

**A lipidcseppek eloszlásának vizsgálata és speciális kérgi gliasejtek
anatómiai jellemzése *Drosophila melanogaster*ben**

Doktori értekezés tézisei

Kis Viktor



Biológia Doktori Iskola, iskolavezető: Prof. Erdei Anna

Molekuláris Sejt- és Neurobiológia Doktori Program, Programvezető: Dr. Juhász Gábor

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar

Témavezető: Prof. Sass Miklós

Készült:

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar

Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék

Budapest, 2016

Bevezetés

A lipid cseppek (lipid droplets, LDk) az eukarióta sejtek jellemző, és régóta ismert sejtorganelumai. Megismerésük az első fénymikroszkópok megalkotásával egy időben kezdődött, de mivel rutin szövettani módszerekkel nehezen festhetők, megismerésükben igazi áttörést csak a modern fluoreszcens és elektronmikroszkópos módszerek hoztak. Az általános vélekedés szerint, a lipid cseppekben raktározódnak a sejtet felépítő neutrális lipidek (trigliceridek, és különböző szterolszármazékok; főként szterolészterek). Ebből következően a sejtmembránt felépítő foszfolipidek elő anyagai is itt raktározódhatnak a beépülésükig (Farese és mtsi. 2009, Thiele és Spandl 2008). A lipidek, különös tekintettel a szabad zsírsavakra, külön kompartmentben történő tárolása kiemelt jelentőségű, hiszen ezek az anyagok nem vízoldékonyak, citoszolikus raktározásuk csak szállítófehérjék közreműködésével valósulhat meg (Richieri és mtsi. 1993, Thumser és mtsi. 1994). Mindemellet a szabad zsírsavak már nanomólos koncentrációban is toxikusak, mert micellákat képezve destabilizálják, károsítják a biológiai membránokat (Lapre és mtsi. 1992, Wu és mtsi. 2006). Az utóbbi néhány évtizedben számos publikáció számolt be arról, hogy a LDk nem csupán a feleslegben lévő zsírnemű anyagok raktározását végzik, hanem számos más sejtélettani folyamatban is aktívan részt vesznek úgy, mint: a sejten belüli fehérje és foszfolipid anyagcsere a sejtosztódás során (Kurat és mtsi. 2009), a Hepatitis C vírus replikációja (Barba és mtsi 1997, Miyanari és mtsi. 2007), és a proteaszomális fehérjelebontás (Ohsaki és mtsi. 2006. Ezzel párhuzamosan az is kiderült, hogy a lipid cseppek szerepet játszanak számos humán betegség kialakulásában is, úgy min az, elhízás (obezitás), metabolikus szindróma, májzsírosodás és az atheroszklerózis (Guyton és Klemp 1989, Lang és Insull 1970, Reddy és Sambasiva Rao 2006, Cohen és mtsi. 2011, Greenberg és mtsi. 2012). A lipid csepp kutatás egyik mérföldköve volt, amikor 2006-ban egymástól függetlenül két kutatócsoport is megmutatta, ecetmuslica embriókban, hogy a LDk sejten belüli fehérje raktárként funkcionálnak (Cermelli és mtsi. 2006, Beller és mtsi. 2006). A lipidomikai kutatások között kiemelt helyet foglal el az idegrendszer vizsgálata. Nemcsak, hogy az idegszövet tartalmazza a legnagyobb mennyiségű és fajtájú lipidet, de a központi idegrendszerben található a szervezet legtöbbféle sejt típusa is. Arról már vannak adatok, hogy egy teljes agy homogenizátumban hányféle lipid fordul elő (Brügger és mtsi. 1997, Han és Gross 2003, Kind és mtsi. 2013, Nemes és mtsi. 2010, Sjövall és mtsi. 2004, Eberlin és mtsi. 2010), de hogy ezek hogyan oszlanak el az egyes sejt típusok különböző sejtalkotói és membrán domainjei között, arról még csak elképzeléseink sincsenek, nem is beszélve ezek transzportjáról, turnoveréről, s lehetséges funkciójáról. Így talán meglepő lehet, hogy napjainkig az idegrendszerben sem a lipid cseppek térbeli, sem pedig időbeli mintázatának szisztematikus feltérképezése nem történt meg. Ezért munkám során célul tűztem ki, hogy az ecetmuslica lárvális agyában feltérképezzem a lipid cseppek tér és időbeli eloszlását, és meghatározzam, hogy ezek az organellumok, milyen mértékben oszlanak meg az idegrendszer különböző sejt típusai között.

Célkitűzések

1. Fő célkitűzésünk a muslica agyában lévő lipidcseppek anatómiai módszerekkel történő minőségi és mennyiségi jellemzése volt, az állat posztembrionális fejlődése során.

2. További célunk volt, hogy összehasonlítsuk a harmadik stádiumú lárvák agyában található egyes gliasejtípusok lipidcsepp-tartalmát, különös tekintettel az általunk felfedezett felszíni kérgi gliasejtekre. E sejteket további anatómiai, genetikai és citokémiai módszerekkel is szeretnénk volna jellemezni.

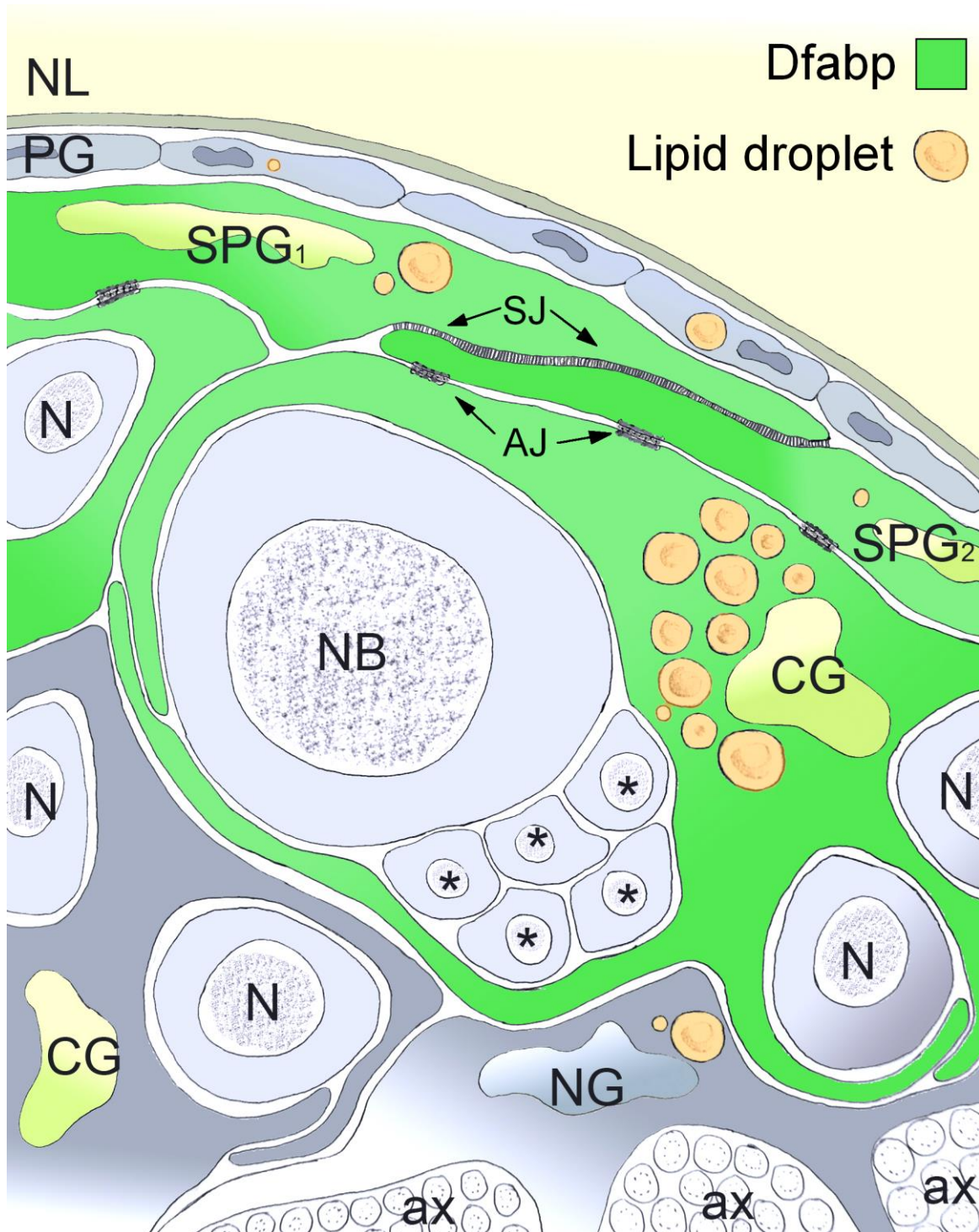
3. Irodalmi adatok felhasználásával szeretnénk volna olyan kandidáns géneket felkutatni, amelyek ellen poliklonális antitestet termeltetve a lipidcsepp tartalmú sejtek jelölhetővé válnak. Egy ilyen gén volt a muslica zsírsavköti fehérje a dFabp (Drosophila fatty acid binding protein), mely ellen specifikus poliklonális ellenanyagot termeltettünk, majd funkcióvesztéses háttéren validáltunk. Az antiszérum segítségével egyszeres, kétszeres fluoreszcens, és post-embedding immunarany festéseket végeztünk.

Alkalmazott módszerek

1. Muslica törzsek és genetika
2. A flip-out klónok létrehozása
3. A dFabp antiszérum létrehozása
4. Western blot
5. Szöveti vizsgálatok, immunfestések, és képalkotás
6. Oil Red O festés
7. Félvékony metszetek
8. Rutin elektronmikroszkópia és tormaperoxidáz citokémia
9. Fagyasztva helyettesítés és LR White beágyazás
10. Beágyazás utáni ezüst-intenzifikált immunarany reakció
11. Statisztikai mintavétel és adatelemzés

Eredmények, tézisek

- A jelen munkában megmutattuk, hogy a lipid cseppek jelen vannak az ecetmuslica lárvák agyában, de kifejezetten nagy sűrűségben figyelhetők meg a centrális agy dorzomediális részében. A lipid cseppek nagy csoportokban találhatóak a gliasejtek citoplazmájában, de teljes mértékben hiányoznak az idegsejtekből. Ezen az agyterületen a lipid cseppek legnagyobb mennyiségben a gliasejtek kötelékében lévő idegi összejtek, az ún. neuroblasztok közvetlen közelében találhatóak.
- A muslica embriók agyában még nem figyelhetőek meg lipid cseppek, majd L1 lárvastádiumtól kezdve számuk egyre nő, egészen a vándorló stádium végéig, ahol eléri a maximumát, majd a metamorfózis során számuk folyamatosan csökken, s a kifejlett állatok agyában, az általunk használt szövettani és mikroszkópos technikákkal már nem mutathatóak ki.
- A munka további részében megmutattuk, hogy a gliasejtekben felhalmozódott lipid cseppek nem egyenlő mértékben oszlanak meg az egyes gliasejttípusok között, hanem a neuroblasztokat izoláló felszíni kérgi gliasejtek különösen nagy mennyiségű lipid cseppet tartalmaznak. Ezeket a sejteket, rutin morfológiai, genetikai, és immunhisztokémiai módszerekkel is karakterizáltuk. E sejtek nagyméretű, heterokromatikus, invaginált sejtmaggal rendelkeztek, citoplazmájukban pedig számos lipidcseppet, és kiterjedt glikogén areákat találtunk. Nyúlványainkkal neuroblasztokat és azok leánysejtjeit ölelték körül, s a bennük felhalmozott lipidcseppek mindig a neuroblasztok közvetlen közelében dúsultak fel.
- A lipid csepp akkumuláló felszíni kérgi gliasejtek neurokémiai jellemzése során azt találtuk, hogy ezek a sejtek, a szubperineurális sejtekkel együtt kifejezik a *Drosophila* fatty acid binding proteint, az emlős FABP7/BLBP muslica ortológját. A dfabp ellen specifikus ellenanyagot termeltettünk, melynek specificitását Western blotton, és dfabp funkcióvesztéses háttéren is validáltuk. Nagy nagyítású fluoreszcens és elektronmikroszkópos immunhisztokémiai módszerekkel azt találtuk, hogy a fehérje ezen gliasejtek sejtmagjában és citoszóljában található. Eredményeinket Barti Benjámintal grafikáján foglaltuk össze.



A lipid cseppek gliasejteken belüli megoszlásának és a dFabp fehérje lokalizációjának sémás ábrázolása. A lipid cseppek kizárólag a gliasejteken találhatók, ahol a sejtek perinukleáris régiójában nagy csoportokba rendeződnek. A lipid cseppek a neuronokban (N) nincsenek jelen. A neuroblasztokat (NB) és leánysejtjeiket (csillagok) izoláló felszíni kérgi gliasejteken (CG) található a legnagyobb mennyiségű lipid csepp. A szomszédos szubperineurális sejtek (SPG) egymással szeptális kapcsolatokat (SJ) létesítenek, míg a szubperineurális sejtek és a felszíni kérgi gliasejtekek között adherens kapcsolatokat (AJ) találunk. A *Drosophila* zsírsavkötő fehérje (dFabp) jelen van a szubperineurális sejtekben és a lipidraktározó felszíni kérgi gliasejtekenben. NL: neurális lamella, PG: perineurális glia, NG: neuropil glia, ax: axon.

Eredmények megvitatása

A lipid cseppek szerepe a központi idegrendszer gliasejtjeiben

A jelen munkában megmutattuk, hogy a lipid cseppek jelen vannak az *ecetmuslica* lárvák agyában, de kifejezetten nagy sűrűségben figyelhetők meg a centrális agy dorzomediális részében. Minden vizsgálatunkat ezen az agyterületen folytattuk. A lipid cseppek nagy csoportokban találhatóak a gliasejtek citoplazmájában, de teljes mértékben hiányoznak az idegsejtekből. Ezen az agyterületen a lipid cseppek legnagyobb mennyiségben a gliasejtek kötelékében lévő idegi őssejtek, az ún. neuroblasztok közvetlen közelében találhatóak. A *muslica* embriók agyában még nem figyelhetők meg lipid cseppek, majd L1 lárvastádiumtól kezdve számuk egyre nő, egészen a vándorló stádium végéig, ahol eléri a maximumát, majd a metamorfózis során számuk folyamatosan csökken, s a kifejlett állatok agyában, az általunk használt szövettani és mikroszkópos technikákkal már nem mutathatók ki. A lipid cseppek mennyiségének a posztembrionális fejlődés alatti fluktuációja felveti annak a lehetőségét, hogy a lipidcseppek az egyedfejlődés meghatározott pontjain kiemelt funkcióval bírnak, egy eddig fel nem derített glia-neuron kölcsönhatás során. Erre a legvalószínűbb magyarázat, hogy a gliasejtekben felhalmozódott lipidcseppekből felszabaduló zsírnemű anyagok biztosítják a bábstádium alatt az idegsejtek utódsejtjeinek osztódásához, növekedéséhez és nyúlványnövesztéshez szükséges metabolitokat. Ezt az elképzelést támogatja az a tény, hogy az idegsejteken végigfutó masszív osztódási hullám, s az ezután meginduló nyúlványnövesztés pontosan a bábstádium első egynegyedekor következik be (Siegrist és mtsi. 2010, Sousa-Nunes és mtsi. 2010, D'Alessandro és mtsi. 2010 Pfenninger 2009). Az idegsejtek hatalmas felülettel rendelkeznek, s ennek felépítéséhez, s fenntartásához rengeteg lipidre van szükség. Mivel a bábstádium alatt az állat képtelen a táplálkozásra az idegrendszer fejlődéséhez szükséges lipidek csakis saját szöveteiből származhatnak. Emiatt a gliasejtekben felhalmozott lipidek a legvalószínűbb jelöltek, hogy ezen építőköveket biztosítsák a neuronok számára. A másik oldalról megközelítve a kérdést, a membránlipidekhez szükséges építőkövek, viszont csak és kizárólag a lipidcseppekből pótolhatóak, s mivel a *muslica* szterol auxotróf és képtelen a többszörösen telítetlen zsírsavak szintézisére (Keith 1967), erősíti azt a feltételezést, hogy a lipidcseppek kiemelt raktárai lehetnek e fontos zsírnemű anyagoknak. A munka további részében megmutattuk, hogy a gliasejtekben felhalmozódott lipid cseppek nem egyenlő mértékben oszlanak meg az egyes gliasejt típusok között, hanem a neuroblasztokat izoláló felszíni kérgi gliasejtek különösen nagy mennyiségű lipid cseppet tartalmaznak. Ezeket a sejteket, rutin morfológiai, genetikai, és immunhisztokémiai módszerekkel is karakterizáltuk. A sejtek morfológiai azonosításán túl, megmutattuk azt is, hogy míg a szomszédos szubperineurális sejtek egymáshoz szeptális kapcsolatokon keresztül kapcsolódnak, addig a szubperineurális sejtek, és a felszíni kérgi gliasejtek között adherens kapcsolatokot találunk. A sejtkapcsoló struktúrák, e sejt típus-specifikus szegregációja sejteti a létezését egy precízen szervezett gliasejtekből felépülő állványzatnak, s felveti a szubperineurális sejtek és a felszíni kérgi gliasejtek anatómiai és funkcionális kapcsoltságát is. A jelen tanulmány (Kis és mtsi. 2015) publikálása után három hónappal közzét le Alex P. Gould kutatócsoportja a *Cell*-ben egy igen nagy tanulmányt, amely az általunk leírt glia-neuroblaszt kapcsolatot, egy niche-ként értelmezi, s a lipid cseppeknek egy eddig le nem írt teljesen új funkciót tulajdonít (Bailey és mtsi. 2015). Nevezetesen azt találták, hogy a neuroblasztok ebben a speciális

mikrokörnyezetben a tracheatörzsektől távol helyezkednek el, oxigén elátottságuk alacsony, így a fejlődés során relatíve hipoxiás környezetben vannak, s bennük a reaktív oxigén gyökök feldúsulása figyelhető meg. A szubperineurális és kérgi gliasejtekben jelen lévő lipidcseppekről kimutatták, hogy (véltetően a bennük tárolt lipidek vagy fehérjéken keresztül) antioxidáns hatással rendelkeznek, és meggátolják a többszörösen telítetlen esszenciális zsírsavak oxidációját. Ezáltal egy protektív környezetet hoznak létre, mellyel megvédik a neuroblasztokat a reaktív oxigén gyökök károsító hatásától, s ezzel hozzájárulnak az agy megfelelő fejlődéséhez.

A lipid csepp tartalmú gliasejtek neurokémiai jellemzése és az agyi zsírsavkötő fehérjék lehetséges funkciói

A lipid csepp akkumuláló felszíni kérgi gliasejtek neurokémiai jellemzése során azt találtuk, hogy ezek a sejtek, a szubperineurális sejtekkel együtt kifejezik a *Drosophila* fatty acid binding proteint, az emlős FABP7/BLBP *muslica* ortológját. A dFabp ellen specifikus ellenanyagot termeltettünk, melynek specificitását Western blotton, és dFabp funkcióvesztéses háttéren is validáltuk. Nagy nagyítású fluoreszcens és elektronmikroszkópos immunhisztokémiai módszerekkel azt találtuk, hogy a fehérje ezen gliasejtek sejtmagjában és citoszóljában található. Az idegsejtekben és a perineurális sejtekben a dFabp nem volt kimutatható, a neuropil gliasejteket pedig ebben a munkában, morfológiai heterogenitásuk miatt, nem vizsgáltuk. Ezen eredményeink összhangban vannak az emlős idegrendszerben leírtakkal, ahol több kutatócsoport is beszámolt a citoszólikus zsírsavkötő fehérjék nukleáris és citoszólikus lokalizációjáról (Feng és mtsi. 1995, Liu és mtsi. 2010). A dFabp semmilyen más sejtorganelumban (lipidcseppek, ER, Golgi, miktokondriumok) nem volt kimutatható. Mivel a zsírsavkötő fehérjék a sejtek citoszólikus lipid-szállító fehérjéi (Schaap és mtsi. 1999), a legkézenfekvőbb magyarázat a dFabp gliális (SPG és felszíni CG) lokalizációjára az lenne, hogy a dFabp segíti a zsírsavak hemolimfából a gliasejtekbe történő szállítását. Azt a már fent említett Cell cikkben megmutatták, hogy a lárvális gliasejtekben lévő lipidcseppek biogenezéséhez a *de novo* zsírsavszintézis mellett szükség van a táplálékból felvett zsírsavak beépülésére is. A *muslica* éppen ezért kínálna kiváló modell-rendszert, hogy tanulmányozzuk a zsírsavkötő fehérjék sejttéttani szerepét, mivel a *muslica* genomban egyetlen zsírsavkötő fehérje található, s így kiütése esetén nincs még egy gén ami kompenzálhatná azt. Mivel a dFabp fehérje gliális lokalizációjáról a jelen tanulmány az egyedüli kísérletes bizonyíték, a dFabp *muslica*-ban betöltött funkciójára csak sejttések tehetőek, illetve az emlősökben megszerzett információkra hagyatkozhatunk. Az emlős adatok is sokáig csak indirekt bizonyítékok alapján valószínűsítették a zsírsavkötő fehérjék transzport funkcióját. Régóta feltételezték a kutatók, hogy a lipid természetű anyagok transzportját fehérjék segíthetik, mert noha a legtöbb zsírnemű anyag (különösen az enyhén hidrofil foszfolipidek és szterolészterek) önmagában is képes bejutni a sejtekbe, facilitált diffúziójuk szállítófehérjék nélkül nem képzelhető el. Talán ez magyarázhatja azt is, hogy a perineurális gliasejtek dFabp fehérje hiányában is képesek lipid cseppeket képezni. Mivel a perineurális gliasejtekben lévő lipid cseppek lipid összetétele nem ismert, itt sem zárhatjuk ki, hogy e gliasejtekben a lipid cseppeket felépítú molekulák *de novo* keletkeznek.

A doktori értekezés alapjául szolgáló közlemények

Cservenák, M., **Kis, V.**, Keller, D., Dimén, D., Menyhárt, L., Oláh, S., Szabó, É, R., Barna, J., Renner, É., Usdin, B, T., Dobolyi, Á. (2016). Maternally involved galanin neurons in the preoptic area of the rat. *Brain Structure and Function*, 1-18.

Györffy, B. A., Gulyássy, P., Gellén, B., Völgyi, K., Madarasi, D., **Kis, V.**, Ozohanics, O., Papp, I., Kovács, P., Lubec, G., Dobolyi, Á., Kardos, J., Drahos, L., Juhász, G., Kékesi, A, K. (2016). Widespread alterations in the synaptic proteome of the adolescent cerebral cortex following prenatal immune activation in rats. *Brain, behavior, and immunity*. Vol 56, 289–309

Kis V, Barti B, Lippai M, Sass M (2015) Specialized cortex glial cells accumulate lipid droplets in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* 10(7): e0131250. doi:10.1371 / journal.pone.0131250

Kovacs GG, Breydo L, Green R, **Kis V**, Puska G, Lőrincz P, Perju-Dumbrava L, Giera R, Pirker W, Lutz M: Intracellular processing of disease-associated α -synuclein in the human brain suggests prion-like cell-to-cell spread. *Neurobiology of disease* 2014.

Lőrincz P, Lakatos Z, Maruzs T, Szatmári Z, **Kis V**, Sass M: Atg6/UVRAG/Vps34-containing lipid kinase complex is required for receptor downregulation through endolysosomal degradation and epithelial polarity during *Drosophila* wing development. *BioMed Research International* 2014, 2014.

Szatmári Z, **Kis V**, Lippai M, Hegedűs K, Faragó T, Lőrincz P, Tanaka T, Juhász G, Sass M: Rab11 facilitates cross-talk between autophagy and endosomal pathway through regulation of Hook localization. *Molecular biology of the cell* 2014, 25(4):522-531.

Unal, G., Joshi, A., Viney, T.J., **Kis, V.**, Somogyi, P: Synaptic Targets of Medial Septal Projections in the Hippocampus and Extra-Hippocampal Cortices of the Mouse. *Journal of Neuroscience*, 2015 • 35 (48):15812–15826

Völgyi K, Gulyássy P, Háden K, **Kis V**, Kékesi AK, Simor A, Györffy B, Tóth EA, Lubec G, Juhász G, Dobolyi Á: Synaptic mitochondria: a brain mitochondria cluster with a specific proteome. *Journal of Proteomics* 2015

Völgyi, K., Háden, K., **Kis, V.**, Gulyássy, P., Badics, K., Györffy, B. A., Simor, A., Szabó, Z., Janáky, T., Drahos, L., Dobolyi, Á., Penke, B., Juhász, G., Kékesi, A, K. (2016). Mitochondrial Proteome Changes Correlating with β -Amyloid Accumulation. *Molecular neurobiology*, 1-19. I

Irodalomjegyzék

- Bailey, A. P., Koster, G., Guillemier, C., Hirst, E. M., MacRae, J. I., Lechene, C. P., Postle, A. D., Gould, A. P. (2015). Antioxidant role for lipid droplets in a stem cell niche of *Drosophila*. *Cell*, 163(2), 340-353.
- Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, Goulinet S, Matsuura Y, et al. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997, 94:1200–1205
- Beller M, Riedel D, Jansch L, Dieterich G, Wehland J, Jäckle H, et al. Characterization of the *Drosophila* lipid droplet subproteome. *Molecular & Cellular Proteomics* 2006, 5:1082–1094
- Beller, M., Bulankina, A. V., Hsiao, H. H., Urlaub, H., Jäckle, H., & Kühnlein, R. P. (2010). PERILIPIN-dependent control of lipid droplet structure and fat storage in *Drosophila*. *Cell Metabolism*, 12(5), 521-532.
- Brügger, B., Erben, G., Sandhoff, R., Wieland, F. T., & Lehmann, W. D. (1997). Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(6), 2339-2344.
- Cermelli S, Guo Y, Gross SP, Welte MA: The Lipid-droplet proteome reveals that droplets are a protein storage depot. *Current Biology* 2006, 16:1783–1795
- Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH: Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 2011, 332:1519–1523
- D'Alessandro R, Racchetti G, Meldolesi J: Outgrowth of neurites is a dual process. *Communicative & Integrative Biology* 2010, 3:576–578
- Eberlin, L. S., Ifa, D. R., Wu, C., & Cooks, R. G. (2010). Three dimensional visualization of mouse brain by lipid analysis using ambient ionization mass spectrometry. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(5), 873-876.
- Farese RV, Walther TC: Lipid Droplets Finally Get a Little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* 2009, 139:855–860
- Feng L and Heintz N: Differentiating neurons activate transcription of the brain lipid-binding protein gene in radial glia through a novel regulatory element. *Development* 1995, 121:1719–1730
- Greenberg AS, Coleman RA, Kraemer FB, McManaman JL, Obin MS, Puri V, et al. The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans. *The Journal of clinical investigation* 2012, 121
- Guyton JR, Klemp KF: The lipid-rich core region of human atherosclerotic fibrous plaques. Prevalence of small lipid droplets and vesicles by electron microscopy. *The American journal of pathology* 1989, 134:705
- Han, X., & Gross, R. W. (2003). Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry a bridge to lipidomics. *Journal of lipid research*, 44(6), 1071-1079.
- Kind, T., Liu, K. H., Lee, D. Y., DeFelice, B., Meissen, J. K., & Fiehn, O. (2013). LipidBlast in silico tandem mass spectrometry database for lipid identification. *Nature methods*, 10(8), 755-758.
- Kis V, Barti B, Lippai M, Sass M (2015) Specialized cortex glial cells accumulate lipid droplets in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* 10(7): e0131250. doi:10.1371 / journal. pone.0131250

- Kurat CF, Wolinski H, Petschnigg J, Kaluarachchi S, Andrews B, Natter K, et al. Cdk1/Cdc28-dependent activation of the major triacylglycerol lipase Tgl4 in yeast links lipolysis to cell-cycle progression. *Molecular cell* 2009, 33:53–63
- Lang PD, InsullWJr: Lipid droplets in atherosclerotic fatty streaks of human aorta. *Journal of Clinical Investigation* 1970, 49:1479
- Lapre, J. A., Termont, D. S., Groen, A. K., & Van der Meer, R. (1992). Lytic effects of mixed micelles of fatty acids and bile acids. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 263(3), G333-G337.
- Liu RZ, Mita R, Beaulieu M, Gao Z and Godbout R: Fatty acid binding proteins in brain development and disease. *Int. J. Dev. Biol.* 2010, 54:1229–1239
- Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, et al. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature cell biology* 2007, 9:1089–1097.
- Nemes, P., Woods, A. S., & Vertes, A. (2010). Simultaneous imaging of small metabolites and lipids in rat brain tissues at atmospheric pressure by laser ablation electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 82(3), 982-988.
- Ohsaki Y, Cheng J, Fujita A, Tokumoto T, Fujimoto T: Cytoplasmic lipid droplets are sites of convergence of proteasomal and autophagic degradation of apolipoprotein B. *Molecular biology of the cell* 2006, 17:2674–2683
- Pfenninger KH: Plasma membrane expansion: a neuron's Herculean task. *Nature Reviews Neuroscience* 2009, 10:251–261
- Reddy JK, Sambasiva Rao M: Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2006, 290:852–858
- Richieri, G. V., Anel, A., & Kleinfeld, A. M. (1993). Interactions of long-chain fatty acids and albumin: determination of free fatty acid levels using the fluorescent probe ADIFAB. *Biochemistry*, 32(29), 7574-7580.
- Schaap FG, Binas B, Danneberg H, van der Vusse GJ, Glatz JFC: Impaired long-chain fatty acid utilization by cardiac myocytes isolated from mice lacking the heart-type fatty acid binding protein gene. *Circulation Research* 1999, 85:329–337
- Siegrist SE, Haque NS, Chen CH, Hay BA, Hariharan IK: Inactivation of both foxo and reaper promotes long-term adult neurogenesis in *Drosophila*. *Current Biology* 2010, 20:643–648
- Sjövall, P., Lausmaa, J., & Johansson, B. (2004). Mass spectrometric imaging of lipids in brain tissue. *Analytical chemistry*, 76(15), 4271-4278.
- Sousa-Nunes R, Cheng LY, Gould AP: Regulating neural proliferation in the *Drosophila* CNS. *Current Opinion in Neurobiology* 2010, 20:50–57
- Thiele C, Spandl J: Cell biology of lipid droplets. *Current Opinion in Cell Biology* 2008, 20:378–385
- Thumser, A. E., Voysey, J. E., & Wilton, D. C. (1994). The binding of lysophospholipids to rat liver fatty acid-binding protein and albumin. *Biochemical Journal*, 301(3), 801-806.