (CellSignaling) 1 órán keresztül inkubáltuk őket. A másodlagos antitestet 1x töménységű PBS-oldatban, 1:600 arányban hígítottuk. A másodlagos antitesttel történő inkubációt követően a sejteket újból mostuk 1x töménységű PBS-oldatban háromszor 5 percig. A mosások után a sejteket DAPI festéket 1:10000 arányban tartalmazó 1x töménységű PBS-sel 5 percig inkubáltuk. A festést követően kétszer 3 percig mostuk a sejteket 1x töménységű PBS-sel. Ezután a sejteket FluoroSave reagenssel (Millipore) vontuk be és fedőlemezekkel fedtük be őket. Egy éjszakán át tartó száradást követően fluoreszcens mikroszkóp (Nikon Eclipse Ts2R) használatával készítettünk felvételeket a sejtekről.

### 3.11. Statisztika

Minden kísérlet esetén három, egymástól független párhuzamos mérést végeztünk. Az eredményeket tartalmazó diagramokon a mérések átlagát ábrázoltuk, feltüntetve a szórást (SD - standard deviation). A szórásokat ANOVA módszer segítségével hasonlítottuk össze. A diagramokon levő jelek a megfelelő kontrolltól való statisztikailag szignifikáns eltérést jeleznek: ns- nem szignifikáns; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .

### 3.12. Modellezés

Az mTOR-AMPK-ULK1 szabályozási hálózat dinamikai viselkedését nemlineáris közönséges differenciálegyenletek segítségével írtuk le (128-130), így egy sokparaméteres elsőfokú differenciál-egyenletrendszert kaptunk. A dinamikai szimulációk analizisét az XPP-AUT programmal végeztük, mely ingyenesen elérhető innen: <http://www.math.pitt.edu/~bard/xpp/xpp.html> (129, 130).

A differenciálegyenletek egy komponens (AMPK, ULK1, mTORC1, GADD34, autofágia induktor, apoptózis) szintjének, koncentrációjának vagy aktivitásának változását írják le az időben.

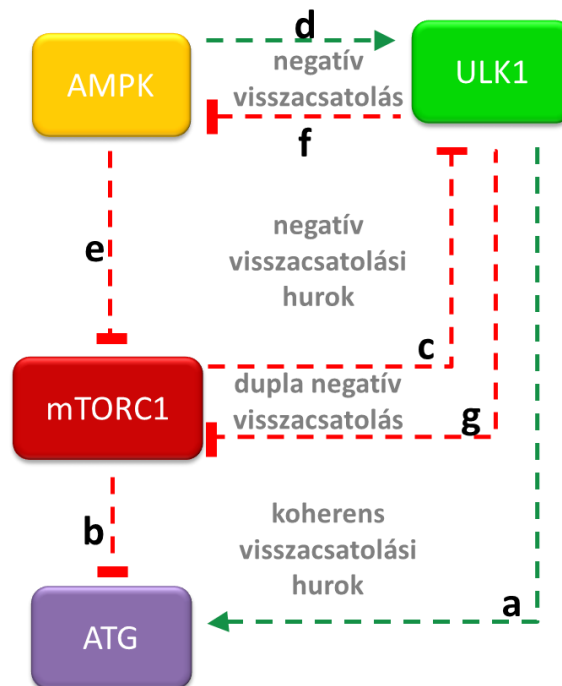
A szabályozási hálózat elemeinek időbeni változásait leíró differenciálegyenletek két részből állnak: egy pozitív és egy negatív tagból. A pozitív tag lehet fehérjeszintézis és aktiválódás (pl.: poszttranszlációs módosítással), míg a negatív tag lehet fehérje degradáció és inaktiváció. A szintézis és a degradáció folyamatait általában tömeghatás kinetikával, míg a fehérje aktiválódást tömeghatás vagy Michaelis-Menten kinetikával írtuk le. A nemlineáris differenciálegyenlet rendszer megoldása megadja a relatív fehérjekoncentráció vagy aktivitás időbeli alakulását.

A (k) sebességi állandók  $\text{min}^{-1}$  mértékegységgel rendelkeznek, míg a Michaelis állandók (J) dimenzió nélküliek. A fehérjeszintet vagy aktivitást önkényes egységekben adjuk meg.

## 4. Eredmények

### 4.1. Az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási háromszög dinamikai viselkedésének vizsgálata

Az utóbbi években több olyan tanulmány készült, ahol a biológiai rendszerek dinamikai viselkedését elméleti módszerekkel próbálták közelíteni. Egy lengyel-amerikai kutatócsoport létrehozott egy egyszerű mechanisztikus matematikai modellt, az autofágia és a sejtnövekedést szabályozó mechanizmusok leírására, melyben a kulcsfontosságú tagokat és azok egymásra gyakorolt hatását differenciálegyenletekkel írták le (103). A Szymańska P. és munkatársai által felépített modell megfelelően szimulálta a glukózmegvonás és a rapamycin-kezelés hatását az autofágia és a transzláció aktiválódása szempontjából, de más kísérleti beállításokat nem teszteltek (103).



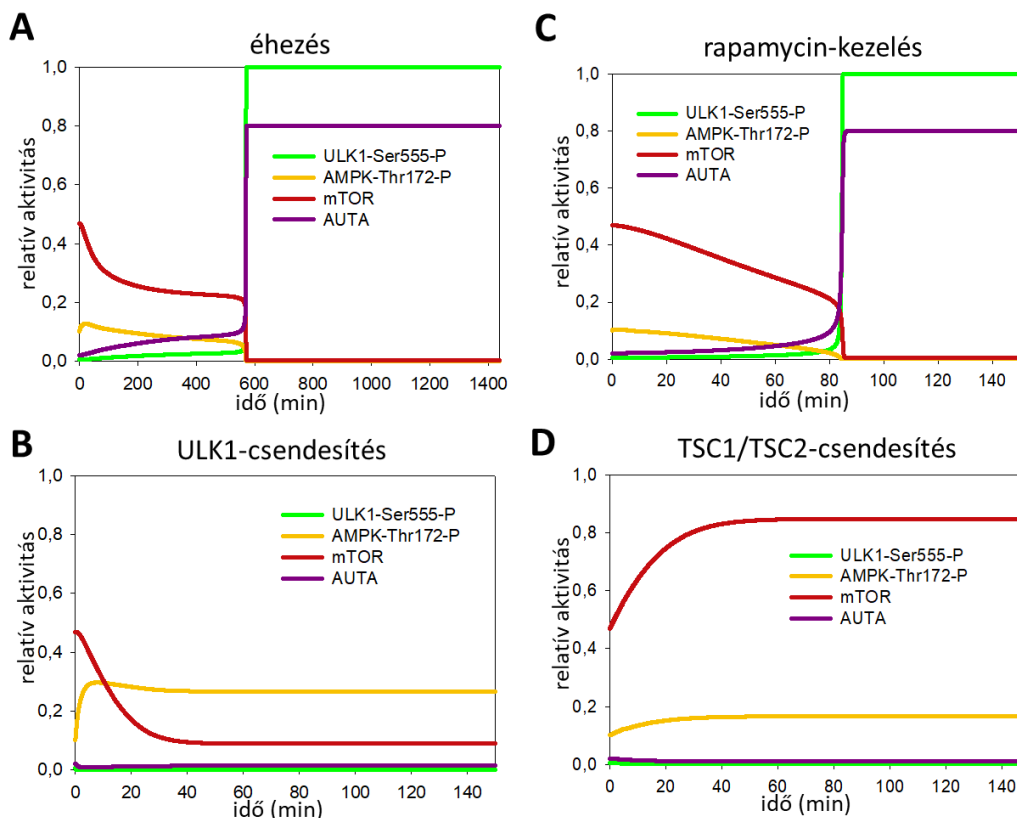
15. ábra. Az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási háromszög.

A szabályozási hálózatban levő kapcsolatok (a,b,c,d,e,f,g) az irodalmi adatok alapján. A zöld nyilak serkentő, míg a pirosak gátló kapcsolatot feltételeznek a hálózat tagjai között.

Ezért a szabályozási rendszer működésének további vizsgálatához reprodukáltuk az általuk leírt kapcsolatokat tartalmazó matematikai modellt (15. ábra) úgy, hogy a definiált kapcsolatok alapján differenciálegyenletek segítségével írtuk meg a modellhez szükséges programot.

Ebben a hálózati rendszerben megtalálható egy bizonyított negatív visszacsatolási hurok az AMPK és az ULK1 között (15. ábra, 'd', 'f'), valamint egy dupla negatív visszacsatolási hurok az ULK1 és az mTORC1 között (15. ábra, 'c', 'g'). Az AMPK gátolja az mTORC1 működését (15. ábra, 'e'), míg az mTORC1 megakadályozza (15. ábra, 'b'), az ULK1 pedig serkenti (15. ábra, 'a') az autofágia (ATG) működését.

A reprodukált modellel elvégeztük az éhezés és a rapamycin-kezelés időbeni szimulációját, majd különböző, az irodalomban már jól dokumentált válaszreakciók segítségével is teszteltük a rendszer működését (az irodalmi adatok a 7. melléklet táblázatában találhatók meg).



16. ábra. A reprodukált modellel végzett időbeni szimulációk eredményei.

A reprodukált modellel végzett kezelések időbeni szimulációi: A) éhezés, B) ULK1-csenedesítés, C) rapamycin-kezelés, D) mTORC1-hiperaktiváció (TSC1/2-csenedesítés).

Azt vettük észre, hogy ezzel a modellel végzett időbeni szimulációk nem elég pontosan – sőt mi több, ellentmondásosan – írták le a szabályozási hálózat működését. Éhezés és rapamycin-kezelés hatására irodalmi adatok alapján AMPK aktiválódást, míg ULK1 csendesítése és mTORC1 hiperaktivációja esetén pedig inaktív AMPK-t várnánk. Ezzel szemben éhezés (16. ábra – A) és rapamycin-kezelés (16. ábra – C) során az AMPK inaktiválódott, míg az ULK1 csendesítése (16. ábra – B) és az mTORC1 hiperaktivációja (16. ábra – D) esetén enyhén növekedett az AMPK aktivitási szintje. Ezek a szimulációs eredmények tehát arra utalnak, hogy a rendszerből hiányzik egy vagy akár több további kapcsolat, visszacsatolási hurok, amellyel a modellt kiegészítve az képes lenne megfelelően leírni az élő rendszerek működését.

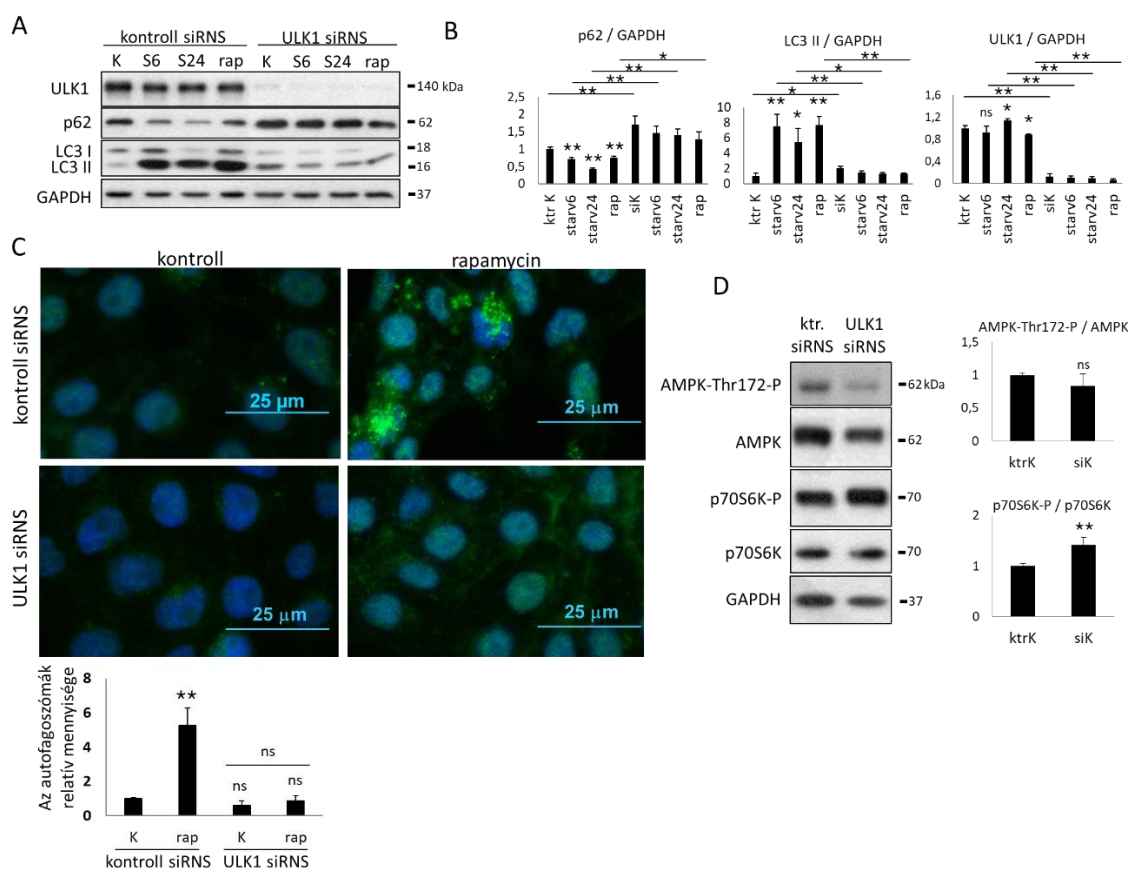
#### *4.1.1. Az ULK1 csendesítésének vizsgálata*

Ahhoz, hogy igazoljuk a hiányzó kapcsolatot, kísérletesen is elvégeztük az ULK1 (17. ábra) és a TSC1/2 (mTORC1 hiperaktiváció) (131) csendesítését és a hálózat tagjainak aktivációs profilját immunoblottal vizsgáltuk meg (17. ábra).

Az ULK1-csendesítés hatékonyságát fehérjeszinten ellenőriztük (17. ábra – A, B). Kíváncsiak voltunk az ULK1-csendesítés autofágiára gyakorolt hatására is, így a csendesítést éhezéssel és rapamycin-kezeléssel kombináltuk. Rapamycin-kezelés és éhezés hatására a p62 fehérje szintje szignifikánsan csökkent, míg az LC3 II/GAPDH arány növekedett, ami az autofágia aktiválódására utal. Ha ezeket a kezeléseket az ULK1 fehérje csendesítése előzte meg, az autofágia nem tudott megfelelően aktiválódni, azaz az LC3 II formájának mennyisége nem növekedett (az LC3 II/GAPDH arány nem nőtt), a p62 fehérje mennyisége pedig nem csökkent (17. ábra – A, B). Ezt megvizsgáltuk az LC3 fehérje fluoreszcens antitesttel való jelölésével is (17. ábra – C), ahol az immunoblottokkal megegyező eredményeket kaptunk. Itt az LC3-at az autofagoszómákban felhalmozódva, éles pontokként detektálhattuk. Rapamycin-kezelés hatására kb. ötszörös növekedést tapasztaltunk az autofagoszómák számában, ezzel szemben ULK1 hiányában az autofagoszómák száma a kontrollhoz hasonló alacsony szinten maradt.

Mivel ULK1 nélkül a sejtekben nem detektáltunk autofágiás aktivitást azt mondhatjuk, hogy az autofágia működéséhez az ULK1 jelenléte mindenképpen szükséges.

Ezután megvizsgáltuk az AMPK és az mTORC1 aktivációs profilját is az ULK1 csendesítése esetén. Azt láttuk, hogy az AMPK inaktív, mivel az aktivitását jelző foszforiláció nem növekedett (a foszforilált AMPK mennyisége a kontrollhoz viszonyítva még csökkent is), míg az mTORC1 aktív (az mTORC1 szubsztrát p70S6K foszforilációja a kontrollhoz képest változatlan) maradt (17. ábra – D). Ez azt sugallja, hogy bár az AMPK-t ebben az esetben az ULK1 nem tudja inaktív állapotban tartani, mivel a szabályozási hálózatból kiesik az ULK1 AMPK-on való gátlása, egy további ismeretlen tényező mégis megakadályozza azt, hogy az AMPK aktiválódjon.



17. ábra. Az ULK1-csenedítés hatásának vizsgálata.

A) Az ULK1-csenedítés hatékonyságának (ULK1) és az autofágia aktiválódás (p62, LC3) nyomon követése Western blot segítségével. B) A Western blot eredmények denzitometriás analízise. C) Az autofágia fluoreszcens LC3-mal való detektálása. D) Az ULK1-csenedítés hatása az AMPK (AMPK-Thr172-P) és az mTORC1 (p70S6K-P) működésére.

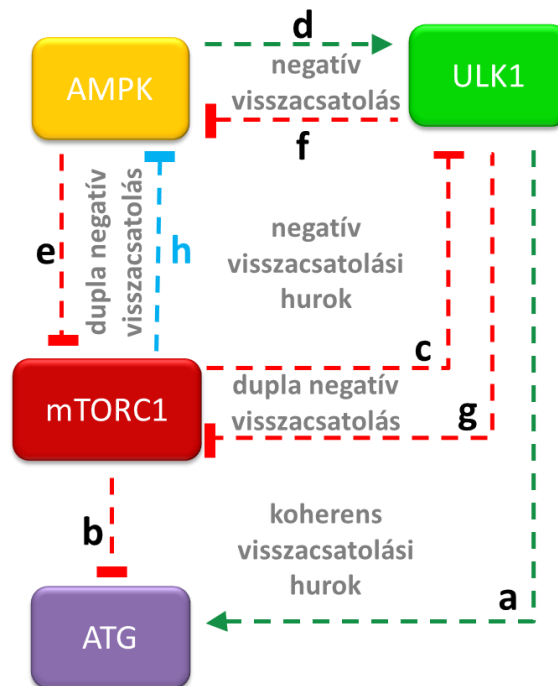
A hibasávok a szórást jelölik, a jelek statisztikailag szignifikáns eltérést mutatnak a kontrolltól: ns - nem szignifikáns; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .

Az mTORC1 autofágia szabályozásában betöltött szerepének további vizsgálatához az mTORC1 működés hiperaktiválását az öt gátló TSC1 és TSC2 fehérjék siRNS-sel történő csendesítésével érték el.

Az mTORC1 hiperaktivációját kombináltuk éhezéssel és rapamycin-kezeléssel is, hogy az mTORC1 szerepéről megbizonyosodjunk az autofágia szabályozásában. Az mTORC1 fokozott működése esetén az autofágia inaktív maradt. Habár az ULK1 aktivitását nem tudtuk megfigyelni a TSC1 és TSC2 fehérjék csendesítése esetén, az AMPK mégis inaktív volt (131).

Mivel az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási hálózatban egyedül az mTORC1 aktív, arra következtettünk, hogy az mTORC1-nek valamilyen direkt vagy indirekt gátló hatása lehet az AMPK-ra.

Ezen eredmények alapján valóban szükséges kiegészíteni a modellt egy további kapcsolattal is a megfelelő működéshez, így létrehoztuk a saját matematikai modellünket, amelybe beépítettük az általunk feltételezett extra visszacsatolási hurkot az AMPK és az mTORC1 közé (18. ábra, 'h').



18. ábra. Az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási háromszög kiegészítése a feltételezett kapcsolattal.

A szabályozási hálózatban levő irodalmi adatokkal igazolt kapcsolatok (a,b,c,d,e,f,g) és az általunk feltételezett kapcsolat (h). A zöld nyilak serkentő, míg a pirosak gátló kapcsolatot feltételeznek a hálózat tagjai között, az új kapcsolatot kék színnel jelöltük.

#### 4.1.2. Az $mTORC1 \dashv$ AMPK kapcsolattal kiegészített modell vizsgálata

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk az AMPK  $mTORC1$ -függő gátlásának fontosságát a vizsgált szabályozási hálózatunkban, kiegészítettük a korábbi modellt ezzel a negatív kapcsolattal ( $mTORC1 \dashv$  AMPK). Így egy dupla negatív visszacsatolási hurok jött létre az AMPK és az  $mTORC1$  között ( $mTORC1 \dashv$  AMPK  $\dashv$   $mTORC1$ , 18. ábra, 'h' és 'e'). A kiegészített modellel is elvégeztük ugyanazokat a szimulációkat, mint az eredeti modellel és azt láttuk, hogy a kapott szimulációk a kísérletes eredményeinket már jobban megközelítették (19. ábra).

Az éhezés szimulációjakor azt tapasztaltuk, hogy az AMPK gyorsan aktívvá vált, majd aktiválta az ULK1-et. Az aktív AMPK és az ULK1 pedig együtt indukálta az autofágiás folyamatokat, ezt követően pedig az ULK1 legátolta az AMPK további működését (19. ábra – A).

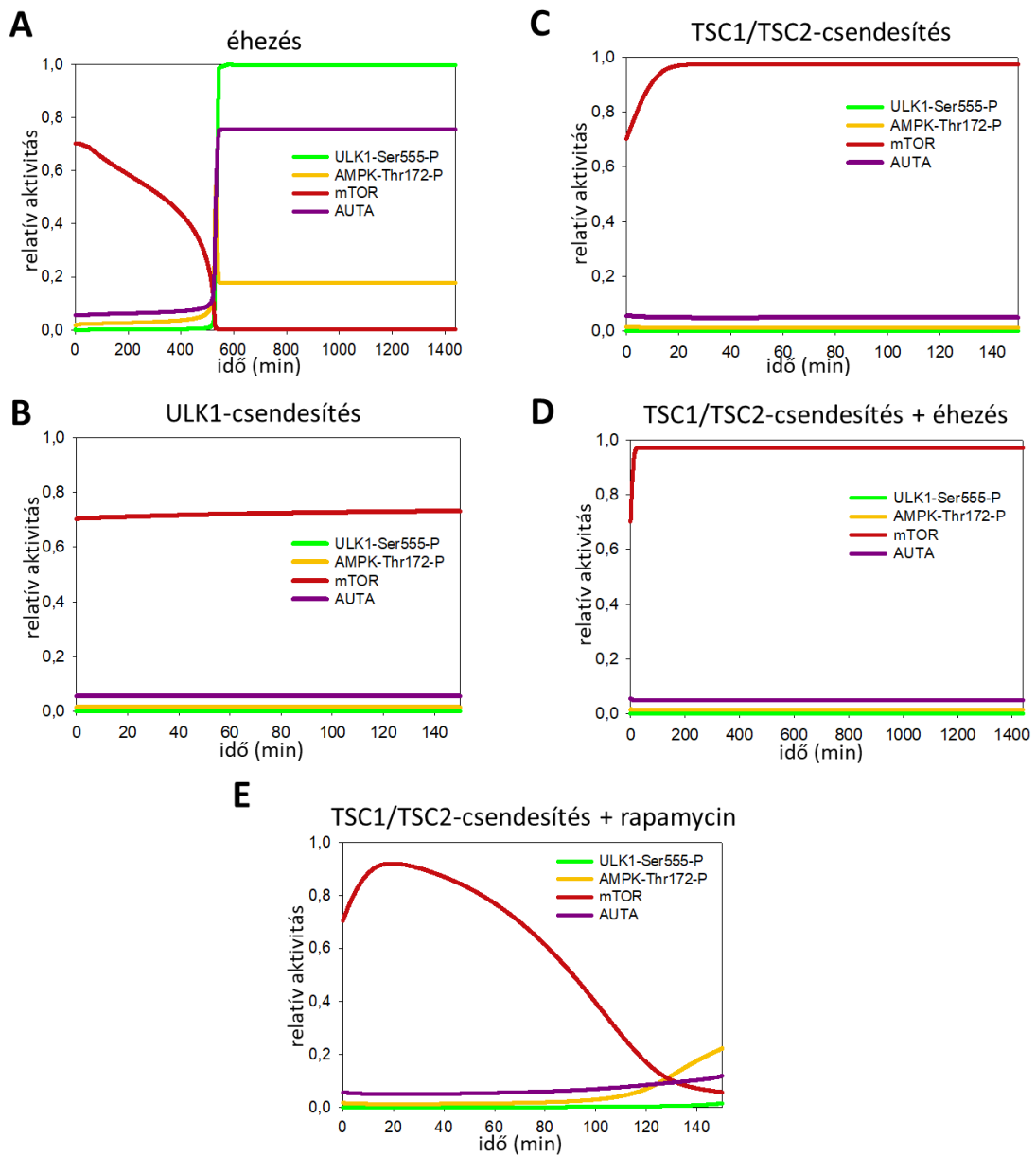
Az ULK1-csendesítés szimulációjakor az  $mTORC1$  aktivitása nem csökkent, köszönhetően az AMPK  $mTORC1$ -függő gátlásának, így az AMPK inaktív, tehát defoszforilált állapotban maradt (19. ábra – B).

Amennyiben az  $mTORC1$ -et hiperaktiváltuk, akkor ugyan az aktívabb  $mTORC1$  gyorsan gátolta az ULK1-et, az AMPK nem vált aktívvá, mivel az  $mTORC1$  gátló hatása érvényesült az AMPK-on (19. ábra – C).

Továbbá a modellünkkel végzett szimulációkon az is látszódott, hogy az  $mTORC1$  hiperaktivációja rapamycin-kezeléssel elnyomható volt, ebben az esetben az AMPK, az ULK1 és az autofágia is képes lehet aktiválódni (19. ábra – E), míg az éhezés hatására ezt nem tudtuk megfigyelni (19. ábra – D).

Az elvégzett időbeni szimulációk eredményei alapján tehát elképzelhető az, hogy az  $mTORC1$  az a keresett faktor, ami gátolja az AMPK működését. Így a rendszerben létrejön egy új dupla negatív visszacsatolási hurok, aminek alapvető szerepe lehet abban, hogy fiziológias körülmények között az AMPK biztosan az inaktív állapotban maradjon.

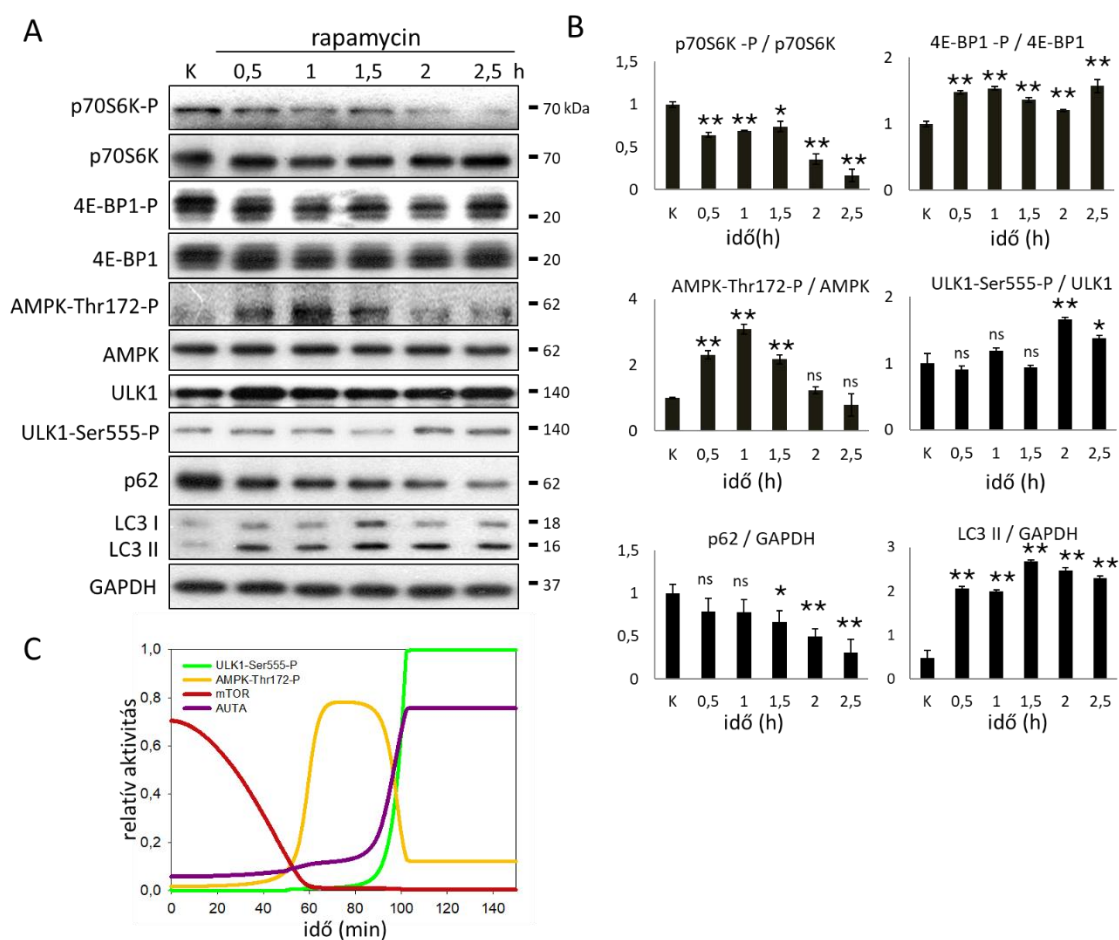




19. ábra. Az általunk felépített modellel végzett időbeni szimulációk. A modellünkkel végzett időbeni szimulációk eredményei a diagramokon láthatók: A) éhezés, B) ULK1-csendesítés, C) mTORC1-hiperaktiváció (TSC1/2-csendesítés), D) mTORC1-hiperaktiváció (TSC1/2-csendesítés) kombinálása éhezéssel, E) mTORC1-hiperaktiváció (TSC1/2-csendesítés) kombinálása rapamycin-kezeléssel.

### 4.1.3. Az AMPK aktivációs profiljának vizsgálata az mTORC1 gátlása esetén

Az mTORC1 AMPK-ra kifejtett gátló hatásának megerősítéséhez megvizsgáltuk az mTORC1 gátlása esetén az AMPK aktivációs profilját. Ezért az mTORC1 működését több időpontban is rapamycinnel gátoltuk, majd a hálózat tagjainak aktiválódását immunoblottal vizsgáltuk (20. ábra).



20. ábra. Az AMPK aktivációjának vizsgálata az mTORC1 gátlása esetén.

A) Az mTORC1-markerek (p70S6K-P, 4E-BP1-P), az AMPK (AMPK-Thr172-P), az ULK1 (ULK1-Ser555-P) és az autofágia aktiválódásának (p62, LC3) nyomon követése Western blot segítségével. B) A Western blot eredmények denzitometriás analízise. A hibasávok a szórást jelölik, a jelek statisztikailag szignifikáns eltérést mutatnak a kontrolltól: ns - nem szignifikáns; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ . C) A rapamycin-kezelés hatásának időbeni szimulációja a kiegészített modell segítségével.

A kezelés hatására az mTORC1 aktivitása gyorsan lecsökkent, amire a szubsztrát fehérjék foszforilációjának változásából következtethettünk (p70S6K foszforilációja csökkent, a 4E-BP1 3. csíkjának foszforilációja nőtt) (20. ábra– A, B).

Az mTORC1 inaktiválódásával párhuzamosan az AMPK aktiválódott. Az aktív AMPK pedig kis időbeni késleltetéssel aktiválta az ULK1-et (ULK1-Ser555-P megjelenése), de ezt követően az AMPK aktivitása lecsökkent, mivel az aktív ULK1 gátolta az AMPK működését (20. ábra– A, B).

Bár az LC3 II-es formájának mennyisége már 30 perc kezelés után megnőtt, a p62 szintje szignifikánsan csak akkor kezdett el csökkenni, amikor már az ULK1 is aktív volt. Az autofágia a kezelés végéig aktív maradt, annak ellenére, hogy az ULK1 gátolta az AMPK működését, vagyis aktív AMPK jelenléte nem esszenciális az autofágiás folyamatok fenntartásához (20. ábra – A, B).

A modellünkkel készített időbeni szimuláció karakterisztikája megegyezett a kísérletes eredményeinkkel (20. ábra – C).

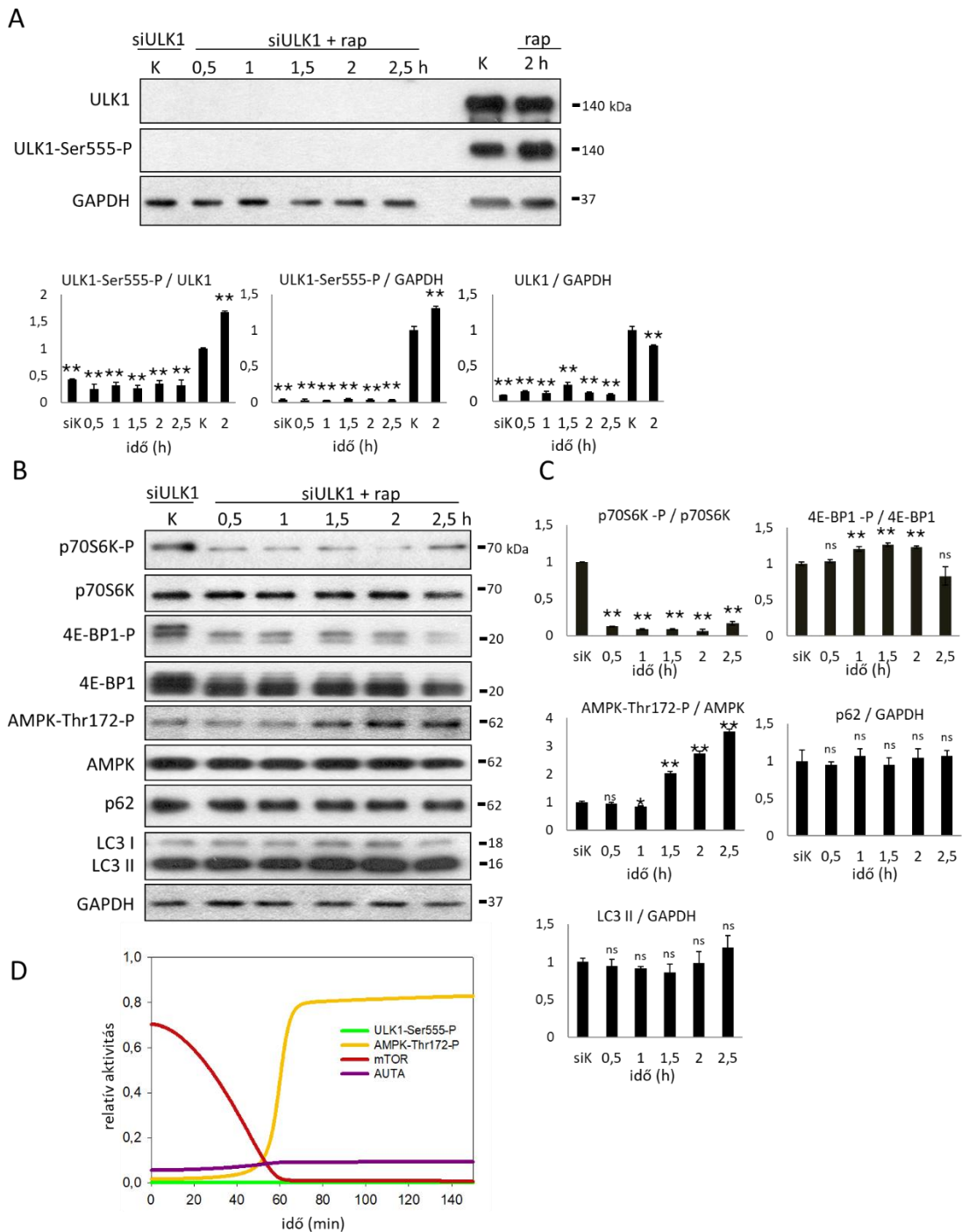
Tehát az eredményeink alapján az mTORC1 gátlásakor az AMPK tranziensen aktiválódik, és az aktiválódása megelőzi az ULK1 aktiválódását.

#### *4.1.4. Az ULK1 csendesítés kombinálása az mTORC1 gátlásával*

A korábbi eredmények azt mutatták, hogy az AMPK inaktív maradt ULK1-csendesítés esetén, míg az mTORC1 aktív volt. Így a közöttük levő kapcsolat további vizsgálatának érdekében az ULK1 csendesítését rapamycin-kezeléssel is kombináltuk, így megvizsgálva azt, hogy az mTORC1 gátlása esetén az AMPK már képes-e aktiválódni. A sejtekben először csendesítettük az ULK1 fehérjét siRNS-sel, majd rapamycinnel kezeltük őket és a hálózat tagjainak aktiválódását immunoblot segítségével követtük nyomon (21. ábra).

Az ULK1 csendesítésének hatékonyságát fehérje szinten vizsgáltuk az ULK1 fehérje aktív és összes mennyiségének összehasonlításával (21. ábra – A).

Az ULK1 csendesítése esetén a rapamycin-kezelés hatására az mTORC1 már 30 perc után inaktiválódott (a p70S6K foszforilációja csökkent, a 4E-BP1 3. csíkjának foszforilációja nőtt) (21. ábra – B, C).



21. ábra. Az ULK1 csendesítésének kombinálása az mTORC1 gátlásával.

A) Az ULK1-csenedítés hatékonyságának ellenőrzése (ULK1-Ser555-P, ULK1, GAPDH) Western blottal és az eredmények denzitometriás analízise. B) Az mTORC1-markerek (p70S6K-P, 4E-BP1-P), az AMPK (AMPK-Thr172-P) és az autofágia aktiválódásának (p62, LC3) nyomon követése Western blot segítségével. C) A Western blot eredmények denzitometriás analízise. D) A kombinált kezelés hatásának időbeni szimulációja a kiegészített modell segítségével.

A hibásávok a szórást jelölik, a jelek statisztikailag szignifikáns eltérést mutatnak a kontrolltól: ns - nem szignifikáns; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .

Az AMPK pedig ezt követően másfél óra után aktiválódott, és az aktivitása ULK1 hiányában a kezelés végéig fennmaradt (21. ábra – B, C). Azonban az autofágiás folyamatok ULK1 nélkül nem tudtak aktiválódni (LC3 II-es formájának mennyisége a kontrollhoz képest nem változott, a p62 szintje nem csökkent) (21. ábra – B, C).

Számítógépes szimulációnkon is az látszik, hogy az AMPK aktiválódott az mTORC1 gátlása esetén és ez az aktivitás az ULK1 csendesítése miatt tartósan fenn is maradt (21. ábra – D). Az AMPK fokozott aktivitása arra utal, hogy az őt gátló fehérjék hiányoznak a rendszerből.

Tehát abban az esetben, ha mind az ULK1, mind az mTORC1 aktiválódása gátolt, az AMPK képes aktiválódni, de önmagában nem elégséges az autofágia aktiválásához.

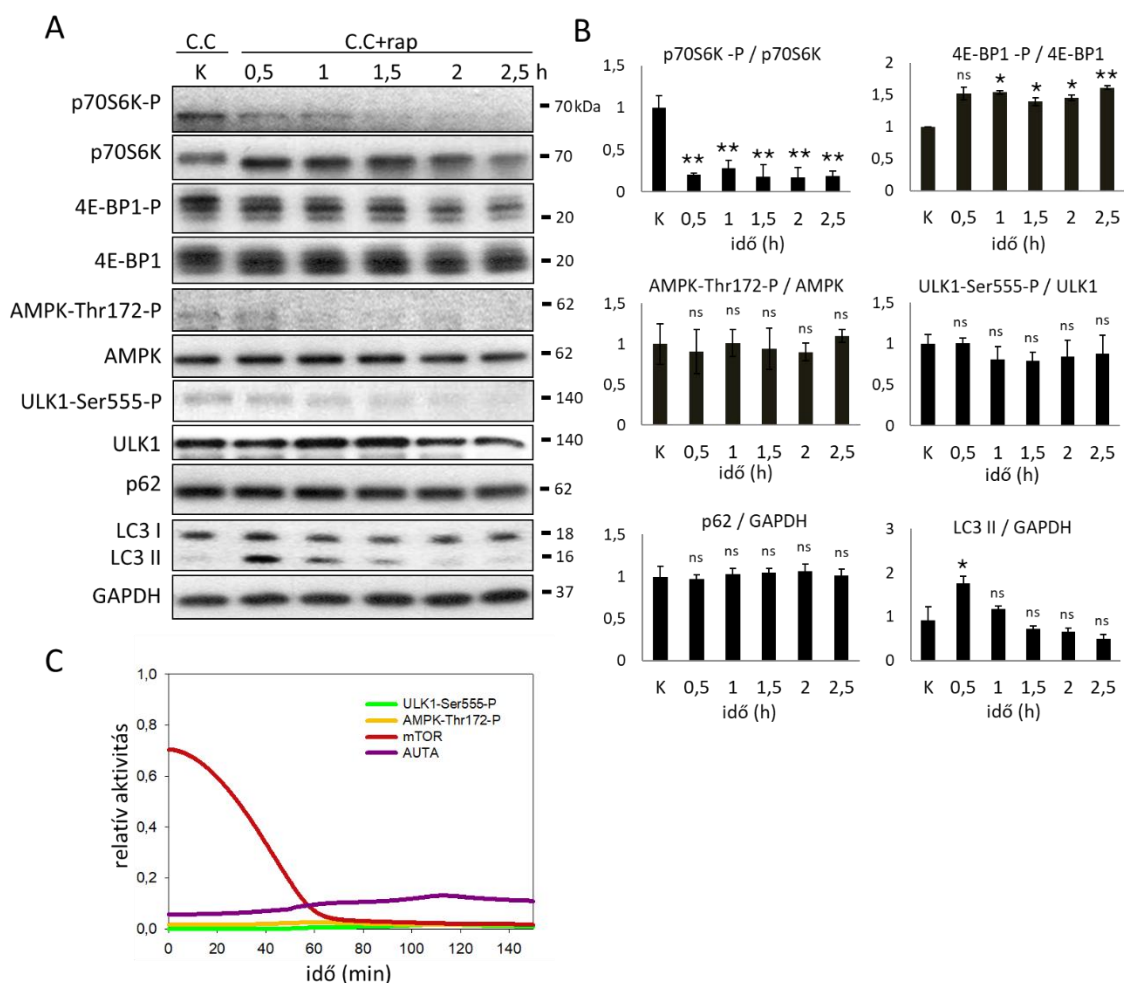
#### *4.1.5. Az AMPK gátlásának kombinálása az mTORC1 gátlásával*

Az AMPK az autofágia aktiválásában nyújtott szerepének vizsgálatához gátoltuk a működését Compound C-vel és ezt a kezelést az mTORC1 gátlásával is kombináltuk (rapamycin-kezelés). A kezeléseket követően a hálózat egyes tagjainak markerfehérjéit immunoblottal vizsgáltuk (22. ábra).

A Compound C teljesen gátolta az AMPK aktiválódását, így a Thr172-es hely foszforilációját egyáltalán nem figyeltük meg (22. ábra – A, B). A rapamycin-kezelés hatására az mTORC1 is inaktiválódott (p70S6K foszforilációja csökkent, a 4E-BP1 3. csíkjának foszforilációja nőtt) (22. ábra – A, B).

Az aktív AMPK hiányában sem az ULK1 (az ULK1 Ser555-ös foszforilációja nem nőtt), sem az autofágia (LC3 II-es formájának mennyisége a kontrollhoz képest nem változott, a p62 szintje nem csökkent) nem tudott aktiválódni, hiába volt az mTORC1 inaktív állapotban (22. ábra – A, B).

A modellel végzett szimulációk esetén is hasonló karakterisztikát tudtunk megfigyelni, vagyis az ULK1 inaktív maradt. Bár az ULK1-et az mTORC1 nem gátolta, mégsem volt képes aktiválódni, mert aktivációjához az AMPK nélkülözhetetlennek bizonyult. Mivel sem az aktív AMPK, sem az aktív ULK1 nem volt detektálható, így az önemésztő folyamatok sem tudtak aktiválódni (22. ábra – C).



22. ábra. Az AMPK gátlásának kombinálása az mTORC1 gátlásával.

A) Az mTORC1 markereinek (p70S6K-P, 4E-BP1-P), az AMPK (AMPK-Thr172-P), az ULK1 (ULK1-Ser555-P) és az autofágia aktiválódásának (p62, LC3) nyomon követése Western blot segítségével. B) A Western blot eredmények denzitometriás analízise. A hibasávok a szórást jelölik, a jelek statisztikailag szignifikáns eltérést mutatnak a kontrolltól: ns - nem szignifikáns; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ . C) A kombinált kezelés hatásának időbeni szimulációja a kiegészített modell segítségével.

A kísérletes és az elméleti módszerekkel kapott eredmények arra utalnak, hogy az AMPK aktivációja szükséges az autofágia elindulásához, azáltal, hogy az ULK1-et foszforilációval aktiválja.

A modellekkel további szimulációkat is elvégeztünk, ahol az AMPK mTORC1 általi gátlásának beépítésével végzett szimulációkkal vetettük össze az eredeti modell működését és kiemeltük a két modell szimulációinak különbségeit (131).

## 4.2. Az AMPK és az ULK1 közötti negatív visszacsatolási hurok dinamikai vizsgálata

Az elkészített modellünkkel a következőkben az  $AMPK-P \rightarrow ULK1-P \dashv AMPK-P$  negatív visszacsatolási hurok működését tanulmányoztuk, hogy ennek a kapcsolatnak a dinamikai tulajdonságait jobban megértsük.

### 4.2.1. Az AMPK és az ULK1 közötti direkt negatív visszacsatolás vizsgálata

Először azt feltételeztük, hogy a szabályozási hálózatunkban az AMPK és az ULK1 között  $AMPK-P \rightarrow ULK1-P \dashv AMPK-P$  módon felépülő direkt visszacsatolási hurok található, azaz az aktív AMPK indukálja az ULK1 működését, majd az aktiválódott ULK1 legátolja az AMPK-t.

A feltételezett direkt negatív visszacsatolás a hálózat működésére gyakorolt hatásának megértéséhez jel-válasz görbéket generáltunk.

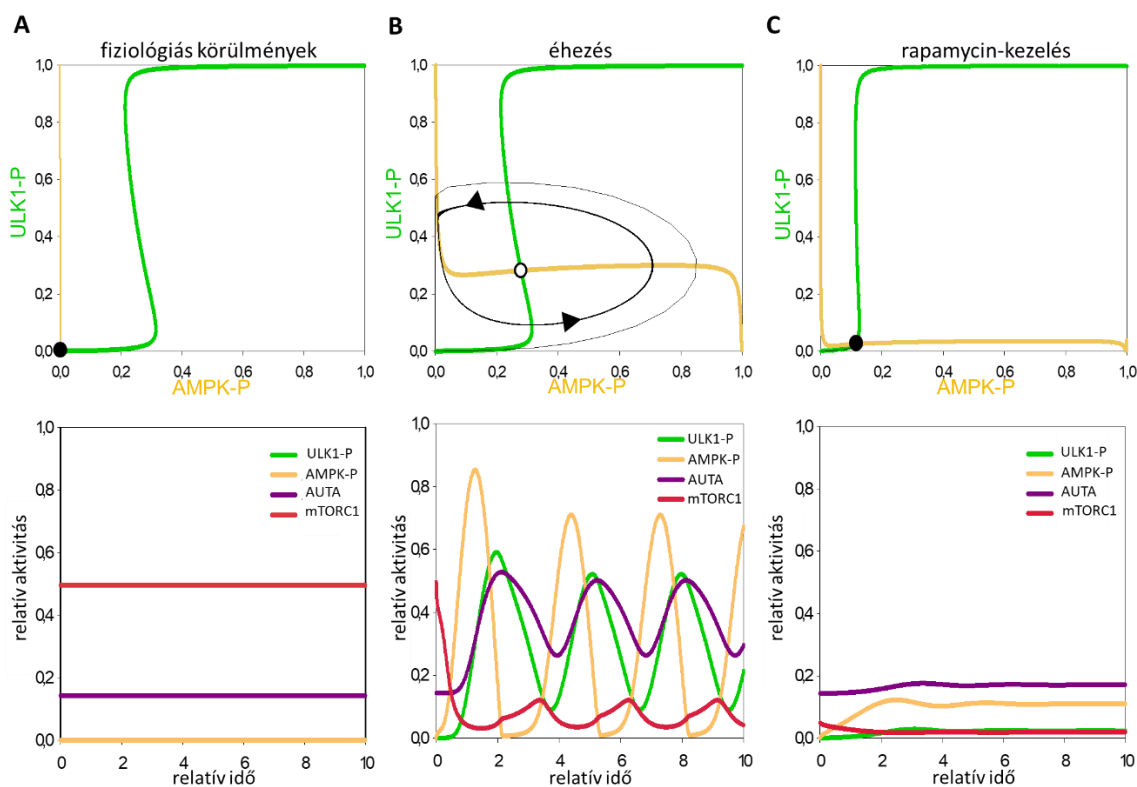
Abban az esetben, ha a hálózat többi tagjáról feltételezzük, hogy gyorsan egyensúlyi állapotba (steady state) kerülnek, akkor az aktív AMPK (AMPK-P) függvényében ábrázolhatjuk az aktív ULK1-et (ULK1-P) (23. ábra, felső diagramok). A két görbe metszéspontjait egyensúlyi pontoknak nevezzük, itt a rendszer egyensúlyban van, tehát ezek a pontok a szabályozási hálózatban fiziológiás állapotként értelmezhetők.

Fiziológiás körülmények között az egyensúlyi görbék a 0-hoz közel metszették egymást, arra utalva, hogy itt mind az AMPK, mind az ULK1 inaktív (23. ábra – A, felső diagram). A modellünkkel időbeni szimulációkat végezve pedig azt láttuk, hogy fiziológiás körülmények között az mTORC1 aktív, míg az AMPK, az ULK1 és az autofágia inaktív állapotban volt (23. ábra – A, alsó diagram).

Az éhezés hatását a modellünkben az AMPK-t aktiváló tag sebességi állandójának növelésével szimuláltuk. Ekkor az AMPK magasabb aktivitása a negatív visszacsatolási hurokban egy késleltetést generált. Ennek hatására a rendszer elemeinek oszcillációját tudtuk megfigyelni, amit az  $AMPK-P \dashv mTORC1 \dashv ULK1-P \dashv AMPK-P$  visszacsatolási hurok eredményezett (23. ábra – B).

A szimulációk szerint tehát a sejtben az éhezés az autofágia periodikus aktiválódását okozta ahelyett, hogy az önemésztő folyamatok aktivitása állandósult volna (23. ábra – B).

Rapamycinnel történő kezelés hatására az mTORC1 működése gátlódott, vagyis a rendszerünkben kiesett az AMPK-P  $\downarrow$  mTORC1  $\downarrow$  ULK1-P  $\downarrow$  AMPK-P hurok és csak az AMPK-P  $\rightarrow$  ULK1-P  $\downarrow$  AMPK-P direkt visszacsatolási hurok maradt. A direkt kapcsolat hatására egy homeosztatisz állapot állt be, ahol az AMPK és az ULK1 is inaktív volt (23. ábra – C, felső diagram). Vagyis az mTORC1 hiányában az AMPK gyorsan aktiválódott és foszforilálta az ULK1-et, azonban az ULK1 legátolta az AMPK további aktivációját, mielőtt még az autofágiás folyamatok elindultak volna, emiatt az időben végzett szimuláció esetén sem történt autofágia aktiváció (23. ábra – C, alsó diagram). Ez viszont teljesen ellentmond a korábbi kísérletek során tapasztalt eredményeknek, miszerint rapamycin-kezelés hatására az AMPK és az ULK1 aktiválódik és elősegítik az önemésztő folyamatok indukálódását.



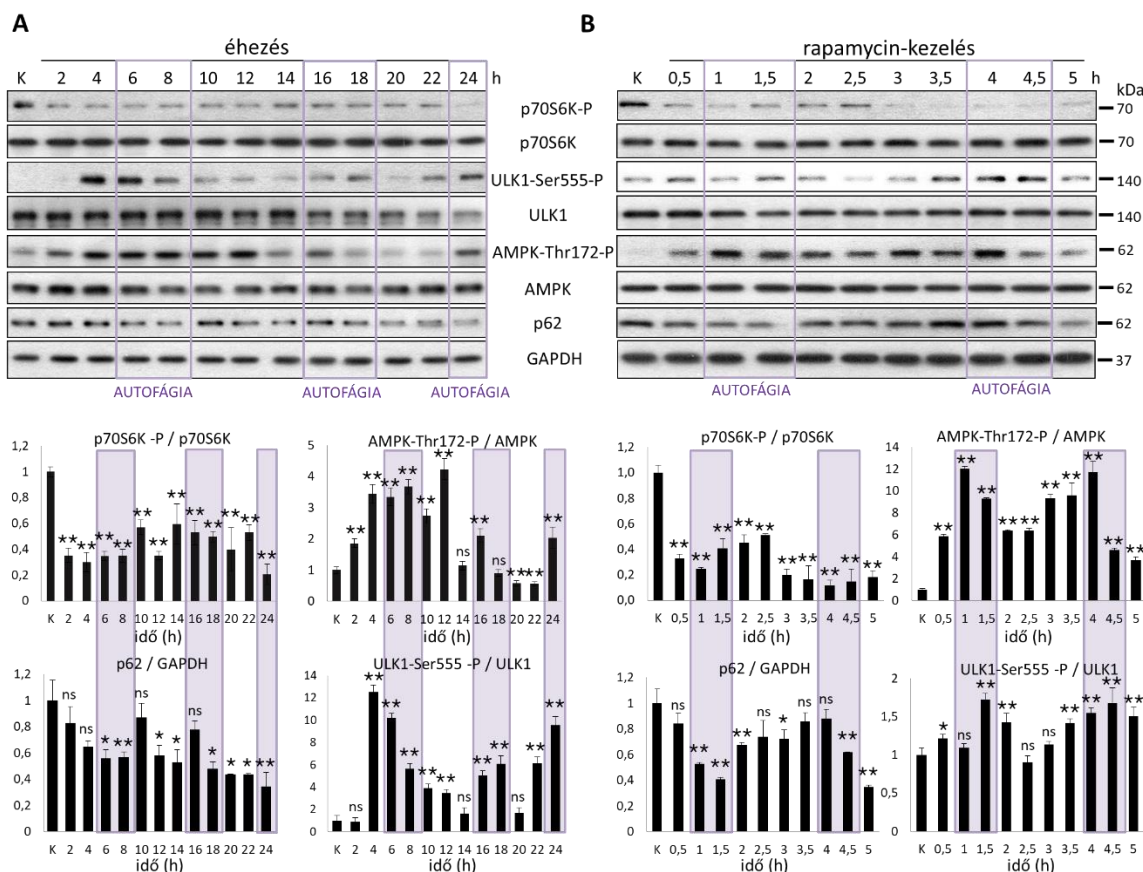
23. ábra. A felépített modellünkben az AMPK és az ULK1 közötti direkt negatív visszacsatolási hurok vizsgálata.

A modellünkkel végzett szimulációk eredményei: A) fiziológias körülmények között, B) éhezés és C) rapamycin-kezelés esetén.



#### 4.2.2. A tartós éhezés és rapamycin-kezelés hatásának vizsgálata

Mivel a modellünkkel nem sikerült megfelelően szimulálnunk a rapamycin-kezelés hatását, továbbá, hogy egy sokkal pontosabb képet kapjunk a rendszer működéséről kísérletesen is vizsgáltuk a tartós éhezés és a tartós rapamycin-kezelés időfüggését (24. ábra).



24. ábra. A tartós éhezés és rapamycin-kezelés hatásának vizsgálata.

A) Az éhezés (glukóz-mentes médium) hatására bekövetkező változások vizsgálata Western blottal: az mTORC1 (p70S6K-P), az AMPK (AMPK-Thr172-P), az ULK1 (ULK1-Ser555-P) és az autofágia (p62) aktiválódásának nyomon követése. A Western blot eredmények densitometriás analízise. B) A rapamycin-kezelés hatására bekövetkező változások vizsgálata Western blottal: az mTORC1 (p70S6K-P), az AMPK (AMPK-Thr172-P), az ULK1 (ULK1-Ser555-P) és az autofágia (p62) aktiválódásának nyomon követése. A Western blot eredmények densitometriás analízise.

A hibásávok a szórást jelölik, a jelek statisztikailag szignifikáns eltérést mutatnak a kontrolltól: ns - nem szignifikáns; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .

A kísérletekhez a sejteket FBS-mentes médiummal szinkronizáltuk, majd szénhidrát-mentes médiumban éhezettük őket 24 óráig, illetve 100 nM rapamycinnal 5 órán át inkubáltuk őket.

A mintákat éhezés esetén két óránként, míg rapamycin-kezelés esetén félóránként vettük. Ezt követően pedig immunoblottal vizsgáltuk az mTORC1, az ULK1, az AMPK és az autofágia aktiválódását (24. ábra).

A kezelések nyomán azt tapasztaltuk, hogy az mTORC1 gyorsan gátlódott (a p70S6K foszforilációja lecsökkent) (24. ábra). Az mTORC1 inaktiválódásával párhuzamosan az AMPK képes volt aktiválódni, mivel a Thr172-es aminosav foszforilációja megnőtt és aktiválta az ULK1-et (ULK1-Ser555-P megjelenése). Az aktív ULK1 ezután legátolta az AMPK működését, így az AMPK aktivációja egy alacsonyabb értékre csökkent vissza. Emiatt viszont az ULK1 is inaktiválódott, azonban mivel az mTORC1 a kezelések hatására még mindig inaktív állapotban volt, az AMPK képes volt újból aktiválódni és aktiválni az ULK1 fehérjét (24. ábra).

Ennek megfelelően az aktív AMPK és ULK1 jelenléte esetén az autofágia is aktiválódott, ekkor a p62 szintje lecsökkent, míg az AMPK és az ULK1 inaktiválódásakor az autofágia is visszaállt egy alap állapotra (itt a p62 fehérje szintje nem csökkent). Tehát a p62 fehérje szintjének ritmikus változása az autofágia oszcillatorikus aktiválódására utal (24. ábra). Eredményeinket összefoglalva tartós rapamycin-kezelés és éhezés hatására az AMPK, az ULK1 és az autofágia periodikus aktiválódását tudtuk megfigyelni.

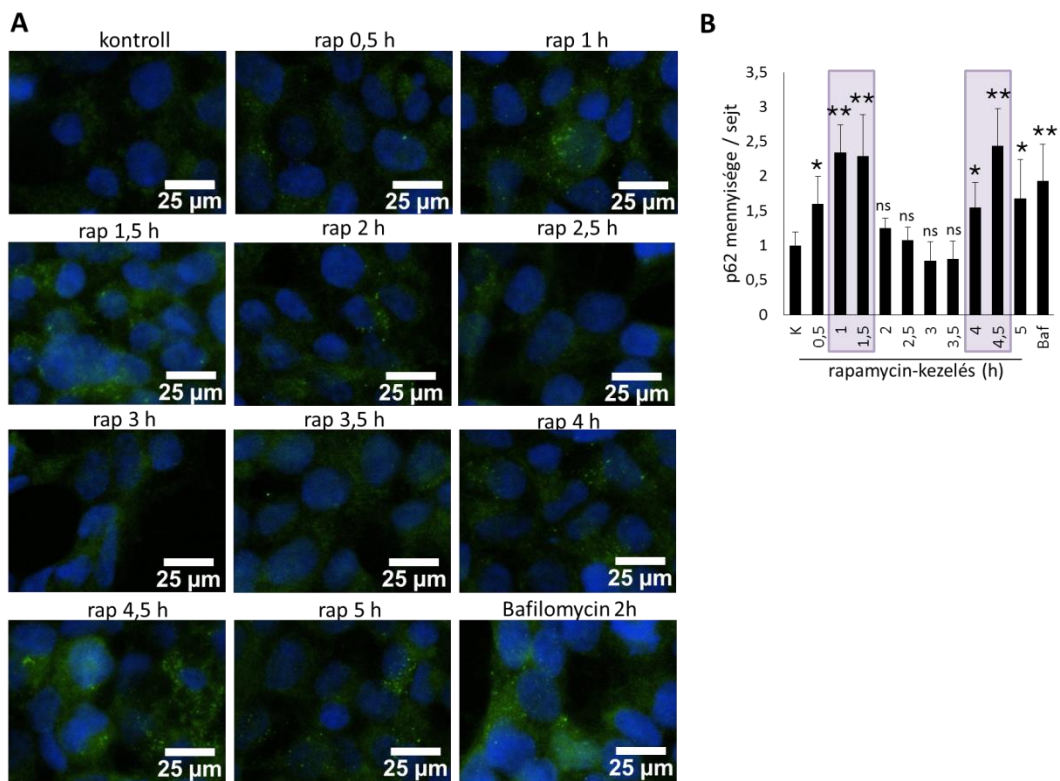
Az autofágia aktiválódásának periodikus változását a p62 fehérje fluoreszcens antitesttel való jelölése után fluoreszcens mikroszkóppal is megvizsgáltuk (25. ábra). Aktív autofágia esetén a p62 fehérje intenzív pöttyök formájában az autofagoszómákban felhalmozódva detektálható.

Az autofagoszómák relatív mennyisége szignifikánsan megnövekedett 1 és 4 óra kezelés után és az autofagoszómák magas száma kb. fél órán át maradt fent.

Ezt követően a mennyiségük szignifikánsan lecsökkent és a kontroll szintjére állt be (25. ábra).

A vizsgálat során pozitív kontrollként bafilomycin A1-kezelést alkalmaztunk (25. ábra). A bafilomycin A1 egy vakuoláris ATP-áz inhibitor, amely gátolja az autofagoszómák lizoszómákkal történő fúzióját, így a sejtben az autofagoszómák felhalmozódását okozza (132, 133).

A p62 fluoreszcens jelölésével tehát az immunoblot eredményeihez hasonlóan az autofágia intenzitásának oszcillációját tudtuk detektálni.



25. ábra. A tartós rapamycin-kezelés hatásának további vizsgálata.

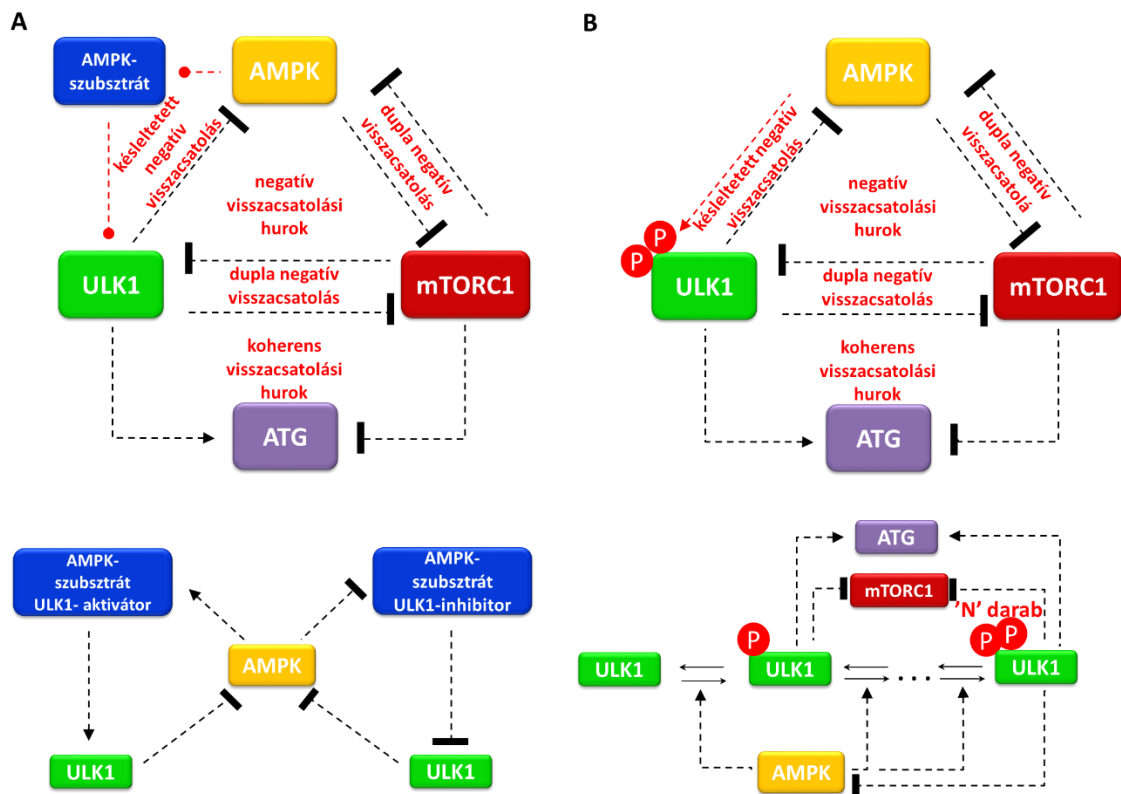
A) A p62 fehérje fluoreszcens antitesttel való jelölése, B) a mikroszkóppal készített képeken leszámolt, az autofágia aktivitására utaló p62-jelölt intenzív pöttyök mennyisége egy sejtre vonatkoztatva. A hibasávok a szórást jelölik, a jelek statisztikailag szignifikáns eltérést mutatnak a kontrolltól: ns - nem szignifikáns; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .

#### 4.2.3. Az AMPK és az ULK1 közötti negatív visszacsatolás időbeni késleltetése

Kinetikai modellekkel már bebizonyították, hogy a negatív visszacsatolás képes a rendszer oszcillációját okozni, amennyiben az a negatív visszacsatolás időben késleltetett. Ezért a rendszerünkbe a direkt kapcsolat helyett valamilyen késleltetési mechanizmust kellett beépítenünk az AMPK és az ULK1 közé, hogy a modellünk a kísérletes eredményeknek megfelelően működhessen. A késleltetés elméletben lehet mind az  $AMPK-P \rightarrow ULK1-P$  aktiváló ágon, mind az  $ULK1-P \dashv AMPK-P$  gátló ágon, azonban kísérleteink során azt láttuk, hogy az AMPK aktiválódása mindig megelőzte az ULK1 aktiválódását, ezért a késleltetést az  $AMPK-P \rightarrow ULK1-P$  aktiváló ágba építettük be.

A késleltetés eléréséhez elméleti módon lehetőségeket kerestünk és két biológiailag releváns utat találtunk.

A fehérje – fehérje kölcsönhatások során a késleltetés általában egy további szabályozó faktor közbeiktatásával történik, ami a rendszerünkben egy AMPK-szubsztrát (26. ábra – A). Ebben az esetben az ULK1 aktiválódásához ennek az AMPK-szubsztrát fehérjének az AMPK általi aktiválása vagy gátlása is előfordulhat. Vagyis lehetséges, az, hogy az AMPK-nak aktiválnia kell egy fehérjét, amelynek aktiválódása szükséges ahhoz, hogy az ULK1 aktiválódni tudjon (AMPK-P → AMPK szubsztrát → ULK1-P), vagy az AMPK-nak gátolnia kell egy olyan fehérjét, amelynek gátlása szükséges ahhoz, hogy az ULK1 aktiválódhasson (AMPK-P ⊣ AMPK szubsztrát ⊣ ULK1-P) (26. ábra – A).



26. ábra. Az AMPK és az ULK1 közötti negatív visszacsatolási hurok időbeni késleltetésének lehetséges módjai.

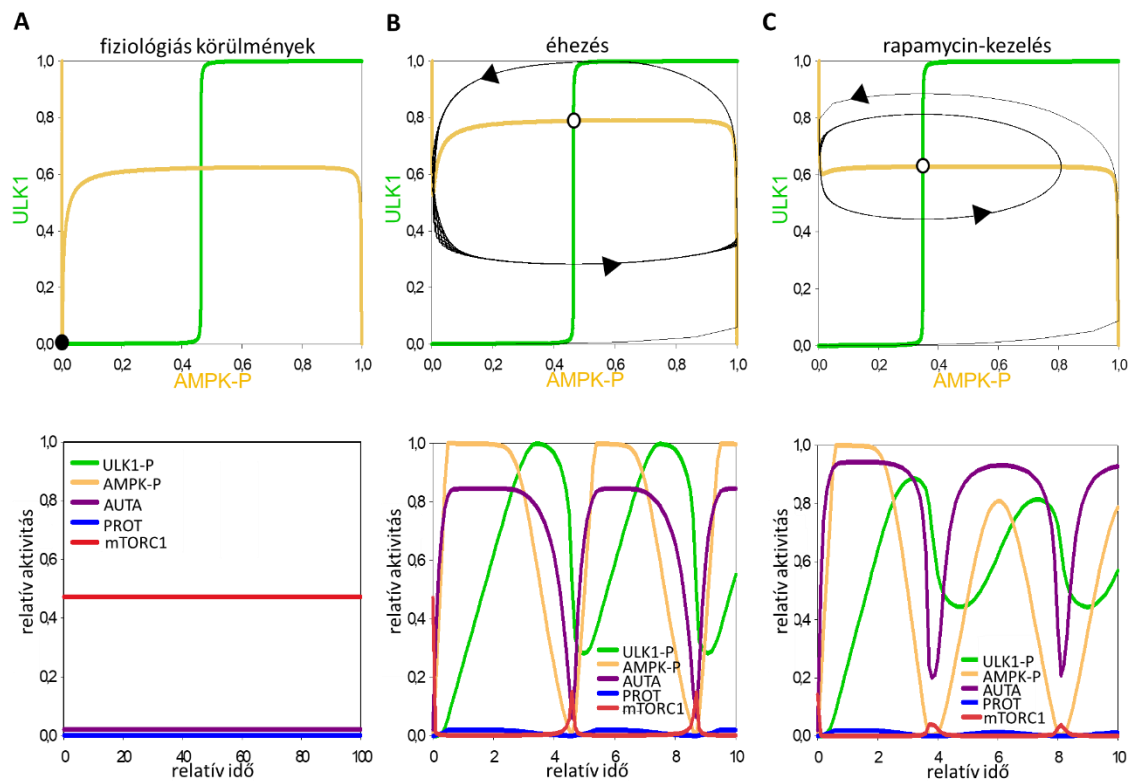
A) Az AMPK és az ULK1 közötti kapcsolat további fehérjével való kiegészítése, B) az ULK1 fehérje több lépcsőben történő foszforilációjának feltételezése az AMPK által.

A másik lehetőség a késleltetésre, ha egy több lépcsőben történő folyamatot feltételezünk, vagyis, hogy az AMPK több egymást követő lépésben, különböző aminosavakon történő foszforilációval tudja csak aktiválni az ULK1-et (26. ábra – B).

Ennek eredményeképpen különböző foszforiláltsági állapotú ULK1 fehérjék képződnek, melyeknek aktivitása is eltérő (26. ábra – B).

A két lehetséges késleltetett negatív visszacsatolási hurok (szubsztrát beépítés, több lépcsőben történő foszforiláció) oszcillációs tulajdonságainak további vizsgálatához számítógépes szimulációkat végeztünk, amihez mindkét időkésleltetéssel kiegészítettük a modellünket.

A köztes szubsztrát beépítésével végzett szimulációk (27. ábra) során azt tapasztaltuk, hogy fiziológias körülmények között a rendszerben egy egyensúlyi állapot található az AMPK és az ULK1 alacsony aktivitási szintjénél, tehát itt az autofágia is inaktív maradt (27. ábra – A, felső panel).



27. ábra. Az AMPK és az ULK1 közötti kapcsolatnak egy köztes fehérjével való kiegészítése.

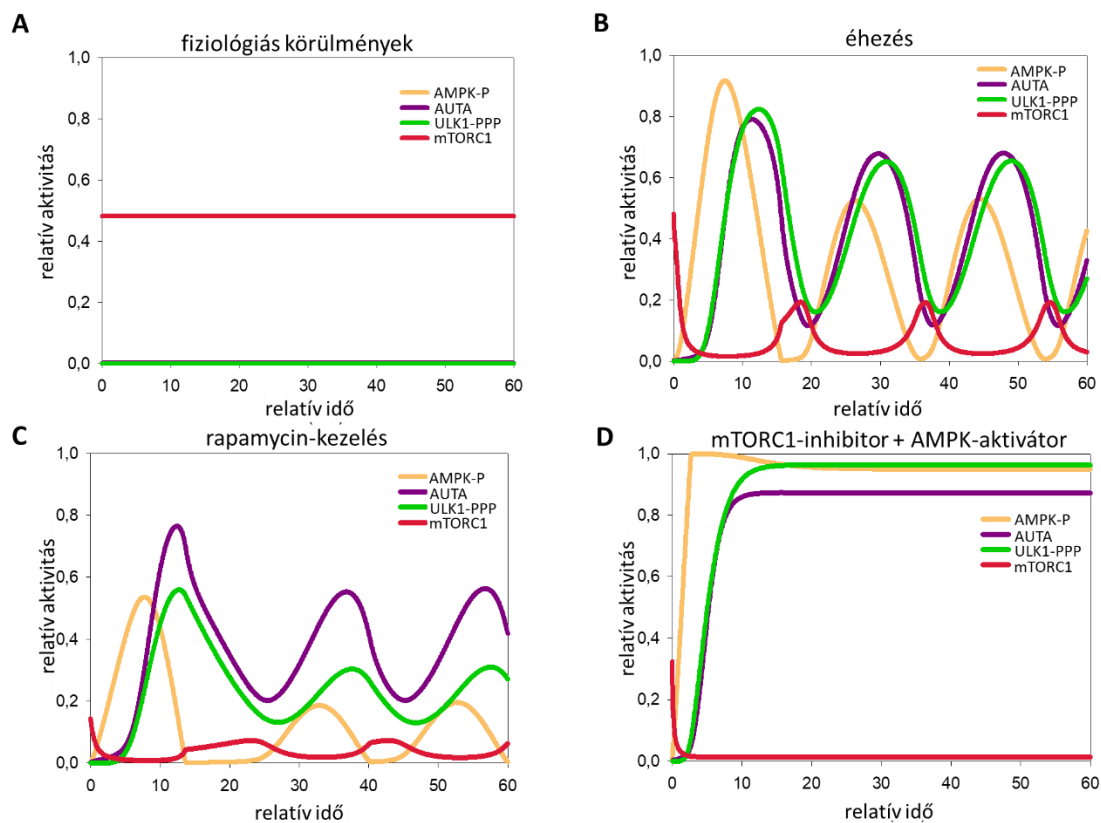
A kiegészített modellel végzett szimulációk A) fiziológias körülmények között, B) éhezés és C) rapamycin-kezelés esetén.

Éhezés és rapamycin-kezelés esetén a késleltetett negatív visszacsatolási hurokknak köszönhetően a rendszer az egyensúlyi állapotot nem érte el, ellenben a rendszer oszcillációja bekövetkezett (27. ábra – B, C felső panel).

A hálózat tagjainak relatív aktivitását az idő függvényében vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy fiziológias körülmények között az mTOR aktív, míg az AMPK, az ULK1 és az autofágia inaktív volt (27. ábra – A, alsó panel). Az éhezés és a rapamycin-kezelés modellezése megerősítette, hogy a köztes AMPK-szubsztrát beépítése képes volt egy hosszantartó oszcillációt előidézni az AMPK az ULK1, valamint az autofágia aktivációjában (27. ábra – B, C alsó panel).

A köztes fehérjével kiegészített modell biológiai relevanciájának alátámasztásához adatbázisok (BioGrid, DIP, MINT, InnateDB, IntAct) segítségével olyan fehérjéket kerestünk, melyek már bizonyítottan kapcsolatban állnak az ULK1 fehérjével.

Ezeken a fehérjéken lehetséges AMPK foszforilációs helyeket azonosítottunk a Group-based Prediction System 5.0 (134) és a NetPhos 3.1 (135) ingyenesen elérhető szoftverek segítségével. Több olyan fehérjét is találtunk, mint a PP1CA, a PP2A, vagy a NEDD4L, amelyet az AMPK képes lehet foszforilálni (8. melléklet).



28. ábra. Az ULK1 több lépcsőben történő foszforilációja az AMPK által. A kiegészített modellel végzett szimulációk A) fiziológias körülmények között, B) éhezés, C) rapamycin-kezelés esetén és D) az AMPK-aktiváció és az mTORC1-gátlás kombinálásakor.

Hasonló eredményeket kaptunk, ha az időkésleltetést a többlépcsős foszforiláción keresztül értük el a rendszerben (28. ábra). Fiziológias körülmények között szintén aktív mTORC1 és inaktív AMPK, ULK1 és autofágia volt megfigyelhető (28. ábra – A). Éhezés és rapamycin-kezelés hatására pedig az mTORC1 inaktiválódott, míg az AMPK, az ULK1 és az autofágia periodikusan aktiválódott és inaktiválódott (28. ábra – B, C). Több mTORC1-inhibitor és/vagy AMPK-aktivátor (mint a resveratrol és az EGCG) esetén kimutattuk, hogy stabil autofágiát képesek indukálni és nem okozzák a rendszer oszcillációját. A szimulációk segítségével is azt láttuk, hogy a rendszerben az autofágia bekapcsolódik, ha az mTOR gátolt és az AMPK hiperaktivált ugyanabban az időben. Itt az ULK1 hiába aktiválódott, az AMPK aktivitása nem csökkent le és ez az autofágia folyamatos indukcióját eredményezte. Tehát ebben az esetben az ULK1-AMPK negatív visszacsatolási hurok nem tudott egy oszcillációs kinetikát mutatni (28. ábra – D).

Mivel már több AMPK foszforilációs hely is ismert az ULK1-en (Ser317, Ser467, Ser555, Thr574 és Ser777) (93, 136), ezért elméleti módszerekkel, a Group-based Prediction System 5.0 és a NetPhos 3.1 szoftverek segítségével még további lehetséges AMPK foszforilációs helyeket kerestünk az ULK1-en (9. melléklet). Több olyan foszforilációs helyet is találtunk, ahol a foszforilációs hely környéki peptid szekvencia nagymértékben átfedett az AMPK konszenzus foszforilációs motívumával és a NetPhos 3.1 alapján nem ismert az a kináz, amely azt az aminosavat foszforilálja. Ilyen foszforilációs helyek voltak a Ser111, a Ser247, a Ser308, a Ser495, a Ser694, a Ser716 és a Ser1042 (9. melléklet táblázata).

#### 4.3. Az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási háromszög és az ER-stressz folyamatok közötti kapcsolat vizsgálata

Az UPR, PERK-ágának részeként aktiválódó GADD34 számos körülmény között (éhezés, vírusos és bakteriális fertőzések, huntingtin fehérje túltermelés esetén) gátolja az mTORC1 működését, azonban ezt a kapcsolatot ER-stressz esetén még nem vizsgálták.

Az UPR és az mTORC1 közötti kapcsolat vizsgálatához először thapsigarginnal (TG) (29. ábra) vagy tunicamycinnel (TM) (137), ismert ER-stresszorokkal kezeltük a sejteket és ezt kombináltuk a GADD34 gátlásával (guanabenz, GB), majd vizsgáltuk a fehérjék aktivitását és a sejtek túlélését.

A TG felborítja az ER kalcium-homeosztázisát, a TM pedig gátolja a szekréciós- és membránfehérjék N-glikozilációját az ER-ben (105). Mivel a TM ER-stresszor használatával készült eredményeink hasonlóak a TG-nal végzett kezelés eredményeihez, így azok a dolgozatban nem kerülnek bemutatásra, csak hivatkozások szintjén szerepelnek (137, 138).

A GB-kezelés nem befolyásolja a GADD34 fehérje szintjét, hanem gátolja annak katalitikus aktivitását (139). Ezért a GB-kezelés hatásának ellenőrzéséhez az eIF2 $\alpha$  foszforilációjának szintjét követtük nyomon, amit az aktiválódott GADD34 defoszforilálna normál körülmények között (139).

Mivel GB-előkezelés esetén az eIF2 $\alpha$  foszforilációjának mértéke a kezelés végén is fennmaradt, ebből arra következtettünk, hogy a GADD34 gátlása megfelelő volt (29. ábra – A, B).

Ha összehasonlítjuk a GB-zel kombinált TG-nal történt kombinációs kezelés hatásait a csak TG-nal történt kezelés hatásaival, akkor azt látjuk, hogy az LC3 II-es formájának mennyisége alacsonyabb volt (LC3 II/GAPDH) a GADD34 hiányában, vagyis itt az autofágia függő túlélési folyamatok gátoltak voltak. GADD34 hiányában a PARP hasadása már fél óra után intenzíven megfigyelhető volt, míg a csak TG-nal kezelt esetben másfél óra után vált intenzívvé. Ez arra utal, hogy az autofágia indukálódása nélkül az apoptotikus folyamatok hamarabb aktiválódtak (29. ábra – A, B).

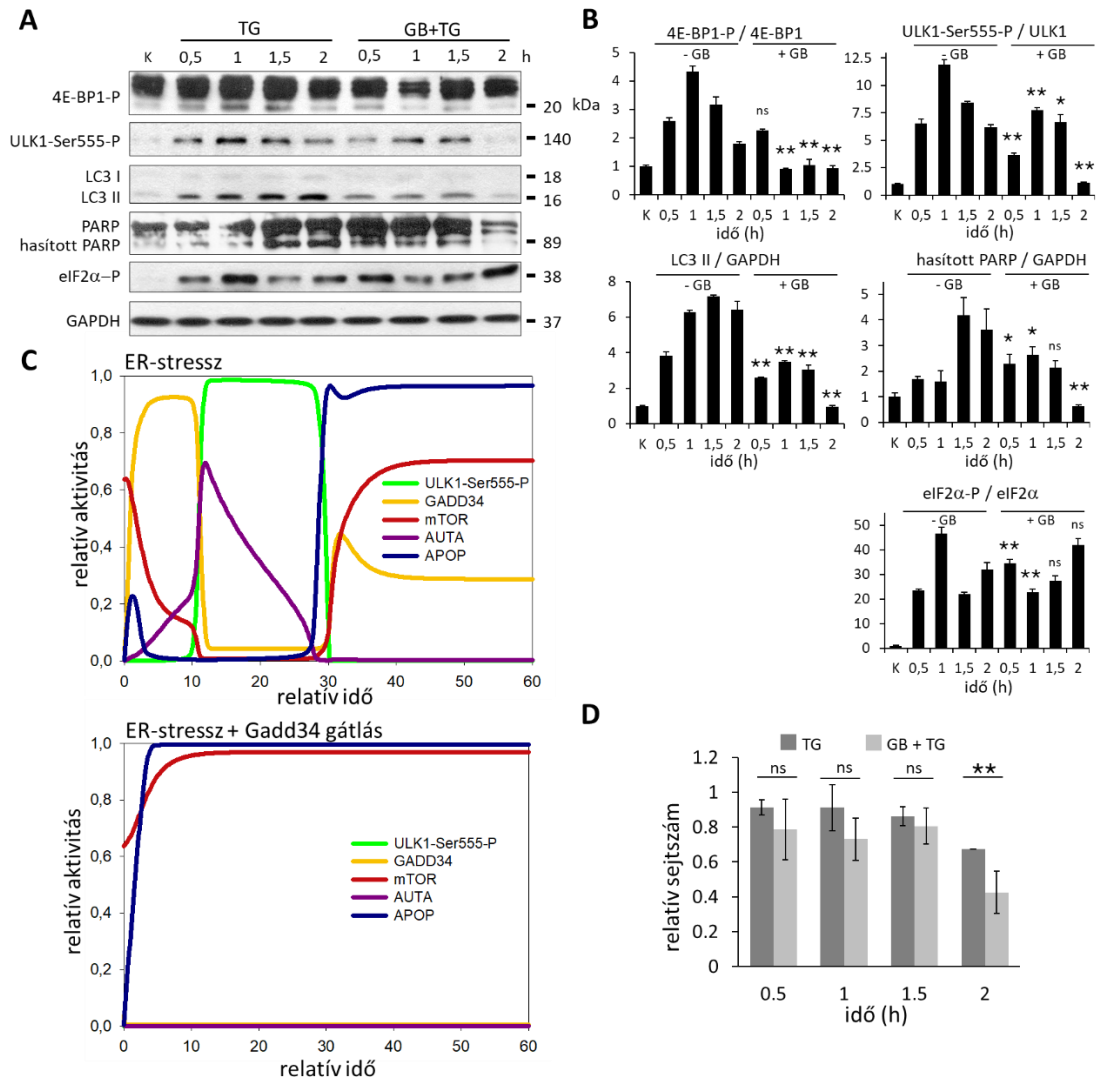
Az ULK1 fehérje tranziensen aktiválódott a TG-nal kezelt esetben (ULK1-Ser555-P fehérje szint), ha pedig a TG-kezelést a GADD34 gátlásával is kombináltuk az ULK1 Ser555-ös foszforilációja kevésbé volt kifejezett (29. ábra – A, B). Az AMPK aktivációs profilja az általa foszforilált ULK1-éhez hasonló lehet, vagyis TG-kezelés esetén szintén tranziensen aktiválódhat, ezzel ellentétben GB-kezeléssel kombinált TG-kezelés esetén inaktív maradhat.

Ennek megfelelően TG-kezelés esetén a 4E-BP1 3. csíkja foszforilálódott, vagyis ott az mTORC1 inaktív volt. Míg GADD34 nélkül ez a foszforiláció a kontrollhoz képest alig változott, tehát ott az mTORC1 aktív maradt a kezelés végéig (29. ábra – A, B).



Az intenzív ER-stressz hatását időben szimulálva kezdetben az mTORC1 aktivitása lecsökkent, ekkor a GADD34, az ULK1 és az autofágia aktiválódott (29. ábra – C, felső panel).

Hosszabb idő után azonban az autofágia aktivitása csökkent le, így az mTORC1 újból aktiválódott és az aktiválódásával párhuzamosan az apoptózis is bekapcsolt (29. ábra – C, felső panel).



29. ábra. A GADD34 gátlás kombinálása intenzív ER-stresszel.

A) Az mTORC1 marker (4E-BP1-P), az ULK1 (ULK1-Ser555-P), az autofágia (LC3) és az apoptózis (PARP) aktiválódásának és az ER-stressz (eIF2α-P) nyomon követése Western blot segítségével. B) A Western blot eredmények denzitometriás analízise. C) A kezelés hatásának időbeni szimulációja a kiegészített modell segítségével intenzív ER-stressz (felső panel) és a GADD34 gátlásával kombinált intenzív ER-stressz (alsó panel) esetén. D) Az élő sejtek számának változása.

A hibasávok a szórást jelölik, a jelek statisztikailag szignifikáns eltérést mutatnak a kontrolltól: ns - nem szignifikáns; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .

Ha a GADD34 gátlása esetén szimuláltunk intenzív ER-stresszt, akkor az mTORC1 aktivitása fokozódott és az apoptózis is aktiválódott, míg a GADD34, az ULK1 és az autofágia inaktív maradt (29. ábra – C, alsó panel).

Az élő sejtek számának változását is megvizsgáltuk a kezelések hatására. A sejtek életképesek maradtak másfél óráig a TG-kezelés során, míg két óra elteltével az életképességük drámaian csökkent (29. ábra – D). A GADD34 gátlása esetén az intenzív ER-stresszhez képest nagyobb mértékben csökkent a sejtek életképessége (29. ábra – D), tehát ez is alátámasztja, hogy a GADD34 gátlása képes időben előbbre hozni a sejthalál folyamatok aktiválódását.

Ezen eredmények alapján a GADD34-nek fontos szerepe lehet a sejtek életképességének a fenntartásában, az mTORC1 gátlásával ER-stressz esetén.

#### 4.4. Az autofágiás túlélési folyamatok időbeni kitolása

Ezután olyan hatóanyagokat kerestünk, amelyek segítségével az autofágiás túlélési folyamatok időben meghosszabbíthatóak ER-stressz esetén.

Korábbi munkánk során ehhez először az mTORC1 működését gátló rapamycint teszteltük és azt tapasztaltuk, hogy intenzív ER-stressz esetén az mTORC1 gátlásának hatására az apoptotikus folyamatok aktiválódása egy későbbi időpontra tolódott ki, míg az AMPK, az ULK1, a GADD34 és az autofágia aktivitása hosszabb ideig fennmaradt ezzel növelve a sejtek életképességét. Ezért a továbbiakban olyan, a természetben is előforduló hatóanyagokat kerestünk, amelyek képesek az AMPK aktiválásán és/vagy az mTORC1 gátlásán keresztül növelni a sejtek életképességét. Ezen hatóanyagok közül a resveratrol és az EGCG működését vizsgáltuk meg alaposabban.

##### *4.4.1. Az EGCG hatásának vizsgálata az autofágiára és az apoptózisra*

A sejteket különböző koncentrációban (10, 20, 40, 80  $\mu$ M) kezeltük az EGCG-vel, majd vizsgáltuk az élő sejtek számának változását és a sejtek életképességét (30. ábra).

Az irodalmi adatokkal összehangban (140) azt találtuk, hogy alacsony koncentrációjú EGCG-kezelés esetén sem az élő sejtek száma, sem a sejtek életképessége nem változott jelentősen a kontrollhoz képest (30. ábra – A).

A 80  $\mu\text{M}$ -os EGCG-kezelés azonban már kb. a felére csökkentette az életképes sejtek mennyiségét (30. ábra – A).

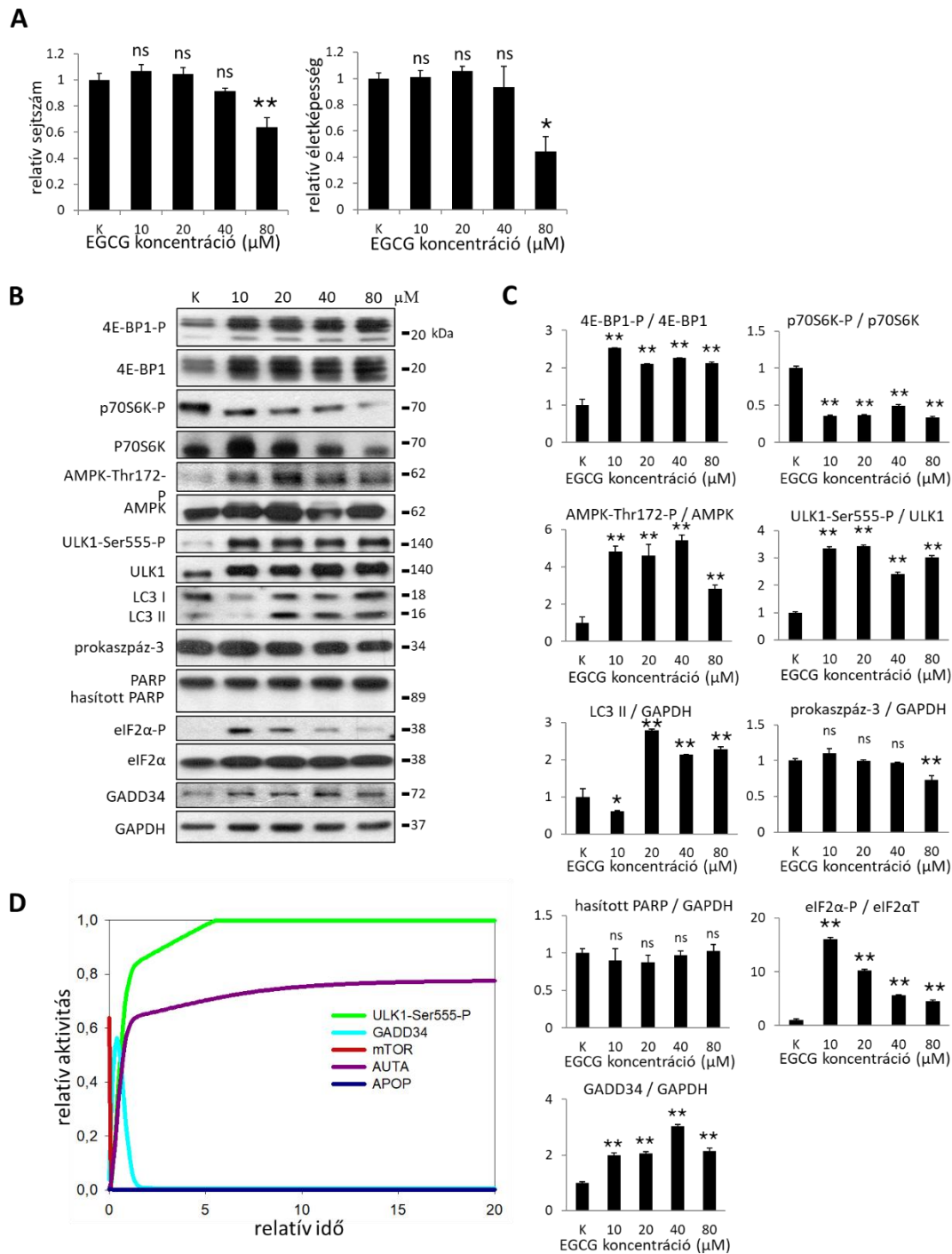
Az autofágia- és apoptózis-markerek aktivációs profiljának vizsgálatához az egyes markereket immunoblottal követtük nyomon. Az alacsony koncentrációjú (10 és 20  $\mu\text{M}$ ) EGCG-kezelés esetén az autofágia aktiválódott, az LC3 II-es formájának mennyisége megnövekedett és az ULK1 is intenzíven foszforilálódott a Ser555-ös aminosavon. Ezen eredmények igazolhatják, hogy a sejtek életképességét az EGCG, egy jól definiálható koncentráció tartományban, autofágia-függő módon tartja fent. A magas koncentrációjú EGCG-kezelés (80  $\mu\text{M}$ ) kismértékben már csökkentette az autofágia aktivitását, amivel párhuzamosan a prokaspáz-3 szintjének csökkenése is megfigyelhető volt. A prokaspáz-3 hasításakor létrejön az aktív kaspáz-3, amely hasítja a PARP fehérjét. A PARP hasadása így tehát egyértelműen utal az apoptózis aktiválására.

Mivel a PARP hasadása a 80  $\mu\text{M}$ -os koncentrációnál még nem volt megfigyelhető, ezért az EGCG-indukált apoptózis az ennél magasabb koncentrációknál történhet (30. ábra – B, C).

Az EGCG-t alacsony koncentrációban használva az ER-stressz válasz is aktiválódott. Az eIF2 $\alpha$  foszforilációja és a GADD34 fehérje szintje is megnövekedett, viszont a magasabb koncentrációknál az eIF2 $\alpha$ -P szintje redukálódott (30. ábra – B, C).

Az EGCG-nek az AMPK és az mTORC1 útvonalak közötti egyensúlyra gyakorolt hatását is megvizsgáltuk, ezért immunoblottal vizsgáltuk az AMPK és az mTORC1 aktivitását (30. ábra – B, C). Azt tapasztaltuk, hogy az AMPK aktiválódott az EGCG-kezelés hatására, erre utal, hogy a Thr172-es aminosav foszforilációja növekedett ezen felül pedig az általa foszforilált ULK1-Ser555-P szintje is megnőtt. Ezzel szemben az EGCG-kezelés hatására az mTORC1 inaktiválódott a szubsztrátjainak foszforiláltsági állapota alapján (a 4E-BP1 3. csíkjának foszforilációja növekedett, a p70S6K foszforilációja lecsökkent) (30. ábra – B, C).

A modellünk segítségével az EGCG-kezelés hatását időben szimulálva azt láttuk, hogy az mTORC1 gyorsan inaktiválódott, míg ezzel párhuzamosan a GADD34 gyorsan aktiválódott. A GADD34 aktiválódását követően az ULK1 és az autofágia is indukálódott és az aktivitásuk fenn is maradt. Az EGCG-kezelés szimulációjakor a sejthalál folyamatok nem aktiválódtak (30. ábra – D).



30. ábra. Az EGCG-kezelés hatásának vizsgálata.

A) Az élő sejtek számának és életképességének változása a kezelés hatására. B) Az *mTORC1*-marker (4E-BP1-P, p70S6K-P), az AMPK (AMPK-Thr172-P), az ULK1 (ULK1-Ser555-P), az autofágia (LC3) és az apoptózis (prokaszpáz-3, PARP) aktiválódásának és az ER-stressz (eIF2α-P, GADD34) nyomon követése Western blot segítségével. C) A Western blot eredmények denzitometriás analízise. D) A kezelés hatásának időbeni szimulációja a kiegészített modell segítségével.

A hibasávok a szórást jelölik, a jelek statisztikailag szignifikáns eltérést mutatnak a kontrolltól: ns - nem szignifikáns; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .

Tehát az EGCG-t alacsony koncentrációban alkalmazni lehet az AMPK aktiválására és az mTORC1 gátlására, ami a sejtek életképességének a növekedését eredményezi. Ezen eredmények pedig igazolják, hogy az EGCG képes befolyásolni az AMPK és az mTORC1 közötti egyensúlyt.

#### 4.4.2. Az EGCG-indukált autofágia vizsgálata

Az EGCG az AMPK és az mTORC1 közötti egyensúlyra való hatásának további vizsgálatához az EGCG hatását más autofágia aktiváló szerekkel hasonlítottuk össze (31. ábra). Ehhez rapamycin- és H-89-kezelést használtunk. A rapamycin-kezelés autofágiát indukál az mTORC1 gátlásán keresztül, míg a H-89 egy PKA-inhibitor és az mTORC1-től független módon indukálja az autofágiát (125). A sejteket külön-külön a stresszorokkal kezeltük, valamint az EGCG-kezelést rapamycinnel és H-89-cel is kombináltuk (31. ábra).

Az alkalmazott kezelések és kombinációik nem befolyásolták sem az élő sejtek számát, sem a sejtek életképességét, a kontrollhoz képest nem történt változás (31. ábra – A).

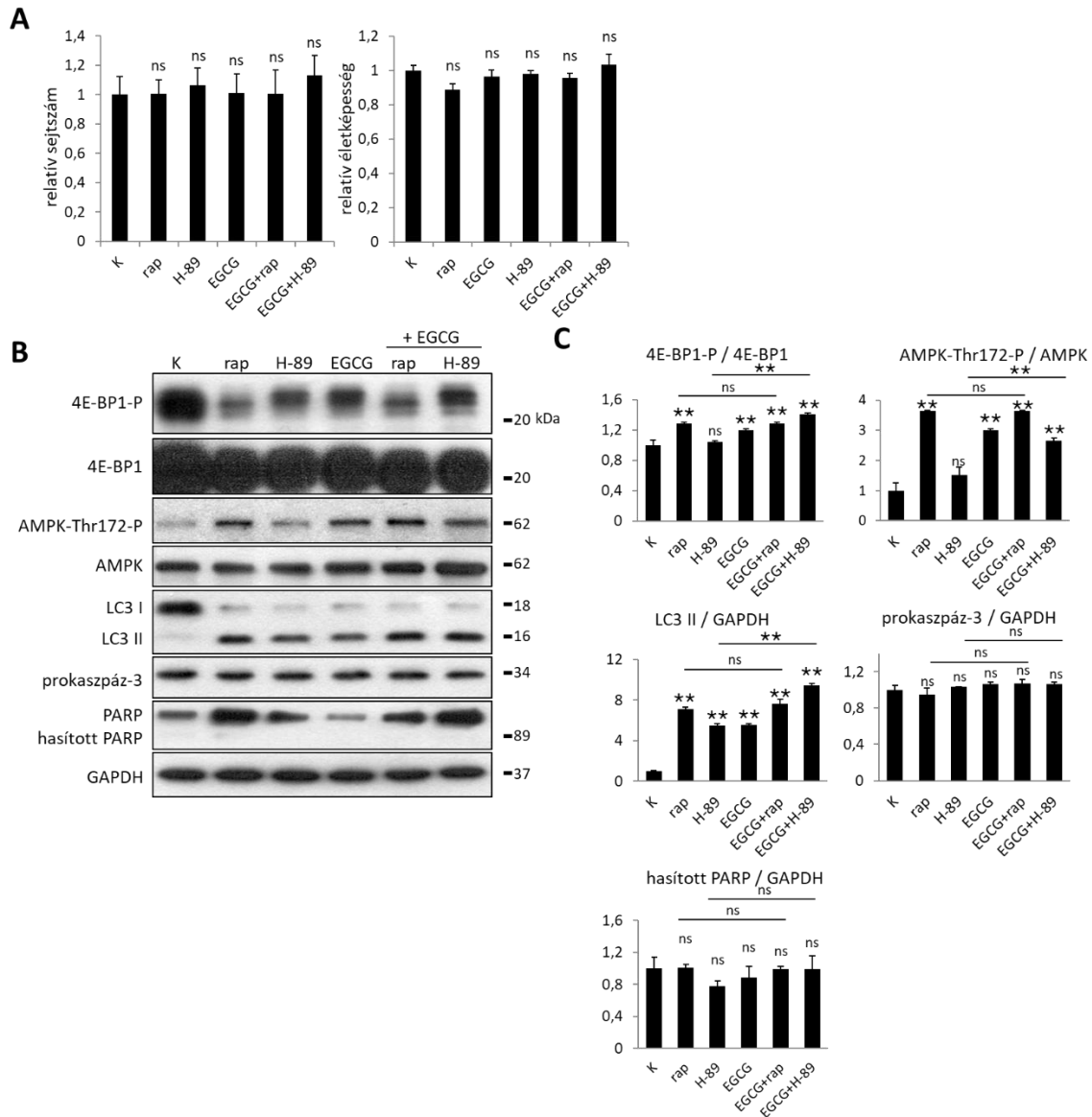
Az mTORC1, az AMPK, az autofágia és az apoptózis aktivitását immunoblot segítségével követtük nyomon.

A sejtek változatlan életképességének megfelelően az apoptotikus sejthalál folyamatok nem aktiválódtak a kezelések hatására (a prokaspáz-3 szintje nem csökkent, a PARP nem hasadt) (31. ábra – B, C).

Abban az esetben, ha az EGCG-t rapamycin-kezeléssel kombináltuk, nem tapasztaltunk szignifikáns növekedést az autofágia és az AMPK aktivációban, valamint az mTORC1 gátlásban. Ez arra utal, hogy az EGCG és a rapamycin ugyanazon az útvonalon keresztül hat az autofágia aktiválódására (31. ábra – B, C).

Amikor az EGCG-kezelést H-89-kezeléssel kombináltuk, akkor az autofágia aktiválódásában egy szignifikáns fokozódást figyeltünk meg, ami igazolja, hogy az EGCG és a H-89 különböző útvonalakon keresztül indukálják az autofágiás önemésztő folyamatokat (31. ábra – B, C).

Habár a H-89-nek önmagában nem volt hatása az AMPK és az mTORC1 közötti egyensúlyra, az EGCG-kezeléssel kombinálva az AMPK már aktiválódott (az AMPK-Thr172-P szintje nőtt) és az mTORC1 inaktiválódott (a 4E-BP1 3. csíkja foszforilálódott) (31. ábra – B, C).



31. ábra. Az EGCG-kezelés hatásának vizsgálata mTORC1- és PKA-gátlószerekkel történő kombináláson keresztül.

A) Az élő sejtek számának és életképességének változása a kezelések hatására. B) Az mTORC1-marker (4E-BP1-P), az AMPK (AMPK-Thr172-P), az autofágia (LC3) és az apoptózis (prokaspáz-3, PARP) aktiválódásának nyomon követése Western blot segítségével. C) A Western blot eredmények denzitometriás analízise.

A hibásávok a szórást jelölik, a jelek statisztikailag szignifikáns eltérést mutatnak a kontrolltól: ns - nem szignifikáns; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .

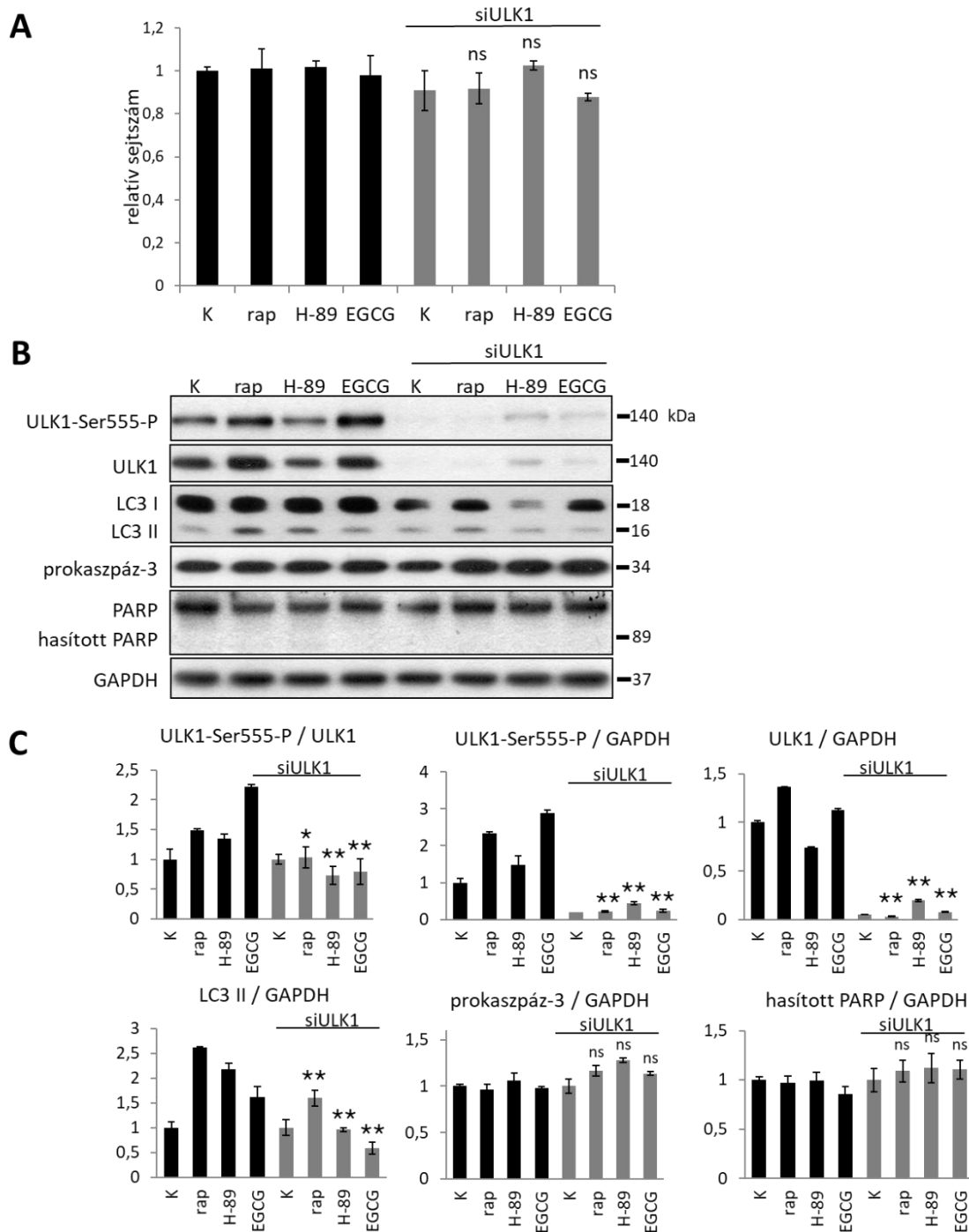
A kombinált kezelések alapján az EGCG nem PKA-függő módon aktiválja az autofágiát, hanem a rapamycinhez hasonlóan az AMPK-mTORC1 egyensúlyra hat.

#### *4.4.3. EGCG-kezelés hatásának vizsgálata ULK1-csendesítés esetén*

Az AMPK-mTORC1-útvonal EGCG-indukált autofágiában betöltött szerepének további vizsgálatához, az AMPK és az mTORC1 által szabályozott ULK1 fehérje jelenlétében és annak hiányában is elvégeztük az EGCG-kezelést. Ebben az esetben is a rapamycin- és a H-89- kezelést használtuk kontrollként (32. ábra). Az ULK1 csendesítése nem okozott az élő sejtek számában változást a kezelésekre (32. ábra – A), és ennek megfelelően a sejthalál-folyamatok sem aktiválódtak (a prokaspáz-3 szintje nem csökkent, a PARP nem hasadt) (32. ábra – B, C).

Az ULK1 csendesítésének hatékonyságát fehérje-szinten követtük nyomon Western blot segítségével (az ULK1 és az ULK1-Ser555-P szinteket vizsgáltuk). Az EGCG-kezelés hatására az LC3 II-es formája ULK1 jelenlétében növekedett, míg ULK1 nélkül a szintje szignifikánsan csökkent a kontroll kezeléshez viszonyítva. Hasonló jelenséget tudunk megfigyelni a rapamycin-kezelés és a H-89-kezelés hatására is (32. ábra – B, C).

Az eredmények alapján tehát az valószínűsíthető, hogy az ULK1 szükséges az EGCG által indukált autofágiás folyamatok lezajlásához.



32. ábra. Az EGCG-kezelés kombinálása az ULK1 csendesítésével.

A) Az élő sejtek számának változása a kezelés hatására. B) Az ULK1 (ULK1-Ser555-P), az autofágia (LC3) és az apoptózis (prokaspáz-3, PARP) aktiválódásának nyomon követése Western blot segítségével. C) A Western blot eredmények denzitometriás analízise.

A hibásávok a szórást jelölik, a jelek statisztikailag szignifikáns eltérést mutatnak a kontrolltól: ns - nem szignifikáns; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .



#### 4.4.4. Az EGCG-kezelés kombinálása intenzív ER-stresszel

Mivel az EGCG hatással van az AMPK és az mTORC1 aktivációjára, ezért ER-stressz esetén is pozitív hatása lehet a sejtek túlélésére. Ennek kiderítéséhez a sejteket az intenzív ER-stressz kiváltása (thapsigargin- (33. ábra) vagy tunicamycin-kezelés (138)) előtt EGCG-vel kezeltük. Annak eldöntésére, hogy az EGCG valóban segíti-e a sejtek túlélését ER-stressz esetén, megvizsgáltuk az élő sejtek számának és életképességének a kezelések nyomán fellépő változásait. Az EGCG-előkezelés szignifikánsan megnövelte a sejtek életképességét és kitolta a sejthalál aktiválódását egy későbbi időpontba intenzív TG-indukált (33. ábra – A) ER-stressz esetén.

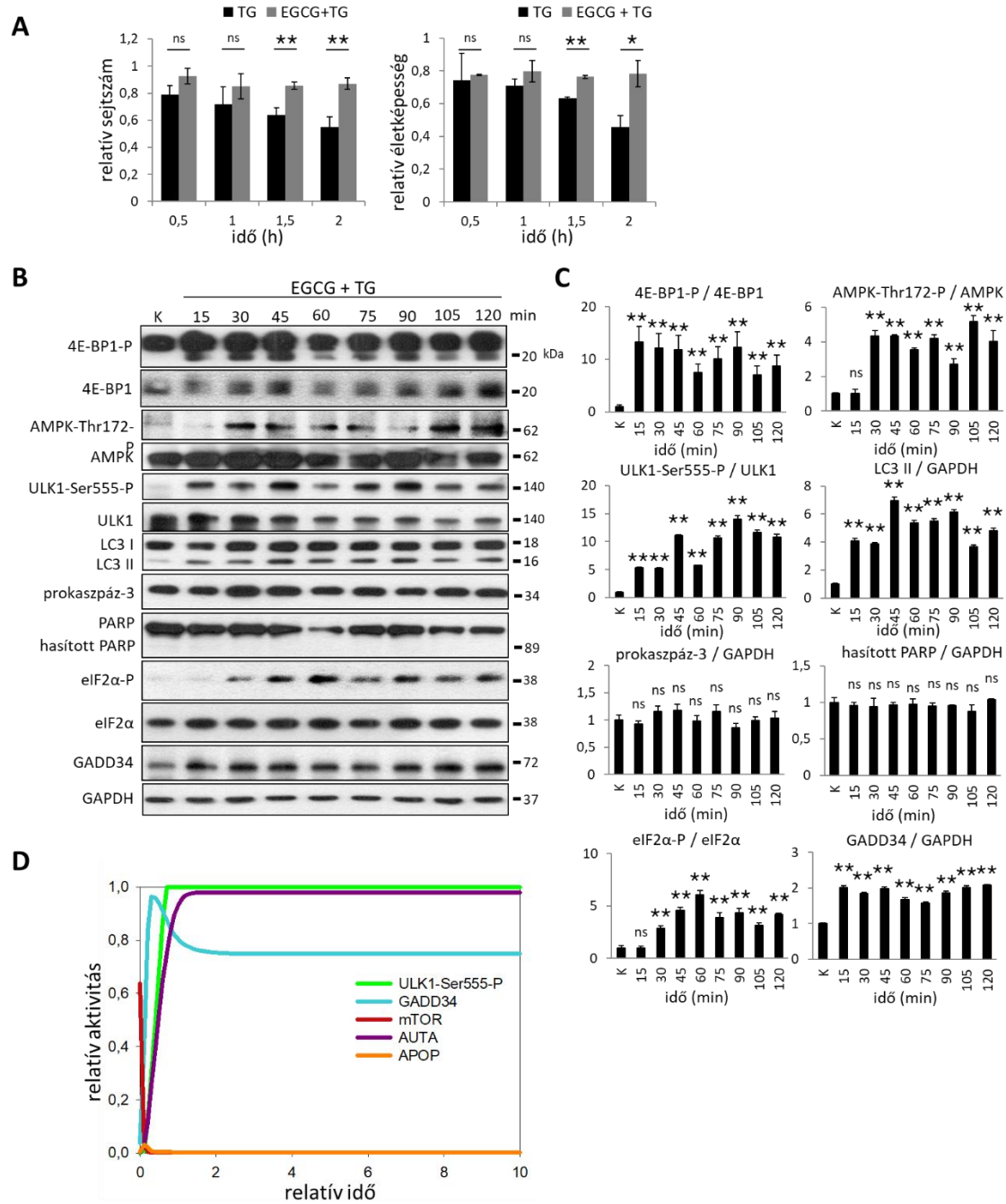
Ezután immunoblottal megvizsgáltuk az EGCG-előkezelés hatását az ER-stressz, az autofágia, az apoptózis, az AMPK és az mTORC1 aktivitására TG-indukált ER-stressz esetén.

Az LC3 II-es formájának magas szintje mind a két esetben azt igazolja, hogy az autofágia kétórás TG-kezelést követően is aktív maradt, miközben sem a prokaspáz-3 fogyása, sem a PARP hasadása nem volt megfigyelhető (33. ábra – B, C).

Az AMPK és az ULK1 (a Ser555-ös aminosavon) intenzív foszforilálódása alapján az AMPK aktív volt és az aktivitása a kezelés végéig fennmaradt. Ezzel párhuzamosan az mTORC1 inaktiválódott, ha az ER-stresszt EGCG-kezelés előzte meg (33. ábra – B, C). A GADD34 szintje gyorsan megnövekedett EGCG-előkezelés esetén és a szintje magas maradt a kétórás TG-kezelés esetén is. Ebből arra következtettünk, hogy a GADD34-nek fontos szerepe lehet az EGCG-indukált autofágiában ER-stressz esetén (33. ábra – B, C).

Az EGCG-vel kombinált intenzív ER-stressz szimulációjakor azt láttuk, hogy az EGCG hatására az mTORC1 azonnal inaktiválódott, megteremtve ezzel a GADD34 aktiválódásának lehetőségét. A GADD34 aktiválódása után az ULK1 és az autofágia is aktiválódott. A GADD34, az ULK1 és az autofágia aktivitása a szimuláció során nem csökkent le. Mivel az intenzív ER-stresszt az EGCG jelenlétében váltottuk ki, apoptózis egyáltalán nem következett be (33. ábra – D).

Ezen eredmények alapján kijelenthetjük, hogy intenzív ER-stressz esetén az EGCG az autofágia indukálásán keresztül képes időben késleltetni az apoptotikus sejthalál aktiválódását.



33. ábra. Az EGCG-kezelés kombinálása TG-indukált intenzív ER-stresszel.

A) Az élő sejtek számának és életképességének változása a kezelések hatására. B) Az *mTORC1*-marker (4E-BP1-P), az AMPK (AMPK-Thr172-P), az ULK1 (ULK1-Ser555-P), az autofágia (LC3) és az apoptózis (prokaspáz-3, PARP) aktiválódásának és az ER-stressz (eIF2α-P, GADD34) nyomon követése Western blot segítségével. C) A Western blot eredmények denzitometriás analízise. D) A kezelés hatásának időbeni szimulációja a kiegészített modell segítségével.

A hibasávok a szórást jelölik, a jelek statisztikailag szignifikáns eltérést mutatnak a kontrolltól: ns - nem szignifikáns; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .

#### 4.5. A GADD34-hiány negatív hatásainak kiküszöbölése

A GADD34 működésének gátlása esetén azt tapasztaltuk, hogy az autofágia-függő túlélési mechanizmusok gátlódtak, az mTORC1 gyors aktiválódását pedig az apoptotikus sejthalál folyamatok aktiválódása követte ER-stressz esetén. Korábbi eredményeink azt mutatták, hogy a rapamycin-kezelés az mTORC1 gátlásával képes volt megszüntetni a GADD34 gátlásának negatív hatásait, így további hatóanyagokat kerestünk, amelyeknek hasonló hatásuk lehet. Mivel mind az EGCG, mind a resveratrol hatást gyakorolhat az AMPK-mTORC1 egyensúlyra celluláris stressz esetén, ezért ezek a vegyületek ER-stressz alatt a GADD34 hiányában is képesek lehetnek a sejtek életképességét fenntartani az autofágia indukcióján keresztül.

##### 4.5.1. A GADD34 működésének gátlása inhibitorral

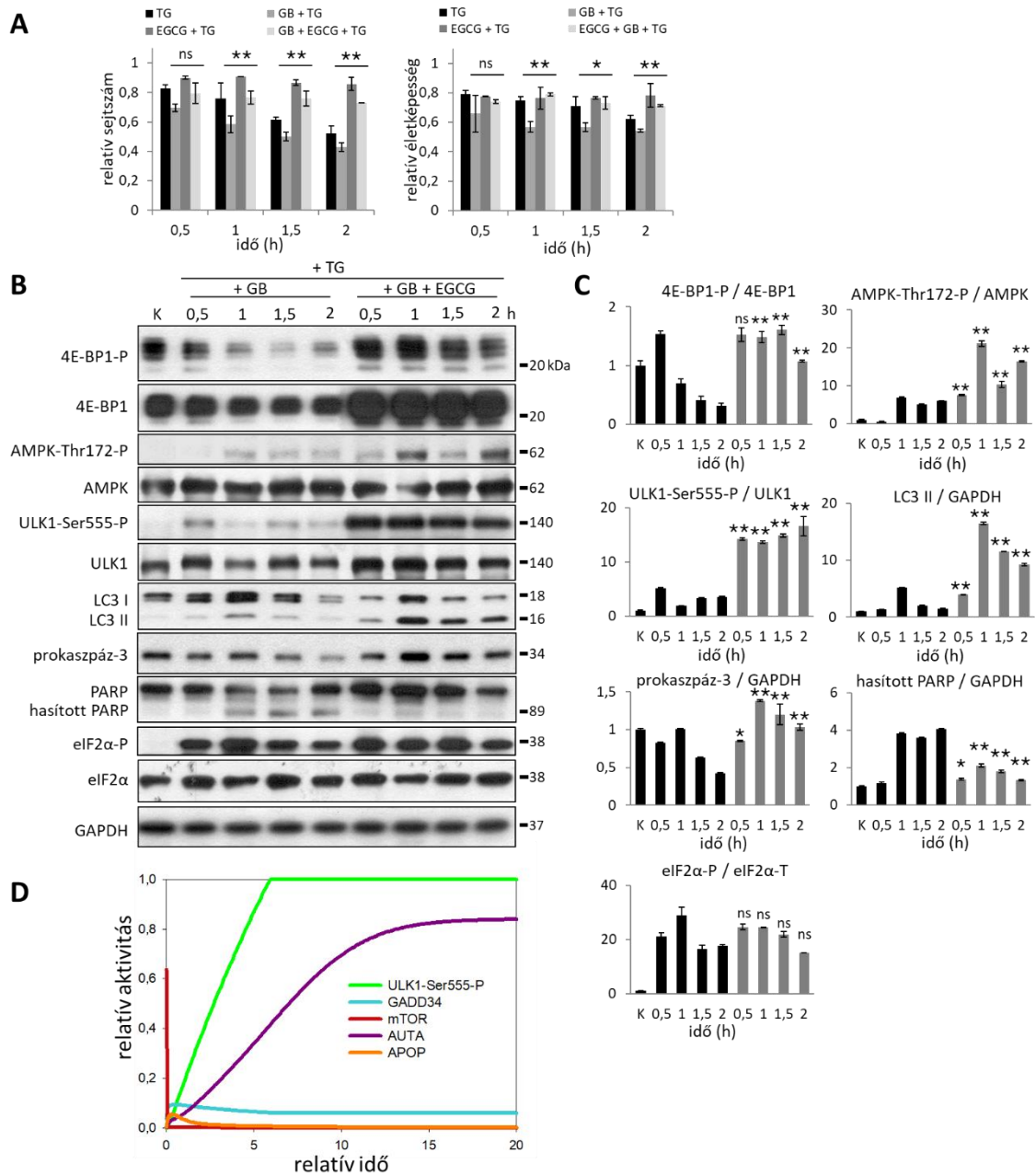
Az EGCG-előkezelés védőhatásának vizsgálatához elvégeztünk egy kombinált kezelést, ahol a sejteket a GADD34-et gátló guanabenzzel kezeltük elő, majd ezt követően EGCG-t adtunk a sejtekhez és ezek után a sejtekben intenzív ER-stresszt indukáltunk TG-nal (34. ábra) és TM-nel (138).

Az EGCG-előkezelés képes volt a sejtek életképességét fokozni és az élő sejtek számát növelni, ha intenzív ER-stressz esetén gátoltuk a GADD34 működését (34. ábra – A).

Az EGCG-előkezelés hatását immunoblot segítségével vizsgáltuk meg az autofágiára, az apoptózisra, az AMPK és az mTORC1 aktivitásra intenzív ER-stressz esetén, amikor a GADD34 működését inhibitorral gátoltuk.

A GADD34 gátlásának hatásosságát az eIF2 $\alpha$  foszforiláltsága alapján ellenőriztük. Mivel az eIF2 $\alpha$  foszforiláció nem csökkent le, ezért feltételezhetjük, hogy a GADD34 a kezelés ideje alatt inaktív volt (34. ábra – B, C).

EGCG-előkezelés nélkül a GADD34 gátlásának hatására az autofágia nem volt képes megfelelő mértékben aktiválódni, az LC3 II-es formájának mennyisége a kontrollhoz képest szinte nem is változott. Eközben az apoptózis már a kezelés elején aktiválódott, a prokaspáz-3 szintje egy órán át tartó TG-kezelés után csökkenni kezdett és ekkor már a PARP hasadása is intenzíven megfigyelhető volt (34. ábra – B, C).



34. ábra. Az EGCG-kezelés kombinálása TG-indukált intenzív ER-stresszel a GADD34 gátlása esetén.

A) Az élő sejtek számának és életképességének változása a kezelés hatására. B) Az mTORC1-marker (4E-BP1-P), az AMPK (AMPK-Thr172-P), az ULK1 (ULK1-Ser555-P), az autofágia (LC3) és az apoptózis (prokaspáz-3, PARP) aktiválódásának és az ER-stressz (eIF2 $\alpha$ -P) nyomon követése Western blot segítségével. C) A Western blot eredmények denzitometriás analízise. D) A kezelés hatásának időbeni szimulációja a kiegészített modell segítségével.

A hibasávok a szórást jelölik, a jelek statisztikailag szignifikáns eltérést mutatnak a kontrolltól: ns - nem szignifikáns; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .

EGCG-vel történt előkezelés nyomán azonban az LC3 II-es formájának mennyisége nagymértékben megnövekedett, ez pedig intenzív autofágiás folyamatokra utal, ami a kezelés végéig fenn is maradt. Ekkor az apoptózis inaktív maradt, sem a prokaspáz-3 csökkenését, sem a PARP hasadását nem tudtuk detektálni (34. ábra – B, C).

Az AMPK a Thr172-es aminosavon foszforilálódott az EGCG-előkezelés esetén, vagyis az EGCG képes volt aktiválni az AMPK-t. Aktív AMPK-ra utal, hogy az általa foszforilált ULK1 foszforilációja is megnövekedett a Ser555-ös aminosavon. Ennek megfelelően EGCG-kezelés esetén az mTORC1 inaktiválódott, mivel a 4E-BP1 3. csíkjának a foszforilációja megnövekedett (34. ábra – B, C).

A modellünk segítségével is szimuláltuk az EGCG-előkezelés hatását a GADD34 hiányában, intenzív ER-stressz esetén. A szimuláción azt láttuk, hogy az EGCG-kezelés hatására az mTORC1 aktivitása lecsökkent, ezt követően pedig az ULK1 és az autofágia aktiválódott. A szimuláció során az apoptózis végig inaktív volt és mivel a GADD34 aktiválódását is gátoltuk, ezért a GADD34 aktivitása is egy nagyon alacsony szinten maradt (34. ábra – D).

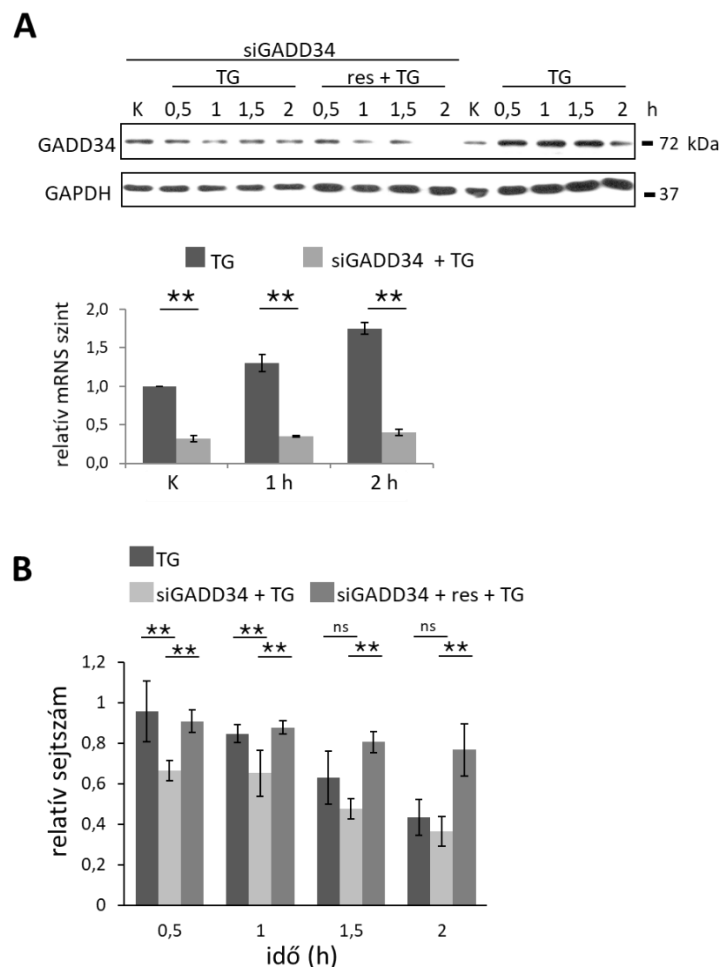
Az eredmények alapján tehát az EGCG ER-stressz esetén még akkor is képes fenntartani a sejtek életképességét az autofágia-függő túlélési mechanizmusok aktiválásán keresztül, ha az mTORC1-et gátló GADD34 működését egy inhibitorral megakadályozzuk. Vagyis az GADD34 gátlásának negatív hatásait az EGCG képes volt kiküszöbölni az AMPK és az mTORC1 közötti egyensúly felborításával a TM- és TG-indukált ER-stressz esetén.

#### 4.5.2. A GADD34 csendesítése siRNS-sel

Ahhoz, hogy igazoljuk, hogy az EGCG és a resveratrol képes az ER-stressz-indukált apoptotikus sejthalált késleltetni a GADD34 hiányában, elvégeztünk még egy kombinált kezelést, ahol a sejtekben a GADD34-et siRNS segítségével csendesítettük, majd előkezeltük a sejteket EGCG-vel vagy resveratrollal és ezután kezeltük őket thapsigargin ER-stresszrel (35. és 36. ábra).

4.5.2.1. *Resveratrol-előkezelés GADD34 csendesítés esetén*

A GADD34 csendesítésének hatékonyságát fehérjeszinten Western blottal és mRNS-szinten kvantitatív PCR-rel is ellenőriztük. Mind a fehérje-, mind az mRNS-szintek alapján a csendesítésünk megfelelő mértékben hatékony volt a kontroll sejtekkel végzett kezelésekhöz viszonyítva (35. ábra – A). A GADD34 csendesítésének hatása emellett az eIF2 $\alpha$  foszforilációján is ellenőrizhető, mivel a GADD34 hiányában ez a foszforiláció nem csökkent le a kezelés ideje alatt (36. ábra).



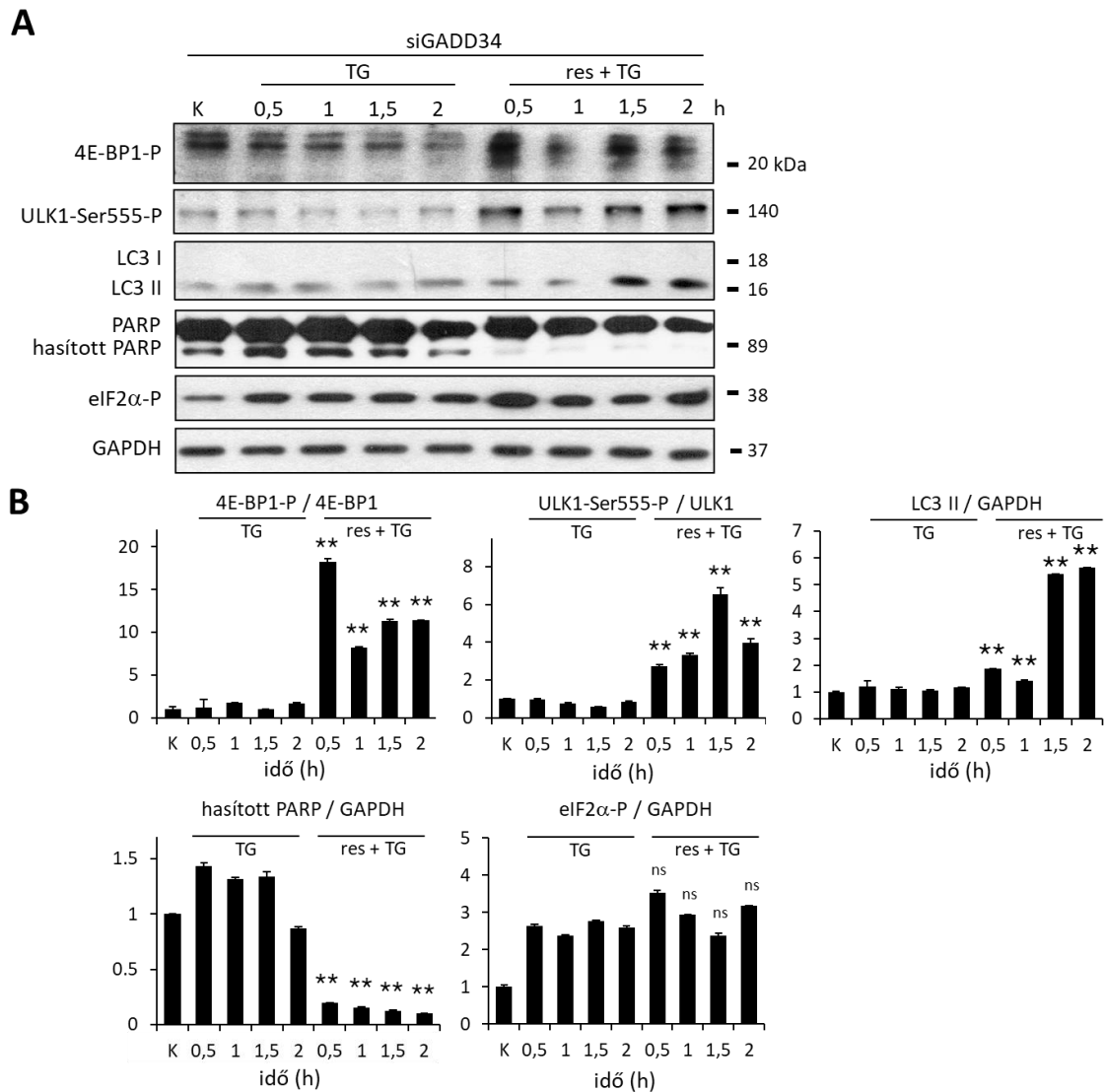
35. ábra. A resveratrol-kezelés kombinálása TG-indukált intenzív ER-stresszel a GADD34 csendesítése esetén (I.).

A) A GADD34-csengesítés hatékonyságának ellenőrzése fehérjeszinten Western blottal (felső panel) és mRNS-szinten kvantitatív PCR-rel (alsó panel). B) Az élő sejtek számának változása a kezelés hatására.

A hibásávok a szórást jelölik, a jelek statisztikailag szignifikáns eltérést mutatnak a kontrolltól: ns - nem szignifikáns; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .

A GADD34 guanabenzzel történő gátlásához hasonlóan a GADD34 csendesítésekor is nagyobb mértékben csökkent az élő sejtek száma, mint a nem csendesített sejtek TG-nal történő kezelése esetén (35. ábra – B).

A GADD34 csendesítésének az élő sejtek számára gyakorolt negatív hatása a resveratrol-előkezeléssel kivédhető volt és a sejtek életben maradtak (35. ábra – B).



36. ábra. A resveratrol-kezelés kombinálása TG-indukált intenzív ER-stresszel a GADD34 csendesítése esetén (II.).

A) Az mTORC1-marker (4E-BP1-P), az ULK1 (ULK1-Ser555-P), az autofágia (LC3) és az apoptózis (PARP) aktiválódásának és az ER-stressz (eIF2α-P) nyomon követése Western blot segítségével. B) A Western blot eredmények denzitometriás analízise.

A hibásávok a szórást jelölik, a jelek statisztikailag szignifikáns eltérést mutatnak a kontrolltól: ns - nem szignifikáns; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .

A GADD34 csendesítésekor TG-indukált ER-stressz esetén az autofágiás válasz nem aktiválódott, mivel sem az ULK1 Ser555-ös foszforilációja, sem az LC3 II-es formájának a mennyisége nem nőtt jelentős mértékben a kontrollhoz képest (36. ábra). Ennek megfelelően az apoptózis viszont hamarabb bekapcsolt, a PARP hasadását pedig már a kezelés elején intenzíven megfigyelhettük (36. ábra).

Ezzel ellentétben a resveratrol-előkezelés GADD34 hiányában is képes volt az autofágia aktivációját előidézni, mivel azt tapasztaltuk, hogy az LC3 II-es formájának a mennyisége megnövekedett. Az apoptózis aktiválódását az előkezelés késleltette, a PARP hasadását a kezelés ideje alatt nem tudtuk megfigyelni (36. ábra).

A resveratrollal kombinált esetben az AMPK aktiválódott, mivel az általa foszforilált ULK1-Ser555-P szintje megnövekedett, az mTORC1 pedig inaktív maradt (a 4E-BP1 3. csíkja foszforilálódott) (36. ábra).

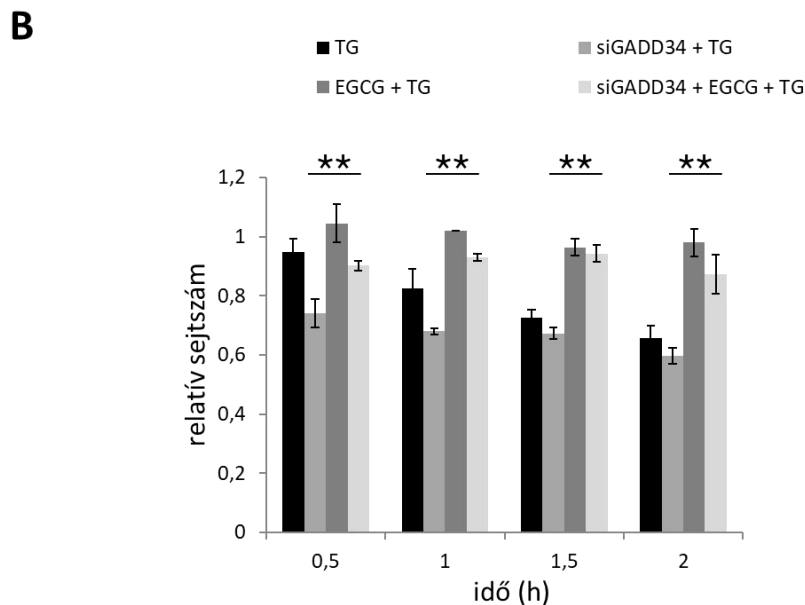
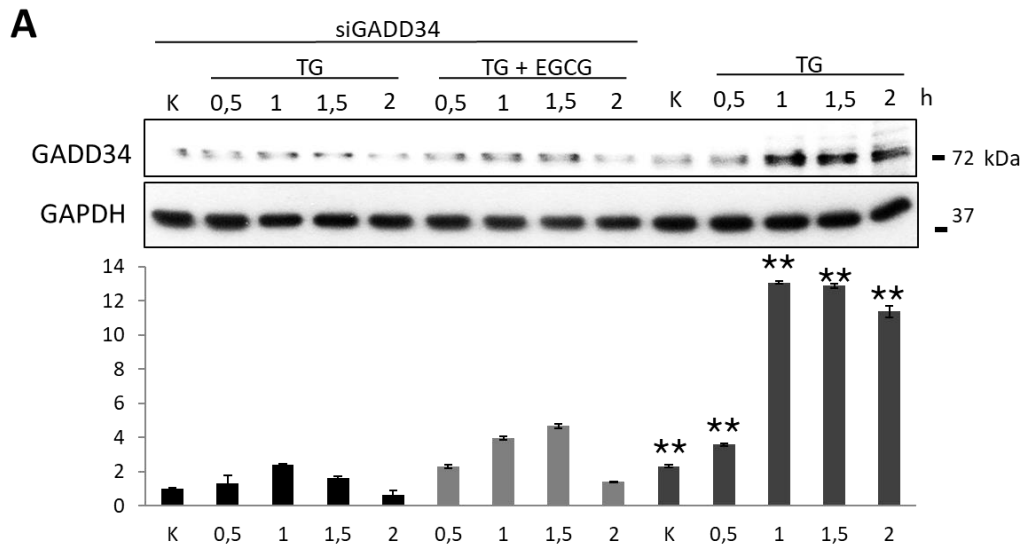
Ezek az eredmények azt támasztják alá, hogy a resveratrol képes a sejtek életképességét növelni és a GADD34 negatív hatásait kiküszöbölni az mTORC1 gátlásával és az AMPK aktiválásával ER-stressz során.

#### 4.5.2.2. EGCG-előkezelés a GADD34 csendesítése esetén

Az EGCG-vel történt előkezelés esetén először a csendesítés hatékonyságát teszteltük fehérjeszinten immunoblot használatával. Mivel a csendesítés esetén a kezelések hatására a GADD34 szintje nem növekedett a kontroll sejtekhez viszonyítva (TG-kezelés GADD34-csendesítés nélkül), ezért a GADD34 csendesítését sikeresnek tekintettük (37. ábra – A). A csendesítés hatásosságát támasztja alá továbbá az is, hogy az eIF2 $\alpha$  foszforilációja a kezelések során nem csökkent le, vagyis a GADD34 nincs jelen, hogy defoszforilálni tudja őt (38. ábra).

A guanabenz kezeléshez hasonlóan a GADD34 csendesítése ebben az esetben is csökkentette az élő sejtek számát ER-stressz esetén a nem csendesített sejtekhez képest. Azonban ezt az EGCG-előkezelés képes volt kivédeni, és a sejtek életképességét a kontrollhoz hasonló szinten tartani (37. ábra – B).



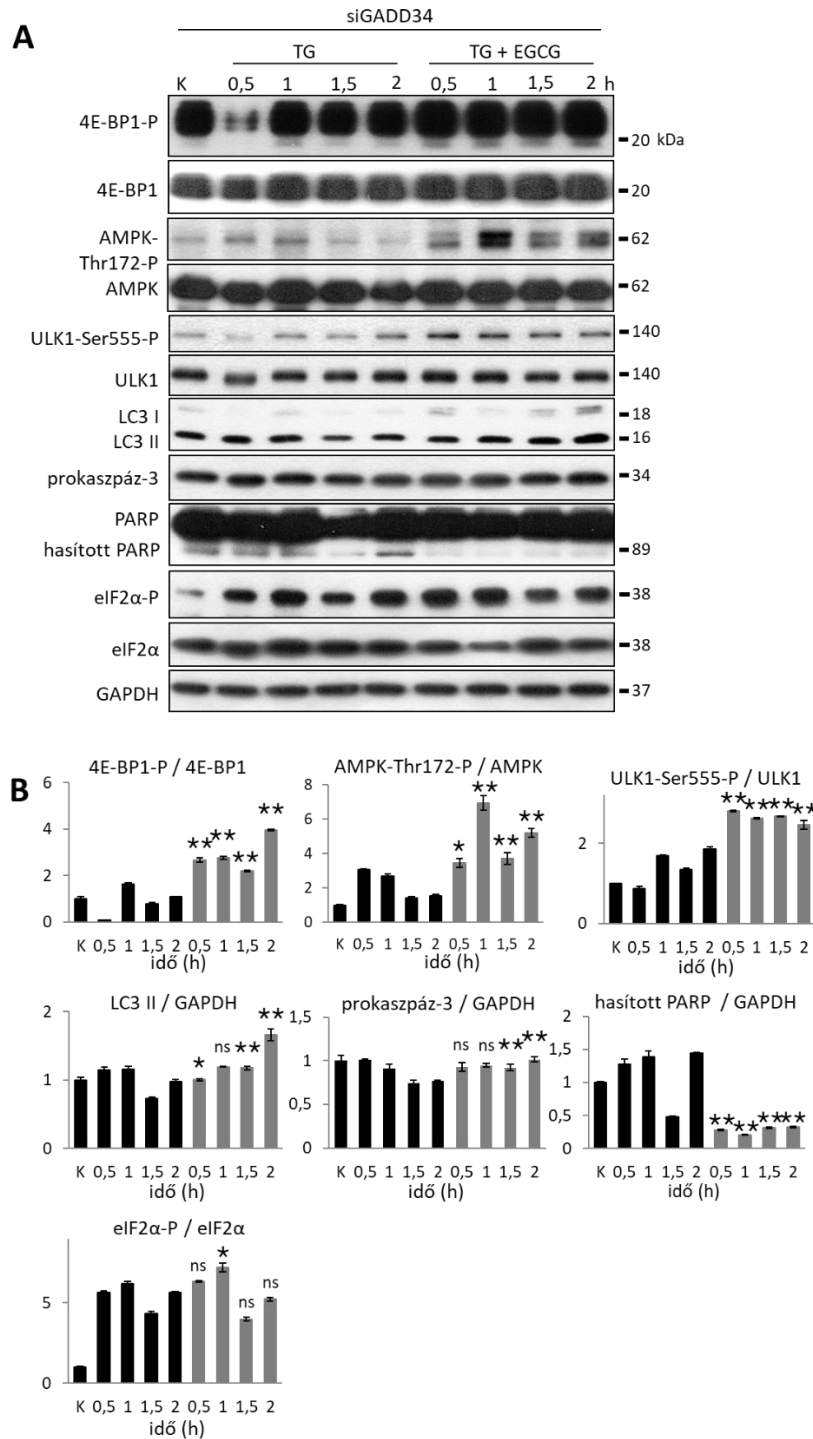


37. ábra. Az EGCG-előkezelés kombinálása TG-indukált intenzív ER-stresszel a GADD34 csendesítése esetén (I.).

A) A GADD34-csendesítés hatékonyságának ellenőrzése fehérje-szinten Western blottal. B) Az élő sejtek számának változása a kezelés hatására.

A hibasávok a szórást jelölik, a jelek statisztikailag szignifikáns eltérést mutatnak a kontrolltól: ns - nem szignifikáns; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .

A GADD34 csendesítése esetén az ER-stressz hatására az autofágia rövid időre és kismértékben aktiválódott, ugyanis az AMPK és az ULK1 foszforilációja és az LC3 II-es formájának mennyisége is enyhén megnövekedett (38. ábra).



38. ábra. Az EGCG-előkezelés kombinálása TG-indukált intenzív ER-stresszel a GADD34 csendesítése esetén (II.).

A) Az mTORC1-marker (4E-BP1-P), az AMPK (AMPK-Thr172-P), az ULK1 (ULK1-Ser555-P), az autofágia (LC3) és az apoptózis (prokaspáz-3, PARP) aktiválódásának és az ER-stressz (eIF2α-P) nyomon követése Western blot segítségével. B) A Western blot eredmények densitometriás analízise.

A hibasávok a szórást jelölik, a jelek statisztikailag szignifikáns eltérést mutatnak a kontrolltól: ns - nem szignifikáns; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .

Azonban az apoptózis hamarabb aktiválódott, a prokaspáz-3 mennyiségének csökkenését és a PARP hasadását már a TG-kezelés elején megfigyelhettük (38. ábra). Ezzel ellentétben, ha a GADD34-csendesített sejteket EGCG-vel is kezeltük, akkor az autofágia aktivitása hosszabb ideig fennmaradt, az apoptózis aktiválódása pedig egy későbbi időpontra tolódott. Az AMPK és az ULK1 foszforilációja és az LC3 II-es formájának mennyisége is magas maradt a kezelés végéig, míg a kaspáz-3 aktivációját és a PARP hasadását nem tudtuk detektálni (38. ábra).

Az EGCG-vel kombinált esetben tehát az AMPK végig aktív volt, erre utal a Thr172-es aminosavon történő foszforiláció és az ULK1 Ser555-ös aminosavának foszforiláltsága is, míg az mTORC1 gátolt maradt (a 4E-BP1 3. csíkja foszforilált) (38. ábra).

Ezek az eredmények tehát igazolják azt, hogy a GADD34 csendesítésének negatív hatásai ER-stressz esetén EGCG- és resveratrol-előkezeléssel kivédhetőek, mindkét természetes hatóanyag az AMPK-mTORC1 egyensúly megborítása révén elősegíti az autofágia aktiválódását és a sejtek túlélését.

## 5. Megbeszélés

A sejt homeosztázisának fenntartását számos szabályozási hálózat összehangolt működése teszi lehetővé. Különböző környezeti hatásokra vagy stresszre reagálva a sejtek megpróbálnak egy korábbi homeosztatis állapotba kerülni, de ha ez nem lehetséges, akkor a sejthalál folyamatai indukálódhatnak. Ezekben a folyamatokban kulcsfontosságú a tápanyag-ellátottságot követő mTORC1 és az energiatöltöttséget érzékelő AMPK közötti egyensúly, mivel ez a két kináz közösen szabályozza az autofágia egyik esszenciális induktorát, az ULK1-et (26, 81, 93, 141). Az AMPK az ATP fogyasztásán és az AMP mennyiségének növekedésén keresztül érzékeli a sejt energia állapotát, míg az ULK1 aktiválásán és az mTORC1 gátlásán keresztül elősegíti a lebontó, autofágiás folyamatokat (26, 93, 98). Megfelelő tápanyag-ellátottság esetén azonban az mTORC1 az ULK1 gátlásával megakadályozza ezeket a lebontó folyamatokat (26, 93). Bizonyított, hogy az ULK1 egy negatív visszacsatolással gátolja az AMPK-t (100, 142), ami lehetővé teszi az autofágia lecsengését és az mTORC1 visszaaktiválódását (39. ábra).

Az utóbbi években több olyan tanulmány készült, ahol a biológiai rendszerek dinamikai viselkedését elméleti módszerekkel próbálták megközelíteni. Ezek közül az egyik egyszerű mechanisztikus matematikai modell az autofágia és a sejtnövekedést szabályozó mechanizmusok működését vizsgálta. Ebben a modellben a kulcsfontosságú tagokat és azok egymásra gyakorolt hatását differenciálegyenletekkel írták le és több kísérletes eredményt is megfelelően szimuláltak (pl. éhezés, rapamycin-kezelés) (103), de mivel csak két bemeneti tényezőt vizsgáltak, számos, már kísérletekkel bizonyított folyamatot nem pontosan írt le a modell. Ezért a modell megfelelő működéséhez szükség lehet újabb kapcsolat(ok) (visszacsatolási hurok) beépítésére is az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási hálózatba, így felépítettük saját modellünket, majd teszteltük annak működését különböző stresszekre adott válaszok alapján, amiket mind elméleti, mind molekuláris biológiai technikák segítségével ellenőriztünk.

Megállapítottuk, hogy az AMPK nem aktiválódik sem az ULK1 csendesítése, sem az mTORC1 hiperaktivációja (a TSC1/2 csendesítés) esetén, habár a hálózatban az őt gátló ULK1 működését megakadályoztuk.

Mivel mindkét helyzetben az mTORC1 aktív volt a sejtben, ezért arra következtettünk, hogy az mTORC1-nek valamilyen módon negatív hatása lehet az AMPK-ra.

Ezen felül, ha az mTORC1 működését rapamycin segítségével gátoltuk, akkor az AMPK képes volt aktiválódni, ami szintén alátámasztja azt, hogy az mTORC1 direkt vagy indirekt hatással megakadályozza az AMPK aktiválódását. Mivel az AMPK már bizonyítottan gátolja az mTORC1 működését (56, 93), ezért a hálózatunkban egy dupla negatív visszacsatolási hurkot feltételeztünk és hoztunk létre a kiegészítő kapcsolat beépítésével (39. ábra: AMPK  $\dashv$  mTORC1  $\dashv$  AMPK). A dupla negatív visszacsatolás egy úgynevezett kapcsolószerű (igen-nem típusú) viselkedést biztosít a biológiai rendszerek szabályozása során, és így egy irreverzibilis átmenetet hozhat létre két jól elkülöníthető állapot között (pl.: autofágia – sejtnövekedés) (129). Vagyis ebben a helyzetben fiziológias körülmények között az mTORC1 aktív, míg az AMPK inaktív, azonban az AMPK gyorsan aktiválódik energiahány esetén. Az AMPK aktiválódása pedig az mTORC1 gátlását eredményezi, ezáltal elősegíti az autofágia folyamatainak aktiválódását. Véleményünk szerint az AMPK mTORC1 általi gátlása tehát ahhoz szükséges, hogy az AMPK fiziológias körülmények között biztosan inaktív maradjon, és hogy elkerülhessük az intenzív autofágia akár már enyhe stressz hatására történő bekövetkezését.

Mivel az mTORC1 egy szerin/treonin-kináz, ezért az AMPK-t foszforilációval gátolhatja, amit kutató csoportunk elméleti módszerekkel igazolt, majd Ling és munkatársai ezt követően már kísérletesen is bizonyítottak. Vizsgálataik alapján az mTORC1 a Ser345-ös aminosavon foszforilálja az AMPK-t, ami negatívan hat az AMPK katalitikus alegységén levő Thr172-es aminosav foszforilálódására és így az AMPK aktiválódását gátolja (143).

Habár az AMPK szabályozása és az autofágiára gyakorolt hatása már jól ismert (97), az aktív AMPK viselkedésének dinamikai karakterisztikáját még nem tanulmányozták. Ezért elméleti és molekuláris biológiai módszerekkel megvizsgáltuk az AMPK szerepét az autofágiás folyamatok elősegítésében. Eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy az aktív AMPK szükséges, de önmagában nem elégséges az autofágia indukciójához celluláris stressz esetén.

Ha rapamycin-kezelés esetén gátoltuk az AMPK működését (Compound C-vel), autofágia nem következett be és ugyanezt tapasztaltuk akkor is, ha a kezelést az ULK1 csendesítése előzte meg, hiába volt aktív AMPK jelen. Tehát az aktív AMPK szükséges az autofágia megfelelő indukálásához az ULK1 foszforilációján keresztül.

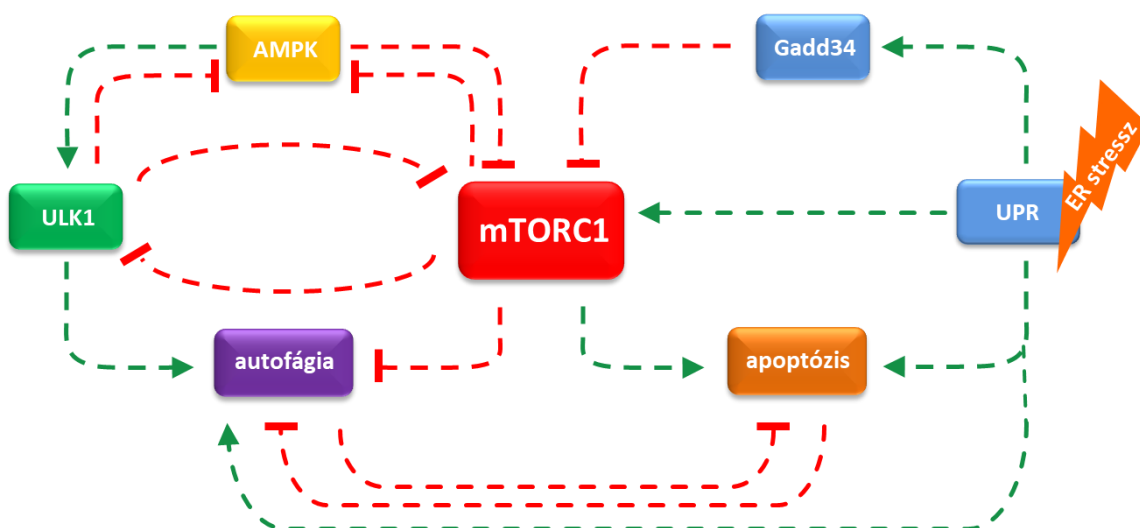
Az mTORC1 időbeni gátlása (rapamycin-kezelés) során pedig azt láttuk, hogy az AMPK aktiválódása az mTORC1 gátlódását követően figyelhető meg és ez az aktiválódás megelőzte az ULK1 aktiválódását. Ha a sejtben jelen volt mind az aktív AMPK, mind az aktív ULK1, akkor az önmérsztő autofágiás folyamatok is aktívvá váltak. Érdekes módon az aktiválódott ULK1 szinte azonnal gátolta az AMPK működését, miközben az autofágia aktív maradt.

Az ULK1 és az AMPK között negatív visszacsatolás figyelhető meg, pedig mindketten szükségesek az intenzív autofágia kialakításához. Elképzelésünk szerint az AMPK szükséges az autofágia beindításához az ULK1 pedig annak fenntartásához szükséges. Viszont a sejt idővel az autofágiás folyamatok lecsengését helyezi előtérbe, ezért az ULK1 gátolja az AMPK további működését. Ezzel azonban az ULK1 a saját maga további aktivitásának fennmaradását is korlátozza, így az autofágia lecseng és az mTORC1 képes lesz újból aktiválódni.

A továbbiakban az autofágia időbeni lecsengésében szerepet játszó, az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási hálózatban megtalálható negatív visszacsatolási hurkok működését vizsgáltuk meg. A vizsgált hálózatban két, részben egymásba ágyazott negatív visszacsatolási hurok található: az  $AMPK-P \rightarrow ULK1-P \dashv AMPK-P$  és az  $AMPK-P \dashv mTORC1 \dashv ULK1-P \dashv AMPK-P$  hurkok. Abban az esetben, ha az AMPK és az ULK1 között egy direkt negatív visszacsatolás lehetőségét vizsgáltuk a modellünk segítségével, akkor éhezés esetén a fokozott AMPK-aktiválásnak köszönhetően az  $AMPK-P \dashv mTORC1 \dashv ULK1-P \dashv AMPK-P$  negatív visszacsatolási hurok az autofágia oszcillatorikus aktiválódását okozta. Kísérletes eredményeink alapján is éhezés hatására a fiziológias állapot (aktív mTORC1, inaktív AMPK és ULK1) és az autofágiás állapot (inaktív mTORC1, aktív AMPK és ULK1) periodikus váltakozását tudtuk megfigyelni. Az ULK1 fehérje periodikus aktiválódását már korábban is leírták (144), de glükóz megvonás hatására az autofágia oszcillációs aktiválódását nem vizsgálták meg.

Az mTORC1 rapamycin-függő gátlásának hatására bekövetkező AMPK-aktiválódásra egymásnak ellentmondó eredmények találhatóak meg az irodalomban, miszerint rapamycin-kezelés esetén az AMPK aktiválódik (saját eredmények, (145)), míg mások nem detektálták az AMPK aktiválódását (146, 147). Az utóbbi esetekben viszont, amikor nem tapasztaltak AMPK aktiválódást, a mintákat csak egy adott időpontban vizsgálták.

Ezért kísérleteink során az eddigieknél hosszabb rapamycin-kezelést végeztünk és a mintákat fél óránként vettük. Az autofágiás folyamatok oszcillatorikus aktiválódásával párhuzamosan az AMPK foszforilációjában is periodikus változásokat tudtunk megfigyelni. Ez az eredmény az ellentmondó irodalmi adatokra is magyarázatot adhat, amelyek szerint hol aktív, hol pedig inaktív az AMPK.



39. ábra. A munkánk során vizsgált szabályozási hálózat felépítése.

A zöld nyilak aktiváló, a pirosak gátló kapcsolatot feltételeznek a hálózat tagjai között.

Mivel az mTORC1 működése a tartós rapamycin-kezelés és éhezés esetén gátolt, az AMPK-P  $\downarrow$  mTORC1  $\downarrow$  ULK1-P  $\downarrow$  AMPK-P negatív visszacsatolási hurok hatása nem érvényesül a szabályozási hálózatban, ezért feltételezéseink szerint a rendszer oszcillációs viselkedését az AMPK-P  $\rightarrow$  ULK1-P  $\downarrow$  AMPK-P visszacsatolási hurok okozza. Mivel ezt a viselkedést az AMPK és az ULK1 közötti direkt kapcsolattal nem tudtuk leírni, elméleti módszerekkel biológiailag releváns időbeni késleltetési módokat kerestünk. Az egyik lehetőség az AMPK és az ULK1 közötti kapcsolat kiegészítése egy további fehérjével, míg a másik, ha az ULK1 fehérje több lépcsőben történő foszforilációját feltételezzük az AMPK által.

A modellünkkel végzett vizsgálatok alapján, mind a további fehérje beépítése, mind a több lépcsőben történő foszforiláció megfelelő időkésleltetést biztosít a szabályozási hálózat tagjainak oszcillációjához.

Feltételezéseink szerint az autofágiás és a fiziológias állapot periodikus váltakozása éhezés és rapamycin-kezelés esetén lehetőséget biztosít a rendszer számára, hogy az autofágia által létrehozott építőanyagokat komplex, a működés szempontjából nélkülözhetetlen, biológiai elemek létrehozására használja fel, és amennyiben a stressz lecsengett, visszaálljon a fiziológias állapotba.

Az endoplazmás retikulumnak kulcs szerepe van a sejt homeosztázisának fenntartásában, azáltal, hogy a membránjában olyan szabályozó fehérjék találhatók meg, amelyek a sejtek élet-halál közötti döntését segítik elő (104, 105). Endoplazmás retikulum stressz esetén a stressz nagyságától és hosszától függően a sejt vagy autofágia-függő túlélési folyamatokat indít el, vagy ha ez már nem lehetséges, akkor aktiválja az apoptotikus útvonalakat (148). A generált válasz mechanizmusoknak pontos döntést kell hozniuk a „félreértések” és azok akár végzetes következményeinek elkerülése érdekében. Ebben lehet szerepe két különálló jelátviteli útvonal, az UPR (105) és az mTORC1 (52) közötti keresztkapcsolatoknak (39. ábra) (107). Korábbi eredményeink alapján azt láttuk, hogy az apoptotikus sejthalál indukálódását mindig megelőzi az autofágia-függő túlélési folyamat aktiválódása intenzív ER-stressz esetén (148, 149). Számos stresszhelyzet, mint az éhezés, a vírus fertőzés vagy a huntingtin fehérje túltermelése során kimutatták, hogy a GADD34 képes gátolni az mTORC1 működését (108, 109, 111, 117-120). Mivel a GADD34 az UPR-útvonal részeként aktiválódik ER-stressz során, megvizsgáltuk, hogy ebben az esetben is van-e egy gátló hatása az mTORC1 működésére. Ha a GADD34 működését annak egy farmakológiai inhibitorával (guanabenz) gátoltuk, akkor az látszódt, hogy az mTORC1 és az apoptózis gyorsan aktiválódott, miközben az AMPK inaktív maradt és az autofágia-függő túlélés sokkal rövidebb ideig volt aktív intenzív ER-stressz esetén. Ennek megfelelően a sejtek életképessége is nagyobb mértékben csökkent a GADD34 gátlásakor. Tehát a GADD34-nek fontos szerepe van a túlélés és a sejthalál közötti egyensúly kialakításában, mivel képes megakadályozni az apoptotikus sejthalál aktiválódását az mTORC1 gátlásán keresztül.



Ezek az eredmények azt is igazolják, hogy az AMPK- és az mTORC1-útvonalak a GADD34 fehérjén keresztül kapcsolódnak az UPR-útvonalhoz ER-stressz esetén.

ER-stressz okozta károsodások számos humán kórképnél megfigyelhetők, mint a neurodegeneratív betegségek, a gyulladós betegségek vagy a II-es típusú cukorbetegség (106). Mostanra már több olyan autofágia aktiváló szert is azonosítottak, amelyek a jövőben potenciális hatóanyagok lehetnek ezen betegségek kezelésében, az ER-stressz káros hatásainak időbeni elhalasztásával. Kutatócsoportunk megerősítette, hogy az autofágia meghosszabbítható mTORC1-gátlók és/vagy AMPK-aktivátorok (pl.: metyrapone, rapamycin, resveratrol) előkezelésként történő használatával ER-stressz esetén (137, 149).

A hatóanyagok keresésekor a zöld teában található katekin, az EGCG hatásmechanizmusát alaposabban is megvizsgáltuk, mivel az EGCG számos hatása ismert már (126, 127), azonban az AMPK-zal való pontos kapcsolatát még nem vizsgálták.

Az EGCG-t alacsony koncentrációban használva az autofágia aktiválódott, miközben a sejtek életképessége a kontrollhoz képest nem változott, vagyis az EGCG nem toxikus a sejtek számára.

Az alacsony koncentrációjú EGCG-előkezelés thapsigarginnal és tunicamycinnel kiváltott ER-stressz esetén képes volt meghosszabbítani az autofágia-függő túlélést, miközben a sejtek életképessége nem változott és az apoptotikus útvonalak aktiválódását sem tudtuk megfigyelni. Az eif2 $\alpha$  alacsony koncentrációjú EGCG-kezelés során is foszforilálódott. Az eif2 $\alpha$  foszforilációjának kulcs szerepe van ER-stressz esetén a globális fehérje transzláció leállításában (104, 105), azonban ez az EGCG-indukált eif2 $\alpha$  foszforilálódás szükséges a GADD34 aktiválásához is. A GADD34 szintje az autofágia aktiválásával párhuzamosan növekedett EGCG-vel történt kezelés során, ami a GADD34 fontos szerepére utalhat az EGCG által segített túlélésben.

Mivel az EGCG hatása az mTORC1-útvonalra nem teljesen egyértelmű, ezért az EGCG-kezelést kombináltuk az autofágia mTORC1-függő (rapamycin) vagy PKA-függő (H-89) aktivátoraival, hogy kiderítsük, vajon melyik útvonal vesz részt az autofágia indukálásában EGCG-kezeléskor.

Eredményeink szerint az autofágia egyforma mértékben aktiválódott mind az EGCG, mind az EGCG-vel kombinált rapamycin-kezelések hatására, ami arra utal, hogy az EGCG és a rapamycin az önemésztő folyamatokat egyaránt az mTORC1-útvonal gátlásán keresztül aktiválja.

Az EGCG és a H-89 együttes adása esetén az autofágia aktiválódásában szignifikáns növekedést tapasztaltunk a H-89-cel történt kezeléshez képest, ami alátámasztja, hogy az EGCG nem PKA-függő módon aktiválja az autofágiát. Az ULK1-csendesítése esetén az EGCG-kezelés a rapamycin-kezeléshez hasonlóan nem volt képes aktiválni az autofágiás önemésztő folyamatokat, vagyis az EGCG az önemésztő folyamatokat az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási hálózaton keresztül indukálja.

Az EGCG és a resveratrol az AMPK-mTORC1-útvonalakra gyakorolt hatásának további vizsgálatához a GADD34 működését gátoltuk guanabenzzel vagy siRNS-sel, majd EGCG-vel vagy resveratrollal történt előkezelés után intenzív ER-stresszt indukáltunk náluk. Ekkor azt tapasztaltuk, hogy a 24 órás, alacsony koncentrációjú EGCG- vagy resveratrol-előkezelés képes volt a sejtek életképességének a fenntartására az AMPK és az autofágia aktiválásán keresztül intenzív ER-stressz esetén, ha a GADD34 gátolt volt. Amíg az mTORC1 és az apoptotikus sejthalál ebben az esetben inaktív maradt és az aktiválódásuk egy későbbi időpontra tolódott ki. Tehát a resveratrol és az EGCG is képes az mTORC1 és az AMPK közötti egyensúlyra hatni, és így kiküszöbölni a GADD34 gátlásának negatív hatásait.

Mivel az ER-stressz számos különböző humán patológiás állapot esetén megfigyelhető, ezért az ilyenkor meghozott ER-stressz indukált élet-halál közötti döntés mechanizmusának pontos feltérképezése terápiás jelentőségű. Mivel többféle ER-stresszort is alkalmaztunk a kísérleteink során, és különböző sejtvonalak esetén is hasonló eredményeket kaptunk, ez arra utalhat, hogy az általunk leírt mechanizmus általános érvényű.

A resveratrol és az EGCG számos intracelluláris jelpályára képes hatni, ezért terápiás potenciállal rendelkezhetnek (123-127). Mindkét vegyületről kimutatták már, hogy neuroprotektív hatással bírnak Huntington betegség esetén (150). Hyrskyluoto és munkatársai azt találták, hogy a GADD34 túltermeltetése képes volt indukálni az autofágiát és gátolni az mTORC1 működését mutáns huntingtin fehérjét expresszáló sejtekben (111).

Mi pedig igazoltuk, hogy a GADD34 resveratrol- és EGCG-kezelés hatására egyaránt aktiválódik ER-stressz esetén, igazolva, hogy a GADD34 fontos része lehet a resveratrol- és EGCG-függő idegsejt védelemnek Huntington betegség esetén. Azonban további vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy eredményeinket in vivo, élő szervezetekben is alkalmazni lehessen.

Annak megértése, hogy a precíz molekuláris egyensúly az mTORC1- és az AMPK-útvonalak között hogyan szabályozza a sejtek túlélését, azon belül is az autofágiát, nagy jelentőséggel bír a celluláris stresszhez köthető betegségek esetén. Rendszerbiológiai elemzésünk hozzájárul ezen komplex betegségek molekuláris alapjainak megértéséhez, és elősegítheti a betegségek elleni terápiák fejlesztését, a pontos molekuláris célpontok megtalálását.

Kísérletes eredményekkel is alátámasztott komplex modellünk (39. ábra) segítségével a szabályozási hálózat működését befolyásoló hatóanyagok, molekulák a jövőben tesztelhetők, a hálózatra kifejtett hatásuk pedig modellezhető.

## 6. Következtetések

Munkánk során egyrészt az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási hálózatban levő kapcsolatok dinamikai működését és a szabályozási hálózat különböző stresszre adott válaszait, másrészt az AMPK-ULK1-mTORC1 és az UPR-útvonalak közötti keresztkapcsolatokat vizsgáltuk mind elméleti, mind molekuláris biológiai technikák segítségével. Eredményeink alapján az alábbiakat állapítottuk meg:

1. A korábban mások által már leírt modellt reprodukáltuk és a modell működésének tesztelése során arra jutottunk, hogy a rendszer megfelelő működéséhez szükség van egy további kapcsolat beépítésére is, miszerint az mTORC1 is gátolja az AMPK működését. Így a szabályozási hálózatban az AMPK és az mTORC1 között egy dupla negatív visszacsatolási hurkot hoztunk létre, aminek hatására a szimulációink során a stresszválaszok robusztusabbá váltak.
2. Kimutattuk, hogy az AMPK és az ULK1 közötti negatív visszacsatolási hurok időbeni késleltetése szükséges a rendszer megfelelő működéséhez, és ennek a visszacsatolásnak köszönhetően a hálózat tagjai, az AMPK, az ULK1 és az autofágia folyamata időben ismétlődve, periodikusan aktiválódhatnak bizonyos stressz hatására. Biológiailag releváns időbeni késleltetést biztosít a rendszer oszcillációjához, ha az AMPK és az ULK1 közé egy további fehérjét építünk be a szabályozási hálózatba, vagy ha az ULK1 több lépcsőben történő foszforilációját feltételezzük az AMPK által.
3. Megállapítottuk, hogy a GADD34 fehérje képes gátolni az mTORC1 működését ER-stressz esetén, míg a GADD34 gátlásakor az mTORC1 és az apoptotikus útvonalak aktiválódása időben előbbre tolódik intenzív ER-stressz során.

4. Eredményeink szerint mind a resveratrol, mind az EGCG – az AMPK és az mTORC1 közötti egyensúlyra hatva – az autofágiás folyamatok aktiválásán keresztül növelte a sejtek túlélését, és kivédte az ER-stressz okozta sejthalált, időben egy későbbi időpontra toltta ki azt. Emellett mind a resveratrollal, mind az EGCG-vel történő előkezelés képes volt a GADD34 fehérje gátlásának negatív hatásait kivédeni és a GADD34 gátlása esetén is aktiválni az autofágiás folyamatokat ER-stressz esetén.
  
5. Az általunk létrehozott komplex matematikai modell jól használható a szabályozási hálózat működését befolyásoló molekulák, természetes vagy mesterséges hatóanyagok tesztelésére és a különböző celluláris stressz hatások hálózatra kifejtett hatásainak modellezésére.

## 7. Összefoglalás

A sejtek homeosztázisának fenntartásában fontos szerepe van az autofágiának, ami egy evolúciósan konzervált önemésztő folyamat. Az autofágia aktiválódását az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási háromszög irányítja, míg ER-stressz esetén ehhez a rendszerhez még hozzákapcsolódik az UPR is, hogy az élet-halál közötti döntési mechanizmus minél pontosabb legyen. Az mTORC1 és az UPR között szabályozásbeli keresztkapcsolatok vannak, mivel az UPR PERK-ágának részeként aktiválódó GADD34 képes gátolni az mTORC1 működését számos stressz hatására. Célunk az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási háromszögben levő kapcsolatok dinamikai viselkedésének vizsgálata, különösen az AMPK és az mTORC1 közötti kapcsolat pontosabb megértése, valamint az AMPK és az ULK1 közötti negatív visszacsatolási hurok elemzése volt. További célunk az mTORC1 és a GADD34 közötti kapcsolat vizsgálata intenzív ER-stressz esetén, és olyan természetes hatóanyagok keresése, amelyekkel a szabályozási hálózat működése befolyásolható. Munkánk során rendszerbiológiai megközelítést alkalmaztunk, azaz egyaránt használtunk elméleti és molekuláris biológiai technikákat is.

Eredményeinkből arra következtettünk, hogy a rendszer megfelelő működéséhez az AMPK és az mTORC1 közé egy további kapcsolatot is szükséges beépíteni, miszerint az mTORC1 is gátolja az AMPK működését. A kísérletek során azt láttuk, hogy hosszantartó éhezés esetén az AMPK, az ULK1 és az autofágia aktiválódása az idő függvényében oszcillál. Emiatt az AMPK és az ULK1 közötti negatív visszacsatolás időben késleltetve kell történjen, mely késleltetésre két biológiailag releváns lehetőséget találtunk: (1) a visszacsatolás egy további fehérjével való kiegészítése vagy (2) az ULK1 több lépcsőben történő foszforilációja. Megfigyeléseink alapján a GADD34 intenzív ER-stressz esetén is képes gátolni az mTORC1 működését, ezáltal elősegítve a sejtek túlélését. A resveratrol és az EGCG az AMPK aktiválásán és az mTORC1 gátlásán keresztül segítik elő az autofágiás önemésztő folyamatok aktiválódását, és használatuk kiküszöböli a GADD34 gátlásának negatív hatásait.

Rendszerbiológiai elemzésünk segítheti az ER-stresszhez köthető komplex kórképek molekuláris alapjainak megértését, hozzájárulhat jövőbeni terápiák fejlesztéséhez és azok hatásának teszteléséhez.

## 8. Summary

Cellular homeostasis is controlled by an evolutionary conserved cellular digestive process termed autophagy. Autophagy is tightly governed by the AMPK-ULK1-mTORC1 regulatory triangle, while UPR is connected to the control network under ER stress. This complex regulatory network has an essential role in a precise decision-making between survival and death. There is a crosstalk between mTORC1 and UPR pathways, since GADD34 activated upon UPR can downregulate the mTORC1 under several cellular stress conditions. Our aims were to explore the dynamical characteristic of AMPK-ULK1-mTORC1 regulatory triangle, focusing on the connection between AMPK and mTORC1. Furthermore, the negative feedback loop between AMPK and ULK1 was also studied in detail. Our additional goal was to investigate the relationship between mTORC1 and GADD34 upon prolonged ER stress and to find natural compounds with the ability to influence the behavior of the investigated regulatory system. To approach our study from a systems biological perspective we used both theoretical and molecular biological techniques.

Our results confirm that there is an essential double-negative feedback loop between mTORC1 and AMPK; namely, mTORC1 can inhibit AMPK to guarantee the precise function of the cell response mechanism. We demonstrate that prolonged starvation results in a periodic reiteration of the activation of AMPK, ULK1 and autophagy. This oscillatory dynamics is achieved by introducing a proper time-delay in the negative feedback loop between AMPK and ULK1. Two biologically relevant options to generate a time-delay in the control network are (1) the incorporation of an extra regulatory element in the negative feedback loop or (2) the AMPK-dependent multiple phosphorylation of ULK1. Our analysis suggests that GADD34 inhibits the mTORC1 pathway under excessive levels of ER stress and might promote cell viability. Both resveratrol and EGCG can underpin the autophagy-dependent self-digestive process via activation of AMPK and/or inhibition of mTORC1, and therefore they are able to diminish the deleterious effect of GADD34 depletion.

Our systems biological analysis improves our understanding of the molecular basis of several ER stress-related complex diseases and might help promote advanced therapies and to test their effect in the near future.

## 9. Irodalomjegyzék

1. Eskelinen EL. (2019) Autophagy: Supporting cellular and organismal homeostasis by self-eating. *Int J Biochem Cell Biol*, 111: 1-10.
2. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, Jimenez-Sanchez M, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DC, Menzies FM, Moreau K, Narayanan U, Renna M, Siddiqi FH, Underwood BR, Winslow AR, Rubinsztein DC. (2010) Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 90: 1383-1435.
3. Wen X, Klionsky DJ. (2016) An overview of macroautophagy in yeast. *J Mol Biol*, 428: 1681-1699.
4. Parzych KR, Klionsky DJ. (2014) An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*, 20: 460-473.
5. Mizushima N, Komatsu M. (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 147: 728-741.
6. Rubinsztein DC, Bento CF, Deretic V. (2015) Therapeutic targeting of autophagy in neurodegenerative and infectious diseases. *J Exp Med*, 212: 979-990.
7. Rubinsztein DC, Codogno P, Levine B. (2012) Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 11: 709-730.
8. Rubinsztein DC, Marino G, Kroemer G. (2011) Autophagy and aging. *Cell*, 146: 682-695.
9. Bento CF, Renna M, Ghislat G, Puri C, Ashkenazi A, Vicinanza M, Menzies FM, Rubinsztein DC. (2016) Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annu Rev Biochem*, 85: 685-713.
10. Pengo N, Agrotis A, Prak K, Jones J, Ketteler R. (2017) A reversible phospho-switch mediated by ULK1 regulates the activity of autophagy protease ATG4B. *Nat Commun*, 8: 294.
11. Stolz A, Ernst A, Dikic I. (2014) Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat Cell Biol*, 16: 495-501.



12. Zachari M, Ganley IG. (2017) The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays Biochem*, 61: 585-596.
13. Chan EY, Kir S, Tooze SA. (2007) siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J Biol Chem*, 282: 25464-25474.
14. Kundu M, Lindsten T, Yang CY, Wu J, Zhao F, Zhang J, Selak MA, Ney PA, Thompson CB. (2008) Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. *Blood*, 112: 1493-1502.
15. Lee EJ, Tournier C. (2011) The requirement of uncoordinated 51-like kinase 1 (ULK1) and ULK2 in the regulation of autophagy. *Autophagy*, 7: 689-695.
16. Chan EY, Longatti A, McKnight NC, Tooze SA. (2009) Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism. *Mol Cell Biol*, 29: 157-171.
17. Petherick KJ, Conway OJ, Mpamhanga C, Osborne SA, Kamal A, Saxty B, Ganley IG. (2015) Pharmacological inhibition of ULK1 kinase blocks mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent autophagy. *J Biol Chem*, 290: 11376-11383.
18. Egan DF, Chun MG, Vamos M, Zou H, Rong J, Miller CJ, Lou HJ, Raveendra-Panickar D, Yang CC, Sheffler DJ, Teriete P, Asara JM, Turk BE, Cosford ND, Shaw RJ. (2015) Small Molecule Inhibition of the Autophagy Kinase ULK1 and Identification of ULK1 Substrates. *Mol Cell*, 59: 285-297.
19. Hosokawa N, Sasaki T, Iemura S, Natsume T, Hara T, Mizushima N. (2009) Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy*, 5: 973-979.
20. Ganley IG, Lam du H, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X. (2009) ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem*, 284: 12297-12305.
21. Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH. (2009) ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell*, 20: 1992-2003.

22. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan JL, Oshiro N, Mizushima N. (2009) Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell*, 20: 1981-1991.
23. Mercer CA, Kaliappan A, Dennis PB. (2009) A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy*, 5: 649-662.
24. Puente C, Hendrickson RC, Jiang X. (2016) Nutrient-regulated Phosphorylation of ATG13 Inhibits Starvation-induced Autophagy. *J Biol Chem*, 291: 6026-6035.
25. Nazio F, Strappazzon F, Antonioli M, Bielli P, Cianfanelli V, Bordi M, Gretzmeier C, Dengjel J, Piacentini M, Fimia GM, Cecconi F. (2013) mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nat Cell Biol*, 15: 406-416.
26. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 13: 132-141.
27. Lin SY, Li TY, Liu Q, Zhang C, Li X, Chen Y, Zhang SM, Lian G, Liu Q, Ruan K, Wang Z, Zhang CS, Chien KY, Wu J, Li Q, Han J, Lin SC. (2012) GSK3-TIP60-ULK1 signaling pathway links growth factor deprivation to autophagy. *Science*, 336: 477-481.
28. Karanasios E, Stapleton E, Manifava M, Kaizuka T, Mizushima N, Walker SA, Ktistakis NT. (2013) Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction. *J Cell Sci*, 126: 5224-5238.
29. Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang YY, Kim J, Kim H, Neufeld TP, Dillin A, Guan KL. (2013) ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol*, 15: 741-750.
30. Wold MS, Lim J, Lachance V, Deng Z, Yue Z. (2016) ULK1-mediated phosphorylation of ATG14 promotes autophagy and is impaired in Huntington's disease models. *Mol Neurodegener*, 11: 76.
31. Di Bartolomeo S, Corazzari M, Nazio F, Oliverio S, Lisi G, Antonioli M, Pagliarini V, Matteoni S, Fuoco C, Giunta L, D'Amelio M, Nardacci R, Romagnoli A, Piacentini M, Cecconi F, Fimia GM. (2010) The dynamic

- interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J Cell Biol*, 191: 155-168.
32. Young AR, Chan EY, Hu XW, Kochl R, Crawshaw SG, High S, Hailey DW, Lippincott-Schwartz J, Tooze SA. (2006) Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci*, 119: 3888-3900.
  33. Kim YC, Guan KL. (2015) mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J Clin Invest*, 125: 25-32.
  34. Laplante M, Sabatini DM. (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149: 274-293.
  35. Kaizuka T, Hara T, Oshiro N, Kikkawa U, Yonezawa K, Takehana K, Iemura S, Natsume T, Mizushima N. (2010) Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly. *J Biol Chem*, 285: 20109-20116.
  36. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, Hall MN. (2004) Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*, 6: 1122-1128.
  37. Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, Gray NS, Sabatini DM. (2009) DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*, 137: 873-886.
  38. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KV, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. (2003) GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell*, 11: 895-904.
  39. Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K. (2002) Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*, 110: 177-189.
  40. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. (2002) mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, 110: 163-175.

41. Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, Carr SA, Sabatini DM. (2007) PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell*, 25: 903-915.
42. Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH. (2007) Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol*, 9: 316-323.
43. Thedieck K, Polak P, Kim ML, Molle KD, Cohen A, Jenö P, Arriemerlou C, Hall MN. (2007) PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis. *PLoS One*, 2: e1217.
44. Wang L, Harris TE, Roth RA, Lawrence JC, Jr. (2007) PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J Biol Chem*, 282: 20036-20044.
45. Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. (2004) Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*, 14: 1296-1302.
46. Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY, Huang Q, Qin J, Su B. (2006) SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell*, 127: 125-137.
47. Frias MA, Thoreen CC, Jaffe JD, Schroder W, Sculley T, Carr SA, Sabatini DM. (2006) mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol*, 16: 1865-1870.
48. Pearce LR, Huang X, Boudeau J, Pawlowski R, Wullschleger S, Deak M, Ibrahim AF, Gurlay R, Magnuson MA, Alessi DR. (2007) Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem J*, 405: 513-522.
49. Yang Q, Inoki K, Ikenoue T, Guan KL. (2006) Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity. *Genes Dev*, 20: 2820-2832.
50. Shimobayashi M, Hall MN. (2014) Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15: 155-162.

51. Laplante M, Sabatini DM. (2013) Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *J Cell Sci*, 126: 1713-1719.
52. Hay N, Sonenberg N. (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*, 18: 1926-1945.
53. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. (2002) TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*, 4: 648-657.
54. Gao X, Zhang Y, Arrazola P, Hino O, Kobayashi T, Yeung RS, Ru B, Pan D. (2002) Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. *Nat Cell Biol*, 4: 699-704.
55. Yang H, Jiang X, Li B, Yang HJ, Miller M, Yang A, Dhar A, Pavletich NP. (2017) Mechanisms of mTORC1 activation by RHEB and inhibition by PRAS40. *Nature*, 552: 368-373.
56. Inoki K, Zhu T, Guan KL. (2003) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 115: 577-590.
57. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ. (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*, 30: 214-226.
58. Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH, Hafen E, Witters LA, Ellisen LW, Kaelin WG, Jr. (2004) Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev*, 18: 2893-2904.
59. DeYoung MP, Horak P, Sofer A, Sgroi D, Ellisen LW. (2008) Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev*, 22: 239-251.
60. Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC. (2002) Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell*, 10: 151-162.
61. Potter CJ, Pedraza LG, Xu T. (2002) Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat Cell Biol*, 4: 658-665.
62. Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J. (2003) Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberlin and Hamartin, control mTOR

- signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol*, 13: 1259-1268.
63. Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL. (2003) Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev*, 17: 1829-1834.
  64. Menon S, Dibble CC, Talbott G, Hoxhaj G, Valvezan AJ, Takahashi H, Cantley LC, Manning BD. (2014) Spatial control of the TSC complex integrates insulin and nutrient regulation of mTORC1 at the lysosome. *Cell*, 156: 771-785.
  65. Saucedo LJ, Gao X, Chiarelli DA, Li L, Pan D, Edgar BA. (2003) Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. *Nat Cell Biol*, 5: 566-571.
  66. Stocker H, Radimerski T, Schindelholz B, Wittwer F, Belawat P, Daram P, Breuer S, Thomas G, Hafen E. (2003) Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in *Drosophila*. *Nat Cell Biol*, 5: 559-565.
  67. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307: 1098-1101.
  68. Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J. (2004) Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 13489-13494.
  69. Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. (2005) Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell*, 121: 179-193.
  70. Jewell JL, Russell RC, Guan KL. (2013) Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14: 133-139.
  71. Bar-Peled L, Sabatini DM. (2014) Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends Cell Biol*, 24: 400-406.
  72. Noda T, Ohsumi Y. (1998) Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem*, 273: 3963-3966.
  73. Scott RC, Schuldiner O, Neufeld TP. (2004) Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev Cell*, 7: 167-178.

74. Yuan HX, Russell RC, Guan KL. (2013) Regulation of PIK3C3/VPS34 complexes by MTOR in nutrient stress-induced autophagy. *Autophagy*, 9: 1983-1995.
75. Settembre C, Fraldi A, Medina DL, Ballabio A. (2013) Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14: 283-296.
76. Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Garcia Arencibia M, Vetrini F, Erdin S, Erdin SU, Huynh T, Medina D, Colella P, Sardiello M, Rubinsztein DC, Ballabio A. (2011) TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science*, 332: 1429-1433.
77. Settembre C, Zoncu R, Medina DL, Vetrini F, Erdin S, Erdin S, Huynh T, Ferron M, Karsenty G, Vellard MC, Facchinetti V, Sabatini DM, Ballabio A. (2012) A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J*, 31: 1095-1108.
78. Yu L, McPhee CK, Zheng L, Mardones GA, Rong Y, Peng J, Mi N, Zhao Y, Liu Z, Wan F, Hailey DW, Oorschot V, Klumperman J, Baehrecke EH, Lenardo MJ. (2010) Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature*, 465: 942-946.
79. Garcia D, Shaw RJ. (2017) AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Mol Cell*, 66: 789-800.
80. Mihaylova MM, Shaw RJ. (2011) The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol*, 13: 1016-1023.
81. Tamargo-Gomez I, Marino G. (2018) AMPK: Regulation of Metabolic Dynamics in the Context of Autophagy. *Int J Mol Sci*, 19.
82. Willows R, Navaratnam N, Lima A, Read J, Carling D. (2017) Effect of different gamma-subunit isoforms on the regulation of AMPK. *Biochem J*, 474: 1741-1754.
83. Stein SC, Woods A, Jones NA, Davison MD, Carling D. (2000) The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem J*, 345 Pt 3: 437-443.
84. Hardie DG. (2015) AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis. *Curr Opin Cell Biol*, 33: 1-7.

85. Fogarty S, Hawley SA, Green KA, Saner N, Mustard KJ, Hardie DG. (2010) Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta activates AMPK without forming a stable complex: synergistic effects of Ca<sup>2+</sup> and AMP. *Biochem J*, 426: 109-118.
86. Xie M, Zhang D, Dyck JR, Li Y, Zhang H, Morishima M, Mann DL, Taffet GE, Baldini A, Khoury DS, Schneider MD. (2006) A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 17378-17383.
87. Herrero-Martin G, Hoyer-Hansen M, Garcia-Garcia C, Fumarola C, Farkas T, Lopez-Rivas A, Jaattela M. (2009) TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells. *EMBO J*, 28: 677-685.
88. Oakhill JS, Steel R, Chen ZP, Scott JW, Ling N, Tam S, Kemp BE. (2011) AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science*, 332: 1433-1435.
89. Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, Makela TP, Alessi DR, Hardie DG. (2003) Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol*, 2: 28.
90. Lin SC, Hardie DG. (2018) AMPK: Sensing Glucose as well as Cellular Energy Status. *Cell Metab*, 27: 299-313.
91. Gowans GJ, Hawley SA, Ross FA, Hardie DG. (2013) AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. *Cell Metab*, 18: 556-566.
92. Xiao B, Heath R, Saiu P, Leiper FC, Leone P, Jing C, Walker PA, Haire L, Eccleston JF, Davis CT, Martin SR, Carling D, Gamblin SJ. (2007) Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature*, 449: 496-500.
93. Alers S, Loffler AS, Wesselborg S, Stork B. (2012) Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol*, 32: 2-11.



94. Kim J, Kim YC, Fang C, Russell RC, Kim JH, Fan W, Liu R, Zhong Q, Guan KL. (2013) Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell*, 152: 290-303.
95. Kim J, Guan KL. (2013) AMPK connects energy stress to PIK3C3/VPS34 regulation. *Autophagy*, 9: 1110-1111.
96. Weerasekara VK, Panek DJ, Broadbent DG, Mortenson JB, Mathis AD, Logan GN, Prince JT, Thomson DM, Thompson JW, Andersen JL. (2014) Metabolic-stress-induced rearrangement of the 14-3-3zeta interactome promotes autophagy via a ULK1- and AMPK-regulated 14-3-3zeta interaction with phosphorylated Atg9. *Mol Cell Biol*, 34: 4379-4388.
97. Li Y, Chen Y. (2019) AMPK and Autophagy. *Adv Exp Med Biol*, 1206: 85-108.
98. Dunlop EA, Tee AR. (2013) The kinase triad, AMPK, mTORC1 and ULK1, maintains energy and nutrient homeostasis. *Biochem Soc Trans*, 41: 939-943.
99. Shang L, Chen S, Du F, Li S, Zhao L, Wang X. (2011) Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 4788-4793.
100. Loffler AS, Alers S, Dieterle AM, Keppeler H, Franz-Wachtel M, Kundu M, Campbell DG, Wesselborg S, Alessi DR, Stork B. (2011) Ulk1-mediated phosphorylation of AMPK constitutes a negative regulatory feedback loop. *Autophagy*, 7: 696-706.
101. Dunlop EA, Hunt DK, Acosta-Jaquez HA, Fingar DC, Tee AR. (2011) ULK1 inhibits mTORC1 signaling, promotes multisite Raptor phosphorylation and hinders substrate binding. *Autophagy*, 7: 737-747.
102. Jung CH, Seo M, Otto NM, Kim DH. (2011) ULK1 inhibits the kinase activity of mTORC1 and cell proliferation. *Autophagy*, 7: 1212-1221.
103. Szymanska P, Martin KR, MacKeigan JP, Hlavacek WS, Lipniacki T. (2015) Computational analysis of an autophagy/translation switch based on mutual inhibition of MTORC1 and ULK1. *PLoS One*, 10: e0116550.
104. Qi Z, Chen L. (2019) Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy. *Adv Exp Med Biol*, 1206: 167-177.

105. Walter P, Ron D. (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334: 1081-1086.
106. Sano R, Reed JC. (2013) ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1833: 3460-3470.
107. Appenzeller-Herzog C, Hall MN. (2012) Bidirectional crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mTOR signaling. *Trends Cell Biol*, 22: 274-282.
108. Watanabe R, Tambe Y, Inoue H, Isono T, Haneda M, Isobe K, Kobayashi T, Hino O, Okabe H, Chano T. (2007) GADD34 inhibits mammalian target of rapamycin signaling via tuberous sclerosis complex and controls cell survival under bioenergetic stress. *Int J Mol Med*, 19: 475-483.
109. Minami K, Tambe Y, Watanabe R, Isono T, Haneda M, Isobe K, Kobayashi T, Hino O, Okabe H, Chano T, Inoue H. (2007) Suppression of viral replication by stress-inducible GADD34 protein via the mammalian serine/threonine protein kinase mTOR pathway. *J Virol*, 81: 11106-11115.
110. Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D. (2001) Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol*, 153: 1011-1022.
111. Hyrskyluoto A, Reijonen S, Kivinen J, Lindholm D, Korhonen L. (2012) GADD34 mediates cytoprotective autophagy in mutant huntingtin expressing cells via the mTOR pathway. *Exp Cell Res*, 318: 33-42.
112. Kato H, Nakajima S, Saito Y, Takahashi S, Katoh R, Kitamura M. (2012) mTORC1 serves ER stress-triggered apoptosis via selective activation of the IRE1-JNK pathway. *Cell Death Differ*, 19: 310-320.
113. Kang YJ, Lu MK, Guan KL. (2011) The TSC1 and TSC2 tumor suppressors are required for proper ER stress response and protect cells from ER stress-induced apoptosis. *Cell Death Differ*, 18: 133-144.
114. Karassek S, Berghaus C, Schwarten M, Goemans CG, Ohse N, Kock G, Jockers K, Neumann S, Gottfried S, Herrmann C, Heumann R, Stoll R. (2010) Ras homolog enriched in brain (Rheb) enhances apoptotic signaling. *J Biol Chem*, 285: 33979-33991.

115. Mounir Z, Krishnamoorthy JL, Wang S, Papadopoulou B, Campbell S, Muller WJ, Hatzoglou M, Koromilas AE. (2011) Akt determines cell fate through inhibition of the PERK-eIF2alpha phosphorylation pathway. *Sci Signal*, 4: ra62.
116. Schewe DM, Aguirre-Ghiso JA. (2008) ATF6alpha-Rheb-mTOR signaling promotes survival of dormant tumor cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 10519-10524.
117. Uddin MN, Ito S, Nishio N, Suganya T, Isobe K. (2011) Gadd34 induces autophagy through the suppression of the mTOR pathway during starvation. *Biochem Biophys Res Commun*, 407: 692-698.
118. Tambe Y, Okuyama N, Nakagawa T, Muramoto A, Hasebe M, Chano T, Inoue H. (2012) Suppression of viral replication by drs tumor suppressor via mTOR dependent pathway. *Cancer Lett*, 314: 82-91.
119. Mukai R, Ohshima T. (2014) HTLV-1 HBZ positively regulates the mTOR signaling pathway via inhibition of GADD34 activity in the cytoplasm. *Oncogene*, 33: 2317-2328.
120. Ito S, Tanaka Y, Oshino R, Aiba K, Thanasegaran S, Nishio N, Isobe K. (2015) GADD34 inhibits activation-induced apoptosis of macrophages through enhancement of autophagy. *Sci Rep*, 5: 8327.
121. Li J, Kim SG, Blenis J. (2014) Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab*, 19: 373-379.
122. Arriola Apelo SI, Lamming DW. (2016) Rapamycin: An InhibiTOR of Aging Emerges From the Soil of Easter Island. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 71: 841-849.
123. Hou CY, Tain YL, Yu HR, Huang LT. (2019) The Effects of Resveratrol in the Treatment of Metabolic Syndrome. *Int J Mol Sci*, 20.
124. Tian Y, Song W, Li D, Cai L, Zhao Y. (2019) Resveratrol As A Natural Regulator Of Autophagy For Prevention And Treatment Of Cancer. *Onco Targets Ther*, 12: 8601-8609.
125. Park D, Jeong H, Lee MN, Koh A, Kwon O, Yang YR, Noh J, Suh PG, Park H, Ryu SH. (2016) Resveratrol induces autophagy by directly inhibiting mTOR through ATP competition. *Sci Rep*, 6: 21772.

126. Gan RY, Li HB, Sui ZQ, Corke H. (2018) Absorption, metabolism, anti-cancer effect and molecular targets of epigallocatechin gallate (EGCG): An updated review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 58: 924-941.
127. Prasanth MI, Sivamaruthi BS, Chaiyasut C, Tencomnao T. (2019) A Review of the Role of Green Tea (*Camellia sinensis*) in Antiphotaging, Stress Resistance, Neuroprotection, and Autophagy. *Nutrients*, 11.
128. Kaplan D, Glass L. *Understanding nonlinear dynamics*. Springer-Verlag, New York, 1995.
129. Tyson JJ, Chen KC, Novak B. (2003) Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. *Curr Opin Cell Biol*, 15: 221-231.
130. Strogatz SH. *Nonlinear dynamics and Chaos : with applications to physics, biology, chemistry, and engineering*. Addison-Wesley Pub., Reading, Mass., 1994.
131. Holczer M, Hajdu B, Lorincz T, Szarka A, Banhegyi G, Kapuy O. (2019) A Double Negative Feedback Loop between mTORC1 and AMPK Kinases Guarantees Precise Autophagy Induction upon Cellular Stress. *Int J Mol Sci*, 20.
132. Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T, Moriyama Y, Masaki R, Tashiro Y. (1998) Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct*, 23: 33-42.
133. Kliensky DJ, Abdel-Aziz AK, Abdelfatah S, Abdellatif M, Abdoli A, Abel S, Abeliovich H, Abildgaard MH, Abudu YP, Acevedo-Arozena A, Adamopoulos IE, Adeli K, Adolph TE, Adornetto A, Aflaki E, Agam G, Agarwal A, Aggarwal BB, Agnello M, Agostinis P, Agrewala JN, Agrotis A, Aguilar PV, Ahmad ST, Ahmed ZM, Ahumada-Castro U, Aits S, Aizawa S, Akkoc Y, Akoumianaki T, Akpınar HA, Al-Abd AM, Al-Akra L, Al-Gharaibeh A, Alaoui-Jamali MA, Alberti S, Alcocer-Gomez E, Alessandri C, Ali M, Alim Al-Bari MA, Aliwaini S, Alizadeh J, Almacellas E, Almasan A, Alonso A, Alonso GD, Altan-Bonnet N, Altieri DC, Alvarez EMC, Alves S, Alves da Costa C, Alzaharna MM, Amadio M, Amantini C, Amaral C, Ambrosio S, Amer AO, Ammanathan V, An Z, Andersen SU, Andrabi SA, Andrade-Silva M, Andres AM, Angelini S, Ann

D, Anozie UC, Ansari MY, Antas P, Antebi A, Anton Z, Anwar T, Apetoh L, Apostolova N, Araki T, Araki Y, Arasaki K, Araujo WL, Araya J, Arden C, Arevalo MA, Arguelles S, Arias E, Arikath J, Arimoto H, Ariosa AR, Armstrong-James D, Arnaune-Pelloquin L, Aroca A, Arroyo DS, Arsov I, Artero R, Asaro DML, Aschner M, Ashrafizadeh M, Ashur-Fabian O, Atanasov AG, Au AK, Auberger P, Auner HW, Aurelian L, Autelli R, Avagliano L, Avalos Y, Aveic S, Avelaira CA, Avin-Wittenberg T, Aydin Y, Ayton S, Ayyadevara S, Azzopardi M, Baba M, Backer JM, Backues SK, Bae DH, Bae ON, Bae SH, Baehrecke EH, Baek A, Baek SH, Baek SH, Bagetta G, Bagniewska-Zadworna A, Bai H, Bai J, Bai X, Bai Y, Bairagi N, Baksi S, Balbi T, Baldari CT, Balduini W, Ballabio A, Ballester M, Balazadeh S, Balzan R, Bandopadhyay R, Banerjee S, Banerjee S, Banreti A, Bao Y, Baptista MS, Baracca A, Barbati C, Bargiela A, Barila D, Barlow PG, Barmada SJ, Barreiro E, Barreto GE, Bartek J, Bartel B, Bartolome A, Barve GR, Basagoudanavar SH, Bassham DC, Bast RC, Jr., Basu A, Batoko H, Batten I, Baulieu EE, Baumgarner BL, Bayry J, Beale R, Beau I, Beaumatin F, Bechara LRG, Beck GR, Jr., Beers MF, Begun J, Behrends C, Behrens GMN, Bei R, Bejarano E, Bel S, Behl C, Belaid A, Belgareh-Touze N, Bellarosa C, Belleudi F, Bello Perez M, Bello-Morales R, Beltran JSO, Beltran S, Benbrook DM, Bendorius M, Benitez BA, Benito-Cuesta I, Bensalem J, Berchtold MW, Berezowska S, Bergamaschi D, Bergami M, Bergmann A, Berliocchi L, Berlioz-Torrent C, Bernard A, Berthoux L, Besirli CG, Besteiro S, Betin VM, Beyaert R, Bezbradica JS, Bhaskar K, Bhatia-Kissova I, Bhattacharya R, Bhattacharya S, Bhattacharyya S, Bhuiyan MS, Bhutia SK, Bi L, Bi X, Biden TJ, Bijian K, Billes VA, Binart N, Bincoletto C, Birgisdottir AB, Bjorkoy G, Blanco G, Blas-Garcia A, Blasiak J, Blomgran R, Blomgren K, Blum JS, Boada-Romero E, Boban M, Boesze-Battaglia K, Boeuf P, Boland B, Bomont P, Bonaldo P, Bonam SR, Bonfili L, Bonifacino JS, Boone BA, Bootman MD, Bordi M, Borner C, Bornhauser BC, Borthakur G, Bosch J, Bose S, Botana LM, Botas J, Boulanger CM, Boulton ME, Bourdenx M, Bourgeois B, Bourke NM, Bousquet G, Boya P, Bozhkov PV, Bozi LHM, Bozkurt TO, Brackney DE, Brandts CH, Braun RJ, Braus GH, Bravo-Sagua R, Bravo-San Pedro JM, Brest P, Bringer MA, Briones-Herrera A,

Broaddus VC, Brodersen P, Brodsky JL, Brody SL, Bronson PG, Bronstein JM, Brown CN, Brown RE, Brum PC, Brumell JH, Brunetti-Pierri N, Bruno D, Bryson-Richardson RJ, Bucci C, Buchrieser C, Bueno M, Buitrago-Molina LE, Buraschi S, Buch S, Buchan JR, Buckingham EM, Budak H, Budini M, Bultynck G, Burada F, Burgoyne JR, Buron MI, Bustos V, Buttner S, Butturini E, Byrd A, Cabas I, Cabrera-Benitez S, Cadwell K, Cai J, Cai L, Cai Q, Cairo M, Calbet JA, Caldwell GA, Caldwell KA, Call JA, Calvani R, Calvo AC, Calvo-Rubio Barrera M, Camara NO, Camonis JH, Camougrand N, Campanella M, Campbell EM, Campbell-Valois FX, Campello S, Campesi I, Campos JC, Camuzard O, Cancino J, Candido de Almeida D, Canesi L, Caniggia I, Canonico B, Canti C, Cao B, Caraglia M, Carames B, Carchman EH, Cardenal-Munoz E, Cardenas C, Cardenas L, Cardoso SM, Carew JS, Carle GF, Carleton G, Carloni S, Carmona-Gutierrez D, Carneiro LA, Carnevali O, Carosi JM, Carra S, Carrier A, Carrier L, Carroll B, Carter AB, Carvalho AN, Casanova M, Casas C, Casas J, Cassioli C, Castillo EF, Castillo K, Castillo-Lluva S, Castoldi F, Castori M, Castro AF, Castro-Caldas M, Castro-Hernandez J, Castro-Obregon S, Catz SD, Cavadas C, Cavaliere F, Cavallini G, Cavinato M, Cayuela ML, Cebollada Rica P, Cecarini V, Cecconi F, Cechowska-Pasko M, Cenci S, Ceperuelo-Mallafre V, Cerqueira JJ, Cerutti JM, Cervia D, Cetintas VB, Cetrullo S, Chae HJ, Chagin AS, Chai CY, Chakrabarti G, Chakrabarti O, Chakraborty T, Chakraborty T, Chami M, Chamilos G, Chan DW, Chan EYW, Chan ED, Chan HYE, Chan HH, Chan H, Chan MTV, Chan YS, Chandra PK, Chang CP, Chang C, Chang HC, Chang K, Chao J, Chapman T, Charlet-Berguerand N, Chatterjee S, Chaube SK, Chaudhary A, Chauhan S, Chaum E, Checler F, Cheetham ME, Chen CS, Chen GC, Chen JF, Chen LL, Chen L, Chen L, Chen M, Chen MK, Chen N, Chen Q, Chen RH, Chen S, Chen W, Chen W, Chen XM, Chen XW, Chen X, Chen Y, Chen YG, Chen Y, Chen Y, Chen YJ, Chen YQ, Chen ZS, Chen Z, Chen ZH, Chen ZJ, Chen Z, Cheng H, Cheng J, Cheng SY, Cheng W, Cheng X, Cheng XT, Cheng Y, Cheng Z, Chen Z, Cheong H, Cheong JK, Chernyak BV, Cherry S, Cheung CFR, Cheung CHA, Cheung KH, Chevet E, Chi RJ, Chiang AKS, Chiaradonna F, Chiarelli R, Chiariello M, Chica N, Chiocca S, Chiong M, Chiou SH, Chiramel AI, Chiurchiu V, Cho DH, Choe SK, Choi AMK, Choi

ME, Choudhury KR, Chow NS, Chu CT, Chua JP, Chua JJE, Chung H, Chung KP, Chung S, Chung SH, Chung YL, Cianfanelli V, Ciechomska IA, Cifuentes M, Cinque L, Cirak S, Cirone M, Clague MJ, Clarke R, Clementi E, Coccia EM, Codogno P, Cohen E, Cohen MM, Colasanti T, Colasuonno F, Colbert RA, Colell A, Colic M, Coll NS, Collins MO, Colombo MI, Colon-Ramos DA, Combaret L, Comincini S, Cominetti MR, Consiglio A, Conte A, Conti F, Contu VR, Cookson MR, Coombs KM, Coppens I, Corasaniti MT, Corkery DP, Cordes N, Cortese K, Costa MDC, Costantino S, Costelli P, Coto-Montes A, Crack PJ, Crespo JL, Criollo A, Crippa V, Cristofani R, Csizmadia T, Cuadrado A, Cui B, Cui J, Cui Y, Cui Y, Culetto E, Cumino AC, Cybulsky AV, Czaja MJ, Czuczwar SJ, D'Adamo S, D'Amelio M, D'Arcangelo D, D'Lugos AC, D'Orazi G, da Silva JA, Dafsari HS, Dagda RK, Dagdas Y, Daglia M, Dai X, Dai Y, Dai Y, Dal Col J, Dalhaimer P, Dalla Valle L, Dallenga T, Dalmasso G, Damme M, Dando I, Dantuma NP, Darling AL, Das H, Dasarathy S, Dasari SK, Dash S, Daumke O, Dauphinee AN, Davies JS, Davila VA, Davis RJ, Davis T, Dayalan Naidu S, De Amicis F, De Bosscher K, De Felice F, De Franceschi L, De Leonibus C, de Mattos Barbosa MG, De Meyer GRY, De Milito A, De Nunzio C, De Palma C, De Santi M, De Virgilio C, De Zio D, Debnath J, DeBosch BJ, Decuypere JP, Deehan MA, Deflorian G, DeGregori J, Dehay B, Del Rio G, Delaney JR, Delbridge LMD, Delorme-Axford E, Delpino MV, Demarchi F, Dembitz V, Demers ND, Deng H, Deng Z, Dengjel J, Dent P, Denton D, DePamphilis ML, Der CJ, Deretic V, Descoteaux A, Devis L, Devkota S, Devuyst O, Dewson G, Dharmasivam M, Dhiman R, di Bernardo D, Di Cristina M, Di Domenico F, Di Fazio P, Di Fonzo A, Di Guardo G, Di Guglielmo GM, Di Leo L, Di Malta C, Di Nardo A, Di Rienzo M, Di Sano F, Diallinas G, Diao J, Diaz-Araya G, Diaz-Laviada I, Dickinson JM, Diederich M, Dieude M, Dikic I, Ding S, Ding WX, Dini L, Dinic J, Dinic M, Dinkova-Kostova AT, Dionne MS, Distler JHW, Diwan A, Dixon IMC, Djavaheri-Mergny M, Dobrinski I, Dobrovinskaya O, Dobrowolski R, Dobson RCJ, Dokic J, Dokmeci Emre S, Donadelli M, Dong B, Dong X, Dong Z, Dorn Ii GW, Dotsch V, Dou H, Dou J, Dowaidar M, Dridi S, Drucker L, Du A, Du C, Du G, Du HN, Du LL, du Toit A, Duan SB, Duan X, Duarte SP, Dubrovska A, Dunlop EA, Dupont N, Duran RV,

Dwarakanath BS, Dyshlovoy SA, Ebrahimi-Fakhari D, Eckhart L, Edelstein CL, Efferth T, Eftekharpour E, Eichinger L, Eid N, Eisenberg T, Eissa NT, Eissa S, Ejarque M, El Andaloussi A, El-Hage N, El-Naggar S, Eleuteri AM, El-Shafey ES, Elgendy M, Eliopoulos AG, Elizalde MM, Elks PM, Elsasser HP, Elsherbiny ES, Emerling BM, Emre NCT, Eng CH, Engedal N, Engelbrecht AM, Engelsen AST, Enserink JM, Escalante R, Esclatine A, Escobar-Henriques M, Eskelinen EL, Espert L, Eusebio MO, Fabrias G, Fabrizi C, Facchiano A, Facchiano F, Fadeel B, Fader C, Faesen AC, Fairlie WD, Falco A, Falkenburger BH, Fan D, Fan J, Fan Y, Fang EF, Fang Y, Fang Y, Fanto M, Farfel-Becker T, Faure M, Fazeli G, Fedele AO, Feldman AM, Feng D, Feng J, Feng L, Feng Y, Feng Y, Feng W, Fenz Araujo T, Ferguson TA, Fernandez AF, Fernandez-Checa JC, Fernandez-Veledo S, Fernie AR, Ferrante AW, Jr., Ferraresi A, Ferrari MF, Ferreira JCB, Ferro-Novick S, Figueras A, Filadi R, Filigheddu N, Filippi-Chiela E, Filomeni G, Fimia GM, Fineschi V, Finetti F, Finkbeiner S, Fisher EA, Fisher PB, Flamigni F, Fliesler SJ, Flo TH, Florance I, Florey O, Florio T, Fodor E, Follo C, Fon EA, Forlino A, Fornai F, Fortini P, Fracassi A, Fraldi A, Franco B, Franco R, Franconi F, Frankel LB, Friedman SL, Frohlich LF, Fruhbeck G, Fuentes JM, Fujiki Y, Fujita N, Fujiwara Y, Fukuda M, Fulda S, Furic L, Furuya N, Fusco C, Gack MU, Gaffke L, Galadari S, Galasso A, Galindo MF, Gallolu Kankanamalage S, Galluzzi L, Galy V, Gammoh N, Gan B, Ganley IG, Gao F, Gao H, Gao M, Gao P, Gao SJ, Gao W, Gao X, Garcera A, Garcia MN, Garcia VE, Garcia-Del Portillo F, Garcia-Escudero V, Garcia-Garcia A, Garcia-Macia M, Garcia-Moreno D, Garcia-Ruiz C, Garcia-Sanz P, Garg AD, Gargini R, Garofalo T, Garry RF, Gassen NC, Gatica D, Ge L, Ge W, Geiss-Friedlander R, Gelfi C, Genschik P, Gentle IE, Gerbino V, Gerhardt C, Germain K, Germain M, Gewirtz DA, Ghasemipour Afshar E, Ghavami S, Ghigo A, Ghosh M, Giamas G, Giampietri C, Giatromanolaki A, Gibson GE, Gibson SB, Ginet V, Giniger E, Giorgi C, Girao H, Girardin SE, Giridharan M, Giuliano S, Giulivi C, Giuriato S, Giustiniani J, Gluschko A, Goder V, Goginashvili A, Golab J, Goldstone DC, Golebiewska A, Gomes LR, Gomez R, Gomez-Sanchez R, Gomez-Puerto MC, Gomez-Sintes R, Gong Q, Goni FM, Gonzalez-Gallego J, Gonzalez-Hernandez T, Gonzalez-Polo RA, Gonzalez-



Reyes JA, Gonzalez-Rodriguez P, Goping IS, Gorbatyuk MS, Gorbunov NV, Gorgulu K, Gorojod RM, Gorski SM, Goruppi S, Gotor C, Gottlieb RA, Gozes I, Gozuacik D, Graef M, Graler MH, Granatiero V, Grasso D, Gray JP, Green DR, Greenhough A, Gregory SL, Griffin EF, Grinstaff MW, Gros F, Grose C, Gross AS, Gruber F, Grumati P, Grune T, Gu X, Guan JL, Guardia CM, Guda K, Guerra F, Guerri C, Guha P, Guillen C, Gujar S, Gukovskaya A, Gukovsky I, Gunst J, Gunther A, Guntur AR, Guo C, Guo C, Guo H, Guo LW, Guo M, Gupta P, Gupta SK, Gupta S, Gupta VB, Gupta V, Gustafsson AB, Gutterman DD, H BR, Haapasalo A, Haber JE, Hac A, Hadano S, Hafren AJ, Haidar M, Hall BS, Hallden G, Hamacher-Brady A, Hamann A, Hamasaki M, Han W, Hansen M, Hanson PI, Hao Z, Harada M, Harhaji-Trajkovic L, Hariharan N, Haroon N, Harris J, Hasegawa T, Hasima Nagoor N, Haspel JA, Haucke V, Hawkins WD, Hay BA, Haynes CM, Hayrabyan SB, Hays TS, He C, He Q, He RR, He YW, He YY, Heakal Y, Heberle AM, Hejtmancik JF, Helgason GV, Henkel V, Herb M, Hergovich A, Herman-Antosiewicz A, Hernandez A, Hernandez C, Hernandez-Diaz S, Hernandez-Gea V, Herpin A, Herreros J, Hervas JH, Hesselson D, Hetz C, Heussler VT, Higuchi Y, Hilfiker S, Hill JA, Hlavacek WS, Ho EA, Ho IHT, Ho PW, Ho SL, Ho WY, Hobbs GA, Hochstrasser M, Hoet PHM, Hofius D, Hofman P, Hohn A, Holmberg CI, Hombrebueno JR, Yi-Ren Hong CH, Hooper LV, Hoppe T, Horos R, Hoshida Y, Hsin IL, Hsu HY, Hu B, Hu D, Hu LF, Hu MC, Hu R, Hu W, Hu YC, Hu ZW, Hua F, Hua J, Hua Y, Huan C, Huang C, Huang C, Huang C, Huang C, Huang H, Huang K, Huang MLH, Huang R, Huang S, Huang T, Huang X, Huang YJ, Huber TB, Hubert V, Hubner CA, Hughes SM, Hughes WE, Humbert M, Hummer G, Hurley JH, Hussain S, Hussain S, Hussey PJ, Hutabarat M, Hwang HY, Hwang S, Ieni A, Ikeda F, Imagawa Y, Imai Y, Imbriano C, Imoto M, Inman DM, Inoki K, Iovanna J, Iozzo RV, Ippolito G, Irazoqui JE, Iribarren P, Ishaq M, Ishikawa M, Ishimwe N, Isidoro C, Ismail N, Issazadeh-Navikas S, Itakura E, Ito D, Ivankovic D, Ivanova S, Iyer AKV, Izquierdo JM, Izumi M, Jaattela M, Jabir MS, Jackson WT, Jacobo-Herrera N, Jacomin AC, Jacquin E, Jadiya P, Jaeschke H, Jagannath C, Jakobi AJ, Jakobsson J, Janji B, Jansen-Durr P, Jansson PJ, Jantsch J, Januszewski S,

Jassey A, Jean S, Jeltsch-David H, Jendelova P, Jenny A, Jensen TE, Jessen N, Jewell JL, Ji J, Jia L, Jia R, Jiang L, Jiang Q, Jiang R, Jiang T, Jiang X, Jiang Y, Jimenez-Sanchez M, Jin EJ, Jin F, Jin H, Jin L, Jin L, Jin M, Jin S, Jo EK, Joffre C, Johansen T, Johnson GVW, Johnston SA, Jokitalo E, Jolly MK, Joosten LAB, Jordan J, Joseph B, Ju D, Ju JS, Ju J, Juarez E, Judith D, Juhasz G, Jun Y, Jung CH, Jung SC, Jung YK, Jungbluth H, Jungverdorben J, Just S, Kaarniranta K, Kaasik A, Kabuta T, Kaganovich D, Kahana A, Kain R, Kajimura S, Kalamvoki M, Kalia M, Kalinowski DS, Kaludercic N, Kalvari I, Kaminska J, Kaminsky VO, Kanamori H, Kanasaki K, Kang C, Kang R, Kang SS, Kaniyappan S, Kanki T, Kanneganti TD, Kanthasamy AG, Kanthasamy A, Kantorow M, Kapuy O, Karamouzis MV, Karim MR, Karmakar P, Katare RG, Kato M, Kaufmann SHE, Kauppinen A, Kaushal GP, Kaushik S, Kawasaki K, Kazan K, Ke PY, Keating DJ, Keber U, Kehrl JH, Keller KE, Keller CW, Kemper JK, Kenific CM, Kepp O, Kermorgant S, Kern A, Ketteler R, Keulers TG, Khalfin B, Khalil H, Khambu B, Khan SY, Khandelwal VKM, Khandia R, Kho W, Khobreakar NV, Khuansuwan S, Khundadze M, Killackey SA, Kim D, Kim DR, Kim DH, Kim DE, Kim EY, Kim EK, Kim HR, Kim HS, Hyung-Ryong K, Kim JH, Kim JK, Kim JH, Kim J, Kim JH, Kim KI, Kim PK, Kim SJ, Kimball SR, Kimchi A, Kimmelman AC, Kimura T, King MA, Kinghorn KJ, Kinsey CG, Kirkin V, Kirshenbaum LA, Kiselev SL, Kishi S, Kitamoto K, Kitaoka Y, Kitazato K, Kitsis RN, Kittler JT, Kjaerulff O, Klein PS, Klopstock T, Klucken J, Knaevelsrud H, Knorr RL, Ko BCB, Ko F, Ko JL, Kobayashi H, Kobayashi S, Koch I, Koch JC, Koenig U, Kogel D, Koh YH, Koike M, Kohlwein SD, Kocaturk NM, Komatsu M, Konig J, Kono T, Kopp BT, Korcsmaros T, Korkmaz G, Korolchuk VI, Korsnes MS, Koskela A, Kota J, Kotake Y, Kotler ML, Kou Y, Koukourakis MI, Koustas E, Kovacs AL, Kovacs T, Koya D, Kozako T, Kraft C, Krainc D, Kramer H, Krasnodembskaya AD, Kretz-Remy C, Kroemer G, Ktistakis NT, Kuchitsu K, Kuenen S, Kuerschner L, Kukar T, Kumar A, Kumar A, Kumar D, Kumar D, Kumar S, Kume S, Kumsta C, Kundu CN, Kundu M, Kunnnumakkara AB, Kurgan L, Kutateladze TG, Kutlu O, Kwak S, Kwon HJ, Kwon TK, Kwon YT, Kyrmizi I, La Spada A, Labonte P, Ladoire S, Laface I, Lafont F, Lagace DC, Lahiri V, Lai Z, Laird AS, Lakkaraju

A, Lamark T, Lan SH, Landajuella A, Lane DJR, Lane JD, Lang CH, Lange C, Langel U, Langer R, Lapaquette P, Laporte J, LaRusso NF, Lastres-Becker I, Lau WCY, Laurie GW, Lavandero S, Law BYK, Law HK, Layfield R, Le W, Le Stunff H, Leary AY, Lebrun JJ, Leck LYW, Leduc-Gaudet JP, Lee C, Lee CP, Lee DH, Lee EB, Lee EF, Lee GM, Lee HJ, Lee HK, Lee JM, Lee JS, Lee JA, Lee JY, Lee JH, Lee M, Lee MG, Lee MJ, Lee MS, Lee SY, Lee SJ, Lee SY, Lee SB, Lee WH, Lee YR, Lee YH, Lee Y, Lefebvre C, Legouis R, Lei YL, Lei Y, Leikin S, Leitinger G, Lemus L, Leng S, Lenoir O, Lenz G, Lenz HJ, Lenzi P, Leon Y, Leopoldino AM, Leschczyk C, Leskela S, Letellier E, Leung CT, Leung PS, Leventhal JS, Levine B, Lewis PA, Ley K, Li B, Li DQ, Li J, Li J, Li J, Li K, Li L, Li M, Li M, Li M, Li M, Li M, Li PL, Li MQ, Li Q, Li S, Li T, Li W, Li W, Li X, Li YP, Li Y, Li Z, Li Z, Li Z, Lian J, Liang C, Liang Q, Liang W, Liang Y, Liang Y, Liao G, Liao L, Liao M, Liao YF, Librizzi M, Lie PPY, Lilly MA, Lim HJ, Lima TRR, Limana F, Lin C, Lin CW, Lin DS, Lin FC, Lin JD, Lin KM, Lin KH, Lin LT, Lin PH, Lin Q, Lin S, Lin SJ, Lin W, Lin X, Lin YX, Lin YS, Linden R, Lindner P, Ling SC, Lingor P, Linnemann AK, Liou YC, Lipinski MM, Lipovsek S, Lira VA, Lisiak N, Liton PB, Liu C, Liu CH, Liu CF, Liu CH, Liu F, Liu H, Liu HS, Liu HF, Liu H, Liu J, Liu J, Liu J, Liu L, Liu L, Liu M, Liu Q, Liu W, Liu W, Liu XH, Liu X, Liu X, Liu X, Liu X, Liu Y, Liu Y, Liu Y, Liu Y, Liu Y, Livingston JA, Lizard G, Lizcano JM, Ljubojevic-Holzer S, ME LL, Llobet-Navas D, Llorente A, Lo CH, Lobato-Marquez D, Long Q, Long YC, Loos B, Loos JA, Lopez MG, Lopez-Domenech G, Lopez-Guerrero JA, Lopez-Jimenez AT, Lopez-Perez O, Lopez-Valero I, Lorenowicz MJ, Lorente M, Lorincz P, Lossi L, Lotersztajn S, Lovat PE, Lovell JF, Lovy A, Low P, Lu G, Lu H, Lu JH, Lu JJ, Lu M, Lu S, Luciani A, Lucocq JM, Ludovico P, Luftig MA, Luhr M, Luis-Ravelo D, Lum JJ, Luna-Dulcey L, Lund AH, Lund VK, Lunemann JD, Luningschror P, Luo H, Luo R, Luo S, Luo Z, Luparello C, Luscher B, Luu L, Lyakhovich A, Lyamzaev KG, Lystad AH, Lytvynchuk L, Ma AC, Ma C, Ma M, Ma NF, Ma QH, Ma X, Ma Y, Ma Z, MacDougald OA, Macian F, MacIntosh GC, MacKeigan JP, Macleod KF, Maday S, Madeo F, Madesh M, Madl T, Madrigal-Matute J, Maeda A, Maejima Y, Magarinos M, Mahavadi P, Maiani E, Maiese K, Maiti P, Maiuri MC,

Majello B, Major MB, Makareeva E, Malik F, Mallilankaraman K, Malorni W, Maloyan A, Mammadova N, Man GCW, Manai F, Mancias JD, Mandelkow EM, Mandell MA, Manfredi AA, Manjili MH, Manjithaya R, Manque P, Manshian BB, Manzano R, Manzoni C, Mao K, Marchese C, Marchetti S, Marconi AM, Marcucci F, Mardente S, Mareninova OA, Margeta M, Mari M, Marinelli S, Marinelli O, Marino G, Mariotto S, Marshall RS, Marten MR, Martens S, Martin APJ, Martin KR, Martin S, Martin S, Martin-Segura A, Martin-Acebes MA, Martin-Burriel I, Martin-Rincon M, Martin-Sanz P, Martina JA, Martinet W, Martinez A, Martinez A, Martinez J, Martinez Velazquez M, Martinez-Lopez N, Martinez-Vicente M, Martins DO, Martins JO, Martins WK, Martins-Marques T, Marzetti E, Masaldan S, Masclaux-Daubresse C, Mashek DG, Massa V, Massieu L, Masson GR, Masuelli L, Masyuk AI, Masyuk TV, Matarrese P, Matheu A, Matoba S, Matsuzaki S, Mattar P, Matte A, Mattoscio D, Mauriz JL, Mauthe M, Mauvezin C, Maverakis E, Maycotte P, Mayer J, Mazzoccoli G, Mazzoni C, Mazzulli JR, McCarty N, McDonald C, McGill MR, McKenna SL, McLaughlin B, McLoughlin F, McNiven MA, McWilliams TG, Mechta-Grigoriou F, Medeiros TC, Medina DL, Megeney LA, Megyeri K, Mehrpour M, Mehta JL, Meijer AJ, Meijer AH, Mejlvang J, Melendez A, Melk A, Memisoglu G, Mendes AF, Meng D, Meng F, Meng T, Menna-Barreto R, Menon MB, Mercer C, Mercier AE, Mergny JL, Merighi A, Merkley SD, Merla G, Meske V, Mestre AC, Metur SP, Meyer C, Meyer H, Mi W, Mialet-Perez J, Miao J, Micale L, Miki Y, Milan E, Milczarek M, Miller DL, Miller SI, Miller S, Millward SW, Milosevic I, Minina EA, Mirzaei H, Mirzaei HR, Mirzaei M, Mishra A, Mishra N, Mishra PK, Misirkic Marjanovic M, Misasi R, Misra A, Misso G, Mitchell C, Mitou G, Miura T, Miyamoto S, Miyazaki M, Miyazaki M, Miyazaki T, Miyazawa K, Mizushima N, Mogensen TH, Mograbi B, Mohammadinejad R, Mohamud Y, Mohanty A, Mohapatra S, Mohlmann T, Mohammed A, Moles A, Moley KH, Molinari M, Mollace V, Moller AB, Mollereau B, Mollinedo F, Montagna C, Monteiro MJ, Montella A, Montes LR, Montico B, Mony VK, Monzio Compagnoni G, Moore MN, Moosavi MA, Mora AL, Mora M, Morales-Alamo D, Moratalla R, Moreira PI, Morelli E, Moreno S, Moreno-Blas D, Moresi V, Morga B, Morgan AH, Morin F,

Morishita H, Moritz OL, Moriyama M, Moriyasu Y, Morleo M, Morselli E, Moruno-Manchon JF, Moscat J, Mostowy S, Motori E, Moura AF, Moustaid-Moussa N, Mrakovcic M, Mucino-Hernandez G, Mukherjee A, Mukhopadhyay S, Mulcahy Levy JM, Mulero V, Muller S, Munch C, Munjal A, Munoz-Canoves P, Munoz-Galdeano T, Munz C, Murakawa T, Muratori C, Murphy BM, Murphy JP, Murthy A, Myohanen TT, Mysorekar IU, Mytych J, Nabavi SM, Nabissi M, Nagy P, Nah J, Nahimana A, Nakagawa I, Nakamura K, Nakatogawa H, Nandi SS, Nanjundan M, Nanni M, Napolitano G, Nardacci R, Narita M, Nassif M, Nathan I, Natsumeda M, Naude RJ, Naumann C, Naveiras O, Navid F, Nawrocki ST, Nazarko TY, Nazio F, Negoita F, Neill T, Neisch AL, Neri LM, Netea MG, Neubert P, Neufeld TP, Neumann D, Neutzner A, Newton PT, Ney PA, Nezis IP, Ng CCW, Ng TB, Nguyen HTT, Nguyen LT, Ni HM, Ni Cheallaigh C, Ni Z, Nicolao MC, Nicoli F, Nieto-Diaz M, Nilsson P, Ning S, Niranjan R, Nishimune H, Niso-Santano M, Nixon RA, Nobili A, Nobrega C, Noda T, Nogueira-Recalde U, Nolan TM, Nombela I, Novak I, Novoa B, Nozawa T, Nukina N, Nussbaum-Krammer C, Nylandsted J, O'Donovan TR, O'Leary SM, O'Rourke EJ, O'Sullivan MP, O'Sullivan TE, Oddo S, Oehme I, Ogawa M, Ogier-Denis E, Ogmundsdottir MH, Ogretmen B, Oh GT, Oh SH, Oh YJ, Ohama T, Ohashi Y, Ohmuraya M, Oikonomou V, Ojha R, Okamoto K, Okazawa H, Oku M, Oliván S, Oliveira JMA, Ollmann M, Olzmann JA, Omari S, Omary MB, Onal G, Ondrej M, Ong SB, Ong SG, Onnis A, Orellana JA, Orellana-Munoz S, Ortega-Villaizan MDM, Ortiz-Gonzalez XR, Ortona E, Osiewacz HD, Osman AK, Osta R, Otegui MS, Otsu K, Ott C, Ottobri L, Ou JJ, Outeiro TF, Oynebraten I, Ozturk M, Pages G, Pahari S, Pajares M, Pajvani UB, Pal R, Paladino S, Pallet N, Palmieri M, Palmisano G, Palumbo C, Pampaloni F, Pan L, Pan Q, Pan W, Pan X, Panasyuk G, Pandey R, Pandey UB, Pandya V, Paneni F, Pang SY, Panzarini E, Papademetrio DL, Papaleo E, Papinski D, Papp D, Park EC, Park HT, Park JM, Park JI, Park JT, Park J, Park SC, Park SY, Parola AH, Parys JB, Pasquier A, Pasquier B, Passos JF, Pastore N, Patel HH, Patschan D, Pattingre S, Pedraza-Alva G, Pedraza-Chaverri J, Pedrozo Z, Pei G, Pei J, Peled-Zehavi H, Pellegrini JM, Pelletier J, Penalva MA, Peng D, Peng Y, Penna F, Pennuto M, Pentimalli F, Pereira CM,

Pereira GJS, Pereira LC, Pereira de Almeida L, Perera ND, Perez-Lara A, Perez-Oliva AB, Perez-Perez ME, Periyasamy P, Perl A, Perrotta C, Perrotta I, Pestell RG, Petersen M, Petrache I, Petrovski G, Pfirrmann T, Pfister AS, Philips JA, Pi H, Picca A, Pickrell AM, Picot S, Pierantoni GM, Pierdominici M, Pierre P, Pierrefite-Carle V, Pierzynowska K, Pietrocola F, Pietruczuk M, Pignata C, Pimentel-Muinos FX, Pinar M, Pinheiro RO, Pinkas-Kramarski R, Pinton P, Pircs K, Piya S, Pizzo P, Plantinga TS, Platta HW, Plaza-Zabala A, Plomann M, Plotnikov EY, Plun-Favreau H, Pluta R, Pocock R, Poggeler S, Pohl C, Poirot M, Poletti A, Ponpuak M, Popelka H, Popova B, Porta H, Porte Alcon S, Portilla-Fernandez E, Post M, Potts MB, Poulton J, Powers T, Prahlad V, Prajsnar TK, Pratico D, Prencipe R, Priault M, Proikas-Cezanne T, Promponas VJ, Proud CG, Puertollano R, Puglielli L, Pulinilkunnil T, Puri D, Puri R, Puyal J, Qi X, Qi Y, Qian W, Qiang L, Qiu Y, Quadrilatero J, Quarleri J, Raben N, Rabinowich H, Ragona D, Ragusa MJ, Rahimi N, Rahmati M, Raia V, Raimundo N, Rajasekaran NS, Ramachandra Rao S, Rami A, Ramirez-Pardo I, Ramsden DB, Randow F, Rangarajan PN, Ranieri D, Rao H, Rao L, Rao R, Rathore S, Ratnayaka JA, Ratovitski EA, Ravanan P, Ravegnini G, Ray SK, Razani B, Rebecca V, Reggiori F, Regnier-Vigouroux A, Reichert AS, Reigada D, Reiling JH, Rein T, Reipert S, Rekha RS, Ren H, Ren J, Ren W, Renault T, Renga G, Reue K, Rewitz K, Ribeiro de Andrade Ramos B, Riazuddin SA, Ribeiro-Rodrigues TM, Ricci JE, Ricci R, Riccio V, Richardson DR, Rikihisa Y, Risbud MV, Risueno RM, Ritis K, Rizza S, Rizzuto R, Roberts HC, Roberts LD, Robinson KJ, Roccheri MC, Rocchi S, Rodney GG, Rodrigues T, Rodrigues Silva VR, Rodriguez A, Rodriguez-Barrueco R, Rodriguez-Henche N, Rodriguez-Rocha H, Roelofs J, Rogers RS, Rogov VV, Rojo AI, Rolka K, Romanello V, Romani L, Romano A, Romano PS, Romeo-Guitart D, Romero LC, Romero M, Roney JC, Rongo C, Roperto S, Rosenfeldt MT, Rosenstiel P, Rosenwald AG, Roth KA, Roth L, Roth S, Rouschop KMA, Roussel BD, Roux S, Rovere-Querini P, Roy A, Rozieres A, Ruano D, Rubinsztein DC, Rubtsova MP, Ruckdeschel K, Ruckenstuhl C, Rudolf E, Rudolf R, Ruggieri A, Ruparella AA, Rusmini P, Russell RR, Russo GL, Russo M, Russo R, Ryabaya OO, Ryan KM, Ryu KY, Sabater-Arcis M, Sachdev U, Sacher M, Sachse C, Sadhu A,

Sadoshima J, Safren N, Saftig P, Sagona AP, Sahay G, Sahebkar A, Sahin M, Sahin O, Sahni S, Saito N, Saito S, Saito T, Sakai R, Sakai Y, Sakamaki JI, Saksela K, Salazar G, Salazar-Degracia A, Salekdeh GH, Saluja AK, Sampaio-Marques B, Sanchez MC, Sanchez-Alcazar JA, Sanchez-Vera V, Sancho-Shimizu V, Sanderson JT, Sandri M, Santaguida S, Santambrogio L, Santana MM, Santoni G, Sanz A, Sanz P, Saran S, Sardiello M, Sargeant TJ, Sarin A, Sarkar C, Sarkar S, Sarrias MR, Sarkar S, Sarmah DT, Sarparanta J, Sathyanarayan A, Sathyanarayanan R, Scaglione KM, Scatozza F, Schaefer L, Schafer ZT, Schaible UE, Schapira AHV, Scharl M, Schatzl HM, Schein CH, Scheper W, Scheuring D, Schiaffino MV, Schiappacassi M, Schindl R, Schlattner U, Schmidt O, Schmitt R, Schmidt SD, Schmitz I, Schmukler E, Schneider A, Schneider BE, Schober R, Schoijet AC, Schott MB, Schramm M, Schroder B, Schuh K, Schuller C, Schulze RJ, Schurmanns L, Schwamborn JC, Schwarten M, Scialo F, Sciarretta S, Scott MJ, Scotto KW, Scovassi AI, Scrima A, Scrivo A, Sebastian D, Sebti S, Sedej S, Segatori L, Segev N, Seglen PO, Seiliez I, Seki E, Selleck SB, Sellke FW, Selsby JT, Sendtner M, Senturk S, Seranova E, Sergi C, Serra-Moreno R, Sesaki H, Settembre C, Setty SRG, Sgarbi G, Sha O, Shacka JJ, Shah JA, Shang D, Shao C, Shao F, Sharbati S, Sharkey LM, Sharma D, Sharma G, Sharma K, Sharma P, Sharma S, Shen HM, Shen H, Shen J, Shen M, Shen W, Shen Z, Sheng R, Sheng Z, Sheng ZH, Shi J, Shi X, Shi YH, Shiba-Fukushima K, Shieh JJ, Shimada Y, Shimizu S, Shimozawa M, Shintani T, Shoemaker CJ, Shojaei S, Shoji I, Shrivage BV, Shridhar V, Shu CW, Shu HB, Shui K, Shukla AK, Shutt TE, Sica V, Siddiqui A, Sierra A, Sierra-Torre V, Signorelli S, Sil P, Silva BJA, Silva JD, Silva-Pavez E, Silvente-Poirot S, Simmonds RE, Simon AK, Simon HU, Simons M, Singh A, Singh LP, Singh R, Singh SV, Singh SK, Singh SB, Singh S, Singh SP, Sinha D, Sinha RA, Sinha S, Sirko A, Sirohi K, Sivridis EL, Skendros P, Skiryecz A, Slaninova I, Smaili SS, Smertenko A, Smith MD, Soenen SJ, Sohn EJ, Sok SPM, Solaini G, Soldati T, Soleimanpour SA, Soler RM, Solovchenko A, Somarelli JA, Sonawane A, Song F, Song HK, Song JX, Song K, Song Z, Soria LR, Sorice M, Soukas AA, Soukup SF, Sousa D, Sousa N, Spagnuolo PA, Spector SA, Srinivas Bharath MM, St Clair D, Stagni V, Staiano L, Stalneck

CA, Stankov MV, Stathopoulos PB, Stefan K, Stefan SM, Stefanis L, Steffan JS, Steinkasserer A, Stenmark H, Sternecker J, Stevens C, Stoka V, Storch S, Stork B, Strappazon F, Strohecker AM, Stupack DG, Su H, Su LY, Su L, Suarez-Fontes AM, Subauste CS, Subbian S, Subirada PV, Sudhandiran G, Sue CM, Sui X, Summers C, Sun G, Sun J, Sun K, Sun MX, Sun Q, Sun Y, Sun Z, Sunahara KKS, Sundberg E, Susztak K, Sutovsky P, Suzuki H, Sweeney G, Symons JD, Sze SCW, Szewczyk NJ, Tabecka-Lonczynska A, Tabolacci C, Tacke F, Taegtmeyer H, Tafani M, Tagaya M, Tai H, Tait SWG, Takahashi Y, Takats S, Talwar P, Tam C, Tam SY, Tampellini D, Tamura A, Tan CT, Tan EK, Tan YQ, Tanaka M, Tanaka M, Tang D, Tang J, Tang TS, Tanida I, Tao Z, Taouis M, Tatenhorst L, Tavernarakis N, Taylor A, Taylor GA, Taylor JM, Tchétina E, Tee AR, Tegeder I, Teis D, Teixeira N, Teixeira-Clerc F, Tekirdag KA, Tencomnao T, Tenreiro S, Tepikin AV, Testillano PS, Tettamanti G, Tharaux PL, Thedieck K, Thekkinghat AA, Thellung S, Thinwa JW, Thirumalaikumar VP, Thomas SM, Thomes PG, Thorburn A, Thukral L, Thum T, Thumm M, Tian L, Tichy A, Till A, Timmerman V, Titorenko VI, Todi SV, Todorova K, Toivonen JM, Tomaipitınca L, Tomar D, Tomas-Zapico C, Tomic S, Tong BC, Tong C, Tong X, Tooze SA, Torgersen ML, Torii S, Torres-Lopez L, Torriglia A, Towers CG, Towns R, Toyokuni S, Trajkovic V, Tramontano D, Tran QG, Travassos LH, Trelford CB, Tremel S, Trougakos IP, Tsao BP, Tschan MP, Tse HF, Tse TF, Tsugawa H, Tsvetkov AS, Tumbarello DA, Tumtas Y, Tunon MJ, Turcotte S, Turk B, Turk V, Turner BJ, Tuxworth RI, Tyler JK, Tyutereva EV, Uchiyama Y, Ugun-Klusek A, Uhlig HH, Ulamek-Koziol M, Ulasov IV, Umekawa M, Ungermann C, Unno R, Urbe S, Uribe-Carretero E, Ustun S, Uversky VN, Vaccari T, Vaccaro MI, Vahsen BF, Vakifahmetoglu-Norberg H, Valdor R, Valente MJ, Valko A, Vallee RB, Valverde AM, Van den Berghe G, van der Veen S, Van Kaer L, van Loosdregt J, van Wijk SJL, Vandenberghe W, Vanhorebeek I, Vannier-Santos MA, Vannini N, Vanrell MC, Vantaggiato C, Varano G, Varela-Nieto I, Varga M, Vasconcelos MH, Vats S, Vavvas DG, Vega-Naredo I, Vega-Rubin-de-Celis S, Velasco G, Velazquez AP, Vellai T, Vellenga E, Velotti F, Verdier M, Verginis P, Vergne I, Verkade P, Verma M, Verstreken P, Vervliet T, Vervoorts J,



Vessoni AT, Victor VM, Vidal M, Vidoni C, Vieira OV, Vierstra RD, Vigano S, Vihinen H, Vijayan V, Vila M, Vilar M, Villalba JM, Villalobo A, Villarejo-Zori B, Villarroya F, Villarroya J, Vincent O, Vindis C, Viret C, Viscomi MT, Visnjic D, Vitale I, Vocadlo DJ, Voitsekhovskaja OV, Volonte C, Volta M, Vomero M, Von Haefen C, Vooijs MA, Voos W, Vucicevic L, Wade-Martins R, Waguri S, Waite KA, Wakatsuki S, Walker DW, Walker MJ, Walker SA, Walter J, Wandosell FG, Wang B, Wang CY, Wang C, Wang C, Wang C, Wang CY, Wang D, Wang F, Wang F, Wang F, Wang G, Wang H, Wang H, Wang H, Wang HG, Wang J, Wang J, Wang J, Wang J, Wang K, Wang L, Wang L, Wang MH, Wang M, Wang N, Wang P, Wang P, Wang P, Wang P, Wang QJ, Wang Q, Wang QK, Wang QA, Wang WT, Wang W, Wang X, Wang X, Wang Y, Wang Y, Wang Y, Wang YY, Wang Y, Wang Y, Wang Y, Wang Y, Wang Z, Wang Z, Wang Z, Warnes G, Warnsmann V, Watada H, Watanabe E, Watchon M, Wawrzynska A, Weaver TE, Wegrzyn G, Wehman AM, Wei H, Wei L, Wei T, Wei Y, Weiergraber OH, Weihl CC, Weindl G, Weiskirchen R, Wells A, Wen RH, Wen X, Werner A, Weykopf B, Wheatley SP, Whitton JL, Whitworth AJ, Wiktorska K, Wildenberg ME, Wileman T, Wilkinson S, Willbold D, Williams B, Williams RSB, Williams RL, Williamson PR, Wilson RA, Winner B, Winsor NJ, Witkin SS, Wodrich H, Woehlbier U, Wollert T, Wong E, Wong JH, Wong RW, Wong VKW, Wong WW, Wu AG, Wu C, Wu J, Wu J, Wu KK, Wu M, Wu SY, Wu S, Wu SY, Wu S, Wu WKK, Wu X, Wu X, Wu YW, Wu Y, Xavier RJ, Xia H, Xia L, Xia Z, Xiang G, Xiang J, Xiang M, Xiang W, Xiao B, Xiao G, Xiao H, Xiao HT, Xiao J, Xiao L, Xiao S, Xiao Y, Xie B, Xie CM, Xie M, Xie Y, Xie Z, Xie Z, Xilouri M, Xu C, Xu E, Xu H, Xu J, Xu J, Xu L, Xu WW, Xu X, Xue Y, Yakhine-Diop SMS, Yamaguchi M, Yamaguchi O, Yamamoto A, Yamashina S, Yan S, Yan SJ, Yan Z, Yanagi Y, Yang C, Yang DS, Yang H, Yang HT, Yang H, Yang JM, Yang J, Yang J, Yang L, Yang L, Yang M, Yang PM, Yang Q, Yang S, Yang S, Yang SF, Yang W, Yang WY, Yang X, Yang X, Yang Y, Yang Y, Yao H, Yao S, Yao X, Yao YG, Yao YM, Yasui T, Yazdankhah M, Yen PM, Yi C, Yin XM, Yin Y, Yin Z, Yin Z, Ying M, Ying Z, Yip CK, Yiu SPT, Yoo YH, Yoshida K, Yoshii SR, Yoshimori T, Yousefi B, Yu B, Yu H, Yu J, Yu J, Yu L, Yu ML, Yu SW, Yu

- VC, Yu WH, Yu Z, Yu Z, Yuan J, Yuan LQ, Yuan S, Yuan SF, Yuan Y, Yuan Z, Yue J, Yue Z, Yun J, Yung RL, Zacks DN, Zaffagnini G, Zambelli VO, Zanella I, Zang QS, Zanivan S, Zappavigna S, Zaragoza P, Zarbalis KS, Zarebkohan A, Zarrouk A, Zeitlin SO, Zeng J, Zeng JD, Zerovnik E, Zhan L, Zhang B, Zhang DD, Zhang H, Zhang H, Zhang H, Zhang H, Zhang H, Zhang H, Zhang H, Zhang HL, Zhang J, Zhang J, Zhang JP, Zhang KYB, Zhang LW, Zhang L, Zhang L, Zhang L, Zhang L, Zhang M, Zhang P, Zhang S, Zhang W, Zhang X, Zhang XW, Zhang X, Zhang X, Zhang X, Zhang X, Zhang XD, Zhang Y, Zhang Y, Zhang Y, Zhang YD, Zhang Y, Zhang YY, Zhang Y, Zhang Z, Zhang Z, Zhang Z, Zhang Z, Zhang Z, Zhao H, Zhao L, Zhao S, Zhao T, Zhao XF, Zhao Y, Zhao Y, Zhao Y, Zhao Y, Zheng G, Zheng K, Zheng L, Zheng S, Zheng XL, Zheng Y, Zheng ZG, Zhivotovsky B, Zhong Q, Zhou A, Zhou B, Zhou C, Zhou G, Zhou H, Zhou H, Zhou H, Zhou J, Zhou J, Zhou J, Zhou J, Zhou K, Zhou R, Zhou XJ, Zhou Y, Zhou Y, Zhou Y, Zhou ZY, Zhou Z, Zhu B, Zhu C, Zhu GQ, Zhu H, Zhu H, Zhu H, Zhu WG, Zhu Y, Zhu Y, Zhuang H, Zhuang X, Zientara-Rytter K, Zimmermann CM, Ziviani E, Zoladek T, Zong WX, Zorov DB, Zorzano A, Zou W, Zou Z, Zou Z, Zuryn S, Zwerschke W, Brand-Saberi B, Dong XC, Kenchappa CS, Li Z, Lin Y, Oshima S, Rong Y, Sluimer JC, Stallings CL, Tong CK. (2021) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)(1). *Autophagy*, 17: 1-382.
134. Wang C, Xu H, Lin S, Deng W, Zhou J, Zhang Y, Shi Y, Peng D, Xue Y. (2020) GPS 5.0: An Update on the Prediction of Kinase-specific Phosphorylation Sites in Proteins. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 18(1):72-80.
135. Blom N, Sicheritz-Ponten T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S. (2004) Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, 4: 1633-1649.
136. Pyo KE, Kim CR, Lee M, Kim JS, Kim KI, Baek SH. (2018) ULK1 O-GlcNAcylation Is Crucial for Activating VPS34 via ATG14L during Autophagy Initiation. *Cell Rep*, 25: 2878-2890 e2874.

137. Holczer M, Banhegyi G, Kapuy O. (2016) GADD34 Keeps the mTOR Pathway Inactivated in Endoplasmic Reticulum Stress Related Autophagy. *PLoS One*, 11: e0168359.
138. Holczer M, Besze B, Zambo V, Csala M, Banhegyi G, Kapuy O. (2018) Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) Promotes Autophagy-Dependent Survival via Influencing the Balance of mTOR-AMPK Pathways upon Endoplasmic Reticulum Stress. *Oxid Med Cell Longev*, 2018: 6721530.
139. Tsaytler P, Harding HP, Ron D, Bertolotti A. (2011) Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis. *Science*, 332: 91-94.
140. Ahn JI, Jeong KJ, Ko MJ, Shin HJ, Chung HJ, Jeong HS. (2009) High-concentration Epigallocatechin Gallate Treatment Causes Endoplasmic Reticulum Stress-mediated Cell Death in HepG2 Cells. *Genomics Inform*, 7: 97-106.
141. Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM. (2005) Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol*, 17: 596-603.
142. Dite TA, Ling NXY, Scott JW, Hoque A, Galic S, Parker BL, Ngoei KRW, Langendorf CG, O'Brien MT, Kundu M, Viollet B, Steinberg GR, Sakamoto K, Kemp BE, Oakhill JS. (2017) The autophagy initiator ULK1 sensitizes AMPK to allosteric drugs. *Nat Commun*, 8: 571.
143. Ling NXY, Kaczmarek A, Hoque A, Davie E, Ngoei KRW, Morrison KR, Smiles WJ, Forte GM, Wang T, Lie S, Dite TA, Langendorf CG, Scott JW, Oakhill JS, Petersen J. (2020) mTORC1 directly inhibits AMPK to promote cell proliferation under nutrient stress. *Nat Metab*, 2: 41-49.
144. Nazio F, Carinci M, Valacca C, Bielli P, Strappazzon F, Antonioli M, Ciccocanti F, Rodolfo C, Campello S, Fimia GM, Sette C, Bonaldo P, Cecconi F. (2016) Fine-tuning of ULK1 mRNA and protein levels is required for autophagy oscillation. *J Cell Biol*, 215: 841-856.
145. Whang YM, Kim MJ, Cho MJ, Yoon H, Choi YW, Kim TH, Chang IH. (2019) Rapamycin enhances growth inhibition on urothelial carcinoma cells through LKB1 deficiency-mediated mitochondrial dysregulation. *J Cell Physiol*, 234: 13083-13096.

146. Hawley SA, Ross FA, Gowans GJ, Tibarewal P, Leslie NR, Hardie DG. (2014) Phosphorylation by Akt within the ST loop of AMPK- $\alpha$ 1 down-regulates its activation in tumour cells. *Biochem J*, 459: 275-287.
147. Bjedov I, Toivonen JM, Kerr F, Slack C, Jacobson J, Foley A, Partridge L. (2010) Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Cell Metab*, 11: 35-46.
148. Holczer M, Marton M, Kurucz A, Banhegyi G, Kapuy O. (2015) A Comprehensive Systems Biological Study of Autophagy-Apoptosis Crosstalk during Endoplasmic Reticulum Stress. *Biomed Res Int*, 2015: 319589.
149. Kapuy O, Vinod PK, Banhegyi G. (2014) mTOR inhibition increases cell viability via autophagy induction during endoplasmic reticulum stress - An experimental and modeling study. *FEBS Open Bio*, 4: 704-713.
150. Chiu HF, Venkatakrisnan K, Wang CK. (2020) The role of nutraceuticals as a complementary therapy against various neurodegenerative diseases: A mini-review. *J Tradit Complement Med*, 10: 434-439.

## 10. Saját közlemények

A dolgozat témájához kapcsolódó publikációk jegyzéke:

**Holczer M**, Hajdú B, Lőrincz T, Szarka A, Bánhegyi G, Kapuy O: *Fine-tuning of AMPK-ULK1-mTORC1 regulatory triangle is crucial for autophagy oscillation*, Scientific Reports, 10: 1 Paper: 17803, 12 p. (2020) IF: 3,998

**Holczer M**, Hajdú B, Lőrincz T, Szarka A, Bánhegyi G, Kapuy O: *A Double Negative Feedback Loop Between mTORC1 and AMPK Kinases Guarantees Precise Autophagy Induction Upon Cellular Stress*, International Journal of Molecular Sciences, 20: 22 Paper: 5543, 17 p. (2019) IF: 4,556

**Holczer M**, Besze B, Zámbó V, Csala M, Bánhegyi G, Kapuy O: *Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) promotes autophagy-dependent survival via influencing the balance of mTOR-AMPK pathways upon endoplasmic reticulum stress*, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2018 Paper: 6721530, 15 p. (2018) IF: 4,868

**Holczer M**, Bánhegyi G, Kapuy O: *GADD34 keeps the mTOR pathway inactivated in endoplasmic reticulum stress related autophagy*, PLOS ONE, 11:12 Paper: e0168359, 20 p. (2016) IF: 2,806

A dolgozat témájától független publikációk jegyzéke:

Kapuy O, **Holczer M**, Márton M, Korcsmáros T: *Autophagy-dependent survival is controlled with a unique regulatory network upon various cellular stress events* Cell death and disease, 12:4 Paper: 309, 11 p. (2021) IF: 6,304

Lőrincz T, **Holczer M**, Kapuy O, Szarka A: *The interrelationship of pharmacologic ascorbate induced cell death and ferroptosis*, Pathology and Oncology Research, 25:2 pp. 669-679. (2019) IF: 2,826

**Holczer M**, Márton M, Kurucz A, Bánhegyi G, Kapuy O: *A comprehensive systems biological study of autophagy-apoptosis crosstalk during endoplasmic reticulum stress*, Biomed Research International, 2015 Paper: 319589, 12 p. (2015) IF: 2,134

## 11. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Mészáros-Kapuy Orsolyának, hogy szakértelmével és tanácsaival mindvégig segített a PhD munkám során.

Köszönöm Dr. Bánhegyi Gábor professzor úrnak, hogy lehetővé tette, hogy az Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézetben elkezdhettem a kutatási munkámat és azt mindvégig támogatta, emlékének köszönettel adózom. Köszönöm Dr. Csala Miklós és Dr. Mandl József professzor úrknak és Dr. Keszler Gergelynek az intézet illetve a tanszék jelenlegi és korábbi vezetőinek, amiért lehetővé tették, hogy az Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézetben, majd a Molekuláris Biológiai Tanszéken folytathassam a kutatási munkámat.

Köszönöm a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszékéről Dr. Szarka Andrásnak és Dr. Lőrincz Tamásnak, hogy segítettek az immunitokémiai módszer elsajátításában és a mikroszkópos felvételek elkészítésében. Továbbá köszönöm Prof. Csala Miklós és Dr. Zámbo Veronika segítségét a tézishez kapcsolódó publikáció elkészítésében.

Köszönöm a munkacsoportunk minden tagjának, Márton Margitának, Dr. Lizák Beátának és Dr. Gyöngyösi Norbertnek a segítségét és támogatását. Korábbi TDK hallgatóinknak, Besze Boglárkának és Hajdú Bencének is szeretném megköszönni a kísérletek során nyújtott segítségét.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem, Molekuláris Biológiai Tanszék összes dolgozójának a kísérletek során nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom még Szüleimnek, Fecónak és Gábornak, amiért egyetemi és doktori tanulmányaimban mindvégig támogattak. Köszönet illeti tágabb családomat, barátaimat egyaránt, akik szintén mindenben mellettem álltak.

## 12. Mellékletek jegyzéke:

1. melléklet: Kód a hálózat elemeinek időbeni lefutásának szimulációjához, ha az mTORC1  $\dashv$  AMPK kapcsolat hiányzik
2. melléklet: Kód a hálózat elemeinek időbeni lefutásának szimulációjához, ha az mTORC1  $\dashv$  AMPK kapcsolat jelen van
3. melléklet: AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási háromszög dinamikai viselkedésének szimulációja, ha direkt kapcsolat van az AMPK és ULK1 között
4. melléklet: Az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási háromszög dinamikai viselkedésének szimulációja, ha az AMPK egy további, beépített fehérjén keresztül aktiválja az ULK1-et
5. melléklet: Az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási háromszög dinamikai viselkedésének szimulációja, ha az AMPK többszörös foszforiláción keresztül aktiválja az ULK1-et
6. melléklet: Az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási háromszög és az ER-stressz válasz közötti kapcsolat időbeni szimulációja
7. melléklet: Az AMPK, az mTORC1, az ULK1 és az autofágia aktivitásának változása különböző kezelések hatására
8. melléklet: AMPK foszforilációs helyek keresése az ULK1 fehérjével kölcsönhatásba kerülő fehérjéken elméleti módszerek segítségével
9. melléklet: AMPK foszforilációs helyek keresése az ULK1 fehérjével kölcsönhatásba kerülő fehérjéken elméleti módszerek segítségével

## 1. melléklet

Kód a hálózat elemeinek időbeni lefutásának szimulációjához, ha az *mTORC1*  $\downarrow$  *AMPK* kapcsolat hiányzik

1. táblázat - A modell elemeinek részletes megnevezése

	<i>leírás</i>
<i>ULK1</i>	az ULK1 aktív formája
<i>ULK1T</i>	az ULK1 fehérje összmenyisége
<i>AMPK</i>	az AMPK aktív formája
<i>AMPKT</i>	az AMPK fehérje összmenyisége
<i>mTOR</i>	az mTORC1 fehérje aktív formája
<i>mTORT</i>	az mTORC1 fehérje összmenyisége
<i>ATG</i>	az aktív autofágiás komplex
<i>starv</i>	az éhezés mértéke (az adott pillanatban az éhezés mértéke)
<i>starvT</i>	a teljes éhezés mértéke (az éhezés maximális mértéke)
<i>res</i>	a resveratrol-kezelés mértéke
<i>rest</i>	teljes resveratrol mértéke
<i>rap</i>	a rapamycin-kezelés mértéke
<i>rapT</i>	teljes rapamycin mértéke
<i>cc</i>	a Compound C-kezelés mértéke
<i>ccT</i>	teljes Compound C mértéke

2. táblázat - A modell állandóinak részletes megnevezése

	<i>leírás</i>
<i>kaulk</i>	az ULK1 háttéraktivációja
<i>kaulk''</i>	AMPK-függő ULK1-aktiváció
<i>kiulk</i>	az ULK1 háttér-inaktiváció
<i>kiulk'</i>	mTOR-függő ULK1-inaktiváció
<i>Julk</i>	az ULK1 Michaelis-konstansa
<i>kaak</i>	az AMPK háttéraktivációja
<i>kiak</i>	az AMPK háttér-inaktivációja
<i>kiak'</i>	ULK1-függő AMPK-inaktiváció
<i>kiak''</i>	mTORC1-függő AMPK-inaktiváció
<i>Jampk</i>	az AMPK Michaelis-konstansa
<i>kamtor</i>	az mTORC1 háttéraktivációja
<i>kimtor</i>	az mTORC1 háttér-inaktivációja
<i>kimtor'</i>	AMPK-függő mTORC1-inaktiváció
<i>kimtor''</i>	ULK1-függő mTORC1-inaktiváció
<i>Jmtor</i>	az mTORC1 Michaelis-konstansa
<i>kaau</i>	az autofágia háttéraktivációja
<i>kaau'</i>	ULK1-függő autofágia-aktiváció



<i>kiau</i>	az autofágia háttér-inaktivációja
<i>kiau'</i>	mTORC1-függő autofágia-inaktiváció
<i>kistv</i>	az éhezés háttér-inaktivációja
<i>Jstv</i>	az éhezés Michaelis-konstansa
<i>kostv</i>	az éhezés háttéraktivációja
<i>kires</i>	a resveratrol háttér-inaktivációja
<i>Jres</i>	a resveratrol Michaelis-konstansa
<i>kores</i>	a resveratrol háttéraktivációja
<i>kirap</i>	a rapamycin háttér-inaktivációja
<i>Jrap</i>	a rapamycin Michaelis-konstansa
<i>korap</i>	a rapamycin háttéraktivációja
<i>kicc</i>	a Compound C háttér-inaktivációja
<i>Jcc</i>	a Compound C Michaelis-konstansa
<i>kocc</i>	a Compound C háttér-aktivációja

# Matematikai modell az AMPK-mTORC1-ULK1 szabályozási hálózat leírására és időbeli szimulációk készítésére az XPP-AUT programmal  
 # Kód a hálózat elemeinek időbeni lefutásának szimulációjához, ha az mTOR-AMPK kapcsolat hiányzik

# kezdeti feltételek

init ULK1=0.0055, AMPK=0.1017, mTOR=0.4691, ATG=0.0214, starv=0, res=0, rap=0, cc=0

# differenciálegyenletek

# az ULK1 jelöli az ULK1 aktív formáját

$$ULK1' = (kaulk + kaulk * \text{delay}(AMPK, \tau_{11})) * (UlklT - ULK1) / (JulK + UlklT - ULK1) - (kiulk + kiulk * mTOR) * ULK1 / (JulK + ULK1)$$

# az AMPK jelöli az AMPK aktív, foszforilált formáját

$$AMPK' = (kaak + kaak * starv + kaak * res) * (AMPKT - AMPK) / (Jampk + AMPKT - AMPK) - (kiak + kiak * cc + kiak * ULK1) * AMPK / (Jampk + AMPK)$$

# az mTOR jelöli az mTORC1 komplex aktív formáját

$$mTOR' = kamtor * (mTORT - mTOR) / (Jmtor + mTORT - mTOR) - (kimtor + kimtor * AMPK + kimtor * ULK1 + kimtor * res + kimtor * rap) * mTOR / (Jmtor + mTOR)$$

# az ATG jelöli az aktív autofágiás (ATG) géneket, az autofágia alatt; ha az ATG aktív, akkor azt feltételezzük, hogy az autofágia is aktív

$$ATG' = (kaau + kaau * ULK1) * (1 - ATG) - (kiau + kiau * mTOR) * ATG$$

```

# a starv jelöli az AMP/ATP növekvő arányát az éhezés alatt
starv' = kistv*(starvT-starv)/(Jstv + starvT-starv) -
kostv*starv/(Jstv+starv)

# a res jelöli a resveratrol felvételét a sejtbe
res' = kires*(resT-res)/(Jres + resT-res) - kores*res/(Jres+res)

# a rap jelöli a rapamycin felvételét a sejtbe
rap' = kirap*(rapT-rap)/(Jrap + rapT-rap) - korap*rap/(Jrap+rap)

# a cc jelöli a Compound C felvételét a sejtbe
cc' = kicc*(ccT-cc)/(Jcc + ccT-cc) - kocc*cc/(Jcc+cc)

# paraméterek
# éhezés szimulációja: starvT=2
# rapamycin-kezelés szimulációja: rapT=2.25
# resveratrol-kezelés szimulációja: resT=1.5
# ULK1-csendesítés szimulációja: ULK1T=0.001
# TSC1/TSC2-csendesítés szimulációja: kamtor=0.05
# Compound C-kezelés szimulációja: CCT=100
p kaulk=5, kaulk''=1, kiulk=0.1, kiulk'=30, julk=0.01, Ulk1T=1
p kaak=0.35, kiak=0.5, kiak'=150, AMPKT=1, Jampk=0.5
p kamtor=0.025, kimtor=0.0075, kimtor'=0.15, kimtor''=0.5, Jmtor=0.1,
mTORT=1
p kaau=0.01, kaau'=3, kiau=0.75, kiau'=1
p starvT=0, kistv=0.105, Jstv=0.03, kostv=0.1
p resT=0, kires=0.0025, Jres=0.75, kores=0.00075
p rapT=0, kirap=0.125, Jrap=0.1, korap=0.1
p ccT=0, kicc=0.5, Jcc=0.1, kocc=0.1
p taul=5

# az AMPK-ULK1 negatív visszacsatolások hurok késleltetésének mértéke
@ TOTAL=1, METH=stiff, delay=50

done

```

## 2. melléklet

*Kód a hálózat elemeinek időbeni lefutásának szimulációjához, ha az mTORC1  $\downarrow$  AMPK kapcsolat jelen van*

```
# Matematikai modell az AMPK-mTORC1-ULK1 szabályozási hálózat
leírására és időbeni szimulációk készítésére az XPP-AUT programmal
# Kód a hálózat elemeinek időbeni lefutásának szimulációjához, ha az
mTORC1  $\downarrow$  AMPK kapcsolat jelen van

# kezdeti feltételek
init ULK1=0.0008, AMPK=0.0161, mTOR=0.7013, ATG=0.0568, starv=0,
res=0, rap=0, cc=0

# differenciálegyenletek
# az ULK1 jelöli az ULK1 aktív formáját
ULK1' = (kaulk + kaulk"*delay(AMPK,tau1))*(Ulk1T-ULK1)/(Julk + Ulk1T-
ULK1) - (kiulk + kiulk"*mTOR)*ULK1/(Julk + ULK1)

# az AMPK jelöli az AMPK aktív, foszforilált formáját
AMPK' = (kaak + kaak*starv + kaak*res)*(AMPKT-AMPK)/(Jampk + AMPKT-
AMPK) - (kiak + kiak*cc + kiak"*ULK1 + kiak"*mTOR)*AMPK/(Jampk + AMPK)

# az mTOR jelöli az mTORC1 komplex aktív formáját
mTOR' = kamtor*(mTORT-mTOR)/(Jmtor+mTORT-mTOR) - (kimtor +
kimtor"*AMPK + kimtor"*ULK1 + kimtor*res +
kimtor*rap)*mTOR/(Jmtor+mTOR)

# az ATG jelöli az aktív autofágiás (ATG) géneket, az autofágia alatt;
ha az ATG aktív, akkor azt feltételezzük, hogy az autofágia is aktív
ATG' = (kaau + kaau"*ULK1)*(1-ATG) - (kiau + kiau"*mTOR)*ATG

# a starv jelöli az AMP/ATP növekvő arányát az éhezés alatt
starv' = kistv*(starvT-starv)/(Jstv + starvT-starv) -
kostv*starv/(Jstv+starv)

# a res jelöli a resveratrol felvételét a sejtbe
res' = kires*(resT-res)/(Jres + resT-res) - kores*res/(Jres+res)
```

```

# a rap jelöli a rapamycin felvételét a sejtbe
rap' = kirap*(rapT-rap)/(Jrap + rapT-rap) - korap*rap/(Jrap+rap)

# a cc jelöli a Compound C felvételét a sejtbe
cc' = kicc*(ccT-cc)/(Jcc + ccT-cc) - kocc*cc/(Jcc+cc)

# paraméterek
# éhezés szimulációja: starvT=0.75
# rapamycin-kezelés szimulációja: rapT=10
# resveratrol-kezelés szimulációja: resT=0.175
# ULK1-csendesítés szimulációja: ULK1T=0.001
# TSC1/TSC2-csendesítés szimulációja: kamtor=0.05
# Compound C-kezelés szimulációja: CCT=100
p kaulk=0.001, kaulk''=3, kiulk=0.1, kiulk'=0.75, julk=0.01, Ulk1T=1
p kaak=0.5, kiak=0.1, kiak'=1.5, kiak''=15, AMPKT=1, Jampk=0.5
p kamtor=0.015, kimtor=0.01, kimtor'=0.15, kimtor''=0.5, Jmtor=0.1,
mTORT=1
p kaau=0.1, kaau'=3, kiau=1, kiau'=1
p starvT=0, kistv=0.1, Jstv=0.1, kostv=0.1
p rapT=0, kirap=0.15, Jrap=0.1, korap=0.1
p ccT=0, kicc=1, Jcc=0.5, kocc=0.001
p tau1=50

# az AMPK-ULK1 negatív visszacsatolások hurok késleltetésének mértéke
@ TOTAL=1, METH=stiff, delay=50

done

```

## 3. melléklet

*AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási háromszög dinamikai viselkedésének szimulációja, ha direkt kapcsolat van az AMPK és ULK1 között*

## 3. táblázat - A modell elemeinek részletes leírása

	<i>leírás</i>
<i>ULK1</i>	az ULK1 aktív formája
<i>ULK1T</i>	az ULK1 fehérje összmenyisége
<i>AMPK</i>	az AMPK aktív formája
<i>AMPKT</i>	az AMPK fehérje összmenyisége
<i>mTOR</i>	az mTORC1 fehérje aktív formája
<i>mTORT</i>	az mTORC1 fehérje összmenyisége
<i>AUTA</i>	az aktív autofágiás komplex
<i>STARV</i>	az éhezés mértéke

## 4. táblázat - A modell állandóinak részletes leírása

	<i>Leírás</i>
<i>kaulk</i>	az ULK1 háttéraktivációja
<i>kaulk'</i>	AMPK-függő ULK1-aktiváció
<i>kiulk</i>	az ULK1 háttér-inaktiváció
<i>kiulk'</i>	mTORC1-függő ULK1-inaktiváció
<i>Julk</i>	az ULK1 Michaelis-konstansa
<i>kaak</i>	az AMPK háttéraktivációja
<i>kiak</i>	az AMPK háttér-inaktivációja
<i>kiak'</i>	ULK1-függő AMPK-inaktiváció
<i>kiak''</i>	mTOR-függő AMPK-inaktiváció
<i>Jampk</i>	az AMPK Michaelis-konstansa
<i>kamtor</i>	az mTORC1 háttéraktivációja
<i>kimtor</i>	az mTORC1 háttér-inaktivációja
<i>kimtor'</i>	AMPK-függő mTORC1-inaktiváció
<i>kimtor''</i>	ULK1-függő mTORC1-inaktiváció
<i>Jmtor</i>	az mTORC1 Michaelis-konstansa
<i>kaau</i>	az autofágia háttéraktivációja
<i>kaau'</i>	ULK1-függő autofágia-aktiváció
<i>kiau</i>	az autofágia háttér-inaktivációja
<i>kiau'</i>	mTORC1-függő autofágia-inaktiváció

### 1. A kód a jel válasz görbék szimulációjához

```
# a modell leírása jel válaszgörbék készítéséhez, ha direkt negatív
visszacsatolás van az AMPK és az ULK1 között

# kezdeti feltételek
init AMPK=0, ULK1=0

# differenciálegyenletek
# az ULK1 jelöli az ULK1 aktív formáját

$$ULK1' = (kaulk + kaulk' * AMPK) * (ULK1T - ULK1) / (JulK + ULK1T - ULK1) - (kiulk + kiulk' * mTOR) * ULK1 / (JulK + ULK1)$$

# az AMPK jelöli az AMPK aktív, foszforilált formáját

$$AMPK' = (kaak + STARV) * (AMPKT - AMPK) / (Jampk + AMPKT - AMPK) - (kiak + kiak' * ULK1 + kiak'' * mTOR) * AMPK / (Jampk + AMPK)$$

# egyensúlyi állapot funkció
# az mTOR jelöli az mTORC1 komplex aktív formáját

$$mTOR = kamtor * mTORT / (kamtor + kintor + kintor' * AMPK + kintor'' * ULK1)$$


# paraméterek
# rapamycin-kezelés szimulációja: mTORT = 0.1
# éhezés szimulációja: STARV = 1.5
p STARV=0
p kaulk=0.01, kaulk'=1, kiulk=0.1, kiulk'=3, Julk=0.01, ULK1T=1
p kaak=0.3, kiak=0.1, kiak'=5, kiak''=5, AMPKT=1, Jampk=0.005
p kamtor=0.01, kintor=0.01, kintor'=0.25, kintor''=0.25, Jmtor=0.01,
mTORT=1

done
```

### 2. A kód az időbeni görbék szimulációjához

```
# a modell leírása időbeni görbék készítéséhez, ha direkt negatív
visszacsatolás van az AMPK és az ULK1 között

# kezdeti feltételek
init ULK1=0.00001, AMPK=0.00065, AUTA=0.14287

# differenciálegyenletek
# az ULK1 jelöli az ULK1 aktív formáját

$$ULK1' = (kaulk + kaulk' * AMPK) * (ULK1T - ULK1) / (JulK + ULK1T - ULK1) - (kiulk + kiulk' * mTOR) * ULK1 / (JulK + ULK1)$$

# az AMPK jelöli az AMPK aktív, foszforilált formáját

$$AMPK' = (kaak + STARV) * (AMPKT - AMPK) / (Jampk + AMPKT - AMPK) - (kiak + kiak' * ULK1 + kiak'' * mTOR) * AMPK / (Jampk + AMPK)$$

# az AUTA jelöli az autofágiát aktiváló komplex aktív formáját

$$AUTA' = (kaau + kaau' * ULK1) * (1 - AUTA) - (kiau + kiau' * mTOR) * AUTA$$

# egyensúlyi állapot funkció
# az mTOR jelöli az mTORC1 komplex aktív formáját

$$mTOR = kamtor * mTORT / (kamtor + kintor + kintor' * AMPK + kintor'' * ULK1)$$

```

```
# paraméterek
# rapamycin-kezelés szimulációja: mTORT = 0.1
# éhezés szimulációja: STARV = 1.5
p STARV=0
p kaulk=0.01, kaulk'=1, kiulk=0.1, kiulk'=3, Julk=0.01, ULK1T=1
p kaak=0.3, kiak=0.1, kiak'=5, kiak''=5, AMPKT=1, Jampk=0.005
p kamtor=0.01, kintor=0.01, kintor'=0.25, kintor''=0.25, Jmtor=0.01,
mTORT=1
p kaau=0.01, kaau'=0.1, kiau=0.01, kiau'=0.1

done
```

## 4. melléklet

Az *AMPK-ULK1-mTORC1* szabályozási háromszög dinamikai viselkedésének szimulációja, ha az AMPK egy további, beépített fehérjén keresztül aktiválja az ULK1-et

## 5. táblázat - A modell elemeinek részletes leírása

	<i>leírás</i>
<i>ULK1</i>	az ULK1 aktív formája
<i>ULK1T</i>	az ULK1 fehérje összmenyisége
<i>AMPK</i>	az AMPK aktív formája
<i>AMPKT</i>	az AMPK fehérje összmenyisége
<i>mTOR</i>	az mTORC1 fehérje aktív formája
<i>mTORT</i>	az mTORC1 fehérje összmenyisége
<i>Prot</i>	az AMPK által aktivált fehérje aktív formája
<i>AUTA</i>	az aktív autofágiát aktiváló komplex
<i>STARV</i>	az éhezés mértéke

## 6. táblázat - A modell állandóinak részletes leírása

	<i>Leírás</i>
<i>kaulk</i>	az ULK1 háttéraktivációja
<i>kaulk'</i>	PROT-függő ULK1-aktiváció
<i>kiulk</i>	az ULK1 háttér-inaktiváció
<i>kiulk'</i>	mTORC1-függő ULK1-inaktiváció
<i>Julk</i>	az ULK1 Michaelis-konstansa
<i>kaak</i>	az AMPK háttéraktivációja
<i>kiak</i>	az AMPK háttér-inaktivációja
<i>kiak''</i>	ULK1-függő AMPK-inaktiváció
<i>kiak'''</i>	mTORC1-függő AMPK-inaktiváció
<i>Jampk</i>	az AMPK Michaelis-konstansa
<i>kamtor</i>	az mTORC1 háttéraktivációja
<i>kimtor</i>	az mTORC1 háttér-inaktivációja
<i>kimtor'</i>	AMPK-függő mTORC1-inaktiváció
<i>kimtor''</i>	ULK1-függő mTORC1-inaktiváció
<i>Jmtor</i>	az mTORC1 Michaelis-konstansa
<i>kapr</i>	a Prot háttéraktivációja
<i>kapr'</i>	AMPK-függ Prot-aktiváció
<i>kipr</i>	a Prot háttér-inaktivációja
<i>Jpr</i>	a Prot Michaelis-konstansa
<i>kaau</i>	az autofágia háttéraktivációja
<i>kaau'</i>	ULK1-függő autofágia-aktiváció
<i>kiau</i>	az autofágia háttér-inaktivációja
<i>kiau'</i>	mTORC1-függő autofágia-inaktiváció



## 1. A kód a jel válasz görbék szimulációjához

```
# a modell leírása jel válasz görbék készítéséhez, ha az AMPK egy
# további beépített fehérjén keresztül aktiválja az ULK1-et

# kezdeti feltételek
init ULK1=0, AMPK=0

# differenciálegyenletek
# az ULK1 jelöli az ULK1 aktív formáját

$$ULK1' = (kaulk + kaulk' * Prot) * (ULK1T - ULK1) / (JulK + ULK1T - ULK1) - (kiulk + kiulk' * mTOR) * ULK1 / (JulK + ULK1)$$

# az AMPK jelöli az AMPK aktív, foszforilált formáját

$$AMPK' = (kaak + STARV) * (AMPKT - AMPK) / (Jampk + AMPKT - AMPK) - (kiak + kiak' * ULK1 + kiak'' * mTOR) * AMPK / (Jampk + AMPK)$$

# egyensúlyi állapot funkció
# az mTOR jelöli az mTORC1 komplex aktív formáját

$$mTOR = kamtor * mTORT / (kamtor + kimtor + kimtor' * AMPK + kimtor'' * ULK1)$$

# a Prot jelöli az extra beépített fehérje aktív formáját
Prot = GK(kapr + kapr' * AMPK, kipr, Jpr, Jpr)

# 'Goldbeter-Koshand' funkció (GK)

$$GB(arg1, arg2, arg3, arg4) = arg2 - arg1 + arg2 * arg3 + arg1 * arg4$$


$$GK(arg1, arg2, arg3, arg4) = 2 * arg1 * arg4 / (GB(arg1, arg2, arg3, arg4) + \sqrt{GB(arg1, arg2, arg3, arg4)^2 - 4 * (arg2 - arg1) * arg1 * arg4})$$

# paraméterek
# rapamycin-kezelés szimulációja: mTORT = 0.3
# éhezés szimulációja: STARV = 0.5
p STARV=0
p kaulk=0.101, kaulk'=25, kiulk=0.075, kiulk'=20, Julk=0.001, ULK1T=1
p kaak=2, kiak=0.1, kiak'=3, kiak''=10, AMPKT=1, Jampk=0.001
p kamtor=0.0175, kimtor=0.0125, kimtor'=10, kimtor''=0.1, Jmtor=0.01, mTORT=1
p kapr=0.01, kapr'=10, kipr=20, Jpr=0.02

done
```

## 2. A kód az időbeni görbék szimulációjához

```
# a modell leírása időbeni görbék készítéséhez, ha az AMPK egy további
# beépített fehérjén keresztül aktiválja az ULK1-et

# kezdeti feltételek
init ULK1=0, AMPK=0.00071, AUTA=0.02075

# differenciálegyenletek
# az ULK1 jelöli az ULK1 aktív formáját

$$ULK1' = (kaulk + kaulk' * Prot) * (ULK1T - ULK1) / (JulK + ULK1T - ULK1) - (kiulk + kiulk' * mTOR) * ULK1 / (JulK + ULK1)$$

```

```

# az AMPK jelöli az AMPK aktív, foszforilált formáját
AMPK' = (kaak + STARV)*(AMPKT-AMPK)/(Jampk + AMPKT-AMPK) - (kiak +
kiak'*ULK1 + kiak"*mTOR)*AMPK/(Jampk + AMPK)

# az AUTA jelöli az autofágiát aktiváló komplex aktív formáját
AUTA' = (kaau + kaau'*ULK1)*(1-AUTA) - (kiau + kiau'*mTOR)*AUTA

# egyensúlyi állapot funkció
# az mTOR jelöli az mTORC1 komplex aktív formáját
mTOR = kamtor*mTORT/(kamtor + kimtor + kimtor'*AMPK + kimtor"*ULK1)
aux mTOR = mTOR

# a Prot jelöli az extra beépített fehérje aktív formáját
Prot = GK(kapr + kapr'*AMPK, kipr, Jpr, Jpr)
aux Prot = Prot

# 'Goldbeter-Koshand' funkció (GK)
GB(arg1,arg2,arg3,arg4) = arg2-arg1+arg2*arg3+arg1*arg4
GK(arg1,arg2,arg3,arg4) =
2*arg1*arg4/(GB(arg1,arg2,arg3,arg4)+sqrt(GB(arg1,arg2,arg3,arg4)^2-
4*(arg2-arg1)*arg1*arg4))

# paraméterek
# rapamycin-kezelés szimulációja: mTORT = 0.3
# éhezés szimulációja: STARV = 0.5
p STARV=0
p kaulk=0.101, kaulk'=25, kiulk=0.075, kiulk'=20, Julk=0.001, ULK1T=1
p kaak=2, kiak=0.1, kiak'=3, kiak"=10, AMPKT=1, Jampk=0.001
p kamtor=0.0175, kimtor=0.0125, kimtor'=10, kimtor"=0.1, Jmtor=0.01,
mTORT=1
p kapr=0.01, kapr'=10, kipr=20, Jpr=0.02
p kaau=0.01, kaau'=0.1, kiau=0.01, kiau'=0.1

done

```

## 5. melléklet

Az *AMPK-ULK1-mTORC1* szabályozási háromszög dinamikai viselkedésének szimulációja, ha az AMPK többszörös foszforiláción keresztül aktiválja az ULK1-et

7. táblázat - A modell elemeinek részletes leírása

	<i>leírás</i>
<i>ULK1P</i>	az ULK1 inaktív, egyszeresen foszforilált formája
<i>ULK1PP</i>	az ULK1 inaktív, kétszeresen foszforilált formája
<i>ULK1PPP</i>	az ULK1 inaktív, háromszorosan foszforilált formája
<i>ULK1PPPP</i>	az ULK1 aktív, teljesen foszforilált formája
<i>ULK1T</i>	az ULK1 fehérje összmennyisége
<i>AMPK</i>	az AMPK aktív formája
<i>AMPKT</i>	az AMPK fehérje összmennyisége
<i>mTOR</i>	az mTORC1 fehérje aktív formája
<i>mTORT</i>	az mTORC1 fehérje összmennyisége
<i>AUTA</i>	az aktív autofágiát aktiváló komplex
<i>STARV</i>	az éhezés mértéke

8. táblázat – A modell állandóinak részletes leírása

	<i>Leírás</i>
<i>kaulk</i>	AMPK-függő ULK1-aktiváció
<i>kiulk</i>	mTORC1-függő ULK1-inaktiváció
<i>alfa</i>	az ULK1A aktivitása
<i>beta</i>	az ULK1P, az ULK1PP és az ULK1PPP aktivitása
<i>kaak</i>	az AMPK háttéraktivációja
<i>kiak</i>	az AMPK háttér-inaktivációja
<i>kiak'</i>	ULK1-függő AMPK-inaktiváció
<i>kiak''</i>	mTORC1-függő AMPK-inaktiváció
<i>Jampk</i>	az AMPK Michaelis-konstansa
<i>kamtor</i>	az mTORC1 háttéraktivációja
<i>kimtor</i>	az mTORC1 háttér-inaktivációja
<i>kimtor'</i>	AMPK-függő mTORC1-inaktiváció
<i>kimtor''</i>	ULK1-függő mTORC1-inaktiváció
<i>Jmtor</i>	az mTORC1 Michaelis-konstansa
<i>kaau</i>	az autofágia háttéraktivációja
<i>kaau'</i>	ULK1-függő autofágia-aktiváció
<i>kiau</i>	az autofágia háttér-inaktivációja
<i>kiau'</i>	mTORC1-függő autofágia-inaktiváció

## 1. A kód az időbeni görbék szimulációjához

```

# a modell leírása időbeni görbék készítéséhez, ha az AMPK több
lépcsős foszforilációval aktiválja az ULK1-et

# kezdeti feltételek
ULK1P=0.99945, ULK1PP=0.00055, ULK1PPP=3.035e-007, AMPK=0.00071,
AUTA=0.00207

# differenciálegyenletek
# az ULK1P jelöli az ULK1 inaktív, egyszeresen foszforilált formáját
ULK1P' = kiulk*mTOR*ULK1PP - kaulk*AMPK*ULK1P

# az ULK1PP jelöli az ULK1 inaktív, kétszeresen foszforilált formáját
ULK1PP' = kaulk*AMPK*ULK1P - kiulk*mTOR*ULK1PP - kaulk*AMPK*ULK1PP +
kiulk*mTOR*ULK1PPP

# az ULK1PPP jelöli az ULK1 inaktív, háromszorosan foszforilált
formáját
ULK1PPP' = kaulk*AMPK*ULK1PP - kiulk*mTOR*ULK1PPP - kaulk*AMPK*ULK1PPP
+ kiulk*mTOR*ULK1A

# az AMPK jelöli az AMPK aktív, foszforilált formáját
AMPK' = (kaak + STARV)*(AMPKT-AMPK)/(Jampk + AMPKT-AMPK) - (kiak +
kiak'*ULK1A + kiak"*mTOR*AMPK/(Jampk + AMPK))

# az AUTA jelöli az autofágiát aktiváló komplex aktív formáját
AUTA' = (kaau + kaau'*ULK1A)*(1-AUTA) - (kiau + kiau'*mTOR)*AUTA

# egyensúlyi állapot funkció
# az mTOR jelöli az mTORC1 komplex aktív formáját
mTOR = kamtor*mTORT/(kamtor + kimtor + kimtor'*AMPK +
kimtor"*(alfa*ULK1A + beta*(ULKT-ULK1A)) + RAP)
aux mTOR = mTOR

# az ULK1A jelöli az ULK1 aktív, teljesen foszforilált formáját
ULK1A = ULK1T - ULK1P - ULK1PP - ULK1PPP
aux ULK1A = ULK1A

# paraméterek
# rapamycin-kezelés szimulációja: mTORT = 0.3
# éhezés szimulációja: STARV = 0.1
# az mTOR gátlás és az AMPK aktiválás kombinálásának szimulációja:
mTORT=0.3, kaak=0.4
p ULKT=1, alfa=1, beta=0.1
p STARV=0, RAP=0
p kaulk=0.75, kiulk=2
p kaak=0.1, kiak=0.001, kiak'=0.4, kiak"=0.5, AMPKT=1, Jampk=0.001
p kamtor=0.3, kimtor=0.01, kimtor'=20, kimtor"=3, Jmtor=0.01, mTORT=1
p kaau=0.01, kaau'=1, kiau=0.01, kiau'=10

done

```

## 6. melléklet

Az AMPK-ULK1-mTORC1 szabályozási háromszög és az ER-stressz-válasz közötti kapcsolat időbeni szimulációja

## 9. táblázat - A modell elemeinek részletes leírása

	<i>Leírás</i>
<i>AUCO</i>	az autofágia szabályozó fehérjék aktív formája
<i>AUCOT</i>	az autofágia szabályozó fehérjék összmenyisége
<i>pAUIIN</i>	az autofágia induktor fehérjék aktív formájának előalakja
<i>pAUIIT</i>	az autofágia induktor fehérjék előformájának összmenyisége
<i>AUIN</i>	az autofágia induktor fehérjék aktív formája
<i>AUIN<sup>T</sup></i>	az autofágia induktor fehérjék összmenyisége
<i>mTOR</i>	az mTORC1 fehérje aktív formája
<i>mTOT</i>	az mTORC1 fehérje összmenyisége
<i>AUEX</i>	az aktív autofágiát aktiváló komplex
<i>AUEXT</i>	az autofágiát aktiváló komplex összmenyisége
<i>DEATH</i>	a sejtthálál aktív formája
<i>stress</i>	az ER-stressz mértéke

## 10. táblázat - A modell állandóinak részletes leírása

	<i>Leírás</i>
<i>kaac</i>	az autofágia szabályozó fehérjék háttéraktivációja
<i>kaac'</i>	AUIN-függő autofágia szabályozó fehérje-aktiváció
<i>kiac</i>	az autofágia szabályozó fehérjék háttér-inaktivációja
<i>kiac'</i>	mTORC1-függő autofágia szabályozó fehérje-inaktiváció
<i>JAUCO</i>	az autofágia szabályozó fehérjék Michaelis-konstansa
<i>kapai</i>	az autofágia induktor fehérjék előalakjának háttéraktivációja
<i>kapai'</i>	stresszfüggő autofágia induktor előalakjának aktivációja
<i>kipai</i>	az autofágia induktor fehérjék előalakjának háttér-inaktivációja
<i>kipai'</i>	AUCO-függő autofágia induktor előalakjának inaktivációja
<i>kipai''</i>	mTORC1-függő autofágia induktor előalakjának inaktivációja
<i>kipai'''</i>	DEATH-függő autofágia induktor előforma inaktiváció
<i>kaai</i>	pAUIIN-függő autofágia induktor fehérjék aktivációja
<i>kiai</i>	az autofágia induktor fehérjék háttér-inaktivációja
<i>kiai'</i>	mTORC1-függő autofágia induktor fehérje-inaktiváció
<i>JAUIIN</i>	az autofágia induktor fehérjék Michaelis-konstansa
<i>kamtor</i>	az mTORC1 háttéraktivációja
<i>kamtor'</i>	stresszfüggő mTORC1-aktiváció
<i>kamtor''</i>	DEATH-függő mTORC1-aktiváció
<i>kimtor</i>	az mTORC1 háttér-inaktivációja
<i>kimtor'</i>	AUIN-függő mTORC1-inaktiváció
<i>kimtor''</i>	AUCO-függő mTORC1-inaktiváció

<i>kaax</i>	az autofágiát aktiváló komplex háttéraktivációja
<i>kaax'</i>	AUCO-függő autofágiát aktiváló komplex aktivációja
<i>kaax''</i>	AUIN-függő autofágiát aktiváló komplex aktivációja
<i>kiax</i>	az autofágiát aktiváló komplex háttér-inaktivációja
<i>kiax'</i>	mTORC1-függő autofágiát aktiváló komplex inaktivációja
<i>kiax''</i>	DEATH-függő autofágiát aktiváló komplex inaktivációja
<i>JAUEX</i>	az autofágiát aktiváló komplex Michaelis-konstansa
<i>kade</i>	a sejthalál háttéraktivációja
<i>kade'</i>	AUCO-függő sejthalál aktiváció
<i>kade''</i>	Stresszfüggő sejthalál aktiváció
<i>kade'''</i>	mTORC1-függő sejthalál aktiváció
<i>kide</i>	a sejthalál háttér-inaktivációja
<i>kide'</i>	autofágia-függő sejthalál inaktiváció
<i>Jdea</i>	a sejthalál Michaelis-konstansa

# kezdeti beállítások

init AUCO=1.3381e-005, pAUIN=0.0717, AUIN=0.0382, mTOR=0.6370,  
AUEX=0.0019, DEATH=0.0044

# differenciálegyenletek

# az AUCO jelöli az autofágia szabályozó fehérjék aktív formáját

$$\text{AUCO}' = (\text{kaac} + \text{kaac}' * \text{AUIN}) * (\text{AUCOT} - \text{AUCO}) / (\text{JAUCO} + \text{AUCOT} - \text{AUCO}) - (\text{kiaac} + \text{kiaac}' * \text{mTOR}) * \text{AUCO} / (\text{JAUCO} + \text{AUCO})$$

# a pAUIN jelöli az autofágia induktor fehérjék aktív, előformáját

$$\text{pAUIN}' = (\text{kapai} + \text{kapai}' * \text{stress} / (1 + \text{stress})) * (\text{pAUINT} - \text{pAUIN}) - (\text{kipai} + \text{kipai}' * \text{AUCO} + \text{kipai}'' * \text{mTOR} + \text{kipai}''' * \text{DEATH}) * \text{pAUIN}$$

# az AUIN jelöli az autofágia induktor fehérjék aktív formáját

$$\text{AUIN}' = \text{kaai} * \text{pAUIN} * (\text{AUINT} - \text{AUIN}) / (\text{JAUIN} + \text{AUINT} - \text{AUIN}) - (\text{kiai} + \text{kiai}' * \text{mTOR}) * \text{AUIN} / (\text{JAUIN} + \text{AUIN})$$

# az mTOR jelöli az mTORC1 komplex aktív formáját

$$\text{mTOR}' = (\text{kamtor} + \text{kamtor}' * \text{stress} / (1 + \text{stress}) + \text{kamtor}'' * \text{DEATH}) * (\text{mtoT} - \text{mTOR}) - (\text{kimtor} + \text{kimtor}' * \text{AUIN} + \text{kimtor}'' * \text{AUCO}) * \text{mTOR}$$

# az AUEX jelöli az aktív autofágiát aktiváló komplex géneket; feltételezzük, hogy az autofágiát aktiváló komplex aktív, akkor az autofágia is aktív

$$\text{AUEX}' = (\text{kaax} + \text{kaax}' * \text{AUCO} + \text{kaax}'' * \text{AUIN}) * (\text{AUEXT} - \text{AUEX}) / (\text{JAUEX} + \text{AUEXT} - \text{AUEX}) - (\text{kiax} + \text{kiax}' * \text{mTOR} + \text{kiax}'' * \text{DEATH}) * \text{AUEX} / (\text{JAUEX} + \text{AUEX})$$

```

# a DEATH jelöli a sejthalál aktiválódást a sejtben
DEATH' =(kade + kade'*AUCO + kade"*stress + kade'"*mTOR)*(1-
DEATH)/(Jdea + 1-DEATH) - (kide + kide'*AUEx)*DEATH/(Jdea + DEATH)

# paraméterek
# az intenzív ER-stressz szimulációja: stress=7.5
# a GADD34-hiány szimulációja: AUIT=0.1
# az EGCG-/a resveratrol-előkezelés szimulációja: kaai=50, kimtor=50
# az EGCG-kezelés szimulációja intenzív ER-stressz esetén: kaai=50,
kimtor=50, stress=5
# GADD34 hiány esetén az EGCG-kezelés szimulációja intenzív ER-
stresszel kombinálva: kaai=50, kimtor=50, stress=5, AUIT=0.1
p stress=0
p kaac=0.05, kaac'=2, kiac=0.01, kiac'=15, JAUCO=0.001, AUCOT=1
p kapai=0.02, kapai'=1, kipai=0.25, kipai'=20, kipai"=0, kipai'"=2,
pAUIT=1
p kaai=7.5, kiai=1.5, kiai'=2, AUINT=1, JAUIIN=0.2
p kamtor=0.05, kamtor'=0.03, kamtor"=0.3, kimtor=0.01, kimtor'=0.5,
kimtor"=10, mtoT=1
p kaax=0.075, kaax'=0.15, kaax"=2, kiax=0.1, kiax'=20, kiax"=20,
AUExT=1, JAUEX=0.2
p kade=0, kade'=0.5, kade"=0.05, kade'"=0.005, kide=0.01, kide'=30,
Jdea=0.1

done

```

## 7. melléklet

*Az AMPK, az mTORC1, az ULK1 és az autofágia aktivitásának változása különböző kezelések hatására*

*11. táblázat Irodalmi adatok az AMPK, az mTORC1, az ULK1 és az autofágia aktivitásának változására. Az ATG az autofágiát jelöli a táblázatban.*

KEZELÉS	MÁR PUBLIKÁLT ADATOK				REFERENCIÁK
	mTORC1	AMPK	ULK1	ATG	
+ RAPAMYCIN	inaktív	aktív	aktív	aktív	1, 2
+ RESVERATROL	inaktív	aktív	aktív	aktív	3, 4, 5, 6, 7
+ ÉHEZÉS	inaktív	aktív	aktív	aktív	8, 9, 10, 11, 12, 13
+ ULK1 CSENDESÍTÉS	aktív	inaktív	inaktív	inaktív	14, 15, 16
+ ULK1 CSENDESÍTÉS + RAPAMYCIN	inaktív	inaktív	inaktív	inaktív	15, 17, 18, 19
+ ULK1 CSENDESÍTÉS + RESVERATROL	nincs adat	nincs adat	inaktív	nincs adat	nincs adat
+ ULK1 CSENDESÍTÉS + ÉHEZÉS	inaktív	aktív	inaktív	inaktív	11, 15, 16, 20, 21
+ TSC1/2 CSENDESÍTÉS	aktív	inaktív	inaktív	inaktív	11, 22, 23, 24, 26, 27
+ TSC1/2 CSENDESÍTÉS+ RAPAMYCIN	inaktív	aktív	aktív / inaktív	aktív	22, 23, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 32
+ TSC1/2 CSENDESÍTÉS + RESVERATROL	aktív	nincs adat	nincs adat	inaktív	28, 33, 34, 35
+ TSC1/2 CSENDESÍTÉS + ÉHEZÉS	aktív	inaktív	aktív (Ser317) / inaktív (Ser777)	inaktív	11, 23, 24, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42
+ COMPOUND C	aktív	inaktív	inaktív	inaktív (aktív)	4, 11, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49
+ COMPOUND C + RAPAMYCIN	inaktív	inaktív	nincs adat	aktív	48
+ COMPOUND C + RESVERATROL	aktív	inaktív	inaktív	inaktív	44, 50, 51, 52, 53, 54, 55
+ COMPOUND C + ÉHEZÉS	aktív	inaktív	inaktív	inaktív	11, 56, 57, 58

1. Campos T, et al. Rapamycin requires AMPK activity and p27 expression for promoting autophagy-dependent Tsc2-null cell survival. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Jun; 1863:1200-7. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.03.009



2. Whang YM, et al. Rapamycin enhances growth inhibition on urothelial carcinoma cells through LKB1 deficiency-mediated mitochondrial dysregulation. *J Cell Physiol.* 2018 Dec 13. doi: 10.1002/jcp.27979.
3. Zang M, et al. Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes.* 2006 Aug;55(8):2180-91.
4. Yingying Fan, et al. Resveratrol induces autophagy-dependent apoptosis in HL-60 cells. *BMC Cancer.* 2018; 18: 581. doi: 10.1186/s12885-018-4504-5.
5. Gu J, et al. Resveratrol-induced autophagy promotes survival and attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Int Immunopharmacol.* 2016 Mar;32:1-7. doi: 10.1016/j.intimp.2016.01.002.
6. Kueck A, et al. Resveratrol inhibits glucose metabolism in human ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol.* 2007 Dec;107(3):450-7.
7. Dohyun Park, et al. Resveratrol induces autophagy by directly inhibiting mTOR through ATP competition. *Sci Rep.* 2016; 6: 21772. doi: 10.1038/srep21772.
8. Shi C, et al. Ambra1 modulates starvation-induced autophagy through AMPK signaling pathway in cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Sep 26;452(3):308-14. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.017.
9. Murata Y, et al. Knockdown of AMPK $\alpha$  decreases ATM expression and increases radiosensitivity under hypoxia and nutrient starvation in an SV40-transformed human fibroblast cell line, LM217. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Jan 22;495(4):2566-2572. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.141.
10. Desgeorges MM, et al. Post-transcriptional regulation of autophagy in C2C12 myotubes following starvation and nutrient restoration. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014 Sep;54:208-16. doi: 10.1016/j.biocel.2014.07.008.
11. Kim J, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 2011 Feb;13(2):132-41. doi: 10.1038/ncb2152.
12. Pyo KE, et al. ULK1 O-GlcNAcylation Is Crucial for Activating VPS34 via ATG14L during Autophagy Initiation. *Cell Rep.* 2018 Dec 4;25(10):2878-2890.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2018.11.042.
13. Murata Y, et al. Knockdown of AMPK $\alpha$  decreases ATM expression and increases radiosensitivity under hypoxia and nutrient starvation in an SV40-transformed

- human fibroblast cell line, LM217. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Jan 22;495(4):2566-2572. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.141.
14. Hongxi Chen, et al. Downregulation of ULK1 by microRNA-372 inhibits the survival of human pancreatic adenocarcinoma cells. *Cancer Sci.* 2017 Sep; 108(9): 1811–1819. doi: 10.1111/cas.13315.
  15. Löffler AS, et al. Ulk1-mediated phosphorylation of AMPK constitutes a negative regulatory feedback loop. *Autophagy.* 2011 Jul;7(7):696-706.
  16. Daniel F. Egan, et al. Small molecule inhibition of the autophagy kinase ULK1 and identification of ULK1 substrates. *Mol Cell.* 2015 Jul 16; 59(2): 285–297. doi: 10.1016/j.molcel.2015.05.031.
  17. Chang Hwa Jung, et al. ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery. *Mol Biol Cell.* 2009 Apr 1; 20(7): 1992–2003. doi: 10.1091/mbc.E08-12-1249.
  18. Honda S, et al. Ulk1-mediated Atg5-independent macroautophagy mediates elimination of mitochondria from embryonic reticulocytes. *Nat Commun.* 2014 Jun 4;5:4004. doi: 10.1038/ncomms5004.
  19. Zhang Y, et al. Cartilage-specific deletion of mTOR upregulates autophagy and protects mice from osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2015 Jul;74(7):1432-40. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204599.
  20. Giulia Allavena, et al. Suppressed translation and ULK1 degradation as potential mechanisms of autophagy limitation under prolonged starvation *Autophagy.* 2016; 12(11): 2085–2097. doi: 10.1080/15548627.2016.1226733
  21. Fiona McAlpine, et al. Regulation of nutrient-sensitive autophagy by uncoordinated 51-like kinases 1 and 2. *Autophagy.* 2013 Mar 1; 9(3): 361–373. doi: 10.4161/auto.23066.
  22. Li H, et al. Suppression of the mTORC1/STAT3/Notch1 pathway by activated AMPK prevents hepatic insulin resistance induced by excess amino acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014 Jan 15;306(2):E197-209. doi: 10.1152/ajpendo.00202.2013.
  23. Wang Y, et al. MTOR inhibition attenuates DNA damage and apoptosis through autophagy-mediated suppression of CREB1. *Autophagy.* 2013 Dec;9(12):2069-86. doi: 10.4161/auto.26447.

24. Puente C, et al. Nutrient-regulated Phosphorylation of ATG13 Inhibits Starvation-induced Autophagy. *J Biol Chem.* 2016 Mar 11;291(11):6026-35. doi: 10.1074/jbc.M115.689646.
25. Hartleben G, et al. Tuberous sclerosis complex is required for tumor maintenance in MYC-driven Burkitt's lymphoma. *EMBO J.* 2018 Nov 2;37(21). pii: e98589. doi: 10.15252/embj.201798589.
26. Kim M, Lee JH. Identification of an AMPK phosphorylation site in *Drosophila* TSC2 (gigas) that regulate cell growth. *Int J Mol Sci.* 2015 Mar 27;16(4):7015-26. doi: 10.3390/ijms16047015.
27. Habib SL, et al. Novel mechanism of reducing tumourigenesis: upregulation of the DNA repair enzyme OGG1 by rapamycin-mediated AMPK activation and mTOR inhibition. *Eur J Cancer.* 2010 Oct;46(15):2806-20. doi: 10.1016/j.ejca.2010.06.117.
28. Alayev A, et al. Resveratrol prevents rapamycin-induced upregulation of autophagy and selectively induces apoptosis in TSC2-deficient cells. *Cell Cycle.* 2014;13(3):371-82. doi: 10.4161/cc.27355.
29. Feng Y, Wu L. mTOR up-regulation of PFKFB3 is essential for acute myeloid leukemia cell survival. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Feb 5;483(2):897-903. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.031.
30. McMahon J, et al. Impaired autophagy in neurons after disinhibition of mammalian target of rapamycin and its contribution to epileptogenesis. *Neurosci.* 2012 Nov 7;32(45):15704-14. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2392-12.2012.
31. Pan H, et al. Sustained activation of mTORC1 in macrophages increases AMPK $\alpha$ -dependent autophagy to maintain cellular homeostasis. *BMC Biochem.* 2016 Jul 7;17(1):14. doi: 10.1186/s12858-016-0069-6.
32. Castets P, et al. Sustained activation of mTORC1 in skeletal muscle inhibits constitutive and starvation-induced autophagy and causes a severe, late-onset myopathy. *Cell Metab.* 2013 May 7;17(5):731-44. doi: 10.1016/j.cmet.2013.03.015.
33. García-Aguilar A, et al. 006. TSC2 N-terminal lysine acetylation status affects to its stability modulating mTORC1 signaling and autophagy. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Nov;1863(11):2658-2667. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.08.
34. Alayev A, et al. Combination of Rapamycin and Resveratrol for Treatment of Bladder Cancer. *J Cell Physiol.* 2017 Feb;232(2):436-446. doi: 10.1002/jcp.25443.

35. Liu M, et al. Resveratrol inhibits mTOR signaling by promoting the interaction between mTOR and DEPTOR. *Biol Chem.* 2010 Nov 19;285(47):36387-94. doi: 10.1074/jbc.M110.169284.
36. Yongqiang Chen, et al. Hyperactivation of Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) Promotes Breast Cancer Progression through Enhancing Glucose Starvation-induced Autophagy and Akt Signaling. *J Biol Chem.* 2014 Jan 10; 289(2): 1164–1173. doi: 10.1074/jbc.M113.526335.
37. Thiebold AL, et al. Mammalian target of rapamycin complex 1 activation sensitizes human glioma cells to hypoxia-induced cell death. *Brain.* 2017 Oct 1;140(10):2623-2638. doi: 10.1093/brain/awx196.
38. Demetriades C, et al. Regulation of TORC1 in response to amino acid starvation via lysosomal recruitment of TSC2. *Cell.* 2014 Feb 13;156(4):786-99. doi: 10.1016/j.cell.2014.01.024.
39. Chen Y, et al. Hyperactivation of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) promotes breast cancer progression through enhancing glucose starvation-induced autophagy and Akt signaling. *J Biol Chem.* 2014 Jan 10;289(2):1164-73. doi: 10.1074/jbc.M113.526335.
40. Ng S, et al. Impaired autophagy due to constitutive mTOR activation sensitizes TSC2-null cells to cell death under stress. *Autophagy.* 2011 Oct;7(10):1173-86. doi: 10.4161/auto.7.10.16681.
41. Lee CH, et al. Constitutive mTOR activation in TSC mutants sensitizes cells to energy starvation and genomic damage via p53. *EMBO J.* 2007 Nov 28;26(23):4812-23.
42. Gao X, et al. Nat Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. *Cell Biol.* 2002 Sep;4(9):699-704.
43. Wang XH, et al. Lipopolysaccharide induces autophagy by targeting the AMPK-mTOR pathway in Human Nasal Epithelial Cells. *Biomed Pharmacother.* 2017 Dec;96:899-904. doi: 10.1016/j.biopha.2017.12.011.
44. Song J, et al. Resveratrol reduces intracellular reactive oxygen species levels by inducing autophagy through the AMPK-mTOR pathway. *Front Med.* 2018 Dec;12(6):697-706. doi: 10.1007/s11684-018-0655-7.

45. Cheruiyot A, et al. Compound C inhibits nonsense-mediated RNA decay independently of AMPK. *PLoS One*. 2018 Oct 5;13(10):e0204978. doi: 10.1371/journal.pone.0204978. eCollection 2018.
46. Song Y, et al. AMPK activation-dependent autophagy compromises oleanolic acid-induced cytotoxicity in human bladder cancer cells. *Oncotarget*. 2017 Jul 4;8(40):67942-67954. doi: 10.18632/oncotarget.18980.
47. Jang JE, et al. AMPK-ULK1-Mediated Autophagy Confers Resistance to BET Inhibitor JQ1 in Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. *Clin Cancer Res*. 2017 Jun 1;23(11):2781-2794. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1903.
48. Zhao X, et al. Compound C induces protective autophagy in human cholangiocarcinoma cells via Akt/mTOR-independent pathway. *J Cell Biochem*. 2018 Jul;119(7):5538-5550. doi: 10.1002/jcb.26723.
49. Sun L, et al. Shear Stress Induces Phenotypic Modulation of Vascular Smooth Muscle Cells via AMPK/mTOR/ULK1-Mediated Autophagy. *Cell Mol Neurobiol*. 2018 Mar;38(2):541-548. doi: 10.1007/s10571-017-0505-1.
50. Ido Y, et al. Acute activation of AMP-activated protein kinase prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced premature senescence in primary human keratinocytes. *PLoS One*. 2012;7(4):e35092. doi: 10.1371/journal.pone.0035092.
51. Gu J, et al. Resveratrol-induced autophagy promotes survival and attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Int Immunopharmacol*. 2016 Mar;32:1-7. doi: 10.1016/j.intimp.2016.01.002.
52. Vingtdoux V, et al. AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid-beta peptide metabolism. *J Biol Chem*. 2010 Mar 19;285(12):9100-13. doi: 10.1074/jbc.M109.060061.
53. Fan Y, et al. Resveratrol induces autophagy-dependent apoptosis in HL-60 cells. *BMC Cancer*. 2018 May 22;18(1):581. doi: 10.1186/s12885-018-4504-5.
54. Yu Y, et al. Resveratrol Suppresses Matrix Metalloproteinase-2 Activation Induced by Lipopolysaccharide in Mouse Osteoblasts via Interactions with AMP-Activated Protein Kinase and Suppressor of Cytokine Signaling 1. *Molecules*. 2018 Sep 12;23(9). pii: E2327. doi: 10.3390/molecules23092327.

55. Liu Y, et al. Resveratrol inhibits the proliferation and induces the apoptosis in ovarian cancer cells via inhibiting glycolysis and targeting AMPK/mTOR signaling pathway. *J Cell Biochem.* 2018 Jul;119(7):6162-6172. doi: 10.1002/jcb.26822.
56. Oh TS, et al. Hypothalamic AMPK-induced autophagy increases food intake by regulating NPY and POMC expression. *Autophagy.* 2016 Nov;12(11):2009-2025.
57. Li L, et al. Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation. *Cell Signal.* 2013 Jan;25(1):50-65. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.09.020.
58. Ching JK, et al. A role for AMPK in increased insulin action after serum starvation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010 Nov;299(5):C1171-9. doi: 10.1152/ajpcell.00514.2009.

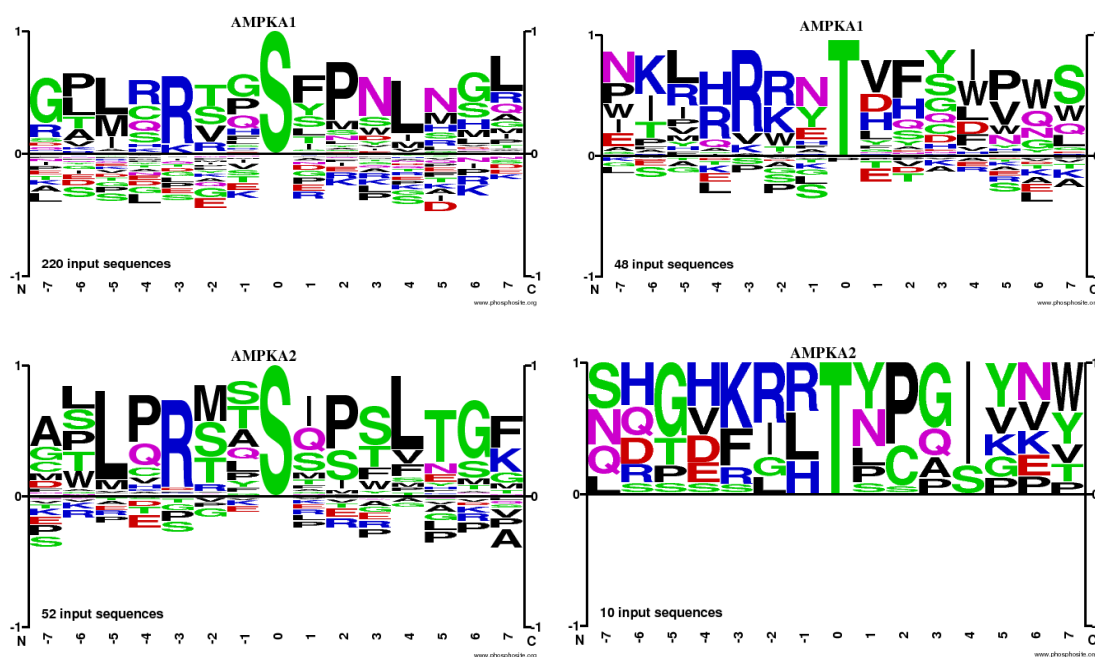
## 8. melléklet

*AMPK foszforilációs helyek keresése az ULK1 fehérjével kölcsönhatásba kerülő fehérjéken elméleti módszerek segítségével*

Az ULK1 fehérjével kapcsolatba kerülő fehérjéket a következő, ingyenesen elérhető adatbázisok segítségével gyűjtöttük ki:

- BioGrid (<https://thebiogrid.org/>),
- DIP (<https://dip.doe-mbi.ucla.edu/dip/Main.cgi>),
- MINT (<https://mint.bio.uniroma2.it/>),
- InnateDB (<https://www.innatedb.com/>),
- IntAct (<https://www.ebi.ac.uk/intact/>).

A táblázat első két oszlopában található a kigyűjtött kölcsönható partnerek, és az ezeket leíró referenciák (12. táblázat, Interaktor, Referencia oszlop).



*1. ábra. Az AMPK konszenzus foszforilációs motívumai. A felső sorban az AMPK1 (PRKAA1 gén) konszenzus szerin és treonin foszforilációs motívumai, az alsó sorban az AMPK2 (PRKAA2 gén) konszenzus szerin és treonin foszforilációs motívumai láthatók. Minél nagyobb egy adott betű az adott pozícióban, annál nagyobb a valószínűsége, hogy ott az adott aminosav található meg.*

Ezt követően a talált kölcsönható fehérjék szekvenciáiban potenciális AMPK foszforilációs helyeket kerestünk a Group-based Prediction System 5.0-val (<http://gps.biocuckoo.cn/>).

A fehérjék szekvenciáit az UniProt adatbázisból töltöttük le (<https://www.uniprot.org/>). A küszöbérték magas volt a foszforilációs hely keresésekor. A táblázat a szerin és treonin aminosavak pozícióját, a peptidszekvenciát a szerin és treonin aminosavak környékén, és a jóslás pontszámát tartalmazza. A jóslás pontszámát a GPS algoritmus kalkulálja az adott foszforilációs hely értékeléséhez. Minél nagyobb ez a pontszám, annál inkább lehetséges foszforilációs hely az adott aminosav (<http://gps.biocuckoo.cn/>) (12. táblázat).

A talált foszforilációs helyeket ezután a NetPhos 3.1 segítségével ellenőriztük (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>). Azokat a foszforilációs helyeket jelöltük, ahol a foszforilációt végző kináz ismeretlen volt (ez a NetPhos oszlop a táblázatban). Ha a predikció értéke 0,5 feletti az adott pozícióra, akkor az nagy valószínűséggel ténylegesen is egy foszforilációs hely (12. táblázat).

A foszforilációs helyeket ezenkívül a PhosphositePlus segítségével is ellenőriztük (<https://www.phosphosite.org/homeAction.action>). Ez az adatbázis tartalmazza az AMPK konszenzus foszforilációs szekvenciáját, amit több, már ismert foszforilációs motívumának felhasználásával állítottak össze (1. ábra). A konszenzus foszforilációs szekvenciával megegyező aminosavakat a peptidszakaszban pirossal jelöltük (12. táblázat, a peptid szakasz oszlopban).



12. táblázat AMPK foszforilációs hely keresés az ULK1 fehérjével kölcsönható fehérjék szekvenciáiban.

Interaktor	Referencia	AMPK foszforilációs hely				NetPhos
		Pozíció	Amino-sav	Peptid szakasz	Érték	Érték ismeretlen kináz esetén
SDCBP	Tomoda et al, 2004	88	S	QLVARPSSINYMVAP	14,028	
		88	S	QLVARPSSINYMVAP	66,738	
		145	S	VQLVQANSPASLVGL	58,233	
		263	T	DILSTSGTVVTITIM	66,858	
PRKAA2/A MPK2	Behrends et al, 2010	338	S	RRIMNQASEFY Lass	13,204	0,995
		410	S	HLGIRSQSKPYDIMA	12,914	
		483	S	VVEQRSGSSTPQRSC	12,722	
		491	S	STPQRSCSAAGLHRP	16,446	
		500	S	AGLHRPRSSFSTTA	12,988	
		491	S	STPQRSCSAAGLHRP	63,602	
		172	T	SDGEFLRTSCGSPNY	65,004	
		348	S	YLASSPPGSGFMDDS	57,736	
511	S	STTAESHLSGSLTG	58,6	0,982		
PPP1CA	Esteves et al, 2012 Pyo et al, 2018	22	S	RLLEVQGS RPKNVQ	14,516	
		22	S	RLLEVQGS RPKNVQ	74,086	
MAP1LC3A	Alemu et al, 2012	-	-	-	-	-
MAP1LC3B	Alemu et al, 2012	-	-	-	-	-
MAP1LC3C	Alemu et al, 2012	93	S	YLLVNNKSLV SMSAT	64,808	
		93	S	YLLVNNKSLV SMSAT	58,465	
GABARAPL1	Alemu et al, 2012	-	-	-	-	-
GABARAPL2	Alemu et al, 2012	-	-	-	-	-

AMBRA1	Nazio et al, 2013	284	T	PSTERPRTSAYIRLR	13,434	
		612	S	SFESVPSSGSQLPPL	13,492	0,966
		684	S	QDMPEESSEEDSLRR	13,312	0,997
		740	S	QYLSRRDSIRQRSMR	17,136	0,996
		757	T	QNRLRSSTSSSSSDN	13,374	
		950	S	NAISVSLSPMGRYVM	12,996	0,964
		1169	S	AVVQREQSTTMASMG	14,09	0,956
		55	S	ELPDSPRSTFLLAFS	63,687	
		284	T	PSTERPRTSAYIRLR	67,941	
		612	S	SFESVPSSGSQLPPL	71,749	0,966
		740	S	QYLSRRDSIRQRSMR	66,558	0,996
		1211	S	SSPQPSTSRGLLPEA	64,174	0,678
		148	T	ASLAFHPTAQLLIA	69,422	
		428	S	RTVLSLNSRSEAESM	59,842	0,972
		443	S	PPRTSASSVLLSV	61,382	
		593	S	RTTPNYSSGEASSW	59,224	0,983
948	S	GPNAISVSLSPMGRY	61,124			
1097	T	LQPRNPATSVTSQGT	58,839			
1209	S	HTSSQPSTSRGLLP	59,429	0,988		
TRAF6	Nazio et al, 2013	28	S	VAMASSCSAVTKDDS	67,077	
		268	S	HLQENTQSHMRMLAQ	66,925	
		486	T	LEALRQRTFIKDDL	61,715	
RALB	Bodemann et al, 2011	182	S	EIRTKKMSENKDKNG	13,214	0,986
EXOC8 (exo84)	Bodemann et al, 2011	78	S	IETAREISYLESEMY	13,048	0,996
		151	S	GGASRDGSGPGEEGK	13,068	0,985
		416	S	KATRRAVSQLIRLQ	12,932	0,756
		333	S	EEEKVDLSMEWIQEL	68,663	0,977
		372	S	HYLEDKPSPPPVKEL	64,265	
EXOC2 (sec5)	Bodemann et al, 2011	691	S	THLSVDVSSPDLFGS	13,07	0,963
		905	S	ELLNKFSSMHLQLT	13,235	
		86	S	KSGGRGTSTVSFKLL	65,323	0,951
		691	S	THLSVDVSSPDLFGS	58,677	0,963

SQSTM1	Ro et al, 2014	24	S	AREIRRFSCCPEP	13,236	0,995
		349	S	SSKEVDPSTGELQSL	13,606	0,988
		284	S	STEEKSSQPSSCCS	63,501	0,944
		294	S	SSCCSDPSKPGGNVE	64,675	
		24	S	AREIRRFSCCPEP	69,085	0,995
ATG101	Mercer et al, 2009 Hosokawa et al, 2009	-	-	-	-	-
OCLN	McKenzie et al, 2006	69	S	PGVIRILSMLIIVMC	14,869	
		471	S	LDDYREESEEYMAAA	14,626	0,991
		471	S	LDDYREESEEYMAAA	75,274	0,991
ATG13	Li et al, 2015 Nazio et al, 2013 Hosokawa et al, 2009	265	S	TSPPSQLSSRLSYQ	71,872	0,922
MUL1	Li et al, 2015	235	S	SLLQRQESSVRLWKV	19,752	0,869
		235	S	SLLQRQESSVRLWKV	77,466	0,869
		235	S	SLLQRQESSVRLWKV	65,851	0,869
HTT (huntingtin)	Rui et al, 2015	350	S	KEMEVSPSAEQLVQV	14,978	0,978
		417	S	ESGGRSRSGSIVELI	15,878	0,824
		419	S	GGRSRSGSIVELIAG	18,337	0,996
		689	S	VHCVRLLSASFLTG	18,091	
		710	S	PDRDVRVSVKALALS	14,107	0,997
		958	S	VAVARDQSSVYLKLL	16,059	
		1347	S	GRAQRLGSSVRPGL	15,103	0,798
		2057	S	QRHQRLYLLDRFRL	13,803	0,854
		2335	T	SPERRTNTPKAISEE	13,591	0,989
		261	S	AFIANLKSSSPTIRR	64,056	
		350	S	KEMEVSPSAEQLVQV	63,942	0,978
		417	S	ESGGRSRSGSIVELI	63,832	0,824
		419	S	GGRSRSGSIVELIAG	74,006	0,996
		689	S	VHCVRLLSASFLTG	70,483	
		781	S	TLICSILSRSFHVG	67,682	
		958	S	VAVARDQSSVYLKLL	69,815	
		1399	T	DVLQKVSTQLKTNLT	64,007	
1511	S	LSYERYHSKQIIGIP	66,971	0,549		
1573	S	TQKEVVSMLLRLIQ	65,453			
1864	S	TPKRHSLSTKLLSP	64,319	0,756		
1965	S	QSRCENLSTPTMLKK	64,188			

		419	S	GGRSRSGSIVELIAG	60,768	0,996
		459	S	EDDSESRSDVSSSAL	62,002	0,966
		501	S	IITEQPRSQHTLQAD	58,103	0,735
		518	T	DLASCDLTSSATDGD	58,078	
		561	S	ASSPISDSSQTTTEG	57,625	
		1173	T	KAALPSLTNPPSLSP	60,86	
		1177	S	PSLTNPPLSPIRRK	74,373	
		1204	S	PLSPKKGSEASAASR	58,379	0,572
		1862	S	QQTPKRHLSSTKLL	63,882	0,998
		2072	S	STMQDLSLSPPPVSS	59,111	0,994
		2217	S	GDAALYQSLPTLARA	75,916	
		2409	T	LPLVNSYTRVPPLVW	58,021	
		2655	S	APSSPPTSPVNSRKH	71,185	0,996
MEFV (trim20)	Kimura et al, 2015	208	S	VRLRRNASSAGRLQG	17,006	0,855
		209	S	RLRRNASSAGRLQGL	13,124	
		638	S	DGPQRFDSQIVLGS	13,22	
		757	S	GPLQPIFSPGTRDGG	12,901	
		208	S	VRLRRNASSAGRLQG	66,872	
		209	S	RLRRNASSAGRLQGL	63,625	
		570	S	KSEFVEKSTKYFSET	64,268	
		757	S	GPLQPIFSPGTRDGG	63,676	
NLRP3	Kimura et al, 2015	265	S	YIHCREVSLVTQRSL	64,802	0,98
		428	S	GLKQQMESGKSLAQT	69,889	
		519	S	VDCEKFYSFIHMTFQ	66,391	
		169	T	VSLNKRYTRLRLIKE	58,483	
		198	S	GKTKTCESPVSPIKM	61,908	
		295	S	HKIVRKPSRILFLMD	69,057	
		970	S	TLLTSQSLRKLSLG	66,729	
TRIM21	Kimura et al, 2015	327	S	GNEERFDSYPMVLGA	67,33	
IRGM	Chauhan et al, 2015	96	S	WDLPGTGSATTTLEN	68,491	
GABARAP	Alemu et al, 2012 Okazaki et al, 2000	-	-	-	-	-

FLCN	Dunlop et al, 2014	130	S	QACVRSLSCEVCPGR	13,007	0,812
		171	S	RGFQRWYSIITIMMD	15,534	
		246	S	RSLTSLTDDNLWAC	12,962	
		573	T	MSTVRSPTASESRN*	14,322	
		491	T	NKIEAALTNQNLSD	65,147	
		532	T	DSRPKEDTQKLLSIL	64,13	
NEDD4L	Nazio et al, 2016	127	T	PTMERPYTFKDFLLR	13,906	0,962
		342	S	SSRLRSCVTDVAE	16,143	0,997
		446	S	PQIRRPRLSSPTVT	13,228	0,995
		448	S	IRRPRLSSPTVTL	16,143	
		941	T	EKLPRAHTCFNRLDL	14,267	
		127	T	PTMERPYTFKDFLLR	65,432	0,962
		137	S	DFLLRPRSHKSRVKG	69,912	0,993
		342	S	SSRLRSCVTDVAE	73,903	0,997
		446	S	PQIRRPRLSSPTVT	63,639	0,995
		446	S	PQIRRPRLSSPTVT	58,537	0,995
		769	T	WILENDPTELDLMFC	57,965	
BIRC2 (ciap1)	Mukhopadhyay et al, 2016	500	T	HDIIKQKTQIPLQAR	12,784	0,753
		580	S	VCMDKEVSVVFIPCG	13,305	
		174	T	EDISSRTNPYSYAM	65,8	
		580	S	VCMDKEVSVVFIPCG	64,358	
		14	S	QRLFPGPSYQNIKSI	59,293	
		157	S	SGSYSLSNPPLNSR	57,583	
500	T	HDIIKQKTQIPLQAR	76,211			
CCDC53	Huttlin et al, 2017	191	S	ESSDSESSFSD****	65,972	0,991
		11	S	DGLPLMGSGIDLTKV	60,072	
		75	S	ILDAKLSSIPGLDDV	63,391	
TRIM16	Chauhan et al, 2016	-	-	-	-	-
TRIM25	Choudhury et al, 2017	158	S	DLLRRKCSQHNRLRE	15,79	0,87
		286	S	QILLKKKSEIQLKE	57,811	
		429	S	AAAKATSSHPNSTSL	57,85	
ATG16L1	Li et al, 2017	265	T	RAISRAATKRLSQPA	13,841	0,974
		289	S	IFGRRSVSFPVPQD	12,854	0,804
		265	T	RAISRAATKRLSQPA	69,289	0,974
		590	S	VAWSPSGSHVSVDK	64,01	
		370	T	SGSNAGITSIEFDSA	62,38	0,619

NEDD4	Pei et al, 2017	76	S	QERSSVPSEENVNKK	13,539	0,95
		232	S	EIFSRSTSTDPFVQD	14,651	0,989
		265	S	IPLKRYSSLVIFPRS	13,755	
		280	S	PSTTRPTSPTSLECTL	14,099	0,998
		349	S	RPLHRKGSLLQKKIVL	15,743	
		444	S	GELERPHSQMNKNHG	15,172	0,932
		458	S	GILRRSISLGGAYPN	14,548	0,865
		508	T	RDSNRDCTNELSNSC	13,231	
		544	T	PRLERPYPYFKDFVLH	15,6	0,962
		1285	T	EKLPRAHTCFNRLDL	15,215	
		1297	S	LDLPPYSEFEELWDK	12,773	0,744
		265	S	IPLKRYSSLVIFPRS	64,206	
		280	S	PSTTRPTSPTSLECTL	65,473	0,998
		349	S	RPLHRKGSLLQKKIVL	70,342	
		402	S	GDCKPEMSEIKLNSD	65,923	
		458	S	GILRRSISLGGAYPN	64,307	0,865
		783	S	KQDERGRSYYVDHNS	63,908	0,987
		16	T	FAARRSNTYPLESETS	65,568	
		56	T	MKLTPRQTALAPLIK	58,034	0,592
		265	S	IPLKRYSSLVIFPRS	61,71	
420	S	IKLMHRTSACLPSQ	60,69			
544	T	PRLERPYPYFKDFVLH	58,219	0,962		
1250	S	LQFVTGTSRVPMNGF	57,402			
BECN1	Chauhan et al, 2015 Park et al, 2016 Pei et al, 2017	43	T	RVTIQELTAPLLTTA	64,961	
SESN2	Ro et al, 2014 Kumar et al, 2018	294	S	FELEKSELLVTPSA	68,432	
PP2A	Wong et al, 2015	167	S	MDLMVEASPRRIFAN	12,735	0,971
		194	S	SDYETYLSADDLRIN	64,07	0,985

OGT	Pyo et al, 2018	20	S	EPTKRMLSFQGLAEL	16,184	0,929
		20	S	EPTKRMLSFQGLAEL	68,551	0,929
		325	T	TALRLCPHADSLNN	62,376	
		491	S	ERMKKLVSIADQLE	60,755	
		770	T	DNADSSNTALNMPV I	57,968	-
E2F4	Polager et al, 2008	161	S	LLAIRAPSGTSLEVP	14,553	0,989
		161	S	LLAIRAPSGTSLEVP	60,999	0,989
		301	S	LDTRPLQSSALLDSS	61,733	
		313	S	DSSSSSSSSSSSN	57,436	0,99
		316	S	SSSSSSSSSSNSNS	61,89	0,988
321	S	SSSSSNNSSSSSG	57,443	0,963		
USP10	Behrends et al, 2010	76	S	DTLPRTPSYSISSTL	15,758	
		674	T	VEISRRVTLEKLPPV	15,015	0,953
		35	S	SVELPPYSGTVLCGT	68,183	
		76	S	DTLPRTPSYSISSTL	64,269	
		674	T	VEISRRVTLEKLPPV	66,781	0,953
172	S	DGGDDSTEALVNG	73,767	0,984		
PRKAB2	Behrends et al, 2010	108	S	TKIPLIKSHNDFVAI	13,193	0,914
		204	S	RSEERFKSPILPPH	15,211	0,913
		249	S	YALSIKDSVMVLSAT	13,491	
		177	S	SMESETSCRDLSSS	72,643	0,996
		182	S	ETSCRDLSSPPGPY	69,145	0,96
PRKAA1	Behrends et al, 2010	415	S	HLGIRSQSRPNDIMA	14,281	0,943
		496	S	ATPQRSGVSNYRSC	13,359	0,995
		508	S	RSCQRSDDAEAQG K	17,644	0,991
		496	S	ATPQRSGVSNYRSC	64,289	0,995
		183	T	SDGEFLRTSCGSPNY	61,357	
415	S	HLGIRSQSRPNDIMA	61,644	0,943		
SYNGAP1	Tomoda et al, 2004	87	S	KLLRRTVSPVEGRP	14,854	
		109	S	LGRSRRKSPGGKQY	15,647	0,998
		117	S	VPGGKQYMEGAPA A	13,312	0,98
		146	S	SSIKRTKQPKLDRT	17,801	0,993
		155	S	PKLDRTSFRQILPR	16,448	0,874
		302	S	TSKPRSASGDTVFW G	13,25	0,796
		590	S	DIADRLIASLFLRF	14,507	
		690	S	IDLGRELTLLHALLW	14,315	
		842	S	LSVNKVSMLDLQG D	13,787	0,973

		859	S	GGRLN <b>SSV</b> SNLAAV	13,049	0,879
		1023	S	DFTRRQL <b>SL</b> QDNLQH	14,363	0,997
		1088	S	AQKPRP <b>SSGN</b> LLQSP	15,915	
		109	S	LGR <b>SRRK</b> SVGGKQY	69,873	0,998
		139	S	FLSRRL <b>KSS</b> IKRTKS	66,886	0,946
		146	S	<b>SSIKRTK</b> SQPKLDRT	74,971	0,993
		155	S	PKLDRT <b>SSFR</b> QILPR	66,47	0,874
		678	S	DTLTN <b>SSS</b> FEGYIDL	63,618	
		859	S	GGRLN <b>SSV</b> SNLAAV	64,888	0,879
		1023	S	DFTRRQL <b>SL</b> QDNLQH	66,758	0,997
		1088	S	AQKPRP <b>SSGN</b> LLQSP	68,034	
		109	S	LGR <b>SRRK</b> SVGGKQY	71,321	0,998
		146	S	<b>SSIKRTK</b> SQPKLDRT	59,488	0,993
		182	S	QSFKE <b>SHS</b> HELLSP	59,323	0,995
		765	S	YMMRDLN <b>SSID</b> LQSF	74,362	0,953
		1088	S	AQKPRP <b>SSGN</b> LLQSP	60,717	
ATG4B	Behrends et al, 2010	121	S	AFIDRKD <b>SYYS</b> IHQI	15,153	0,996
		262	S	VIGG <b>KPN</b> SAHYFIGY	13,497	
		22	T	EFEDFP <b>ETSE</b> PVWIL	65,93	0,849
		48	S	EILSD <b>VASRL</b> WFTYR	63,822	
		160	T	KKLAV <b>FDTW</b> SSLAVH	63,58	
		309	S	QHPPCR <b>MSIAE</b> LDPS	58,995	0,99
RB1CC1 / FIP200	Jung et al, 2009	658	S	<b>ASSPR</b> MESTAGITTT	14,08	0,755
	Behrends et al, 2010	1372	S	KDL <b>IESL</b> EDRARLL	12,83	0,929
	Nazio et al, 2013	1436	S	ADEGR <b>VDS</b> AMETSM	13,104	0,994
		238	T	KAEM <b>KRST</b> ELVLSPD	66,126	
		824	T	EDL <b>CHFRT</b> FVQKEQC	71,039	
		1396	S	VSKL <b>RSS</b> FVSPYV	63,554	0,976
		637	S	QTIT <b>DLL</b> EQKASVS	60,121	
		670	T	TTTT <b>SPRT</b> PPPLTVQ	59,841	
		1394	S	EEVSKL <b>RSS</b> FVSP	58,694	
		1532	S	PTLYFL <b>HSE</b> LPALD	62,359	
CDC37	Behrends et al, 2010	19	T	VSDDE <b>DETH</b> PNIDTA	63,674	
		150	T	VRE <b>QKHKT</b> FVEKEYEK	65,076	
MLST8	Dunlop et al, 2011	-	-	-	-	-
G3BP1	Behrends et al, 2010	162	T	<b>EPEER</b> QQTPEVVPDD	14,774	0,993
		232	S	EDA <b>QKSS</b> PAPADIA	12,897	0,993
		286	S	<b>ASQPR</b> PESKPEIQIP	14,444	0,989



		373	S	VVELRINSGGKLPNF	14,294	
		149	S	VTEPQEESEEEVEEP	68,136	0,989
		162	T	EPEERQQTPEVVPDD	69,493	0,993
		232	S	EDAQKSSSPAPADIA	71,164	0,993
		250	S	QEDLRTFSWASVTSK	64,192	
PRKAG1	Behrends et al, 2010	211	T	IAMVRTTTPVYVALG	13,712	0,979
		125	S	REVYLQDSFKPLVCI	65,419	0,84
FEZ1	McKnight et al, 2012	228	S	YEGLRHMSSGSELTEL	13,056	0,992
		316	S	QMPLKRFSMEGINSNI	13,273	0,996
		228	S	YEGLRHMSSGSELTEL	69,455	0,992
TBC1D14	Longatti et al, 2012	91	S	VHVRKQSDSDLIPE	14,004	0,996
		128	S	EQSVRKSTFPRTGY	13,422	0,932
		441	S	KERWRSLSTGGSEVE	12,686	0,994
		158	S	SDDVSVCSVSSLGTE	66,563	
		473	T	IKLDISRTFPNLCIF	63,774	
		91	S	VHVRKQSDSDLIPE	63,809	0,996
		185	S	LDLVVTSSSAIVTL	60,277	
		531	S	ADAFIAFSNLLNKPC	60,578	
CBLB	Qin et al, 2016	437	S	DEGSRCCSIIDPFGM	14,358	0,99
		476	S	KCTDRQNSPVTSPGS	12,863	0,996
		634	S	GRHSRVGSDPVLMR K	17,125	
		800	S	SSLNRTPSDYDLLIP	17,353	0,995
		847	S	GSSSRPSSGQDLFLL	17,478	0,998
		144	T	SQDRRNLTKSLIFS	68,367	
		368	S	ELYCEMGSTFQLCKI	64,769	
		634	S	GRHSRVGSDPVLMR K	70,352	
		695	S	GPLANSLSEKTRDPV	64,036	
		785	T	LPPARPPTRDNPKHG	67	
		800	S	SSLNRTPSDYDLLIP	68,507	0,995
		847	S	GSSSRPSSGQDLFLL	69,106	0,998
		437	S	DEGSRCCSIIDPFGM	75,176	0,99
		476	S	KCTDRQNSPVTSPGS	69,907	0,996

TBC1D5	Popovic et al, 2014	44	S	KNGRRTSSTLDSEGT	13,51	0,997
		522	S	QRLMKESMPVQLNK	12,688	
		541	S	KNISSSPVESLPGG	13,921	0,996
		574	S	SNISRSRSHKTMGR	16,237	0,997
		584	S	KTMGRKESSEEELEAQ	17,335	0,998
		541	S	KNISSSPVESLPGG	65,543	0,996
		574	S	SNISRSRSHKTMGR	67,925	0,997
		584	S	KTMGRKESSEEELEAQ	73,717	0,998
		767	S	DPLMGPASASSNPS	65,754	
		44	S	KNGRRTSSTLDSEGT	59,17	0,997
		470	S	NFGRKLIPAMAPGS	61,094	0,88
		574	S	SNISRSRSHKTMGR	68,899	0,997
		759	S	VCSPLVFS DPLMGPA	57,987	
PDK1	Qin et al, 2016	410	S	GLPQRSGSNIEQYIH	13,154	0,995
		549	S	VWRQRYQSHPDAAV Q	15,461	0,998
		94	S	ILGEGSFSTVVLARE	64,902	
		398	S	SSSSHLSASDTGLP	64,868	0,996
		16	S	YDAVPIQSSVVLCS	61,359	
		22	S	QSSVVLCS CPSPMV	62,205	
		94	S	ILGEGSFSTVVLARE	57,694	
		393	S	MQVSSSSSHLSAS	63,119	0,833
PRKAB1	Behrends et al, 2010	24	S	HKTPRRDSSGGTKDG	15,978	0,998
		108	S	SKLPLTRSHNNFVAI	13,659	
		24	S	HKTPRRDSSGGTKDG	64,448	0,998
		25	S	KTPRRDSSGGTKDGD	64,318	0,986
		108	S	SKLPLTRSHNNFVAI	64,453	
C9orf72	Webster et al, 2016 Zhang et al, 2018	344	S	TAFWRATSEEDMAQD	13,604	0,997
ATG5	Nishimura et al, 2013	18	T	VWFGRIPTCFTLYQD	13,757	
		43	S	YLLPRVSYLTLVTD	59,562	
NRBF2	Behrends et al, 2010	140	T	IFDRDPD LLYLLQQ	65,252	
NIPSNAP2	Behrends et al, 2010	32	T	SLLPRLRTWTSSSNR	14,904	
		158	S	LEFRKARS DMLLSRK	13,021	
		44	S	SNRSREDSWLKSLFV	67,396	0,993
		158	S	LEFRKARS DMLLSRK	58,633	

ZFYVE1/DF CP1	Joachim et al, 2017	145	T	ETKRKKMTEKVVVSFL	12,68	0,931
		78	S	CDLCKGLSGHLPGVR	64,238	
		145	T	ETKRKKMTEKVVVSFL	68,198	
		21	S	PGLMCQESYACSGTD	62,356	
		572	S	NFMAQSVSELSLGPT	59,661	
DISC1	Sugis et al, 2019	24	S	GVSHRAGSRDCLPPA	13,413	0,987
		267	S	RCLSRPFLLATRV	15,095	0,966
		24	S	GVSHRAGSRDCLPPA	66,582	0,987
		267	S	RCLSRPFLLATRV	71,471	0,966
		285	S	AQAARNSSRPERDMH	63,822	0,99
		133	S	TRLPDRLSWPCGPGS	58,468	0,972
		211	S	SAFTSSFSFIRLSLG	69,825	0,894
		271	T	RPFLLATRVSADLA	57,449	
		285	S	AQAARNSSRPERDMH	57,621	0,99
		301	S	LPDMDPGSSSLDPS	70,121	0,922
WASHC3	Huttlin et al, 2017	191	S	ESSDSESSFSD****	65,972	0,991
		11	S	DGLPLMGSGIDLTKV	60,072	
		75	S	ILDAKLSSIPGLDDV	63,391	
ATG9a	Longatti et al, 2012	333	S	ALGARCWSLYGRCYL	13,239	
		461	T	GNAHRSQTRDEFAQL	13,831	0,988
		738	S	HRREDESGESAPDE	12,874	0,997
		761	S	QSIPRSASYPCAAPR	15,294	0,971
		799	S	GTVPRVPSHFSRLPL	13,622	
		48	S	ENLDLFFSRVYNLHQ	64,98	
		486	T	ELLSPIVTPLILIFC	70,734	
		738	S	HRREDESGESAPDE	63,7	0,997
		799	S	GTVPRVPSHFSRLPL	66,385	
		16	S	QRLEASYSDSPGEE	68,291	
		613	S	TSIQSLQSESEPLSL	73,875	0,993
		673	T	GRAHSTMTGSGVDAR	60,931	0,58
		684	S	VDARTASSGSSVWEG	58,75	

## 9. melléklet

### *További AMPK foszforilációs helyek keresése az ULK1 szekvenciájában*

Potenciális AMPK foszforilációs helyeket kerestünk az ULK1 fehérje szekvenciájában a Group-based Prediction System 5.0-val (<http://gps.biocuckoo.cn/>). A küszöbérték magas volt a foszforilációs hely keresésekor. A táblázat a szerin és treonin aminosavak pozícióját, a peptid szekvenciát a szerin és treonin aminosavak környékén, és a jóslás pontszámát tartalmazza. A jóslás pontszámát a GPS algoritmus kalkulálja az adott foszforilációs hely értékeléséhez. Minél nagyobb ez a pontszám, annál inkább lehetséges foszforilációs hely az adott aminosav (<http://gps.biocuckoo.cn/>) (13. táblázat).

A talált foszforilációs helyeket ezután a NetPhos 3.1 segítségével is ellenőriztük (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>). Azokat a foszforilációs helyeket külön jelöltük, ahol a foszforilációt végző kináz még ismeretlen (ez a NetPhos oszlop a táblázatban). Ha a predikció értéke 0,5 feletti az adott pozícióra, akkor az nagy valószínűséggel ténylegesen is egy foszforilációs hely (13. táblázat).

A foszforilációs helyeket ezen kívül a PhosphositePlus (<https://www.phosphosite.org/homeAction.action>) és az AMPK konszenzus foszforilációs motívumának segítségével is ellenőriztük. A konszenzus foszforilációs szekvenciával megegyező aminosavakat a peptidszakaszban pirossal jelöltük (a peptid szakasz oszlopban) (13. táblázat).

Azok a foszforilációs helyek, melyek az irodalomból már ismertek, lila színű háttérrel vannak megjelölve a táblázatban (13. táblázat).

13. táblázat AMPK foszforilációs helyek az ULK1 fehérje szekvenciájában

AMPK foszforilációs helyek az ULK1-en					NetPhos
Pozíció	Aminósav	Enzim	Peptid szakasz	Érték	Érték ismeretlen kináz esetén
111	S	AMPK	LHAMRTLSEDTIRLF	13,708	0,896
248	S	AMPK	PTIPRETSAPLRQLL	13,38	
467	S	AMPK	SAIRRSGSTSPLGFA	15,15	0,986
495	S	AMPK	GVLARKMSLGGGRPY	12,993	0,969
556	S	AMPK	GLGCRLHSAPNLSDL	19,661	0,806
638	S	AMPK	FDFPKTPSSQNLAL	14,11	
660	T	AMPK	MTPPRNRTLPLDSEV	13,64	
694	S	AMPK	GPFGRSFSTSRITDL	14,751	0,987
1042	S	AMPK	LCIERRLSALLTGIC	13,292	0,990
248	S	PRKAA1	PTIPRETSAPLRQLL	72,872	
317	S	PRKAA1	SHLASPPSLGEMQQL	64,086	0,732
467	S	PRKAA1	SAIRRSGSTSPLGFA	72,895	0,986
495	S	PRKAA1	GVLARKMSLGGGRPY	66,399	0,969
556	S	PRKAA1	GLGCRLHSAPNLSDL	75,749	0,806
638	S	PRKAA1	FDFPKTPSSQNLAL	63,868	
660	T	PRKAA1	MTPPRNRTLPLDSEV	65,978	
247	T	PRKAA2	VPTIPRETSAPLRQL	64,702	0,942
248	S	PRKAA2	PTIPRETSAPLRQLL	63,173	
308	S	PRKAA2	GSSSSSSTSHLASP	66,971	0,977
467	S	PRKAA2	SAIRRSGSTSPLGFA	74,548	0,986
556	S	PRKAA2	GLGCRLHSAPNLSDL	71,088	0,806
575	T	PRKAA2	PKLPKPPDPLGAVF	59,771	
716	S	PRKAA2	TQAPDPGSTESLQEK	67,98	0,893
781	S	PRKAA2	FSAGPTGSASSARH	61,959	