

**ANALISIS SINTESIS TETES LEMAK PADA GEN *DGA1*,
LRO1, *ARE1* DAN *ARE2* PADA PROSES AUTOFAGI
DENGAN MODEL KHAMIR *Saccharomyces cerevisiae***

***ANALYSIS OF LIPID DROPLETS SYNTHESIS ON *DGA1*, *LRO1*,
ARE1 AND *ARE2* GENES IN AUTOPHAGY PROCESS USING
Saccharomyces cerevisiae YEAST MODEL***



Tesis

**Untuk Memenuhi sebagian persyaratan
Mencapai derajat Sarjana S-2
Program Pasca Sarjana Magister Ilmu Biomedik
Konsentrasi Konseling Genetika**

**Venty Muliana Sari Soeroso
22010111400103**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2014**

TESIS

ANALISIS SINTESIS TETES LEMAK PADA GEN *DGA1*, *LRO1*, *ARE1* DAN *ARE2* PADA PROSES AUTOFAGI DENGAN MODEL KHAMIR *Saccharomyces cerevisiae*

Disusun oleh
Venty Muliana Sari Soeroso, MD
22010111400103

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji
pada tanggal 27 Februari 2014
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui
Pembimbing

Pembimbing I,

Pembimbing II,

dr. A. Zulfa Juniarto, Msi.Med, Sp.And, PhD
NIP. 19700608 19972 1 001

Prof. dr. Sultana MH Faradz, PhD
NIP. 19520202 197901 2 001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

Prof. Dr. dr. Tri Nur Kristina, DMM, M.Kes
NIP. 19590527 1986603 2 001

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri, dan bahwa di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi atau lembaga pendidikan lainnya, serta tidak terdapat unsur-unsur yang tergolong Plagiarism sebagaimana yang dimaksud dalam Permendiknas No. 17 tahun 2010. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum atau tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam penulisan dan daftar pustaka.

Semarang, Februari 2014

Venty Muliana Sari Soeroso

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini saya ingin mengungkapkan rasa terima kasih saya yang sedalam-dalamnya kepada semua pihak yang telah membantu mewujudkan penyelesaian tesis ini. Terima kasih banyak terutama saya haturkan kepada guru sekaligus pembimbing saya, Prof. Sultana MH Faradz, MD, PhD untuk curahan bimbingan, saran, kesabaran dan dukungan dari beliau yang sungguh besar selama saya menjalani program master ini. Tak lupa atas segala perhatian, arahan, dan kepercayaan yang telah beliau berikan kepada saya sehingga saya memiliki kesempatan yang sangat berharga, yaitu memperoleh beasiswa dalam program *double degree* dengan Universitas Poitiers, Prancis. Rasa terima kasih yang sebesar-besarnya juga saya haturkan kepada dr. A. Zulfa Juniarto, Sp.And, PhD selaku pembimbing tesis saya, untuk waktu, kesabaran dan bimbingan yang beliau berikan kepada saya dalam penulisan tesis ini. Terima kasih juga saya ucapkan kepada Prof. Dr. Ocky Karna Radjasa, M.Sc dan Dr. dr. RA. Kisdjamiatun RMD, PhD sebagai penguji tesis yang telah memberikan banyak masukan-masukan dan ilmu yang berharga.

Terima kasih kepada Prof. Gérard Mauco, PU-PH, atas kesempatan dan dukungan bagi saya untuk dapat menimba ilmu sebagai mahasiswa Master 2 di Universitas Poitiers. Kemudian ucapan terima kasih saya ucapkan kepada Prof. Thierry Bèrges, pimpinan laboratorium *Génétique des levures* atas kesediaan beliau menerima saya untuk melaksanakan penelitian di laboratorium. Terima kasih yang sebesar-besarnya saya ucapkan kepada Dr. Matthieu Régnacq sebagai supervisor saya, atas saran-saran, bimbingan, kehangatan penerimaan, ilmu dan motivasi beliau bagi saya.

Terima kasih kepada Dr. Anne Cantereau, penanggung jawab mikroskop konfokal dan Jenny Colas, staf laboratorium *Génétique des levures* atas bantuan selama penelitian.

Pada kesempatan ini, saya juga ingin mengungkapkan terima kasih yang setulus-tulusnya kepada Dr. dr. Tri Indah Winarni M.Si.Med atas bimbingan, motivasi dan dukungan beliau selama saya menempuh studi di program master ini. Saya mengucapkan terima kasih pula kepada semua staf *Division of Human Genetics of Center for Biomedical Research (CEBIOR)*, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, untuk kerjasama, asistensi dan bimbingan selama studi saya: Wiwik Lestari, Rita Indriati, Dwi Kustiani, Inthus Apriasa, Lusi Suwarsi, Evi Nurwulan dan kepada Dina Ardiana, S. Sos.

Terima kasih saya ucapkan pula kepada Dr Abe Susanto dan semua staf Biro PKLN, serta Atase pendidikan KBRI Paris, atas pemberian Beasiswa Unggulan (BU) Diknas dan penyalurannya kepada saya selama masa studi di Prancis.

Terima kasih saya ucapkan kepada semua sahabat-sahabat terbaik saya, mahasiswa Angkatan ke-6 Program Konseling Genetika ini, Almira, Tami, Ariesty, Donny, Gara, Hesty, Isna, Sari, Ziske dan Zukhrofi. Terima kasih atas persahabatan, semangat, ilmu dan dukungan selama kebersamaan di dalam program master ini.

Terima kasih yang spesial dan mendalam untuk kedua orang tua saya, H. D. Soeroso, S.E. dan Hj. Dina Dotta Maliku, S.E., kakak saya Elly Rahmawaty, S.S., M.Si., adik saya Rody Verdika Cahyadi S.T., Mas M. Dzulfahmi Yahya, S.T. serta seluruh keluarga saya atas cinta, motivasi dan dukungan penuh mereka sehingga saya mampu melaksanakan studi ini dengan baik.

CURRICULUM VITAE

Personal Data

Name : **Venty Muliana Sari Soeroso**
Sex : Female
Nationality : Indonesian
Place & Date of Birth : Banjarmasin/ October 7th, 1987
Latest Degree : Medical Doctor
Address : Jl. Lily garden No. 21 Perum. Mega Residence,
Semarang, Central Java, Indonesia, 50265
Email : ventymulianasari@gmail.com
Telephone : +628-222-138-5337

Education

1993-1999 Elementary School at SD Kartika VI Banjarmasin
1999-2002 Junior High School at SMP N 1 Tarakan
2002-2005 High School at SMA N 1 Tarakan Majoring Natural Science
2005-2009 Diponegoro University, Medical Faculty (Bachelor Degree)
2009-2011 Diponegoro University, Medical Faculty (Medical Doctor)
2011- present Post Graduate Program at Diponegoro University, Master in Biomedical Science Majoring in Genetic Counseling (Double degree program with Master 2 program of Poitiers University, *Master Science, Technologies, Santé à finalité indifférenciée (professionnelle et recherche) Mention Biologie, Santé, Sciences du Médicaments spécialité Recherche et Ingénierie en Biosanté.*

Experiences

- 2007 **Research assistant** of student creativity program in research of DIKTI
2007
- Laboratory assistant** of medical physics departement, faculty of
 medicine Diponegoro University
- 2008 **Research assistant** of Multicenter research project of National Institute
 of Scientific Analysis and Development - Indonesian Medical Students
 Council Association (NISAD-IMSCA), Indonesia
- 2013 **Internship master students** in Laboratory of Yeast Genetic, CNRS-
 FRE 3511-*Laboratoire Signalisation et transports Ioniques*
 Membranaires (STIM), Poitiers University

Research

- 2009 : Soeroso VMS, Juniarto AZ. The correlation between testosterone and 17-
OH progesterone level with the various stages of external genitalia
virilization in patient with Congenital Adrenal Hyperplasia. Diponegoro
university institutional repository.
- 2013 : Soeroso VMS, Régnacq M, Bèrges T. Involvement of Lipid droplets in
Autophagy in the yeast *Saccaromyces cerevisiae*. Master 2 Internship
report, Poitiers University

Scholarship

- East Borneo Province Student Scholarship Program. PEMKOT KALTIM
2008/2009
- Excellent Scholarship Program of The Bureau of Planning and International
Cooperation, Ministry of National Education, Government of Indonesia
2011/2013

Training and Course

2006 **Seminar of stem cell: A Human Sparepart Engineering.** Semarang, Indonesia

Seminar of In Vitro Fertilization: Bringing New Hope for A New Life. Semarang, Indonesia

2007 **National Seminar On Medical Biotechnology and Its Related Fields** (Link Between Pharmaceutical Industries and Research Universities: Myth or Reality?). Semarang, Indonesia

Student's Management and Leadership Training. Semarang, Indonesia

Symposium of National Scientific Convention NISAD-IMSCA 2007: **Geriatric Challenge in Indonesia.** Bali, Indonesia

2008 **Seminar of HIV/AIDS: Preventing Mother to Child Transmission.** Semarang, Indonesia

Medical Training. Semarang, Indonesia

2011 **Symposium: Basic Life Support, Current Management.** Semarang, Indonesia

2012 **10th Medical Genetic Course: from basic to clinic.** Semarang, Indonesia

Advance of Medical Genetic Course: from basic to clinic. Semarang, Indonesia

Workshop on Neurogenetic. Semarang, Indonesia

Ciliary Dysfunction in Developmental Abnormalities And Diseases

Symposium, Semarang, Indonesia

2013 **Poitiers University, France :**

- The role of large-pore channels in cancer
- Gap junctions in neural development and disease
- Connexins and Pannexins in Stroke
- Control by the calcium second messenger of the life or death outcome of death receptor receptor stimulation and application in oncology
- *Jonctions gap cardiaques: propriétés électriques et dysfonctions pro-arythmiques*
- *Journée Microbiologie Poitevine (Poitevine Microbiology Day)*
- Disruption of vesicular trafficking and its impact on biological processes Symposium
- Pharmacology and Physiopathological Mechanisms of Cancer & Heart Failure Symposium
- From Protein to Pathology: Skin Diseases, Cystic Fibrosis and Diabetes Symposium
- Neuropathologies Symposium

DAFTAR ISI

JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN	iii
UCAPAN TERIMA KASIH	iv
CURRICULUM VITAE.....	vi
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
DAFTAR SINGKATAN / ISTILAH.....	xviii
GLOSARIUM	xx
ABSTRAK (BAHASA INDONESIA)	xxi
ABSTRACT (ENGLISH).....	xxii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.5 Originalitas Penelitian	6

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Proses autofagi dalam sel.....	7
2.1.1 Definisi autofagi dan faktor-faktor yang berperan di dalamnya	7
2.1.2 Fungsi Autofagi	10
2.1.3 Autofagi dan invasi patogen.....	11
2.1.4 Sumber lipid sebagai pembentuk membran dalam proses autofagi	12
2.2 Organel tetes lemak.....	13
2.2.1 Karakteristik tetes lemak	13
2.2.2 Fungsi tetes lemak dalam sel dan hubungannya dengan autofagi.....	15
2.2.3 Studi aktivitas biologis tetes lemak dan penemuan klinis pada manusia....	16
2.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sebagai model penelitian tentang lipid dan autofagi	18
2.3.1 Keunggulan model penelitian menggunakan sel <i>S. cerevisiae</i>	18
2.3.2 Sintesis tetes lemak dan proses mobilisasi lipid pada <i>S. cerevisiae</i>	20
2.3.3 Mutan sel <i>S. cerevisiae</i> sebagai perangkat penelitian gen-gen yang berperan dalam sintesis tetes lemak	21
BAB 3 KERANGKA TEORI DAN KERANGKA KONSEP	23
3.1 Kerangka Teori.....	23
3.2 Kerangka Konsep	24
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	25
4.1 Aspek Penelitian	25
4.1.1 Ruang Lingkup Penelitian	25

4.1.2	Periode dan Tempat Penelitian	25
4.1.3	Desain Penelitian	25
4.2	Bahan.....	25
4.2.1	Strain khamir.....	26
4.2.2	Plasmid.....	26
4.2.3	Bakteri.....	28
4.2.4	Media kultur	28
4.2.5	Primer PCR	29
4.3	Cara Kerja	30
	Studi Autofagi dan peran fisiologis tetes lemak pada sel <i>S. cerevisiae</i>	30
4.3.1	Transformasi Bakteri	30
4.3.2	Ekstraksi DNA Plasmid	31
4.3.3	Transformasi sel <i>S. cerevisiae</i>	32
4.3.3.1	Transformasi sel dengan DNA Plasmid.....	32
4.3.3.2	Transformasi sel dengan fragmen DNA hasil PCR	33
4.3.4	Observasi mikroskopik	34
4.3.5	Western Blot.....	34
4.3.5.1	Ekstraksi Protein	34
4.3.5.2	Gel Elektroforesis (SDS-PAGE).....	35
4.3.5.3	Menentukan volume protein.....	36
4.3.5.4	Migrasi protein pada gel.....	36
4.3.5.5	Elektrotransfer protein pada membran.....	37
4.3.5.6	Imunodeteksi protein yang telah ditransfer pada membran	38

4.3.6 PCR.....	39
4.3.7 Tes kuantitatif autofagi: Uji PHO8Δ60	39
4.3.7.1 Spektrofluorometri.....	39
4.3.7.2 Perhitungan kadar protein sampel dan fosfatase alkalin	40
4.4 Analisis Data	41
4.5 Definisi Operasional.....	42
4.6 Alur Penelitian.....	43
BAB 5 HASIL PENELITIAN.....	44
5.1 Asam lemak eksogen sebagai sumber lipid pada proses autofagi	44
5.2 Evaluasi autofagi pada sel khamir <i>S. cerevisiae</i>	45
5.2.1 Observasi mikroskopik	45
5.2.2 Metode biokimia dengan Western blot.....	47
5.3 Evaluasi kuantitatif autofagi dan analisis gen – gen dalam sintesis tetes lemak dengan uji PHO8Δ60	48
5.4 Keterbatasan Penelitian.....	51
BAB 6 PEMBAHASAN.....	53
6.1 Tetes lemak sebagai sumber lipid pada proses autofagi.....	53
6.2 Peran gen-gen esensial pada sintesis tetes lemak dalam proses autofagi.....	59
6.3 Perspektif pengembangan penelitian selanjutnya tentang peran tetes lemak pada autofagi	61

6.4	Perspektif klinis mengenai studi peran tetes lemak dan autofagi pada kesehatan manusia	63
	BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	66
7.1	Kesimpulan	66
7.2	Saran.....	67
	DAFTAR PUSTAKA.....	68
	LAMPIRAN-LAMPIRAN	74
	ARTIKEL TESIS.....	79

DAFTAR TABEL

Tabel 1 Daftar studi pendahulu mengenai peran sintesis tetes lemak dan sumber lipid pada pembentukan membran autofagi	6
Tabel 2 Strain khamir <i>S. Cerevisiae</i> yang digunakan	26
Tabel 3 Nama dan karakteristik plasmid	27
Tabel 4 Sekuens primer PCR sebagai cassette disruption gene PHO8.....	29

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1	Skema proses makroautofagi..	9
Gambar 2	Kandidat sumber asal membran autofagosom	12
Gambar 3	Struktur tetes lemak.....	14
Gambar 4	Efek inhibisi FAS pada <i>wild-type</i> Y10000 selama proses autofagi	45
Gambar 5	Observasi mikroskopik Y10000 dan mutan RS4 Δ selama autofagi.....	46
Gambar 6	Deteksi protein GFP pada strain Y10000, RS4 Δ dan ATG5 Δ dengan SDS-PAGE	47
Gambar 7	Hasil PCR dari <i>cassette of disruption gen PHO8</i>	49
Gambar 8	Hasil pengukuran kadar aktifitas spesifik fosfatase alkalin modifikasi, PHO8 Δ 60 pada strain mutan dan <i>wild-type</i> Y10000.....	50
Gambar 9	Langkah kerja dalam uji PHO8 Δ 60	56
Gambar 10	Tahap-tahap pembentukan autofagosom.....	62

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Hasil Wstern blot menggunakan antibodi yang lebih spesifik.....	74
Lampiran 2	Gambar hasil observasi mikroskopik percobaan dengan TWEEN80....	75
Lampiran 3	Hasil analisis statistik dari tes kuantitatif autofagi masing-masing strain sel khamir	76

DAFTAR SINGKATAN / ISTILAH

Δ	Simbol delesi gen
Ac / Bis	<i>Acrylamide / bisacrylamide</i>
ATP	<i>Adenosine-5'-TriPhosphate</i>
APS	Ammonium Persulfate
CoA	<i>Coenzyme A</i>
DAG	Diasilgliserol
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	<i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
His	<i>Histidine</i>
LB	Luria Bertani
Leu	<i>Leucine</i>
Lys	<i>Lysine</i>
MAT	<i>Malting type, a ou α</i>
miliQ	air terdeionisasi
M/V	Massa / Volume
OD	<i>Optical Density</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMSF	<i>Phenylmethane sulphonylfluoride</i>
RE	Retikulum Endoplasma
Rev/min	<i>Revolution per minute</i> (revolusi/putaran per menit)
RFP	<i>Red Fluorescent Protein</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Space</i>

SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
TAG	Triasilgliserol
TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine</i>
Trp	<i>Tryptophane</i>
Ura	<i>Uracile</i>
V/V	Volume / Volume
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPG	<i>Yeast-extract Peptone Glucose</i>
YPGE	<i>Yeast-extract Peptone Glycerol Ethanol</i>

GLOSARIUM

PCR	Reaksi amplifikasi / penggandaan daerah tertentu dari urutan basa dalam suatu DNA (<i>template</i>) dengan bantuan dari enzim DNA polimerase, yang terdiri atas beberapa siklus (biasanya 20 hingga 40 siklus).
Western blot	Metode biokimia untuk mengobservasi suatu protein dengan menggunakan antibodi yang spesifik terhadap protein yang dicari (<i>protein of interest</i>) yang divisualisasi dalam bentuk <i>band</i> protein yang memiliki ukuran <i>basepair</i> tertentu dalam suatu gel khusus (biasanya menggunakan <i>SDS-Page gel</i>).
Uji PHO8 Δ 60	Metode enzimatik untuk pengukuran kuantitatif autofagi pada model <i>S. cerevisiae</i> dengan mengukur kadar protein fosfatase alkalin termodifikasi, PHO8 Δ 60. Fosfatase alkalin ini dihantarkan ke dalam lumen vakuola selama proses autofagi, sehingga kadar protein tersebut dapat menggambarkan intensitas autofagi yang sedang berlangsung di dalam sel.

Analisis sintesis tetes lemak pada gen *DGA1*, *LRO1*, *ARE1* dan *ARE2* pada proses autofagi dengan model khamir *Saccharomyces cerevisiae*

Venty Muliana Sari Soeroso

ABSTRAK

Latar Belakang: Tetes lemak merupakan organela sitoplasmik yang berfungsi sebagai cadangan lipid sel. Penelitian terkini menunjukkan tetes lemak juga berperan pada berbagai penyakit inflamasi dan infeksi. Patogen misalnya, memanfaatkan tetes lemak dan menggunakan sistem autofagi untuk perkembangbiakan dan pertahanan diri. Sebaliknya, sel mengaktifkan autofagi untuk eliminasi patogen. Penelitian sebelumnya menemukan bahwa sel khamir mutan RS4 Δ , yang terdelesi pada 4 gen dalam sintesis tetes lemak, *DGA1*, *LRO1*, *ARE1* dan *ARE2*, tidak mampu mengaktifkan respon stres autofagi akibat paparan toksik asam lemak eksogen. Sehingga diduga ada hubungan antara sintesis tetes lemak dan autofagi.

Metode: Strain *Saccharomyces cerevisiae* wild-type Y10000 dan mutan RS4 Δ dikultur dalam media *starvation* (tanpa nitrogen) untuk menginduksi autofagi, kemudian kemampuan autofagi sel dievaluasi dengan mikroskop, western blot (WB) dan tes kuantitatif uji PHO8 Δ 60. Pada observasi mikroskopik, sel ditransformasi dengan plasmid marker fluoresen pSU9-GFP dan pVph1-RFP. WB mendeteksi lepasnya ikatan protein Atg8-GFP oleh protease vakuolar saat autofagi. Uji PHO8 Δ 60 mengukur kadar fosfatase alkalin yang merefleksikan intensitas autofagi. Analisis peran gen dilakukan dengan uji PHO8 Δ 60 menggunakan mutan RS4 Δ , *dga1* Δ , *lro1* Δ dan mutan ganda *dga1* Δ , *lro1* Δ .

Hasil: Sel mutan RS4 Δ menunjukkan gambaran mikroskopik autofagi negatif. Dengan WB, protein GFP bebas tidak terdeteksi pada mutan RS4 Δ . Intensitas autofagi mutan RS4 Δ sangat rendah mendekati 0 dan berbeda bermakna ($p=0.000$) dengan *wild-type*. Mutan ganda *dga1* Δ , *lro1* Δ memiliki intensitas autofagi yang rendah dan tidak berbeda bermakna dengan RS4 Δ ($p=0.183$).

Kesimpulan: Sintesis tetes lemak terutama oleh fungsi gen *DGA1* dan *LRO1* untuk sintesis Triasilgliserol memiliki peranan penting dalam proses autofagi.

Kata Kunci: Tetes lemak, gen *DGA1*, *LRO1*, *ARE1*, *ARE2*, autofagi

*Analysis of lipid droplets synthesis on DGA1, LRO1, ARE1 and ARE2 genes
in autophagy process using Saccharomyces cerevisiae yeast model*

Venty Muliana Sari Soeroso

ABSTRACT

Background: Lipid droplets (LDs) is a cytoplasmic organel whose function as lipid storage. Recent studies showed that LDs are involved in various human diseases. Pathogene uses LD and autophagy system of cell host for its reproduction and survival mechanism. Previous study identified that deletion in 4 genes (*DGA1*, *LRO1*, *ARE1* and *ARE2*) on LDs synthesis leads to disturbance in autophagy stress response due to exogenous fatty acid toxic exposure in yeast cell. Therefore we suggested that LDs might be involved in autophagy process.

Method: *S.cerevisiae* wild-type Y10000 strain and RS4 Δ mutant were cultured in a starvation media (without nitrogen) to induce autophagy. Cell's autophagy ability was evaluated by microscope, western blot (WB) and PHO8 Δ 60 quantitative test. In microscope evaluation, cell was transformed with fluorescence marker's plasmid pSU9-GFP and pVph1-RFP. WB detected the loose of protein Atg8-GFP bound by vacuolar protease during autophagy. PHO8 Δ 60 assay was utilized to measure the level of alkaline phosphatase that reflected autophagy intensity. Gene role was analyzed by PHO8 Δ 60 test in mutant RS4 Δ , single mutant *dga1* Δ and *lro1* Δ and double mutant *dga1* Δ ,*lro1* Δ .

Result: Mutant RS4 Δ showed negative autophagic microscopic images. Protein band GFP free was not detected in mutant RS4 Δ using WB. There was significant difference between level of autophagy in mutant RS4 Δ and *wild-type* ($p=0.000$). Double mutant *dga1* Δ ,*lro1* Δ had very low autophagy intensity and had no significant difference with mutant RS4 Δ ($p=0.183$).

Conclusion: LDs synthesis by gene *DGA1* and *LRO1* which is responsible for Triacylglycerol synthesis plays an important role in autophagy process.

Key words: lipid droplets, *DGA1*, *LRO1*, *ARE1*, *ARE2*, autophagy

