

Doktori értekezés

Feil-Börcsök Dalma

**Szegedi Tudományegyetem
Biológia Doktori Iskola**

**A Sorting nexin 25 homológ Snazarus endoszmális
rendszerben betöltött szerepének vizsgálata az
ecetmuslica garland nefrocitáiban**

PhD értekezés

Feil-Börcsök Dalma

Témavezető: Prof. Dr. Juhász Gábor, az MTA Doktora,
tudományos tanácsadó

Biológia Doktori Iskola

HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Genetikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar

Szeged

2024

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	3
Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Irodalmi áttekintés.....	7
1.1. Az endoszomális rendszer.....	7
1.1.1 Korai endoszómák.....	8
1.1.2 Késői endoszómák.....	9
1.1.3 Lizoszómák.....	10
1.2 Az endocitózis vizsgálatának orvosi biológiai jelentősége.....	12
1.3 A Sorting nexin fehérjecsald.....	14
1.3.1 SNX alcsaldok.....	17
1.3.2 SNX-PXA-RGS-PX-PXC vagy SNX-TM alcsald.....	18
1.4 Snazarus.....	21
1.5 <i>Drosophila</i> modellsejtek.....	23
1.5.1 Garland nefrocita mint humán podocita modell.....	23
1.5.2 A garland nefrocita mint endoszomális rendszer modell.....	28
1.5.3 A nyálmirigy mint exocitózis modell.....	29
2. Célkitűzés.....	30
3. Anyagok és módszerek.....	31
3.1 A kísérletekhez használt <i>Drosophila melanogaster</i> törzsek és tartási körülményeik....	31
3.2 Garland nefrociták láthatóvá tétele.....	33
3.2.1 Fluoreszcens Immunjelölés.....	33
3.2.2 Immunfestés hőfixálásos módszerrel.....	34
3.2.3 LysoTracker Red jelölés.....	35
3.2.4 Oil Red O festés.....	35
3.2.5 <i>Ex vivo</i> nyomjelzőanyag-felvételi (tracer uptake) kísérletek.....	35
3.2.6 Channel diffusion assay.....	36
3.2.7 Elektronmikroszkópos vizsgálatok.....	36
3.2.8 Csersavas impregnálás.....	37
3.3. Képpalkotás, számszerűsítés és statisztikai elemzés.....	37
3.4 Koimmunoprecipitáció.....	38
4. Eredmények.....	40

4.1 Snz hiányában a nefrociták endocitotikus aktivitása fokozódik normál lizoszomális funkció mellett.....	40
4.1.1 Snz hiányában megnagyobbodnak a korai és a késői endoszómák.....	40
4.1.2 Az <i>snz</i> funkcióvesztéses sejtekben a lizoszomális lebontás normális.....	43
4.1.3 Az Snz hiányában fokozódik az endocitotikus aktivitás.....	50
4.2 Garland nefrocitákban az Snz nem része az ER-PM-LD érintkezési pontoknak, viszont kölcsönhat a Rab11 fehérjével	52
4.2.1 Az Snz kolokalizál a Rab11 fehérjével	52
4.2.2 Az Snz és a Rab11 kölcsönhatása	57
4.2.3 Az Snz hatással van a reciklizáló endoszómák nefrocitán belüli elhelyezkedésére	58
4.3 Az Snz a Rab11 szabályozásán keresztül fontos szerepet játszik a nefrocita diafragma integritásának fenntartásában	59
4.4. Nefrocitákban az Snz és a Rab11 együttesen szabályozzák a lakúnák mélységét	63
4.5 Az Snz az exocitózis negatív szabályozója	68
4.5.1 Az exocitózis lassítása menekíti az <i>snz</i> funkcióvesztéses fenotípust.....	68
4.5.2 Az exocitózis fokozódása megváltoztatja az exocyst komplex és a TGN sejten belüli elhelyezkedését.....	68
4.5.3 A Sec5 csendesítése menekíti az <i>snz</i> KD legfeltűnőbb fenotípusát, a késői endoszómák méretnövekedését	70
4.5.4 Az Snz exocitózist szabályozó szereppel bír a nyálmirigyben is.....	71
5. Eredmények megvitatása.....	73
5.1 Az Snz fehérje mint az endocitózis és az exocitózis egyensúlyának szabályozója garland nefrocitákban.....	73
5.2 A lebontási útvonal működése nem sérül Snz hiányában, de az endocitózis fokozódik	75
5.3 Garland sejtekben az Snz a Rab11-gyel kolokalizál, míg az ER-PM-LD érintkezési pontoktól független	77
5.4 Az Snz szerepet játszik a nefrocita diafragma egységes szerkezetének fenntartásában a Rab11 szabályozásán keresztül	79
5.5 Az Snz mint az exocitózis gátlója	81
5.6 Kitekintés, orvosbiológiai vonatkozások	81
6. Összefoglalás.....	83
7. Summary	86
Irodalomjegyzék.....	89
Köszönetnyilvánítás	99
Saját hozzájárulásom a munkához	101
Függelékek	102

Rövidítések jegyzéke

AD	Alzheimer's disease/Alzheimer-kór
APP	Amiloid prekursor protein
BAR	Bin/Amphiphysin/Rvs
CA	Constitutively active/ konstitutívan aktív
CDA	Channel diffusion Assay/ diffúzió alapuló csatorna feltöltési eljárás
Cnx99A	Calnexin99 A
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole/ 4',6-diamidino-2-fenilindol
dMAPPER	<i>Drosophila</i> membrane-attached peripheral ER
Duf	Dumbfounded
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor/ epidermális növekedési faktor receptor
ER-PM	Endoplazmatikus retikulum-plazmamembrán
ER-PM-LD	Endoplazmatikus retikulum-plazmamembrán-lipidcsepp
EYFP	Enhanced Yellow Fluorescent Protein
FASN 1	Fatty acid synthase 1
FERM	protein 4.1/ezrin/radixin/moesin
fkh	forkhead
GAP	GTPase-Activating Protein / GTPáz-aktiváló fehérje
GEF	Guanine Nucleotide Exchange Factor / guanin-nukleotidcserélő faktor
HA	Influenza A Virus Hemagglutinin HA epitóp
HOPS	Homotypic fusion and vacuole protein sorting
KD	Knockdown/ csendesítés
Lamp	Lysosome-associated membrane protein
LIR	LC3 interakciós régió
Lt	light/ humán Vps41
NEPH1	Nephrin-like 1
NOXO1	NADPH-oxidáz organizáló fehérje 1
NPHS1	Nephrotic syndrome type 1/ finn típusú veleszületett nefrotikus szindróma 1
OE	Overexpression/ túltermelés

phox	NADPH-oxidáz
PI(3)P	foszfatidil-inozitol-3-foszfát
PI(3,5)P ₂	foszfatidil-inozitol-3,5-biszfoszfát
PI(4,5)P ₂	foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát
pros	prospero
PX	phox-homology
PXA	PX-associated domain A
PXC	PX-associated domain C
Pyd	Polychaetoid
ref(2)P	refractory to sigma P
RGS	Regulator of G protein signaling
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate poliakrilamid gélelektroforézis
SH3	Src Homology 3
Sns	Sticks and Stones
SNX	Sorting nexin
SNX-TM	transzmembrán doménnel rendelkező Sorting nexin alcsalád
Snz	Snazarus
SRNS	szteroid-rezisztens nefrotikus szindróma
Tbc1d8b	TBC1 Domain Family Member 8B
TGF-β	Transforming growth factor-β
TrkB	Tropomiozin receptor kináz B
UBA	Ubiquitin-associated domains/ Ubiquitin kötő domén
vamp8	vesicle associated membrane protein 8
V-ATPáz	Vakuoláris ATPáz
vha	Vacuolar H ⁺ ATPase alegység
Vps	Vacuolar protein sorting
Wls	Wntless
Wnt	Wingless
ZO-1	Zonula occludens-1

1. Irodalmi áttekintés

1.1. Az endoszomális rendszer

A tipikus emlőssejtekben a plazmamembrán felületének 50-180%-a óránként kicserélődik az endo- és exocitózis következtében (Steinman és mtsai. 1983). Ez az érdekes adat rávilágít arra, hogy mekkora jelentőséggel bír az endocitózis és az exocitózis egy sejt életében. A két folyamat egyensúlya alapvető fontosságú az egészséges sejtműködéshez.

Az endoszomális rendszer résztvevői, az intracelluláris vezikulumok lehetővé teszik a plazmamembrán lipid- és fehérje-összetevőinek szelektív válogatását, ezáltal mennyiségi meghatározását és sejtben belüli szállításukat. Ily módon az endocitózis részese és szabályozója az alapvető sejtéleti folyamatoknak, mint a tápanyagfelvétel, jelátvitel, sejtadhézió, továbbá befolyásolja a sejt-sejt kölcsönhatásokat és az antigénprezentációt is. A sejt felszíni molekulák gyors újraelosztásával elősegíti a sejt polaritás kialakulását (Shafaq-Zadah, Dransart, és Johannes 2020). Bár az endocitózisra gyakran mint egyetlen sejtet érintő, sejtben belüli folyamat gondolunk, több száz sejt működését szabályozza, hiszen részt vesz a sejtek kommunikációs infrastruktúrájának létrehozásában, így rajta keresztül a sejtek képesek működésük összehangolására (Zadka et al., 2023). Egyértelmű, hogy ha ennyi mindenben szerepet játszik, akkor az endocitózis abnormális működése esetén különböző rendellenességek alakulhatnak ki, mint például a rák, Alzheimer-kór, mentális problémák, gyulladásos állapotok, illetve a kórokozók elleni védelem hiánya esetén az azok által kiváltott megbetegedések (Vieira és mtsai. 2021).

Ugyan az irodalomban számos megfogalmazás található, de a legegyszerűbben leírható, tág definíció szerint endocitózissal akkor beszélünk, ha a sejtben kívüli térből anyagfelvétel történik, mely során a plazmamembrán egy darabkája betüremkedik és lefűződik, körülhatárolva a felvett anyagot. Az így létrejött vezikulum az endoszóma. Az endocitózist általában fagocitózissal, pinocitózissal, és receptor mediált endocitózissal osztják a felvett anyagok mérete, milyensége és a felvétel szelektivitása alapján (Cossart és Helenius 2014). A fagocitózis feladata a nagyobb méretű (>500 nm) részecskék, szerves törmelékek szelektív felvétele. A fagocitózist elsősorban mint az immunrendszer első védelmi vonala ismerjük, és leggyakrabban az immunrendszer fagocitái kapcsán gondolunk rá, például a neutrofilek, makrofágok, monociták és dendritikus sejtek esetében, melyek fagocitózissal kebelezik be a

különböző kórokozókat, elhalt sejteket és törmeléket a szervezet védelmének érdekében (Uribe-Querol és Rosales 2020). Pinocitózis során a sejt szelekció nélkül vesz fel egy keveset az extracelluláris folyadékból a benne oldott anyagokkal együtt, míg a receptor mediált endocitózis esetén egy célmolekula a sejtfelszínen lévő specifikus receptor fehérjéhez kapcsolódik, majd internalizálódik (Conner és Schmid 2003). A receptorok általában olyan transzmembrán fehérjék, amelyek a citoplazmatikus végükkel klathrin burokképződéshez kapcsolódnak, ezek határozzák meg az endoszóma további sorsát. A klathrin-mediált endocitózis a legjobban jellemzett endocitotikus útvonal.

A szakirodalomban más csoportosításokkal is találkozhatunk, hiszen a különböző szakterületekre sokszor egyedi nevezéktan jellemző. Dolgozatomban a szakterületemen jelenleg leggyakoribbnak tűnő felosztást alkalmaztam (Cossart és Helenius 2014; Zadka és mtsai. 2023).

Az endoszómák függetlenül eredetüktől és tartalmuktól a plazmamembrán közeli régióból a perinukleáris régió felé haladva különböző érési folyamatokon mennek keresztül, melyeket megannyi fehérje szabályoz, létrehozva az endoszomális rendszert (1. ábra) (Huotari és Helenius 2011). Az endoszomális rendszer tagjai dinamikusak, folyamatosan egyesülnek vagy egymásba alakulnak; szervezetenként és sejtípusonként nagyon változatosak, így az idekapcsolódó nevezéktan sem teljesen egységes. A legismertebb résztvevők a korai endoszómák, a késői endoszómák, a lizoszómák, és a reciklizáló endoszómák. Megkülönböztetésükben a legfontosabb jellemzők a célállomásuk, membránösszetételük, pH-juk és a hozzájuk kapcsolódó kis GTP-ázok, a Rab molekulák típusa.

1.1.1 Korai endoszómák

A plazmamembránból történő lefűződéssel keletkező, legkorábbi endoszomatípust primer endoszómáknak nevezzük. Az egymással fuzionáló primer endocitotikus vezikulumok hozzák létre a korai endoszómákat.

A korai endoszómákat az endoszomális rendszer fő válogatóállomásaiként tartják számon, ezért szortírozó endoszómáknak is nevezik őket. A korai endoszómák jellemzően kb. 10 percig fogadják a bejövő szállítmányt. A felvett anyagok két, egymással ellentétes úton haladhatnak tovább. Visszakerülhetnek a plazmamembránba a reciklizációs útvonalon, vagy az érő endoszómákban maradva késői endoszómává érhetnek, míg végül a lizoszómákkal fuzionálva lebontásra kerülhetnek (Maxfield és McGraw 2004).

A korai endoszómák morfológiájuk, sejten belüli elhelyezkedésük, összetételük és funkciójuk tekintetében nagyon változatosak (Van Meel és Klumperman 2008; Miaczynska és mtsai. 2004). Legtöbbjük viszonylag kicsi, és a plazmamembránhoz közeli perifériás régióban helyezkedik el (Hoepfner és mtsai. 2005; Nielsen és mtsai. 1999). Homotípusos fúzióra való nagy hajlamuk következtében összetett szerkezetűek, tubuláris (~60 nm átmérőjű csövecskék) és vakuoláris (~400 nm átmérőjű hólyagocskák) részekkel is rendelkeznek (Gruenberg 2001). A membrán felületének nagy része a tubulusokban, a térfogat nagy része pedig a vakuoláris részben található. Ezek a morfológiailag eltérő területek funkcionális jelentőséggel bírnak. Az újrahasznosításra kijelölt fehérjék elsősorban a tubulusokban, míg a lebontásra kijelölt elemek a vakuoláris részben halmozódnak fel (Mellman 1996).

A tubuláris régióból bizonyos fehérjék szinte azonnal, közvetlenül kerülnek vissza a plazmamembránba (Jovic és mtsai. 2010) az úgynevezett gyors reciklizációs útvonalon, míg másoknak előbb az ún. reciklizáló endoszómákba kell továbbítódniuk, és csak közvetetten kerülnek vissza a plazmamembránba. Ez utóbbi a lassú reciklizáció folyamata, melynek jellemző kis G-fehérjéje a Rab11 fehérje, amelyet markerként is használunk a reciklizáló kompartmentum megjelölésére (Sönnichsen és mtsai. 2000).

Az endoszomális rendszer fontos ellátója, táplálója a transz-Golgi hálózat (trans-Golgi network, TGN), mely folyamatosan ellátja az endoszómákat az érés különböző fázisaiban a szükséges fehérjékkel és a szolubilis hidrolázokkal. Az endoszómák oda-vissza vezikulumcserét folytatnak a TGN-nel, így már a korai endoszómák is kapnak a TGN-ből emésztőenzimeket, amelyek ugyan még inaktív állapotban vannak, de későbbi aktivációjuk már némi degradatív tulajdonsággal ruházza fel az endoszómákat, amely tovább erősödik a késői endoszómává való érés során (Huotari és Helenius 2011). A korai endoszómák gyengén savasak (pH 6,8–5,9) (Maxfield és Yamashiro 1987) és viszonylag alacsony koncentrációban tartalmaznak Ca^{2+} -ot (Gerasimenko és mtsai. 1998). Jellemző foszfatidilinozitol-foszfátjuk a foszfatidilinozitol-3-foszfát (PI(3)P), markerként is használatos kis G-fehérjéjük pedig a Rab5 (Huotari és Helenius 2011).

1.1.2 Késői endoszómák

A késői endoszómák, a korai endoszómák vakuoláris régiójából származnak. A mikrotubuláris rendszer segítségével folyamatosan közelednek a perinukleáris régió felé, ahol majd lizoszómákkal egyesülnek. Útjuk során több homotípusos fúzió következtében

megnövekszik a méretük, míg a pH-juk folyamatosan csökken pH 6,8 – 6,1 közötti értékről pH 6,0 – 4,9 közé (Maxfield és Yamashiro 1987). Az érő késői endoszómák nagyjából gömb alakúak, méretük 250 - 1000 nm közé tehető, a belsejükben ún. intraluminális vezikulumokkal, így gyakran találkozunk esetükben a multivezikuláris test elnevezéssel is.

Az endoszomális érés fontos tényezője az endoszómákat kísérő kis G-fehérjék konverziója is. A Rab5 a kezdetektől jelen van a korai endoszómákon mint az érés egyik fő szabályozója. Egy összetett mechanizmuson keresztül a Rab5 fehérje Rab7 fehérjét toboroz a membránra, ezáltal inaktíválja önmagát, majd disszociál az immáron késői endoszómává érett vezikulum membránjáról. Ezt a jelenséget Rab5-Rab7 konverciónak nevezik. Ezáltal az endoszóma elveszíti azt a képességét, hogy korai endoszómákkal egyesüljön, mindeközben viszont képessé válik a lizoszómákkal való fúzióra, így determinálva a hordozott anyagok sorsát a lebontásra (Poteryaev és mtsai. 2010).

A kis G-fehérjékhez hasonlóan a vezikulummembrán lipidösszetétele is megváltozik, és jelöli annak identitását. A korai endoszómákra jellemző PI(3)P foszfatidilinozitol-foszfátok az érés következtében foszforilálódnak és a késői endoszómákra jellemző, foszfatidilinozitol-3,5-biszfoszfátban (PI(3,5)P₂) dús membránok jönnek létre (Jefferies és mtsai. 2008).

A késői endoszómák tovább érnek, fogadják a hozzájuk hasonló késői endoszómákat, és a náluk jóval savasabb lizoszómákat. A két kompartmentum elkülönítése igen nehézkes, hiszen gyakran átmeneti, hibrid formával találkozunk, amit endolizoszómának nevezünk. Gyakori módszer a sejtalkotók ultracentrifugálással történő elkülönítése, osztályozása. A lizoszómák ez alapján az endoszomális rendszer legdenzebb organelumai, míg az endolizoszómák kisebb lebegési sűrűséggel rendelkeznek, de sűrűbbek a késői endoszómákhoz képest (Mullock és mtsai. 1998). Az endolizoszómákban dúsulnak fel és aktiválódnak a savas hidrolázok, és itt kezdődik meg a valódi lebontás (Huotari és Helenius 2011).

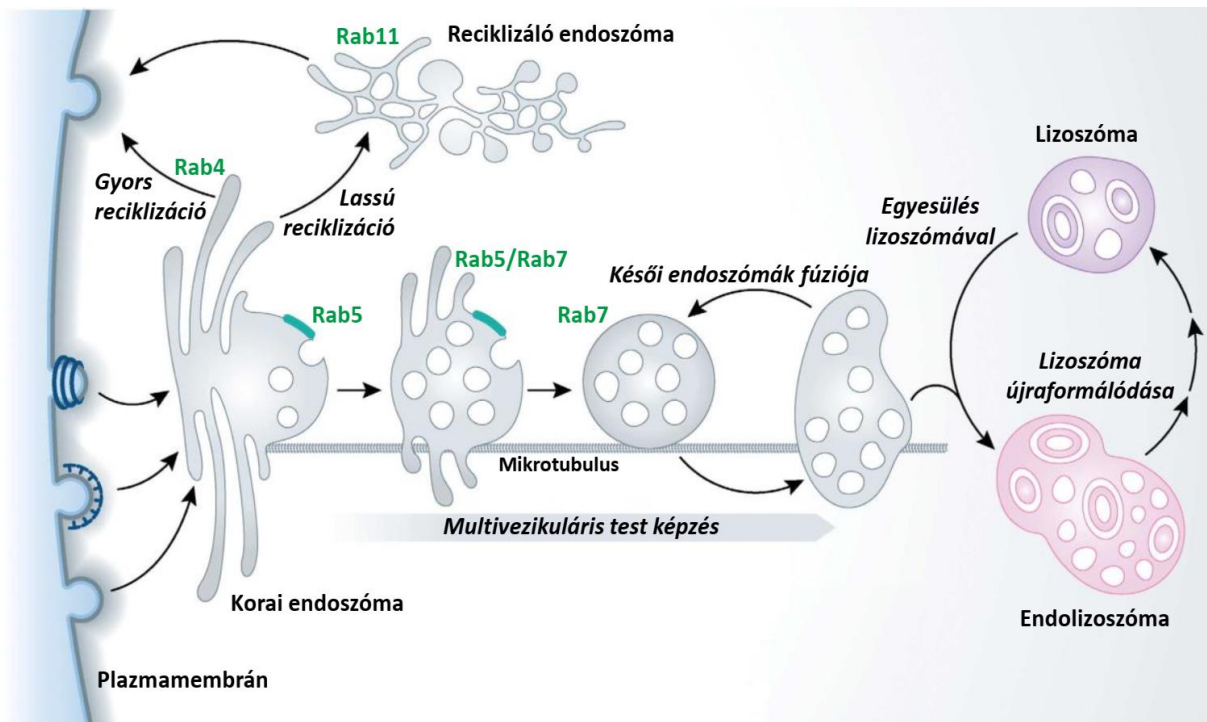
1.1.3 Lizoszómák

A késői endoszómába csomagolt szállítmány lebontásához két fontos tényezőre van szükség: emésztőenzimekre és a működésükhöz szükséges megfelelő, savas pH-jú környezetre. Ezeket a feltételeket biztosítják a lizoszómák, melyek keletkezése a TGN-hez kötött. A lizoszómák működéséhez szükséges savas hidrolázok általában az ún. közvetlen útvonalon, kis vezikulumokba csomagolva érkeznek a TGN felől és a korai vagy késői endoszómákkal egyesülnek, míg a lizoszomális membránt alkotó savtűrő integráns membránfehérjék az ún.

közvetett útvonalat preferálják (Saftig és Klumperman 2009). Azért nevezzük közvetettnek ezt az útvonalat, mert az itt közlekedő fehérjék a TGN-ből történő lefűződést követően exocitózissal kijutnak a plazmamembránba, majd pedig endocitózissal újra belépnek az endoszomális rendszerbe, amelyen keresztül megérkeznek a lizoszómákba. Ezt az utat járják be a lizoszomális markerként is alkalmazott Lamp-fehérjék (lysosome-associated membrane protein) és a savasodáshoz szükséges V-ATPáz komplex alegységek is, amelyek a lizoszómákig érve megteremtik a pH 5,0 – 4,5 közötti állapotot, melyben a savas hidrolázok aktiválódnak (Forgac 2007). Ugyan az endoszómák pH-ja az érés következtében egyre alacsonyabb, és a lizoszomális enzimek is jelen vannak már a korai endoszómákban is, az emésztés legjelentősebb hányada mégis az endolizoszómákban történik. Ezek a hibrid struktúrák a primer lizoszómák és a késői endoszómák fúziójával képződnek.

A primer lizoszómák érdekes módon már egy újrahasznosítási lépés eredményei, nem újonnan alakulnak *de novo* szintézissel (Luzio, Pryor, és Bright 2007; Yu és mtsai. 2010). Az endolizoszomális hálózatot, mint egy folyamatosan egymásba alakuló tubulovezikuláris rendszert kell elképzelni, amelyben a késői endoszómák és a lizoszómák időről időre fuzionálnak, majd a lebontást követően a lizoszomális elemek újrahasznosulnak, és primer lizoszómákként, átmeneti raktárként szolgálnak a savas hidrolázok számára (Luzio és mtsai. 2007).

A korábban tárgyalt organellumokhoz hasonlóan a lizoszómák is heterogén összetételűek és morfológiájúak. Elhelyezkedésük is sokféle lehet, de jellemzően a sejt perinukleáris régiójába tehetőek. A heterogenitás az igen változatos felvett anyagok, illetve azok sokféle származásának következménye. Változatosságukat tovább növelik a többirányú fúziós események és tartalmuk különböző mértékű emésztettsége.



1. ábra: Az endoszomális rendszer tagjai és az endoszomális érés fázisai

A plazmamembránról lefűződő primer endocitotikus vezikulumok egymással fuzionálva korai endoszómákká egyesülnek, amelyek jellemző kis GTP-áza a Rab5. A korai endoszómák a rendszer legfőbb válogató organellumai, bennük történik a szállítmány sorsának meghatározása. Szinte azonnal visszajuttathatnak bizonyos fehérjéket a plazmamembránba a gyors reciklizációs útvonalon vagy a lassú útvonalon egy reciklizáló endoszóma közbeiktatásával, melynek jellemző Rab fehérjéje a Rab11. A lebontásra ítélt anyagok a savasodásnak induló korai endoszómában maradnak, amely a Rab5 Rab7-re cserélődése mellett késői endoszómává érik. A késői endoszómák képessé válnak a lizoszómákkal történő fúzióra, így létrejön az emésztés fő színhelyéül szolgáló endolizoszóma, melyből az emésztést követően újraformálódhatnak a denzebb lizoszómák. (Részletesebb leírás a szövegben. Módosítva Huotari & Helenius, 2011 után.)

1.2 Az endocitózis vizsgálatának orvosbiológiai jelentősége

Az endoszomális rendszer segítségével különböző anyagok sokasága jut a sejt belsejébe. A plazmamembránról történő lefűződés során aktivált receptorok dúsulhatnak fel az endoszómákban és részt vehetnek különböző jelátviteli folyamatokban. A jelátviteli mechanizmusok időtartamának szabályozása kulcsfontosságú a sejt növekedési rátájának finomhangolásában. Az egymást foszforiláló tirozin kinázok a jelátviteli folyamatok fontos szabályozói, éppen ezért egy esetleges mutáció a receptorok dimerizációját vagy a foszforiláció túlaktivációját okozhatja, ennek következtében gyakran, mint az endoszomális rendszer jellemző onkogénjei hivatkoznak rájuk. Az endoszomális rendszer megfelelő működését

megannyi fehérjekomplex szabályozza, ezek hibás összeszerelődése szintén hozzájárulhat a sejtosztódási zavarok kialakulásához, a programozott sejthalál elkerüléséhez vagy a differenciálódási markerek kifejeződésének megváltozásához, mely szintén rák kialakulásához vezethet (Engedal és Mills 2014; Maxfield 2014; Mellman és Yarden 2013).

Jellegzetes poláris szerkezetük megőrzéséhez a neuronoknak szükségük van a különböző receptorok megfelelő eloszlására, a fehérjék és a különböző organellek tökéletes elrendezésére a dendritekben és axonokban, a szinaptikus vezikulumok folyamatos endo- és exocitózisára, valamint a hibás fehérjék eltávolítására. A folyamatos membránforgalom elengedhetetlen a szinapszisok létrejöttéhez is (Wu és mtsai. 2014). Ebből következően, az endoszomális rendszerben zajló membrántranszport az idegsejtek működésének minden aspektusában részt vesz, hibás működése a neurodegenerációval hozható összefüggésbe (Zadka és mtsai. 2023).

Az Alzheimer-kór (AD) egy progresszív neurodegeneratív betegség, a demencia leggyakoribb oka. Az AD jellegzetes neuropatológiai tünetei az oldhatatlan amiloid- β plakkok extracelluláris feldúsulása, a sejten belül pedig a mikrotubulus hálózathoz kapcsolódó hiperfoszforilált tau fehérje kóros felhalmozódása. Ez utóbbit gyakran neurofibrilláris kötegekként szokták említeni (Kumar, Singh, és Ekavali 2015). Az endocitózis az amiloidogén komponensek lebomlásának szabályozásában szerepet játszó központi folyamat, ezért - ugyan a pontos mechanizmus még ismeretlen - az endocitózis folyamatában részt vevő fehérjék hibás expressziója kapcsolatba hozható az AD kialakulásával. Ilyen például az AP-2 (Adaptor protein 2), a klatrin-mediált endocitózis egyik adaptorfehérjéje, melynek túltermelődése fokozza az amyloid precursor protein (APP) amiloid- β -vá hasadását (Maesako és mtsai. 2015). Valószínűleg az APP endoszomális útvonalon való haladásának lassítása egy esetleges terápiás lehetőség lehet, az AD megelőzésére (Burrinha és mtsai. 2021). Az endocitózis szabályozó rendszereinek megismerése hasznos segítséget nyújthat az AD patogenezisének megállítását vagy lassítását célzó terápiás beavatkozások fejlesztésében (Zadka és mtsai. 2023).

Míg az endocitózis egyik formája, a fagocitózis a többsejtű szervezetekben az immunvédekezés elsődleges vonala, addig sok kórokozó számára a fertőzés lehetőségét jelenti. Az evolúciósan alkalmazkodott kórokozók különböző manipulációs mechanizmusokat fejlesztettek ki a fagoszóma-lizoszóma fúzió, és ennek következtében emésztődésük elkerülésére. A *Salmonella enterica* például képes a vezikulum membrán foszfatidilinozitol-foszfát tartalmának a megváltoztatására, hogy csökkentse a membrán felületi töltését, ezáltal

csökkentve a vezikulum lizozómával történő fúziójának esélyét (Hernandez és mtsai. 2004). A *Listeria zadka monocytogenes* ellenben egy olyan rá jellemző citolizint, a listeriolizin O-t választ ki, amely nem csak a baktérium felszabadulását segíti elő, de a vezikulum teljes biokémiai profilját is megváltoztatja, hogy addig is elkerülje a lizozómával történő fúziót (Shaughnessy és mtsai. 2006). Számos további példa hozható a bakteriális membránváltozások kialakulására, amelyekkel a baktérium védelmezi magát a gazdasejt általi lebontástól (Kellermann, Scharte, és Hensel 2021).

A baktériumokhoz hasonlóan a vírusok is gyakran „használják ki” az endocitózis mechanizmusát a gazda plazmamembránján való átjutásra. A vírusok egyszerűségük következtében teljes mértékben a gazdaszervezetre vannak utalva a fertőzési ciklus gyakorlatilag minden szakaszában. Ehhez a gazdaszervezettel párhuzamosan végbemenő több millió éves evolúciós fejlődés során megszerzett molekuláris „jelszavakat” és „belépőjegyeket” alkalmaznak, hogy ki tudják használni és irányítani tudják a sejtfunkciókat (Pelkmans és Helenius 2003). Ezért a vírus-sejt kölcsönhatások elemzésével nemcsak a vírusról, hanem a sejtműködésről is sokat tanulhatunk. Nagy segítséget jelenthetnek az általuk használt sejtélettani folyamatok és a sejt invázióra adott válaszainak megértésében. A sejt által felvett vírusrészecskék hatékony eszközt nyújtanak az endoszomális rendszer útvonalainak feltárásához és nyomkövetéséhez (Cossart és Helenius 2014; Marsh és Helenius 2006).

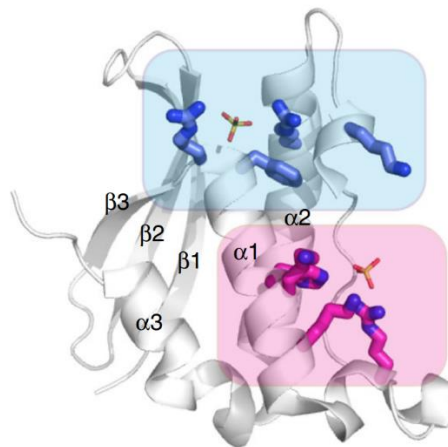
1.3 A Sorting nexin fehérjecsald

A fentebb bemutatott összetett endoszomális hálózatot megannyi fehérje szabályozza. Jelen dolgozatban csak egy ilyen csoportra szeretnék külön kitérni, az ún. Sorting nexin (SNX) fehérjecsaldra, azon belül is kiemelve az SNX-TM (transzmembrán) alcsaldot, ahová kutatásom fő témája az Snz (Snazarus) fehérje is tartozik.

Az SNX fehérjék közös jellemzője a konzervált, 110 aminosavból álló, 3 β -redőt és 3 α -hélixet tartalmazó membránasszociációs PX (phox-homology) domén, mely képes a foszfatidilinozitol-foszfátokhoz kötődni (Teasdale és Collins 2012). A PX domén felfedezése után szekvencia homológián alapuló bioinformatikai szűrések és *in vitro* vizsgálatok segítségével további, PX domént tartalmazó fehérjéket annotáltak és soroltak egy csoportba, ezáltal létrehozva az SNX fehérjecsaldot. Jelenleg szigorú definíció szerint a SNX családba azok a fehérjék tartoznak, amelyek PX domén szekvenciája 50%-nál nagyobb azonosságot mutat az elsőként leírt SNX1 fehérje PX domén szekvenciájával. Következésképp vannak más,

PX doménnel rendelkező fehérjék is, melyeket nem sorolunk az SNX-ek közé, mint például a foszfolipáz D és a foszfatidilinozitol-3-kinázok. A ma ismert, az emlős genomra jellemző, PX domént tartalmazó fehérjecsoportból 33-at tart az irodalom SNX-nek (Vieira és mtsai. 2021). Jelen munkámban a nem SNX-nek nyilvánított, PX domén tartalmú fehérjék tárgyalásától eltekintek. Kitekintésként annyit érdemes megjegyezni, hogy ezeket a fehérjéket eddig főként szignál transzdukciós útvonalakban írták le vagy fehérjepányvázási mechanizmusokkal hozták kapcsolatba. Ezen funkcióikkal is hasonlítanak az SNX-ekhez (Chandra és mtsai. 2019).

Az SNX fehérjék a PX doménjükön keresztül kötődnek a foszfatidilinozitol-foszfátban gazdag endoszomális membránokhoz, így válnak az endoszomális rendszer fontos szabályozóivá.



2. ábra: A NADPH-oxidáz-ban azonosított, elsőként leírt PX domén egyszerűsített szerkezete

Az SNX fehérjéket PX doménjük alapján sorolják egy családba. Ez egy konzervált, 110 aminosavból álló, 3 β -redőt és 3 α -hélixet tartalmazó membránasszociációs domén, mely képes a foszfatidilinozitol-foszfátokhoz kötődni. Kékkel a kanonikus PI(3)P kötőhelyek, míg rózsaszínnel a másodlagos kötőhelyek vannak kiemelve (Chandra és mtsai. 2019).

A PX domént először konzervált motívumként azonosították a neutrofil NADPH-oxidáz (phox), egy szuperoxidot termelő komplex két alegységében: p40phox és p47phox (2. ábra). (Ponting 1996) Élesztőben végzett kísérletek során a PX domén majdnem kizárólagos PI(3)P preferenciáját találták, amely a korai endoszómák jellemző foszfatidilinozitol-foszfát formája. Így az SNX-eket elsősorban a korai endoszómák fehérjeválogató mechanizmusának szabályozójaként értelmezték. Azonban az emlőssejtes vizsgálatok rávilágítottak, hogy egyes SNX fehérjék más foszfatidilinozitol-foszfátokhoz is képesek kötődni (Chandra és mtsai.

2019). Ezáltal egyértelművé válik az endoszomális rendszerben történő változatos lokalizációjuk és kölcsönható fehérjék szélesebb köre.

Később kimutatták, hogy vannak olyan SNX-ek, amelyek egyáltalán nem kötik a PI(3)P-t, mint például az SNX14 (Chandra és mtsai. 2019). Más szerzők pedig arról számoltak be, hogy a PX domén nem csak, mint lipidkötő motívum lehet jelen egy fehérjében, hanem elősegítheti fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakulását is, részt vehet fehérjék pányvázásban, segítve azok komplexbe szerveződését, meghatározva membránhoz való kötődésüket és így sejten belüli helyzetüket is. Mindezt az α -1 és α -2 hélixek közötti prolinhurok dinamikus átformálásával érik el (Hammond és Balla 2015).

Az SNX1 volt az első leírt emlős SNX, amelyről élesztő két-hibrid módszerrel kimutatták, hogy kölcsönhatásba lép az epidermális növekedési faktor receptorral (EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor), és nagy hasonlóságot mutat a Vps5 (Vacuolar protein sorting) retromer komplex alegységgel (Seaman, Mccaffery, és Emr 1998). A retromer kifejezés olyan „heteropentamer” fehérjekomplexek elnevezése, amelyek képesek a korai endoszómákból a plazmamembrán vagy a TGN irányába továbbítani az endoszomális szállítmányt. A már korábban említett gyors reciklizáció, amely során szinte azonnal, néhány percen belül jutnak vissza fehérjék a plazmamembránba, az SNX27 tartalmú retromer segítségével jön létre. Az elsőként felfedezett, (Bin/Amphiphysin/Rvs) BAR-SNX-retromernek is nevezett komplex azonban az ún. retrográd transzportban vesz részt, amely során a korai endoszómákból a TGN felé továbbítódnak a kiválasztott fehérjék (Gallon és Cullen 2015).

A retromer komplex alkotói funkcionálisan két alkompleyre oszthatók: az ún. „cargo selective” vagy receptor alkompleyre, amely a retromer által kiválasztott transzmembrán fehérjékkal lép kapcsolatba, miközben a másik, ún. „membrane deforming” alkomplex tartalmazza az SNX fehérjéket. Ezek a fehérjék PX doménjük segítségével a meghatározott membránrégió foszfatidilinozitol-foszfátjaihoz kapcsolódnak, BAR doménjük segítségével pedig az endoszomális tubulusok köré rendeződve elősegítik a leváláshoz szükséges membrán görbület létrejöttét (Bonifacino és Hurley 2008). Azonban nem minden SNX fehérje részese valamely retromer komplexnek.

Az SNX fehérjék a már említett BAR doménhez hasonló további konzervált doméneket is hordozhatnak közös PX doménjük mellett. Ezek határozzák meg az SNX-ek funkcióját, növelve szerepük sokféleségét, mint a membrángörbület elősegítése, fehérjepányvázás,

jelátviteli funkciók szabályozása. A család különböző tagjait doménösszetételük alapján további alcsaládokba osztják (3. ábra).

1.3.1 SNX alcsaládok

Jelenleg a legismertebb és legjobban jellemzett alcsalád az SNX-BAR, melynek fehérjéi C-terminális BAR doménnel rendelkeznek. Ide sorolják a legtöbb SNX fehérjét. Nagyon jelentősek az endoszomális rendszer válogatási folyamataiban, mind fehérjeszortírozás, mind pedig membrán felismerés szintjén. A foszfatidilinozitol-foszfát asszociáción keresztül felelősek a membrán görbületek kialakításáért, így az endoszomális tubulusok képződéséért is, továbbá kulcsfontosságú hajtóelemei a vezikulumleválás („fission”) folyamatának. Ezen egymáshoz szorosan kapcsolódó tevékenységek következtében jelentős szerepük van a vezikulum szállításon kívül a vírus replikáció utolsó lépésében, a vírus kiszabadulásában és a citokinézisben is (Snead és mtsai. 2019). Ilyen SNX-BAR fehérjék a retromer komplex tagok, mint például az SNX1/SNX2 és SNX5/SNX6 vagy a kevésbé tanulmányozott SNX4, SNX7, SNX8, SNX30, SNX32 fehérjék.

Mindazonáltal, mivel *in vivo* gyakran kapcsolódnak össze a működésük szempontjából kulcsfontosságú homo- vagy heterodimerként, esetleg magasabb rendű oligomer komplexként, ezért sokkal bonyolultabbá válik egyedi szerepük tisztázása. Bizonyos kísérletekből nyilvánvalóvá vált, hogy egyes tagok helyettesíthetik egymást egyes funkciók ellátásában, mivel hasonló biokémiai tulajdonságokkal rendelkeznek. Ilyen például az SNX1/SNX2 vagy az SNX5/SNX6 retromer komplexben betöltött szerepe, mely során részt vesznek a retrográd válogatásban (Kerr és mtsai. 2006; Rojas és mtsai. 2007). Az alcsalád összetettségét tovább növeli, hogy mindegyikük további egyedi tulajdonságokkal és funkciókkal is rendelkezik az endoszomális válogatásban, amelyek során az egyes fehérjék nem cserélhetőek fel (Vieira és mtsai. 2021).

Az SNX-BAR alcsaládon belül elkülönítenek egy SH3-BAR al-alcsoportot, ahová az olyan fehérjék kerülnek, melyek egy N-terminális SH3 (Src Homology 3) domént is tartalmaznak, amely részt vesz fehérje-fehérje kölcsönhatásokban. A PX és az SH3 domén egy linker régió keresztül kötődik egymáshoz, mely fontos a klathrin és az AP-2 megkötésében, ezáltal ezek a fehérjék kapcsolódnak a klathrin-mediált endocitózis lépéseire, továbbá leírták szerepüket az autofagoszóma biogenezisben és mitózisban is (Ma és Chircop 2012).

Létezik egy feltehetőleg BAR doménjét vesztett, PX-SH3-nak nevezett alcsalád is. Ide tartozik az SNX26, egy GTPáz aktiváló fehérje, amely az emberi szervezet minden területén expresszálódik, és az SNX28, egy NADPH-oxidáz organizáló fehérje, amelyet NOXO1-ként is megtalálhatunk az irodalomban (Vieira et al., 2021)..

Az SNX-FERM-nek nevezett alcsalád tagjai egy (protein 4.1/ezrin/radixin/moesin) doménnel rendelkeznek, mely legismertebb szerepe a lipid-fehérje kölcsönhatások kialakításában nyilvánul meg. Ezek a fehérjék a prolinban gazdag szekvenciákat részesítik előnyben, kifejezetten az NPxY (Asn-Pro-Xaa-Tyr) motívumot tartalmazó szállítmányokhoz asszociálnak, és képesek kötődni a H-Ras kis GTP-ázhoz, ezáltal szerepet játszva a jelátviteli folyamatok szabályozásában és összekapcsolva azokat az endoszomális forgalommal (Ghai és mtsai. 2011). Az alcsalád legjobban jellemzett tagja az SNX27, melyet a központi idegrendszeri homeosztázis szabályozásával hoztak összefüggésbe. A vizsgálatok szerint fontos lehet az olyan magasabb rendű idegrendszeri folyamatokhoz, mint a tanulás és a memória kialakulása (Wang és mtsai. 2013).

Egy alcsaládba sorolják az olyan SNX fehérjéket, melyek nem rendelkeznek a PX doménon kívül további konzervált doménnel. Ugyan számos fehérje tartozik ebbe az alcsaládba, mégis kevés ismeret áll a rendelkezésünkre az egyes fehérjékről. Szerkezeti szempontból is igen változatos, eltérő hosszúságú fehérjékről van szó. A legjobban jellemzett tagok az SNX3 és SNX12, melyekről tudjuk, hogy részt vesznek a Wnt (Wingless) jelátviteli folyamat modulálásában a Wls (Wntless) fehérje újrahasznosításának fenntartásával a retrográd transzporton keresztül, és az intraluminális vezikulumok képződésében (Vieira és mtsai. 2021).

Az olyan fehérjéket, amelyek szerkezete még jellemzésre vár vagy nem fértek bele egyik alcsaládba sem az „egyéb SNX-ek” elnevezésű alcsaládba soroltak be. A legtöbbjük funkciója még ismeretlen. Néhányukat az idegrendszer homeosztázisának fenntartásával hozzák kapcsolatba, mint az SNX15, SNX16 és SNX21 (Vieira és mtsai. 2021).

1.3.2 SNX-PXA-RGS-PX-PXC vagy SNX-TM alcsalád

A következő alcsalád, a többiektől eltérően két N-terminális transzmembrán doménnel rendelkezik, ezért használhatjuk esetében az SNX-TM elnevezést is. A központi PX domént több konzervált domén fogja közre. Az első azonosított domén az RGS (Regulator of G protein signaling) domén volt, amely számos olyan molekulából ismeretes, amelyek GAP-ként (GTP-ase activating protein) működnek, és így a G-fehérjékhez kapcsolt jelátviteli útvonalak negatív

szabályozóiként vannak számontartva. A két másik domén kb. 150 aminosav hosszúságú és az RGS és a központi PX domén-t fogják közre; N-terminálisan a PXA (PX-associated domain A), míg C-terminálisan a PXC (PX-associated domain C). Ezen domének esetében különböző funkciókat írtak le, így pontos szerepük még tisztázatlan. Az SNX13, SNX14 és SNX25 mellett az SNX19-et is ide sorolják annak ellenére, hogy az SNX19 nem rendelkezik RGS motívummal.

Az SNX-TM fehérjékkel kapcsolatban kimutatták, hogy PX doménjükben egy olyan megváltozott kötőzsebbel rendelkeznek, amely a megszokott PI(3)P helyett előnyben részesíti a foszfatidilinozitol-biszfoszfátokhoz való kötődést. Az SNX14 esetében kizárólagosan PI(3,5)P₂ kötést mutattak ki, míg a többi fehérje további foszfatidilinozitol-biszfoszfátokhoz is képes kötődni (Amatya és mtsai. 2021).

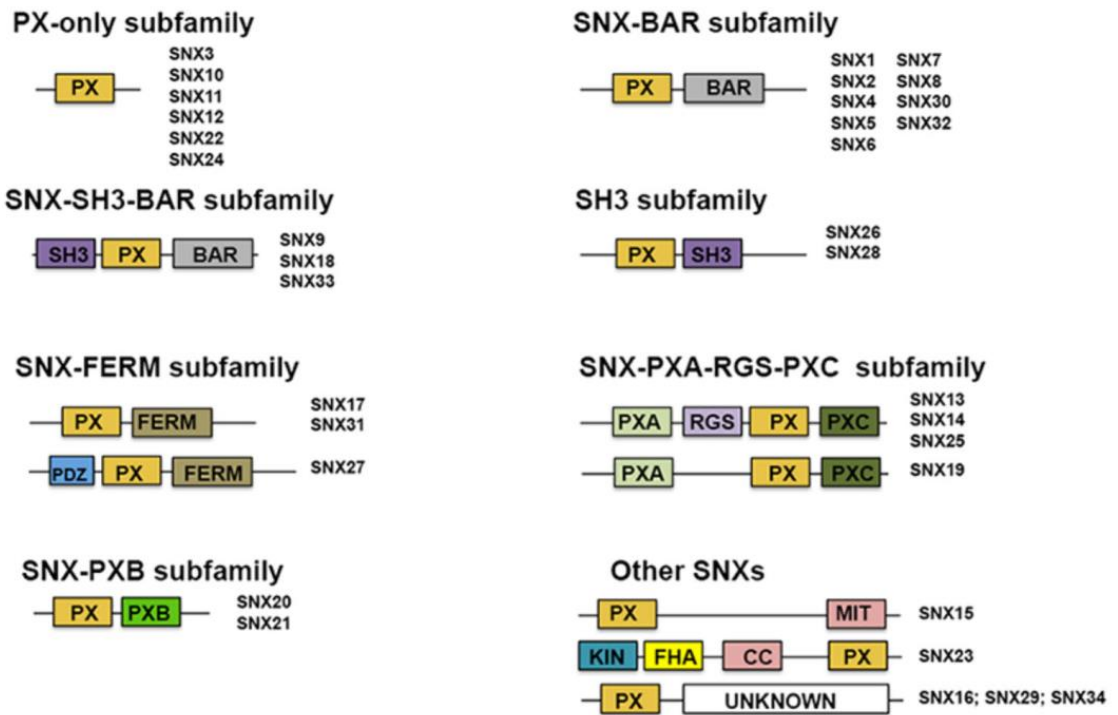
Az SNX13 és SNX19 szerepéről még igen keveset tudunk. Az SNX13 esetében leírták, hogy alapvető fontosságú az egerek egyedfejlődésében, mivel szabályozza az endocitózis közvetítette anyagforgalmat és az EGFR lebomlását (Zheng és mtsai. 2006). Az SNX19 fehérjét pedig, mint a skizofrénia genetikai kockázati tényezője írták le (Ma és mtsai. 2020).

Az SNX14 a legtöbbet vizsgált SNX-TM fehérje, mivel már a kezdeti tanulmányok is idegrendszeri megbetegedésekhez kötötték a hiányát. Az SNX14 mutációi a cerebelláris ataxia szindróma egy típusának kialakulásához vezetnek, amely a kisgyermeki Purkinje-sejtek elhalásával jár és tünetei a betegek értelmi visszamaradottsága, az eltorzult, durva arcvonások. (Akizu és mtsai. 2015; Thomas és mtsai. 2014). A fehérje molekuláris funkcióját vizsgálva azt találták, hogy az SNX14 részese egy olyan, a membránokat összekapcsoló struktúrának, az ún. membrán érintkezési pontoknak, amelyek segítségével az endoplazmatikus retikulum (ER) és a lipidcseppek kerülnek egymáshoz megfelelő közelségbe, így segítve a zsírsavak triacil-gliceridekbe történő beépülését, és fenntartva ezzel a membránok lipidegyensúlyát (Datta és mtsai. 2019, 2020). Az irodalmi adatok alapján tudjuk továbbá, hogy az SNX14 szerepet játszik az idegrendszer homeosztázisának fenntartásában. Fontos az idegrendszer fejlődéséhez is, mivel expressziós szintje fokozatosan emelkedik az agy fejlődésével párhuzamosan. Vélhetően szerepet játszik a neuronális ingerlékenység helyreállításában és fontos a szinaptikus kapcsolatok megteremtéséhez (Huang és mtsai. 2014).

Az SNX25 esetében végzett humán- és egérsejtes kísérletek több, egymástól eltérőnek tekinthető funkciót tártak fel. Emlőszövetben négy szövetben találtak kiemelt SNX25 expressziót: a tüdőben, a lépben, a vesében és az agyban. Elsőként azt találták, hogy az SNX25 kölcsönhatásba lép a TGF- β receptorokkal, és negatívan szabályozza a TGF- β jelátvitelt a

receptor lebomlásának fokozásával vese és tüdősejtekben (Hao és mtsai. 2011). Egy idegsejteket célzó kísérletben meghatározták az SNX25 expressziós mintázatának változását temporális lebeny epilepsziában szenvedő betegek agyszövetében, valamint az epilepszia pilokarpin-indukálta patkánymodelljében. Eredményeikből arra következtettek, hogy az SNX25 túltermelődése szerepet játszhat a temporális lebeny epilepszia kialakulásában (Du és mtsai. 2013). Az idegrendszerben az SNX25 a tropomiozin receptor kináz B-vel (TrkB) kolokalizál az agykéreg és a hippocampus neuronjaiban, ahol elősegíti a TrkB lizoszomális lebomlását (Takemura és mtsai. 2020).

A legújabb, HeLa sejtekben végzett kísérletek során az SNX25-öt az autofág fluxus szabályozójaként azonosították. Ezt a funkcióját valószínűleg a VAMP8 (vesicle associated membrane protein 8) endoszomális rendszerben történő szállításának szabályozásán és a lipidanyagcsere befolyásolásán keresztül érvényesíti. A VAMP8 fehérje szükséges az autofagoszóma-lizoszóma fúzió létrejöttéhez, így hiányában csökkent autofág lebontást tapasztaltak. Érdeemes megemlíteni, hogy ebben a tanulmányban kitértek az SNX paralógok közötti lehetséges komplementáció vizsgálatára is. Az SNX25-hiányos HeLa sejtekben az SNX14 megnövekedett expresszióját mutatták ki, amely rávilágít a kompenzáció jelenségére és a több lehetséges magyarázat egyike lehet arra, hogy SNX25 hiányában miért nem szűnik meg teljesen az autofág fluxus (Amatya és mtsai. 2021).



PX - PX domain
 BAR - Bin-Amphiphysin-Rvs domain
 SH3 - Src Homology 3 domain
 FERM - protein 4.1/ezrin/radixin/moesin domain
 PDZ - PSD-95, Disc-large and ZO-1
 PXA - PX-associated domain A
 RGS - Regulator of G-protein signalling domain
 PXB - PX-associated domain B
 PXC - PX-associated domain C
 MIT - Microtubule associated domain
 KIN - Kinesin motor
 FHA - Forkhead association domain
 CC - Coiled-coil domain
 UNKNOWN - unidentified structures

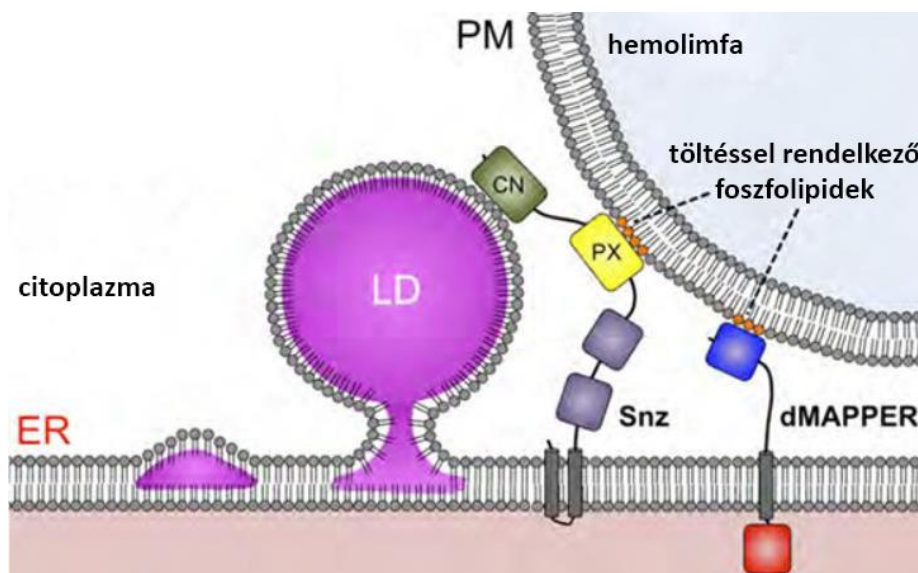
3. ábra: Az SNX fehérjék alcsaládokba sorolásának sematikus ábrázolása

Az SNX fehérjecsald közös jellemzője az okkersárgával jelölt PX domén. A fehérjéket további specifikus doménjeik alapján különböző alcsaládokba soroljuk. (eredeti, módosítatlan ábra Vieira et al., 2021.)

1.4 Snazarus

A *Drosophila melanogaster* egyetlen SNX-TM fehérjével rendelkezik, a CG1514 számú Snazarus-szal (Snz), mely megfeleltethető a fentebb említett humán SNX25-tel. Az Snz-vel kapcsolatos első tanulmányokat lárvális zsírtestben végezték, és a funkcióvesztéses mutánsok élettartamának meghosszabbodásáról számoltak be. Ezért nevezték el a szerzők ezt a gént *sorting nexin lazarus*-nak, röviden *snazarus*-nak, utalva ezzel a bibliai Lázár feltámadására (Suh és mtsai. 2008). A közelmúltban azonosították az Snz molekuláris funkcióját is, mely szerint részt vesz a lipidmetabolizmus szabályozásában, fenntartva a normál lipidcsepp eloszlást a lárvális zsírtestek sejtjeiben azáltal, hogy membrán érintkezési pontokat biztosít az ER, a plazmamembrán és a perifériás lipidcseppek között (Ugrankar és mtsai. 2019).

A zsírsejtek fontos feladata, hogy zsirtartalékaikat egyszerre raktározzák hosszú távú felhasználásra, és mindeközben könnyen mobilizálhatóak is legyenek olyan nagy energia szükségletű élettani folyamatok vagy válságok ellátására, mint a metamorfózis, vagy az éhezés. E két funkció egyidejű fenntartásának módja részben még ismeretlen, de bizonyosan összetett szabályozás alatt áll, és jelentős térbeli és anyagcsere kihívásokat jelent a sejt számára (Arrese és Soulagés 2010). A *Drosophila* zsírtestsejtekben térben elkülönülő, funkcionálisan eltérő lipidcsepp csoportokat találhatunk. A perifériás lipidcseppek a sejt felszín közelében találhatóak és közvetlen kapcsolatban állnak a plazmamembránnal. Éhezés hatására mennyiségük és méretük megváltozik. Ebből arra következtettek, hogy a bennük lévő lipidek mobilizálódnak, hogy tápanyagot biztosíthassanak az éhező lárvális szöveteknek a lipoforin transzferázok segítségével. A sejt belsejében található, mediális lipidcseppekben tárolt zsírok a perifériás lipidcseppekből származnak (elegendő táplálék esetén az ER-en keresztül jutnak ide), illetve a sejt *de novo* FASN1- (fatty acid synthase 1) függő módon is szintetizálja őket. Az Snz fehérjét a lipidcsepp homeosztázis szabályozójaként is jellemzik, amely az ER-plazmamembrán-lipidcsepp (ER-PM-LD) érintkezési pontokon található, ahol elősegíti a triacil-gliceridek lipidcseppek formájában történő tárolását (4. ábra) (Ugrankar és mtsai. 2019).



4. ábra: Az Snz-t tartalmazó ER-PM-LD érintkezési pont modellje *Drosophila* lárvális zsírsejtben

Drosophila zsírsejtekben az Snz a sejtek perifériáján helyezkedik el, és kolokalizál az ER-PM érintkezési pontok markerével, a dMAPPER-rel. Ugrankar és munkatársai eredményeik alapján egy olyan modellt dolgoztak ki, melyben az Snz N-terminális transzmembrán régiójával az ER-be horgonyzódik, PX doménjével pedig a plazmamembránhoz (PM) kötődik, míg C-terminális része (CN) egy szintetizáló lipidcsepphez (LD) képes kapcsolódni, így részt vesz a lipidcseppek kialakulásában az ER-PM-LD érintkezési pontokon keresztül (módosítva Ugrankar et al., 2019 után).

A közelmúltban az Snz fehérjét a zsírszövetben az autofág fluxus, azaz az autofág lebontási rendszeren átáramló anyag mennyiségének szabályozójaként is azonosították a ref(2)P (refractory to sigma P) követésével. A ref(2)P a humán p62 autofág szubsztrát *Drosophila* ortológja, így egyszerre rendelkezik egy ubiquitin kötő doménnel, és egy Atg8 kötő doménnel. Előbbi UBA (Ubiquitin-associated domains) elnevezésű doménjével kapcsolódik a lebontásra kijelölt fehérjékhez, míg Atg8 kötő LIR (LC3 interakciós régió) motívumán keresztül képes kapcsolódni az autofagoszómákhoz, ezáltal elősegítve önmaga és a lebontandó fehérje szelektív lebontását. A kísérlet során az találták, hogy míg vad típusban a ref(2)P az autofagoszómákba kerül, majd a lizoszómákkal történő fúziót követően lebomlik, addig Snz hiányában felhalmozódik a zsírsejtekben, amely az autofág fluxus hibájára utal (Lauzier és mtsai. 2022).

1.5 *Drosophila* modellsejtek

1.5.1 Garland nefrocita mint humán podocita modell

Munkám során az ecetmuslicát, latinul *Drosophila melanogaster*-t használtam modellszervezetként.

A *Drosophila* kutatási célokra történő felhasználása ma már évszázados múltra tekint vissza. Ennek oka az egyszerű és költséghatékony fenntarthatóság, kis helyigény, a gyors reprodukciós idő, viszonylag egyszerű genetikai manipulálhatóság és az alacsony kromoszómaszám (csupán 4 db kromoszóma). Mindezek mellett az *in vitro* sejtenyészetekkel szemben nagy előnye, hogy kísérleteink során egy élőlény komplex rendszerét vizsgáljuk, melyben a sejtek folyamatosan kommunikálnak, és hatnak egymásra a közös cél, az ecetmuslica megfelelő fejlődésének, és génjei tovább örökítésének céljából.

Kísérleteim során elsődleges modellként lárvális garland nefrocitákat alkalmaztam, melyek az ecetmuslica kiválasztó szervrendszerének részei.

A valódi szövetes állati szervezetekben a kiválasztó szervrendszer feladata, hogy megszabadítsa az egyedtet a mérgeanyagoktól és fenntartsa a homeosztatikuss egyensúlyt. Annak ellenére, hogy a különböző állatfajok kiválasztó szervei nagyban eltérnek egymástól, mégis két közös alapfeladattal rendelkeznek (Denholm és Skaer 2009; Weavers és mtsai. 2009). Ezek az ultraszűrés, mely következtében létrejön az elsődleges szűrlet, illetve a szűrlet tubulusokban

történő módosítása, mely magába foglalja az aktív szekréciót és a reabszorpciót. A gerinces vese alapvető szerkezeti és funkcionális egysége a nefron, amely egy, az ultraszűrést biztosító vesetestecskéből (glomerulus és Bowman-tok együttese), és egy vesetubulusból áll, amelyen végighaladva az elsődleges szűrlet vizeletté alakul.

A gerinces vese jelenleg leggyakrabban alkalmazott modellrendszere az egérvese. A modell előnyei vitathatatlanok, ellenben megvannak a maga hátrányai is, mint a költséges fenntartás, a hosszú generációs idő és persze az állatjóléti szempontok is mérlegelendők. Így szükségszerű az alternatív modellek keresése, alkalmazása (Helmstädter, Huber, és Hermle 2017).

Gyakran mint gerinces jellemző tekintenek a nefronokra, de azért a „nefronszerű” jellemzők számos gerinctelen szervezetében megtalálhatók, ami felveti annak a lehetőségét, hogy a gerincesek kiválasztó rendszerük összetevőit gerinctelen őseiktől örökölték (Ruppert 1994).

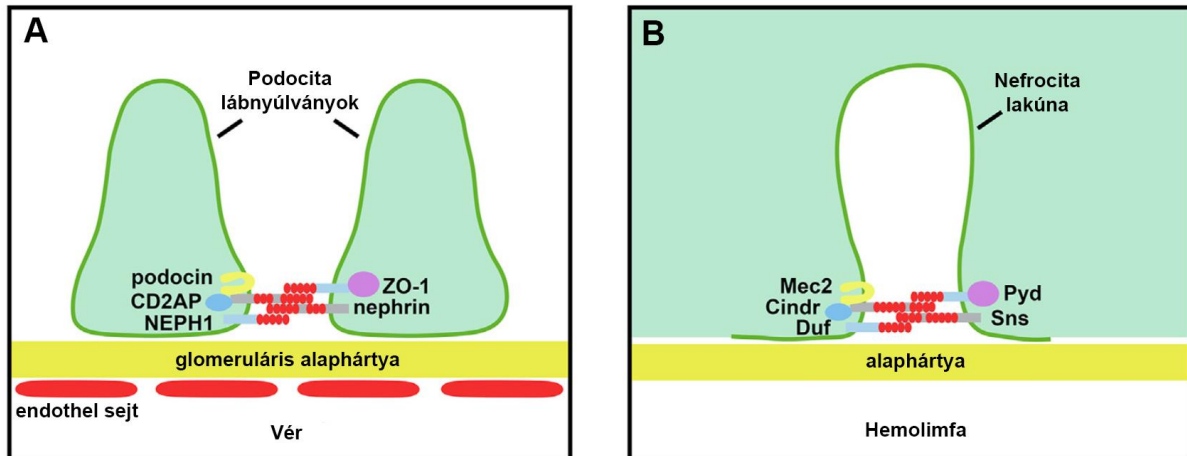
A *Drosophila* nefrocitát először Alexander Onufrievich Kowalevsky írta le 1889-ben, és „tárolóvesének” nevezte el, mivel azt tapasztalta, hogy képes megkötni és tárolni a hemolimfából származó anyagokat (Denholm és Skaer 2009). Erre a sejttípusra az elmúlt évtizedekig csak korlátozott érdeklődés irányult, mígnem felfedezték, hogy figyelemreméltó anatómiai, molekuláris és funkcionális hasonlóságot mutat a gerincesek podocitáival (Helmstädter és mtsai. 2017). Az elmúlt évtizedben egyre nagyobb jelentőséggel használják a humán podociták működésének részletesebb megismerésére, illetve a vese megbetegedéseinek (nefropátiák) tanulmányozására (van de Leemput, Wen, és Han 2022).

A gerinces vesében a podociták vagy lábassejtek kulcsszerepet játszanak a vese filtrációs gátjának kialakításában és fenntartásában. Ezek a sejtek alkotják a Bowman-tok zsigeri falát, és komplex szerkezetet hoznak létre a glomerulust alkotó kapillárisok köré szorosan rendeződve. A podociták lábnyúlványai ún. résmembránnal (slit membrane) vagy diafragmával kapcsolódnak egymáshoz, amelyen kb. 30-50 nm átmérőjű pórusok találhatóak, és a negatív töltésű glomeruláris alaphártyával (glomerular basal membrane, GBM) együtt méret- és töltésszelektív szűrőgátat alkotnak (D’agati, Kaskel, és Falk 2011). Ennek a szűrőgátnak a károsodása vagy lebomlása proteinuriához és végül veseelégtelenséghez vezet (Patrakka és mtsai. 2000).

Bár a rovarok kiválasztó rendszere más funkcionális és szerkezeti egységekbe rendeződik, mint a gerinces nefronok, a sejtmorfológia és a fehérjeexpresszió jelentős hasonlóságai evolúciós összefüggésre utalnak (Weavers és mtsai. 2009; Zhuang és mtsai. 2009). A rovarok kiválasztó szervrendszere több, egymástól fizikailag elkülönülő egységből áll: a Malpighi-tubulusokból és két különálló nefrocita populációból. Az ecetmuslica közepbeléhez csatlakozó Malpighi-tubulusok feladata az ultraszűrlet képzése, az ozmoreguláció, illetve a nitrogéntartalmú salakanyagok hemolimfából történő eltávolítása (Denholm és Skaer 2009). A perikardiális nefrociták a szívcső mellett sorakoznak, míg a garland nefrociták a nyelőcsövet ölelik körül gyöngysorszerűen. A nefrociták feladata a hemolimfa megtisztítása, összetételének szabályozása. A nefrocita plazmamembrán betűrődéseivel jönnek létre a gerinces podociták lábnyúlványainak megfeleltethető struktúrák, melyek együttese alkotja a labirintus csatorna- vagy lakúnahálózatot. A lakúnák bejárata keskeny, kb. 30 nm széles, és egy speciális fehérjék alkotta szűrőgáttal rendelkezik, amelyet nefrocita diafragmának nevezünk. Minden nefrocitát egy negatív töltésű alaphártya borít be, ami a diafragmával közösen alkot töltésszelektív szűrőgátat, mely hatékonyan zárja ki a 10–12 nm-nél nagyobb átmérőjű részecskéket (Weavers és mtsai. 2009). A hemolimfából a szűrőgáton átjutó molekulák, anyagcsere-végtermékek és egyéb részecskék endocitózissal kerülnek be a nefrociták citoplazmájába, ahol az endoszomális hálózatban haladva különböző sorsra juthatnak: módosítás, reciklizáció, lebontás vagy élethosszig tartó izoláció (Denholm és Skaer 2009).

A diafragma molekuláris komponensei erős evolúciós konzerváltságot mutatnak (Zhuang és mtsai. 2009). A diafragma fő összetevői emberben a NEPH1 (Nephrin-like 1) és a nephrin, míg *Drosophila* ortológjaik a Dumbfounded (Duf) és a Sticks and Stones (Sns). Ezek az immunglobulin szupercsalád tagjai, amelyekről ismert, hogy többek között sejtadhéziót közvetítenek, és adaptorfehérjeiken keresztül befolyásolják a citoszkeletális szerveződést. A Duf számára ilyen intracelluláris, aktinhoz kapcsolódó adaptorfehérje a polychaetoid (Pyd) (humán megfelelője a *zonula occludens-1*, ZO-1), mely elősegíti a Duf és az Sns összekapcsolódását a diafragmában. A szűrőgátat alkotó további adaptorfehérjéről (podocin/Mec2 és CD2AP/CG31012) kevesebb ismeret áll rendelkezésünkre, de az bizonyos, hogy mind emberben, mind pedig *Drosophilában* szükségesek a diafragma megfelelő működéséhez, hiszen hiányukban a diafragma kóros elváltozásait tapasztalták (5. ábra) (van de Leemput és mtsai. 2022).

A legtöbbet vizsgált, diafragma-defektushoz kötött megbetegedés a finn típusú veleszületett nefrotikus szindróma (NPHS1, a nephrin genetikai hibái által okozott humán betegség) (Patrakka és mtsai. 2000), mely már jól modellezhető az *sns* és/vagy *duf* mutáns muslicákban, ahol a diafragma teljes hiányát tapasztalták, és a sejt szűrési képességei súlyosan károsodtak (Weavers és mtsai. 2009).

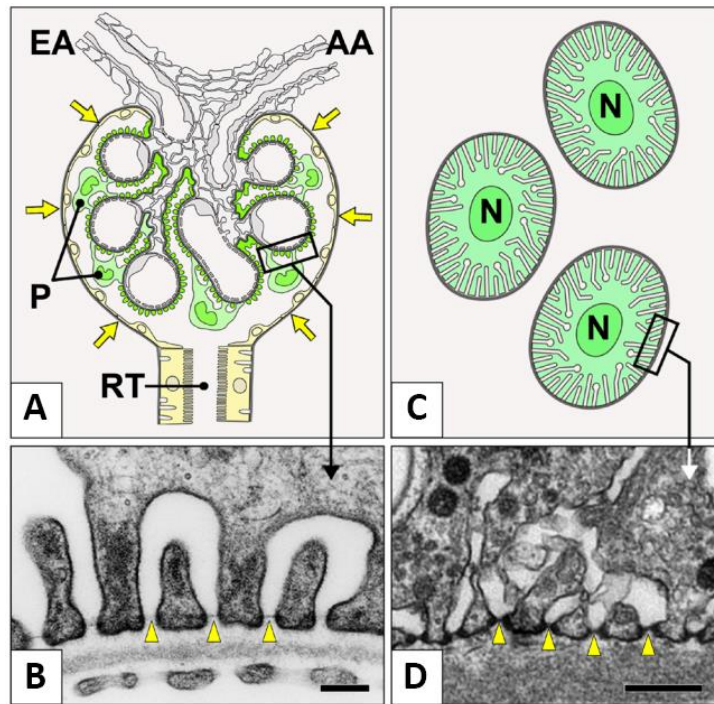


5. ábra: A humán és a *Drosophila* diafragma fehérjék elrendeződésének sematikus ábrázolása

A bal oldali ábra a humán glomeruláris filtrációs gát szerkezetét mutatja (A). A podocita lábnyúlványok közötti diafragma fehérjék szerveződésével és az alattuk látható alaphártya segítségével jön létre a méret- és töltésszelektív szűrőgát, mely a glomeruláris kapillárisok köré szerveződve végzi el a vér szűrését. A jobb oldali panel a *Drosophila* nefrocita szűrőgátját mutatja be (B), ahol a szűrésért felelős diafragma fehérjék a plazmamembrán betűrődése következtében létrejött lakúnak bejáratában ülnek. A diafragma alapvető összetevői erősen konzerváltak a *Drosophilától* az emberig (módosítva van de Leemput et al., 2022 után).

Bár, ahogy fentebb írtam, a *Drosophila* nefrociták és a gerinces podociták nagyon hasonlóak szerkezetükben, mégis fontos kiemelni, hogy a diafragma topológiai viszonyai különbözőek a két sejtípus esetén. A podociták speciális hámsejtek, amelyek szorosan a glomeruláris kapillárisok köré tekeredve végzik el szűrő funkciójukat. Az ujjszerűen összefonódó lábnyúlványokon keresztül a szomszédos podociták szorosan kapcsolódnak egymáshoz (interdigitálódnak), és közöttük alakul ki a diafragma fehérjék komplexe.

Az *ecetmuslica* esetében az egyes nefrociták egymástól függetlenül létező sejtek, melyek ugyan egymás mellé rendeződtek, de nincs közöttük interdigitáció. A podociták lábnyúlványaihoz hasonló struktúrák pedig az egyes sejtek plazmamembránjainak betűrődésével jönnek létre (6. ábra) (Kawasaki és mtsai. 2019).



6. ábra: A humán podociták és a *Drosophila* nefrociták összehasonlítása

Egy glomerulus sematikus rajza (A). A podociták epiteliális rétege (P) körülveszi a glomeruláris kapillárisokat, és a Bowman-tok vékony parietális rétegén (sárga nyilak) keresztül a vesetubulusban (RT) folytatódik. AA, afferens arteriola; EA, efferens arteriola. A glomerulus falának hagyományos elektronmikroszkópos (EM) képe (B). A podocita lábnyúlványok közötti diafragma fehérjék (sárga nyílhegyekkel jelzett halvány sávok) és az alattuk található alaphártya alkotja a szűrőgátat. Perikardiális sejtek sematikus ábrázolása (C) - ezek a sejtek funkcionálisan egyenértékűek a garland nefrocitákkal, azzal a morfológiai különbséggel, hogy utóbbiak nem egy, hanem két sejttaggal rendelkeznek. A nefrociták esetében a podocita lábnyúlványokkal megfeleltethető struktúra az egyedi sejtek plazmamembrán betűrődéseivel jön létre, ezekben a lakúnáknak ülnék a hemolimfa szűréséért felelős, diafragma fehérjék alkotta komplexek. Egy nefrocita periferiájának EM képe (D). Az elektronlucens betűrődések bejáratánál láthatóak a (sárga nyílhegyekkel jelölt) denzebb, diafragma fehérjék alkotta komplexek. Az EM képeken a skála: 200 nm. (Módosítva Kawasaki et al., 2019 után).

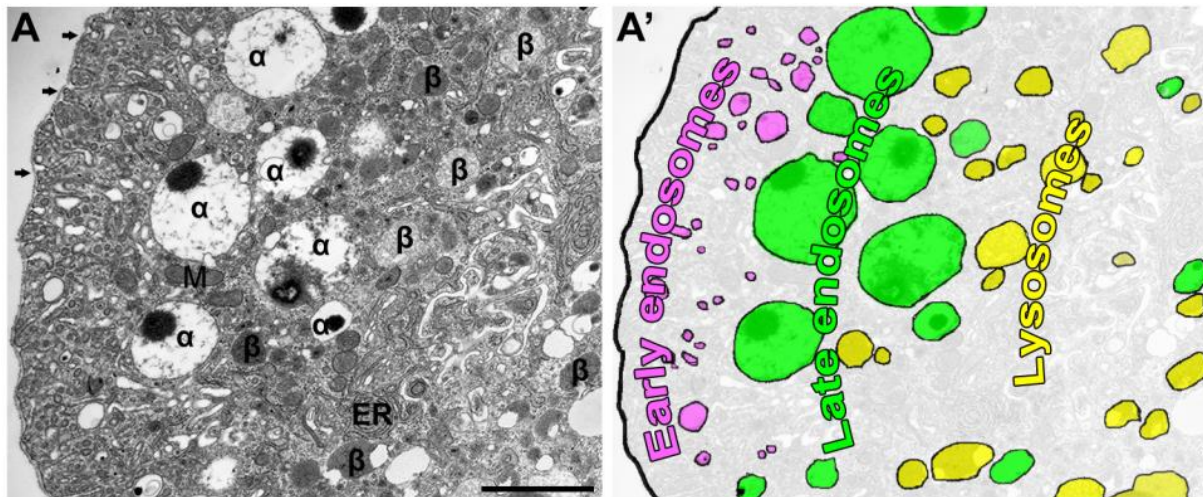
A legújabb tanulmányok is alátámasztják a *Drosophila* nefrociták alkalmasságát, mint vesebetegség modell. A szteroid-rezisztens nefrotikus szindróma (SRNS) esetében, amely a veseelégtelenség gyakori oka, több mint 50 különböző gén mutációját azonosították a betegség monogenetikus okaként (Bierzynska és mtsai. 2017; Lovric és mtsai. 2016). Kiterjedt vizsgálat sorozatot végeztek ezeknek a géneknek a *Drosophila* ortológjaira mutáns nefrocitákon, melyekkel igazolták, hogy a gének több, mint 50 %-a konzervált szerepet játszik a kiválasztásban a muslicáktól az emberekig. Ez azt mutatja, hogy a *Drosophila* értékes és egyszerű állatmodell, amelyben az SRNS-hez köthető gének többségét vizsgálni lehet (Fu és

mtsai. 2017; Hermle és mtsai. 2017). A nefrociták diabétesz modellként is alkalmazhatóak. Megfigyelték, hogy azoknál az ecetmuslicáknál, ahol a táplálék szacharóz tartalmát megemelték, a nefrociták működése megzavarodott, továbbá az Sns diafragma fehérje expressziós szintje lecsökkent (Na és mtsai. 2015).

1.5.2 A garland nefrocita mint endoszomális rendszer modell

A garland nefrociták folyamatosan aktív endocitózissal érik el a hemolimfa összetételének egyensúlyban tartását. Ennek a rendkívül magas endocitotikus aktivitásnak a következtében az endolizoszomális rendszer alkotta vezikulahálózat kitölti a citoplazma nagy részét, és az endoszomális érés fázisai jól elkülönülő, koncentrikus körökbe rendeződő vezikulum populációkat alkotnak a plazmamembrántól a sejtmag felé haladva. A Rab5 vagy Rbsn-5 antigének fluoreszcens immunhisztokémiai kimutatását alkalmazva, közvetlenül a plazmamembrán alatt láthatóvá tehetőek a korai endoszómák. A sejtmag felé haladva a következő réteget nagyobb méretű, Rab7-re pozitív vezikulumok, tehát a késői endoszómák adják, míg a sejtmag körül láthatóak a jóval savasabb, Lamp1-pozitív, kisebb méretű lizoszómák (7. ábra) (Lőrincz és mtsai. 2016).

Ezt a szigorúan rendezett, sávos mintázatot használtuk fel kísérleteink alapjaként. Hiszen, ha elrontunk egy, az endoszomális rendszer szabályozásában szerepet játszó fehérjét, azonnal felborul ez a kategorikus rendezettség. Jó példa erre a már ismert HOPS (homotypic fusion and vacuole protein sorting) komplex alegység, a Vps39 csendesítése, amely markáns fenotípust mutat. A Vps39 hiánya esetén a HOPS képtelen a késői endoszómák és a lizoszómák fúziójának elősegítésére, ami a késői endoszómák, mikroszkópos felvételeken Rab7-pozitív gyűrűk felhalmozódásához vezet a nefrocitákban (Lőrincz és mtsai. 2016).



7. ábra: Egy garland nefrocita ultrastrukturális képének részlete

A bal oldali panelen (A) az EM képeknél jellemző jelöléssel ellátva, az α -val jelölt, denz csapadékot tartalmazó, nagyméretű elektronlucens vezikulumok a késői endoszómákkal, míg a β -val jelöltek a jóval kisebb, világosabb beltartalmú lizoszómákkal feleltethetők meg. A nyilak a plazmamembránt körülvevő alaphártyát jelölik. A színezett ábrán (A') jól látható, ahogy a garland sejtek citoplazmájában határozottan elkülöníthető rétegeket alkotnak az endoszomális rendszer résztvevői. Magentával kijelölve a sejt periferiáján láthatjuk a korai endoszómákat, melyeket a sejtmag irányába haladva felváltanak a nagyobb méretű késői endoszómák (zöld), és végül a lizoszómák (sárga). A skála 2 μm -t jelöl. (Módosítva Lőrincz et al., 2016 után).

1.5.3 A nyálmirigy mint exocitózis modell

A *Drosophila* lárva nyálmirigyének kettős funkciója van. Elsősorban nyálat termel, hogy elősegítse a lárva táplálékfelvételét és emésztését, viszont a posztembrionális fejlődés egy későbbi pontján, kb. 14 órával a bábképződés előtt megváltoztatja funkcióját. A lárva befejezi a táplálkozást és felkészül a bebábozódásra: szilárd felületet keres, amelyhez kikötheti magát a metamorfózis idejére. Ezalatt a nyálmirigysejtek megkezdik a ragasztóanyag, az ún. glue granulumok szintézisét, mely a metamorfózis kezdetén szekrécióval ürül a nyálmirigysejtekből a nyálmirigy kivezetőcsatornájába, onnan pedig a külvilágba, szilárd felülethez tapasztva ezzel az állatot. A nyálmirigyek feleslegben termelik a ragasztóanyagot, így a nagymértékű exocitózist követően is maradnak glue granulumok a nyálmirigysejtekben, melyek lizoszómákkal egyesülve lebomlanak. Ezt a folyamatot krinofágiának nevezzük (Csizmadia és mtsai. 2018).

Kísérleteink során a fentebb leírt folyamatot modellként használva, a glue granulumok fluoreszcens követését használtuk az exocitózis vizsgálatára.

2. Célkitűzés

Az eukarióta sejtek fő anyagfelvételi útvonala az endocitózis, melynek szabályozásáért számos fehérje felelős, mint például az SNX fehérjecsalád tagjai, melyek közös jellemzője a foszfatidilinozitol-foszfát kötésért felelős konzervált PX domén. Az SNX fehérjéket doménösszetételük alapján további alcsaládokba soroljuk. Az SNX-TM alcsalád tagjait számos emberi megbetegedéssel hozták kapcsolatba. *Drosophilában* csupán egyetlen SNX-TM fehérje ismert, a humán SNX25 homológ Snz fehérje, melyről rendkívül kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre az endoszomális rendszer vonatkozásában. Ezért doktori tanulmányaim során célul tűztem ki az Snz endoszomális rendszerben betöltött szerepének megértését garland nefrocitákban.

Elsőként célul tűztük ki az *snz* funkcióvesztés hatásának vizsgálatát, hogy klasszikus genetikai megközelítéssel a fehérje hiányában kialakult fenotípusból közvetkeztethessünk annak szerepére.

Mivel ismert, hogy az SNX-TM fehérjék nem kanonikus, PI(3)P preferenciát mutató PX doménnel rendelkeznek (Amatya és mtsai. 2021), ezért kíváncsiak voltunk, hogy mely endomembrán kompartmenthez képes kötődni.

Célul tűztük ki az Snz esetleges kölcsönható partnereinek kimutatását.

Szerettük volna megvizsgálni az *snz* funkcióvesztés hatását a főbb endomembrán kompartmentekre, mint a korai endoszómák, a késői endoszómák, a lizoszómák, és a reciklizáló endoszómák.

Fontos volt számunkra, hogy vizsgálatokat végezzük, az Snz sejten belüli lokalizációjának feltárásához. Mivel irodalmi adatok alapján zsírtestekben az Snz szerepet játszik a lipidmetabolizmusban, azáltal, hogy fenntartja az ER-PM-LD érintkezési pontokat (Ugrankar és mtsai. 2019), ezért ellenőrizni szerettük volna, hogy garland sejtekben is hasonló szereppel bír-e az Snz.

3. Anyagok és módszerek

3.1 A kísérletekhez használt *Drosophila melanogaster* törzsek és tartási körülményeik

A muslicákat standard, élesztőből, kukoricalisztből és agar agarból előállított táptalajon üvegfiolákban vagy nagyobb volumenű felszaporításuk esetén „ketchupos” üvegeken neveltük. Minden esetben odafigyeltünk, hogy a szaporodáshoz optimális stabil 25 °C-on éljenek, és a kísérleteket is ezen a hőmérsékleten végeztünk. Leggyakrabban RNS interferencia (RNSi) törzseket kombináltunk az Gal4-UAS (Galactose Metabolism 4 - Upstream Activation Sequence) rendszerrel, melynek nagy előnye, hogy segítségével a célzott gének csendesítését szövetspecifikusan idézhetjük elő. A keresztezéseket követő 2. napon az adult állatokat friss fiolára ráztuk és a petéket 29 °C-ra helyeztük, amíg az L3 lárvastádiumot elérték (azaz a boncolás idejéig). Hiszen az UAS és a Gal4 optimális kapcsolódási hőmérséklete 29 °C, azaz ezen a hőmérsékleten a leghatékonyabb a génexpresszió. A garland sejtek esetében *prospero-Gal4* (*pros-Gal4*), a nyálmirigy esetében *forkhead-Gal4* (*fkh-Gal4*) drivert használtunk az RNSi vagy más, UAS-sel vezérelt konstrukciók hajtására. A kísérleteink során használt törzseket az 1. táblázat mutatja be.

Törzs neve	Törzsközpont vagy szerző	Törzsszám
mCherry RNSi (kontroll)	BDSC	35785
<i>snz</i> RNSi 1.	BDSC	39036
<i>snz</i> RNSi 2.	VDRC	105671
<i>Vps39</i> RNSi	VDRC	40425
<i>Vha16-1</i> RNSi	VDRC	49291
<i>Sec5</i> RNSi	BDSC	27526
<i>Rab11</i> RNSi	BDSC	27730
<i>tbc1d8b</i> RNSi	BDSC	32929
UAS-GFP- <i>Rab5</i>	BDSC	BL43336
UAS-EYFP- <i>Rab11Q70L (Rab11^{CA})</i>	BDSC	9791
UAS- <i>Rab11-3xHA (Rab11^{WT})</i>	FlyORF	F001035
pros-Gal4	Bechtel et al. 2013	
glue-dsRed; fkh-Gal4	Costantino et al. 2008	
<i>snz</i> nullmutáns	Ugrankar et al. 2019	
UAS-dMAPPER-Cherry	Ugrankar et al. 2019	
UAS- <i>snz</i> -GFP	Ugrankar et al. 2019	
hs-Flp; UAS-Dcr2; Actin>CD2>Gal4 UAS- <i>Rab7</i> -GFP	Lőrincz et al. 2016	
hs-Flp; UAS-Dcr2; Actin>CD2>Gal4 UAS- <i>Lamp1</i> -GFP	Lőrincz et al. 2016	

1. táblázat: A kísérleteink során alkalmazott törzsek és származásuk

A kísérletek során használt törzsek többsége valamelyik nemzetközi törzsközpontból származik, mint a Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC), a Vienna Drosophila Resource Center (VDRC) vagy a zürichi ORFeome Project a FlyORF. A többi esetben a táblázatban jelöltem a szerzőt, akinek jóvoltából felhasználhattuk őket.

Standard genetikai keresztezéseket használtunk az *UAS-snz-GFP* vagy az *UAS-EYFP-Rab11Q70L* riporterek *prospero-Gal4*-tartalmú vagy *tub-Gal4*-tartalmú kromoszómával való rekombinálására (Függelék 1. ábra). A menekítési kísérletek esetében stabil törzseket állítottunk be a következő genotípusokkal: *snz^{KO}*; +; *pros-Gal4*, *UAS-snz-GFP/TM6Tb* és *snz^{KO}*; +; *tub-Gal4*, *UAS-snz-GFP/TM6Tb* (Függelék 2. ábra).

3.2 Garland nefrociták láthatóvá tétele

3.2.1 Fluoreszcens Immunjelölés

A garland sejtek immunfestéséhez a megfelelő jelölődés érdekében 2 napos protokollt választottunk. A petéztetést követően 29 °C-on fejlődött, L3 vándorló stádiumú lárvákat fénymikroszkóp alatt szobahőmérsékleten egy 25-30 µl-es PBS (Phosphate Buffered Saline) cseppben boncoltuk. A szájkampót és a kutikulát a test középtáján megfogva kifordítottuk a lárvát, és kiemeltük a tápcsatornát egy rövid nyelőcső szakaszt és a középbelet meghagyva. A mikroszkópos elemzés érdekében eltávolítottuk a vakbeleket is, hogy azok a minta fedésekor ne forduljanak a garland sejtekre. Ezt követően 2 ml-es Eppendorf ProteinLoBind® mikrocentrifuga csövekbe helyeztük a mintákat. Általában 8-10 db állatból származó minta került egy csőbe, ahol 3,7%-os formaldehiddel 45 percig fixáltuk őket. A fixálószer eltávolításához és a minták permeabilizálásához 3x15 perces PBTx-es (0,1% Triton X-100 PBS-ben oldva) mosást végeztünk, miközben billegőasztalon enyhén billegtetjük a csöveket. Ezt követően blokkoló oldatra cseréltük a PBTx-et, (ami 5% FCS-sel (Fetal Calf Serum) kiegészített PBTx oldat) és 1 órán át inkubáltuk. Ezt követően kerültek a mintákra az elsődleges ellenanyagok, amit szintén blokkoló oldatban oldottunk a 2. táblázat szerinti hígításban. A mintákat még mindig billegtetve a 4-8 °C közötti hőmérsékletet tartó standard hűtőszekrénybe helyeztük egész éjszakára. Másnap újra szobahőmérsékleten dolgoztunk tovább. Újfént 3x15 perces PBTx-es mosás következett, majd 1 óra blokkoló oldatban történő inkubáció, majd pedig 2 órás inkubáció a megfelelő másodlagos antitestekkel kiegészített blokkoló oldatban. Innentől kezdve a mintákat folyamatosan fénytől elzárt dobozban tároltuk, a fluorofórok megóvása érdekében. Újabb 3x15 perces PBTx-es mosás következett, de ez esetben a 3. PBTx oldatot DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) sejtmagfestéssel egészítettük ki. A felesleges DAPI-t 2x15 perc PBS-es mosással távolítottuk el. A mintákat tárgylemezre helyeztük, majd VectaShield (Vector Laboratories H-1000) fedőmédiával és fedőlemezzel fedtük. A fedőlemezt körömlakkal körbelakkoztuk, hogy az a mikroszkópos vizsgálatok során ne mozdulhasson el.

Az általunk használt és tapasztalataink szerint gyenge jelet adó és/vagy gyorsan fakuló GFP (Green Fluorescent Protein) és EYFP (Enhanced Yellow Fluorescent Protein) riportereket expresszáló mintákat anti-GFP immunjelöléssel láttuk el, hogy megfelelően detektálható, tartós jelet kapjunk.

A minta előkészítés és a boncolás, illetve a fedés minden kísérlet típusban megegyezett a fentiekben leírttal, így a továbbiakban csak abban az esetben térek ki rájuk, ha valamilyen oknál fogva ettől eltértünk.

Elsődleges ellenanyag	Hígítás	Szerző/Gyártó
poliklonális nyúl a-Rab11	1:400	Tanaka and Nakamura 2008
poliklonális csirke a-Sns	1:1000	Hochapfel et al. 2017
monoklonális egér a-Sec5	1:35	Murthy et al. 2003
poliklonális nyúl a-Rab5	1:100	Abcam #31261
monoklonális egér a-Rab7	1:10	DSHB (Developmental Studies Hybridoma Bank)
monoklonális egér a-Cnx99A	1:200	
monoklonális egér a-Pyd	1:400	
poliklonális kecske a-Gmap	1:2000	
poliklonális kecske a-Golgin245	1:2000	
poliklonális csirke a-GFP	1:400	2BScientific #AGFP-NM
poliklonális Alexa Fluor 647 kecske a-Hrp	1:800	Jackson Immunoresearch #2338967
Másodlagos ellenanyag	Hígítás	Gyártó
FITC számár anti-csirke	1:800	Invitrogen - ThermoFisher Scientific
Alexa Fluor 488 kecske anti-nyúl		
Alexa Fluor 488 kecske anti-csirke		
Alexa Fluor 568 kecske anti-nyúl		
Alexa Fluor 568 kecske anti-egér		
Alexa Fluor 568 számár anti-kecske		
Alexa Fluor 568 számár anti-egér		
Alexa Fluor 647 nyúl anti-egér		

2. táblázat: Az immunfestéses kísérleteknél alkalmazott elsődleges és másodlagos ellenanyagok hígítása és származása

3.2.2 Immunfestés hőfixálós módszerrel

A diafragma festéseket Hochapfel et al. 2017 cikke alapján hőfixálással végeztük, mivel a szerzők tapasztalata szerint az anti-Sns ellenanyag a megszokott, formaldehides fixálással nem ad megfelelő jelet. A boncolást követően a mintákat PBS-t tartalmazó centrifuga csövekben gyűjtöttük, majd a PBS-t forrásban lévő 0,03%-os PBTx-re cseréltük és azonnal tovább forraltuk úgy, hogy lebegtető segítségével forró vízfürdőbe kerültek, amit 20 másodpercre mikrohullámú sütőbe helyeztünk. Ezt követően szobahőmérsékleten dolgoztunk

tovább, és PBSTw (PBS-ben oldott 0,1% Tween 20) oldattal mostuk a mintákat 3x10 percen keresztül, majd 1 órás blokkolás következett blokkoló oldatban. A blokkoló oldat ez esetben PBTw-ben oldott 1% BSA (bovine serum albumin). A mintákat blokkolóban oldott anti-Sns és anti-Pyd elsődleges ellenanyagokkal (2. táblázat) inkubáltuk egy éjszakán át hűtőben billegtetve. Másnap szobahőmérsékleten folytattuk a munkát, 3x10 percen át PBTw-ben mostuk a mintákat, majd a megfelelő másodlagos ellenanyagokkal 2 órán át inkubáltuk. Újabb 3x10 perces mosás PBTw-vel, majd pedig 2x15 perces PBS-es mosás következett. Végül pedig Vectashielddel fedtük.

3.2.3 LysoTracker Red jelölés

LysoTracker Red jelöléshez a PBS-ben kiboncolt garland nefrocitákat hordozó bélszakaszt LysoTracker Red festéket (1:1000; ThermoFisher Scientific # L7528) és DAPI (1:500, Sigma) sejtmagfestéket tartalmazó PBS oldatban inkubáltuk 5 percen át fénytől védve, szobahőmérsékleten. Ezt követően a mintákat többször PBS-sel öblítettük, majd glicerín-PBS 8:2 arányú keverékével fedtük. Mivel fixálás nem történt, ezért a mintákat azonnal vizsgáltuk.

3.2.4 Oil Red O festés

Az Oil Red O festés esetében minden alkalommal frissen készítettük a hígított Oil Red O oldatot. Ehhez 0,1%-os Oil Red O (Sigma-Aldrich #O0625) izopropanolos oldatot használtunk, amit 3:2 arányban desztillált vízzel hígítottunk, majd szűrőpapíron homogénre szűrtünk. Hideg PBS-ben kifordítottuk a lárvákat, majd azonnal 4%-os EM tisztaságú paraformaldehiddel (PFA) fixáltuk 30 percen át. Ezt követően 3x5 percig PBS-sel mostuk őket, majd DAPI-val festettük a mintákat 30 percig. A festést újabb 3x5 perces PBS-es mosás követte. Ezt követően adtuk a mintákhoz a friss Oil Red O festéket, melyben 30 percen át inkubáltuk őket. PBS-ben 3x5 percig mostuk a mintákat, majd kiboncoltuk a garland nefrocitákat, 100% glicerinnel fedtük és azonnal mikroszkóp alatt vizsgáltuk őket.

3.2.5 *Ex vivo* nyomjelzőanyag-felvételi (tracer uptake) kísérletek

A sejtek hosszú távú életben tartásához ezeknél a kísérleteknél mindig frissen készített Shields és Sang M3 (Sigma Aldrich #S8398) *Drosophila melanogaster* sejtekre optimalizált tápoldatot használtunk a boncoláshoz és a nyomjelzőanyag beoldásához egyaránt. Boncolást

követően a mintákat BSA DQ Green-nel (Thermo Scientific #D12050) és/vagy BSA Alexa-647-tel (Thermo Scientific #A34785) vagy Avidin TexasReddel (Thermo Scientific #A820) 80 µg/ml koncentrációban kiegészített tápoldatba helyeztük a kísérlet típusától függő ideig. Az ún. pulse-chase módszert alkalmaztuk. A korai endoszomális folyamatok vizsgálatához 1 percig hagytuk a sejteket a nyomjelző anyagot tartalmazó tápoldatban (pulse) majd friss tápoldattal mostuk őket és 9 perc inkubációs időt hagytunk a sejteknek (chase), ezt követően konfokális mikroszkóp alatt azonnal vizsgáltuk őket. Az endoszomális érés későbbi lépéseinek vizsgálatához 5 perces pulse és 30 perc chase periódust hagytunk a sejteknek, míg a lizoszomális lebontást célzó kísérleteknél ezzel szemben 1 órás chase-t alkalmaztunk. A mintákat M3 oldatban fedtük, és konfokális mikroszkóp alatt elemeztük.

3.2.6 Channel diffusion assay

A lakúnák direkt jelölésére az úgynevezett channel diffusion assayt (CDA) vagy diffúzió alapuló csatorna feltöltéses eljárást alkalmaztuk Milosavljevic et al. 2022 munkája alapján. A mintákat M3 oldatban boncoltuk, majd az M3 oldatot leszívtuk és 30 µl 4% PFA cseppre cseréltük, melyben egy rövid, 5 perces előfixálás történt. Ezt követően 1,5 ml PBS tartalmú 2 ml-es mikrocentrifuga csőbe helyeztük a mintákat, majd 3x10 percen át PBS-ben mostuk őket jégen tartva. Szintén jégen M3 médiumban oldott BSA647-ben inkubáltuk 15 percen keresztül, majd egy gyors PBS-es öblítés után 20 perces PFA-val történő fixálás következett. Újabb gyors PBS-es öblítés után 15 percen át DAPI sejtmagfestékekkel inkubáltuk a mintákat, majd 2x10 perces PBS-es mosást követően Vectashield médiummal fedtük.

3.2.7 Elektronmikroszkópos vizsgálatok

A nefrocitákat jégen, jéghideg PBS-ben boncoltuk majd egy éjszakára hűtőszekrénybe (4 °C), billegőasztalra helyeztük őket nátriumkakodilát (pH=7,4) alapú, 3,2% PFA, 0,5% glutáraldehid, 1% szacharóz és 2 mM kalcium-klorid tartalmú fixáló oldatba. Másnap már szobahőmérsékleten dolgoztunk tovább. A fixálószer 3x30 perc nátrium-kakodilátos mosással távolítottuk el, majd a mintákat 1 órán át 0,5% ozmium-tetroxiddal, ezt követően pedig 30 percig 2% uranil-acetáttal utófixáltuk. Az utófixáló oldatokat desztillált vízben oldottuk. A mintákat folyamatosan töményedő etanolos mosásokkal dehidratáltuk. Végül pedig a gyártó ajánlásait követve Spurr gyantába (Merck EM0300) ágyasztuk. Az így készült műgyanta blokkokat 70 nm-es szeletekre metszettük és azokat a Reynolds-féle módszerrel

kontrasztosítottuk (Reynolds 1963). A metszeteket Morada (Olympus) kamerával felszerelt JEM-1011 (JEOL) transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk 5000-10.000-szeres nagyításban, iTEM (Olympus) szoftver segítségével.

3.2.8 Csersavas impregnálás

A csersavas impregnálásnál Kosaka és Ikeda 1983-ban írt cikke alapján jártunk el (Kosaka & Ikeda, 1983). Röviden összefoglalva, a mintákat a fentiek szerint előkészítettük az EM vizsgálatra, annyi különbséggel, hogy a 0,5% ozmium-tetroxiddal történő fixálást követően nem uranil-acetátba kerültek a minták, hanem kétszer rövid ideig 1% csersavat tartalmazó 0,1 M kakodilát pufferben (pH 7,4) öblítettük őket, majd 1 órán át maradtak ugyanebben az oldatban, hogy kellő idő álljon rendelkezésére a lakúnák feltöltődésére. Ezt követően pedig folytatódott a mintaelőkészítés a dehidratálással.

3.3. Képkalkotás, számszerűsítés és statisztikai elemzés

Minden festési eljárást többször (legalább kétszer) megismételtünk. Képkalkotáshoz a Zeiss Axio Imager.M2 ApoTome.2 feltétellel felszerelt fluoreszcens mikroszkópot és/vagy az Airyscan detektorral ellátott Zeiss LSM 800 konfokális mikroszkópot alkalmaztuk. Mindkét esetben 63x/1,4 Plan-Apochromat (olajos) objektívvel dolgoztunk. A képeket a Zeiss ZEN Pro szoftverrel rögzítettük. A mikroszkóp és a képkalkotás beállításai azonosak voltak az azonos típusú kísérleteknél. Általában állatonként 3-5 nefrocitát választottak ki a számszerűsítéshez. A kiértékelésbe a sejtek középsíkjában készült képeket választottuk ki, úgy, hogy a sejtmag legszélesebb részét tekintettük középsíknak, hogy a körülményeket ilyen formán is standardizálhassuk. A lakúnákat és/vagy diafragma fehérjéket célzó kísérletek esetében felszíni (kérgi) és felszín alatti képeket is készítettünk, hiszen az általuk adott fenotípusos változások itt a leglátványosabbak. Az így bemutatott ábrák esetében ezt minden esetben fel is tüntettem.

A képeket Zeiss ZEN 2.6 Blue Edition és Fiji ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) szoftverekkel elemeztük. A zaj- és háttérfestődés szintjét csökkentettük azáltal, hogy az azonos típusú kísérletekhez egységes küszöbértéket alkalmaztunk.

A citoplazmatikus markerek által lefedett területet úgy kaptuk meg, hogy megmértük a sejt által lefedett teljes területet és kivontuk belőle a sejtmagok területét (DAPI festés alapján), végül az értékeket százalékosítottuk.

A késői endoszómák területadataihoz úgy jutottunk, hogy egyenként kijelöltük a Rab7-re pozitív gyűrűket, majd számszerűsítettük a kijelölés által lefedett területeket, az adatokat négyzetmikronban (μm^2) kaptuk meg.

A kolokalizációs elemzésekhez megmértük a vörös és zöld csatornák Pearson-féle korrelációs együtthatóját az ImageJ coloc2 bővítményével, ahol +1 jelenti a tökéletes kolokalizációt, 0 a véletlen kolokalizációs eseményt és -1 a teljes elkerülést.

A lakúnák mélységét a nefrociták átmérőjéhez viszonyított maximális csatornamélység adja meg, melyet a sejtfelszíntől a lakúna legmélyebb pontjára állított merőlegessel mértünk.

A Rab11-pozitív struktúrák elhelyezkedésének megváltozását a plazmamembrántól mért távolságukkal fejeztük ki. Az egyes struktúrákat egyenként jelöltük ki és plazmamembránhoz viszonyított távolságukat egyedileg határoztuk meg. Hasonlóan jártunk el a lakúnák mélységének mérésénél.

A lizoszomális degradációt vizsgáló DQGreen BSA citoplazmatikus jelintenzitásának mérésére a Zeiss Zen 2.6 Blue Edition szoftvert használtuk. Először lemértük a teljes sejt zöld fluoreszcenciájának összintenzitását, majd meghatározott küszöbértékeket állítottunk be a vezikulárisnak tekintett intenzitás kijelölésére, ezt követően kivontuk azt a sejt összintenzitásból.

A statisztikai elemzést minden esetben a GraphPad Prism segítségével végeztük az adatok eloszlásának megfelelő statisztikai tesztekkel. A szignifikáns különbségeket *-gal jelöltem: * esetén $P < 0,05$, ** esetén $P < 0,01$, ***esetén $P < 0,001$. Nsz = nem szignifikáns: $P > 0,05$. Az eredmények bemutatására kiválasztott ábrák reprezentatív képek, tehát a legnagyobb gyakoriságban előforduló fenotípusokat mutatják be.

3.4 Koimmunoprecipitáció

A koimmunoprecipitációra felhasznált állatok pontos genotípusa a következő:

snz^{KO}; +; tub-Gal4, UAS-snz-GFP/+

snz^{KO}; +; tub-Gal4, UAS-snz-GFP/UAS-Rab11-3xHA

3 hím:2 nőstény arányban jól táplált felnőtt egyedeket gyűjtöttük körülbelül 200 mg mennyiségben az egyes genotípusokból. A mintákat 2 ml LBW (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 5

mM MgCl₂, 20 mM KCl, 100 mM NaCl, 0,1 x PBS, 10% glicerin és 0,2% Triton X-100, proteáz inhibitor) pufferben jégen homogenizáltuk Dounce kézi homogenizátorral. A kivonatokat ismételt centrifugálással tisztítottuk, ügyelve arra, hogy a lizátum felső zsírrétegéből a lehető legtöbbet hagyjunk hátra minden lépésben. A kivonatokat tovább tisztítottuk 300 µl Merck Sephadex-G100-t tartalmazó eldobható oszlopon történő átszűréssel. Az áramlás a gravitáció következtében történt. Az így kapott minták 750 µl-ét 4 órán át 30 µl anti-HA mágneses gyöngyökkel (Pierce 88837) inkubáltuk, majd alaposan 3x1 ml kötőpufferrel mostuk, végül 50 µl-ben eluáltuk nem redukáló SDS (Sodium dodecyl sulfate) mintapufferrel.

Az eluátumhoz 1:1 arányban 2x Laemmli oldatot (Sigma, S3401) adtunk és 100 °C-on 5 percig forraltuk. 10%-os SDS-PAGE gélen futtatuk a mintákat (5µl) 1% input lizátum mellett. Majd western blot segítségével nitrocellulóz membránra vittük át. A membránt anti-HA-Hrp (Roche 12013819001) és anti-GFP (Abcam ab6556), illetve anti-nyúl-Hrp (Sigma A0545) elsődleges és másodlagos ellenanyagokkal jelöltük, majd ECL Prime reagens (Cytiva22) mellett röntgen filmen hívtuk elő.

4. Eredmények

4.1 Snz hiányában a nefrociták endocitotikus aktivitása fokozódik normál lizoszomális funkció mellett

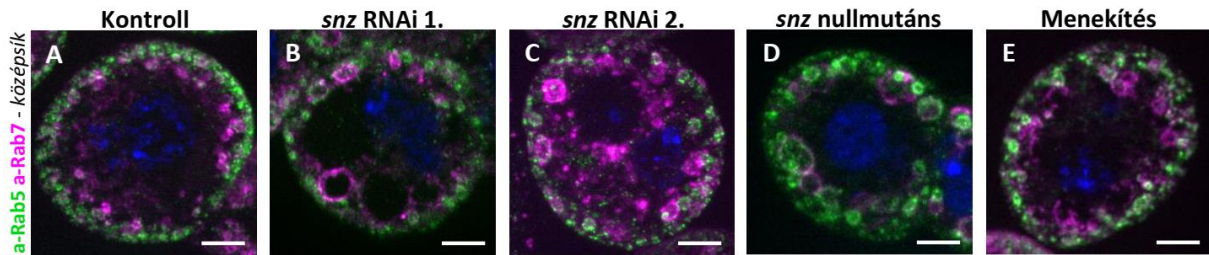
4.1.1 Snz hiányában megnagyobbodnak a korai és a késői endoszómák

Kíváncsiak voltunk, hogy az Snz az SNX fehérjecsalád legtöbb tagjához hasonlóan részt vesz-e az endoszomális rendszer szabályozásában, és ha igen, miként. Ehhez a garland nefrocitákat választottuk modellként, hiszen folyamatosan aktív endocitózist folytatnak és az endoszomális érés különböző lépéseit jelölő endoszóma-populációk jól elkülöníthető sávokat alkotnak bennük. Ez a mintázat könnyen láthatóvá tehető egy egyszerű immunfestési eljárást követően fluoreszcens mikroszkóp segítségével (Lőrincz és mtsai., 2016). A szigorúan rendezett sávotottság felborulásából következtethetünk a vizsgált gén szerepére. Klasszikus genetikai megközelítéssel az Snz funkcióvesztéses kísérletek segítségével próbáltunk következtetni a fehérje szerepére. Az Snz csendesítésére két külön törzsközpontról (BDSC - RNSi 1. és (VDRC - RNSi 2.) két, egymástól független RNSi törzset rendeltünk. Mivel a két RNSi által célzott szekvencia nem fed át, a potenciálisan megegyező off-target szekvenciák előfordulási valószínűsége minimális. A kísérletben L3 vándorló stádiumú lárvákat alkalmaztunk, melyek a petéztetést követően 29 °C-on fejlődtek, hogy az RNSi-t a garland sejtekben kifejező *pros-Gal4* meghajtóelem működését optimalizáljuk.

Elsőként a Rab5 és a Rab7 kis GTP-ázok egyidejű immunfestését hajtottuk végre a kiboncolt garland sejteken. A zöld jel a Rab5 pozitív korai endoszómákat, míg a magenta a Rab7 pozitív késői endoszómákat jelöli (8. ábra). A kontroll esetében a sejt perifériáján láthatjuk az apróbb Rab5 pozitív struktúrákat, míg egy picit beljebb magentával a kis körökre emlékeztető Rab7 pozitív struktúrákat (8. ábra, A). Az RNSi konstrukciókat a garlandsejtekben hajtva azonnal szembe ötlük a késői endoszómák méretnövekedése, és a sejt belüli elhelyezkedésük megváltozása. Bár kevésbé szembetűnő mértékben, de ugyanez elmondható a Rab5 pozitív korai endoszómákról is (8. ábra B-C).

Számszerűsítettük az endoszómák méretváltozását, hogy összevethessük a kontrollal (9. ábra) A késői endoszómák méretnövekedése volt a legszembetűnőbb (9. ábra, B): a kontroll esetben mért átlagos területük $2,23 \mu\text{m}^2$ volt, míg az RNSi csendesítések esetében átlagosan 1,5-2x-szeresére nőttek. Az RNSi 1. esetében $4,89 \mu\text{m}^2$ átlagos területet mértünk, míg az RNSi

2. esetében $3,52 \mu\text{m}^2$ -t. Mivel a két RNSi vonal fenotípusa nagyban megegyezik, ezért a továbbiakban csak az *snz* RNSi 1. vonalat mutatom be, és mint *snz* géncsendesítés/knockdown (KD) hivatkozom rá.

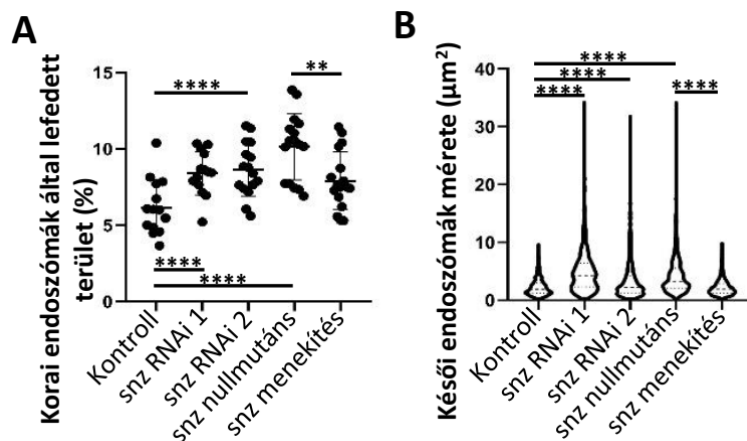


8. ábra: Garland nefrociták korai és késői endoszómáinak immunfestése

A zöld Rab5 jelöli a korai endoszómákat, míg a magenta Rab7 a késői endoszómákat. Mind az *snz* RNSi vonalak (B-C), mind pedig a nullmutáns (D) esetében jól látható a korai és a késői endoszómák méretnövekedése a kontrollhoz (A) viszonyítva. Ezt a fenotípust menekíti a *prosGal4*-driverrel hajtott teljes hosszúságú, *UAS-snz-GFP* bevitele a nullmutáns háttérre (E). A skála a képeken $5 \mu\text{m}$ -t jelöl.

Mike Henne laboratóriumából kaptunk egy CRISPR-rel generált *snz* nullmutáns törzset, melyet a WellGenetics állított elő a számukra. Az általuk beinjektált deléciós kazettát tartalmazó vektort úgy tervezték, hogy az *snz* gén ATG-start kodonját megelőző 188. bp-tól a stop kondont követő 83. bp-ig tartó, 4,5 kb-os deléciót hozzon létre, amely így teljesen eltávolította az *snz*-t kódoló szekvenciát (Ugrankar és mtsai., 2019). A nullmutánssal reprodukáltuk az RNSi vonalaknál látott fenotípust. Talán annyi különbséggel, hogy itt a korai endoszómák méretnövekedése feltűnőbb (8. ábra, D; 9. ábra, A).

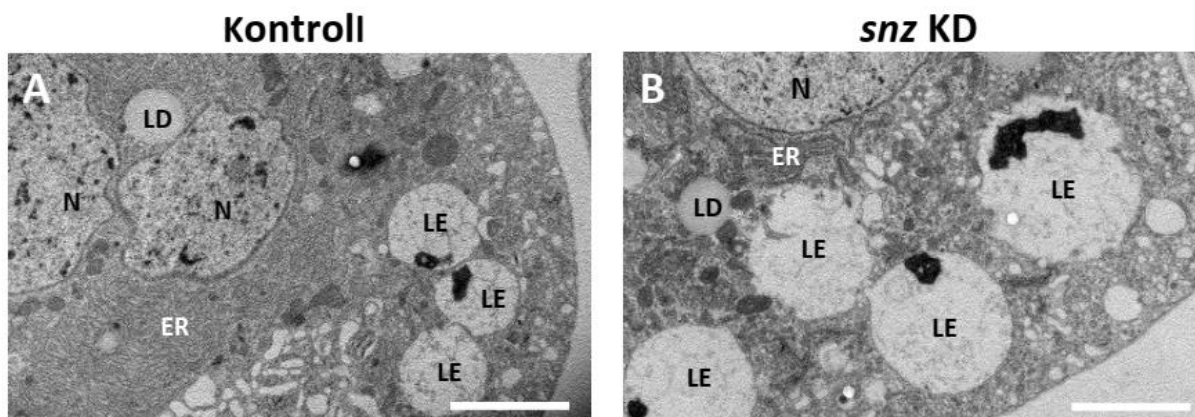
Standard keresztezési lépésekkel létrehoztuk a *prosGal4*, *UAS-snz-GFP* rekombináns 3. kromoszómát (Függelék 1. ábra), majd ezt kombináltuk az *snz* nullmutáns X. kromoszómával, ezzel létrehozva a stabil menekítő törzset (Függelék 2. ábra). Ebben a törzsben láthatóan visszaáll a késői endoszómák normális mérete (8. ábra, E). A mutánsoknál megfigyelt $4,25 \mu\text{m}^2$ átlagos késői endoszóma terület a kontrollra jellemző átlag $2,29 \mu\text{m}^2$ -re változik (9. ábra, B). Ezzel igazoltuk, hogy a garland nefrocitákban általunk tapasztalt endoszóma fenotípust valóban az *snz* funkcióvesztése okozza.



9. ábra: A korai (A) és a késői endoszómák (B) méretének számszerűsítése

Számszerűsítettük a korai endoszómák által lefedett terület százalékos arányát (A). A grafikonon jól látható, hogy az *snz* funkcióvesztéses genotípusok szignifikáns növekedést mutatnak a kontrollhoz képest. A késői endoszómák méretének számszerűsítése során (B) az egyedi Rab7-pozitív endoszóma területeket mértük le. Az így kapott körte diagramok jól mutatják az egyedi endoszómák méreteloszlását. A kontrollhoz és a menekítő törzshöz képest az *snz* funkcióvesztéses genotípusok mind szignifikáns késői endoszóma méretnövekedést mutatnak. A szignifikáns különbségek *-gal jelölve: * esetén $P < 0,05$, ** esetén $P < 0,01$, *** esetén $P < 0,001$, **** esetén $P < 0,0001$.

A fluoreszcens vizsgálatok mellett szeretnénk volna részletgazdagabb képet kapni a látott fenotípusról, ezért kollaborációs partnereink, Lőrincz Péter és Hargitai Dávid segítségével elektronmikroszkópos képeket is készítettünk. Az ultrastrukturális elemzés előnye, a nagy felbontás mellett, hogy nincs fluoreszcens ellenanyag festés, így sem a fluoreszcens festék fakulásával, sem az ellenanyag kötődéssel kapcsolatos bizonytalanságokkal nem kell számolni. Az EM képeken is jól látható az *snz* KD nefrocitákban a késői endoszómák méretének növekedése a kontrollhoz képest. Így elmondható, hogy eredményeinket ultrastrukturális elemzéssel is megerősítettük az *snz* KD sejtekben (10. ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az *Snz* elvesztése súlyos változásokhoz vezet a nefrociták fő endoszomális kompartmentumaiban.



10. ábra: Garland nefrociták ultrastrukturális vizsgálata

Az EM felvételeken a késői endoszómák, mint elektronlucens, jellemzően kör alakú struktúrák ismerhetők fel, a belsejükben elektrondenz csapadékkal. Az snz KD (B) esetében jól látható a késői endoszómák kontrollhoz (A) viszonyított méretnövekedése, mely alátámasztja, hogy a fentebb bemutatott fluoreszcens képeken látott nagyméretű struktúrák valóban a késői endoszómáknak feleltethetők meg. N: sejtmag, LD: lipidcsepp, ER: endoplazmatikus retikulum, LE késői endoszóma, a skála 5 μ m-t jelöl.

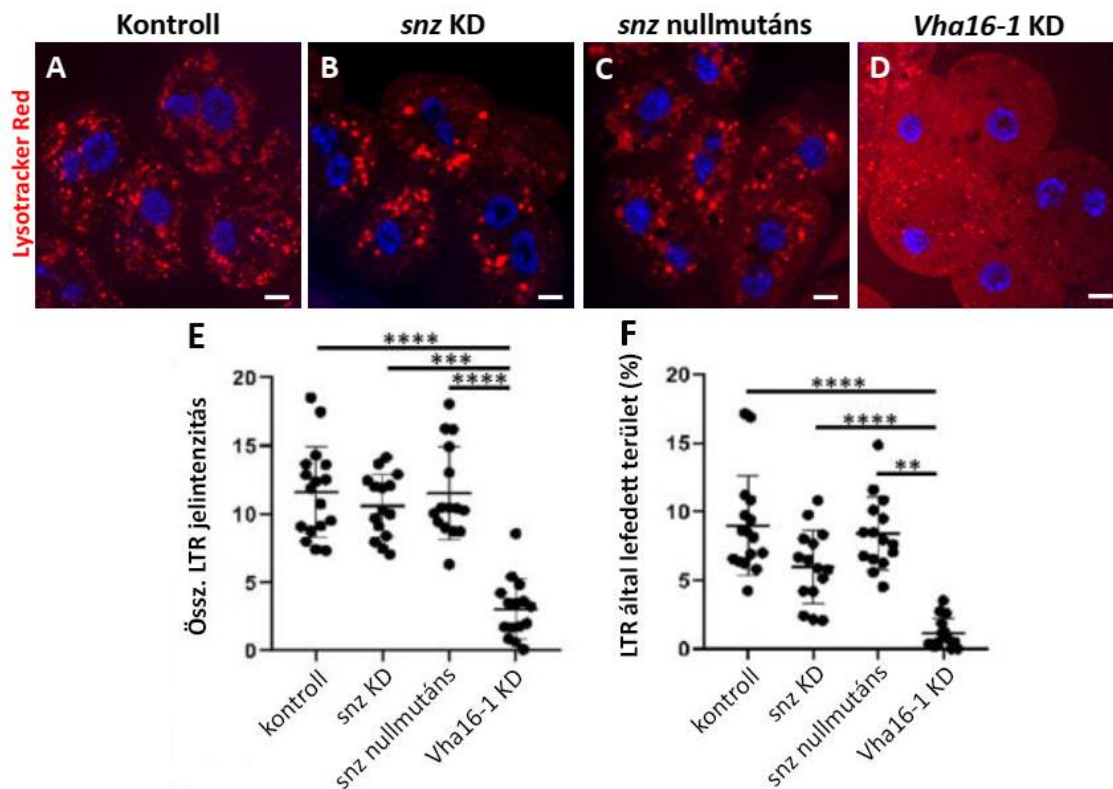
4.1.2 Az snz funkcióvesztéses sejtekben a lizoszomális lebontás normális

A késői endoszómák méretnövekedésének egyik legvalószínűbb oka valamilyen lebontási útvonalon bekövetkező hiba. Hiszen, ha a késői endoszóma képtelen a tartalmát eltávolítani, de folyamatosan kapja a vezikuláris utánpótlást, akkor egyre nagyobb endoszómák képződnek. Ahhoz, hogy a degradációs útvonal megfelelően működjön, nagy léptékben nézve három dologra van szükség. Az első, hogy legyenek a rendszerben lizoszómák. A második, hogy legyenek működőképesek, azaz rendelkezzenek a működésükhöz szükséges motilitással, a megfelelő savas pH-val és a szükséges emésztőenzimekkel. A harmadik feltétel pedig, hogy létrejöhessen az endoszóma-lizoszóma fúzió. Ezen feltételek meglétének ellenőrzésére több különböző vizsgálatot is végeztünk.

Elsőként LysoTracker Red fluoreszcens festést alkalmaztunk, amely kijelöli a sejt belüli savas struktúrákat. A LysoTracker Red egy olyan kis szerves molekula, amely, amíg nem protonálódik, addig képes áthaladni a sejt és sejtsejtszervecskék lipidmembránján, viszont amint savas közeggel érintkezik, megtörténik a protonáció és mivel ilyen formában már képtelen átjutni a membránokon, így feldúsul az adott organelumban (Scott és mtsai., 2004).

A kontroll sejtekben található intenzív LysoTracker Red jel a savasan emésztő lizoszómákat jelöli (11. ábra, A). *snz* hiányában hasonlóan intenzív LysoTracker Red pozitív struktúrákat észleltünk, így már a kontrollhoz viszonyítva is jó látható, hogy jelen vannak a savas struktúrák (11. ábra, B-C). A lizoszómák savasodásához létfontosságú a funkcionális V-ATPáz komplex jelenléte, melynek alegységei közül a *Vha16-1*-et célzó RNSi konstrukciót használtuk pozitív kontrollként, ahol megszűnik a lizoszómák savasodása (Formica és mtsai., 2021). Így látunk ugyan diffúz LysoTracker Red jelet, de sem intenzitásában nem ér fel a kontroll és az *snz* csendesítésénél tapasztalttal, sem pedig a lizoszómákra emlékeztető struktúrák nem ismerhetők fel (11. ábra, D).

Számszerűsítettük a garland nefrocitákban mért teljes LysoTracker Red jelintenzitást (11. ábra, E). A *Vha16-1* csendesítés esetében szignifikánsan alacsonyabb intenzitást mértünk mind a kontrollhoz, mind pedig az *snz* csendesítéshez és a nullmutánshoz viszonyítva. Ezzel szemben az *snz* funkcióvesztéses sejtek nem mutatnak számottevő eltérést a kontrollhoz képest. A másik mérhető paraméter a LysoTracker Red által lefedett terület nagysága, melyből következtethetünk a lizoszómák mennyiségére (11. ábra, F). Amennyiben ez az adat alacsonyabb a kontrollhoz viszonyítva, abból feltételezhetjük, hogy a funkcionáló lizoszómák létrejötte károsodott, ahogy a pozitív kontrollként alkalmazott *Vha16-1* csendesítés esetében is látszik. A *snz* csendesített nefrociták esetében a kontrollhoz hasonló mértékű LysoTracker Red jel lefedettséget tapasztaltunk.

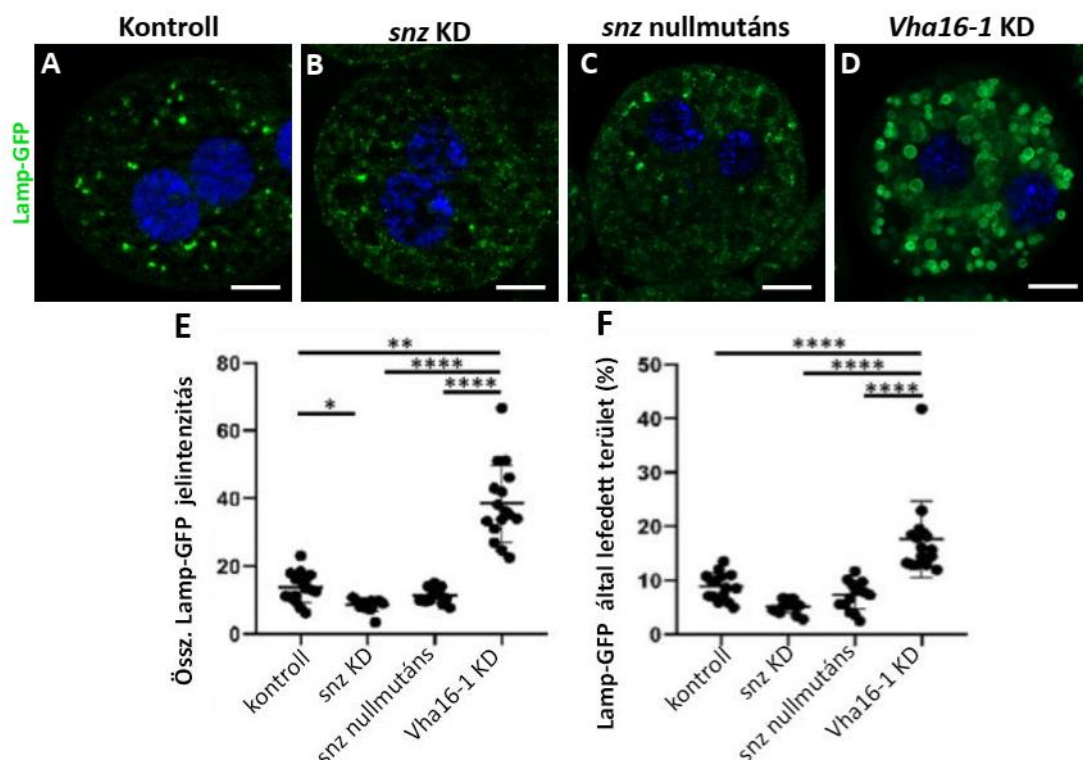


11. ábra: Garland nefrociták LysoTracker Red festése

A LysoTracker Red jel a savas lizoszómákban dúsul fel. Az *snz* funkcióvesztés esetében (B-C) is jól láthatóak a kontrollhoz (A) hasonló intenzív vörös fluoreszcenciát mutató diszkrét pontok, melyek a lizoszómákat jelölik. Míg a *Vha16-1* csendesítés esetében (D) a savasodásért felelős V-ATPáz működése korlátozott, ezért nem látunk a lizoszómákkal megfeleltethető struktúrákat, csak diffúz vörös háttér. Számszerűsítettük a garland nefrocitákban mért LysoTracker Red jel összintenzitását (E) és a jel által lefedett területet (F). A szignifikáns különbségek *-gal jelölve: * esetén $P < 0,05$, ** esetén $P < 0,01$, *** esetén $P < 0,001$, **** esetén $P < 0,0001$. A skála a képeken 5 μm -t jelöl.

A funkcionáló lizoszómák jelenlétének kimutatására egy másik módszer a Lamp-GFP riporter alkalmazása. A transzmembrán lizoszomális komponensek, mint például a V-ATPáz vagy a Lamp több irányból is eljuthatnak a lizoszómákba. Egyrészt az ER-ből és a Golgiból egy AP-3 (adaptor protein 3) komplex- és Lt (light)/Vps41-függő útvonalon keresztül, másrészt pedig a plazmamembránból először a korai, majd késői endoszómákba kerülnek, végül onnan fúziós események következtében a lizoszómákba. Hiányuk pedig zavart okoz a lizoszóma funkcióban. Ezt használjuk ki a Lamp-GFP segítségével, mely egy gyengén expresszáló kiméra riporter. A luminális GFP jel az emésztő lizoszómákba történő szállítódáskor savas pH-n kioltódik, viszont lizoszomális lebontási hibák esetén fluoreszkáló marad (Lund és mtsai., 2018; Milosavljevic és mtsai., 2022). Ennek megfelelően a kontroll sejtek alacsony GFP-fluoreszcenciát mutatnak (12. ábra, A). Hozzájuk viszonyítva az *snz* KD és nullmutáns sejtek

esetében is alacsony GFP-fluoreszcenciát mértünk (12. ábra, B-C), míg a fentebb bemutatott, pozitív kontrollként alkalmazott *Vha16-1* KD sejtekben, ahol a V-ATPáz hibája miatt nem történik meg a lizoszómák savasodása, ott nagyméretű, intenzíven fluoreszkáló GFP-pozitív vezikulumokat látunk, amelyek valószínűleg funkcióképtelen lizoszómáknak felelnek meg (12. ábra, D). A fentebb bemutatott LysoTracker Red festéses vizsgálatokhoz hasonlóan itt is lemértük a jel össz fluoreszcencia intenzitását és a jel által lefedett terület nagyságát. Viszont ebben az esetben a jel hiánya utal az aktív lizoszomális működésre. A kontroll és az *snz* funkcióvesztés esetében éppen ezért igen alacsony jelintenzitást és igen kicsi területi lefedettséget tapasztaltunk, míg a *Vha16-1* csendesítés esetében a lizoszomális hiba következtében nem tudott kioltódni a GFP jel, így az magas intenzitással és nagy mennyiségben mérhető a sejtben (12. ábra, E-F).



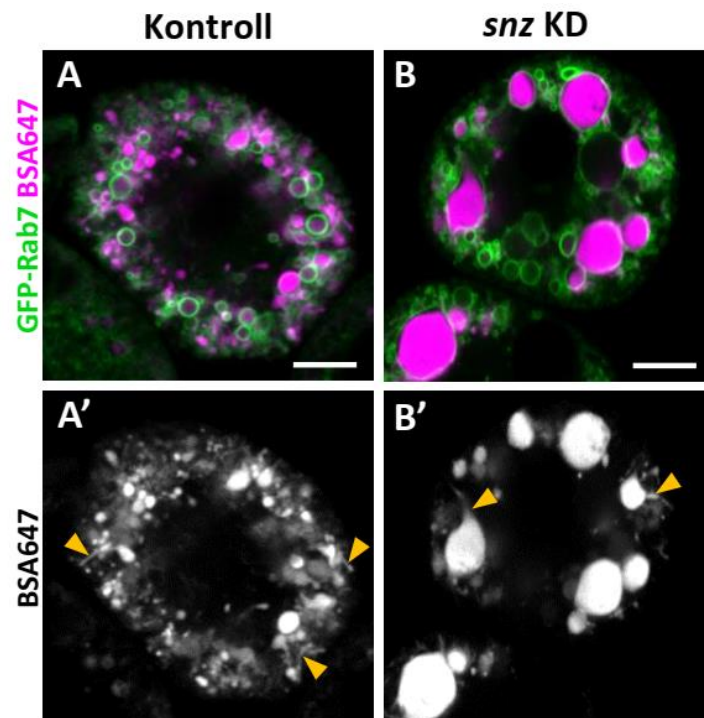
12. ábra: Lizoszómák jelenlétének vizsgálata Lamp-GFP riporterrel

A Lamp fehérjével kapcsolt GFP a lizoszómákba szállítódásakor a savas környezetben kioltódik, ezt láthatjuk a kontroll (A), és az *snz* funkcióvesztéses (B-C) garland nefrocitákban is. Viszont, ha a lizoszómák képtelenek elérni a funkciójuk ellátásához szükséges savas pH-t, akkor intenzív fluoreszcenciát mérhetünk, mint a pozitív kontrollként alkalmazott *Vha16-1* csendesítés esetén (D). A grafikonok a Lamp-GFP jel fluoreszcenciájának összintenzitását (E) és az általa lefedett terület százalékban kifejezett mértékét mutatják (F). Jól látható, hogy mindkét esetben az *snz* funkcióvesztés a kontrollhoz hasonló eredményeket mutat. A szignifikáns különbségek *-gal jelölve: * esetén $P < 0,05$, ** esetén $P < 0,01$, *** esetén $P < 0,001$, **** esetén $P < 0,0001$. A skála a képeken $5 \mu\text{m}$ -t jelöl.

Ezek alapján elmondható, hogy Snz hiányában is vannak savas lizoszómák a nefrocitákban, ezért a következőkben azt vizsgáltuk meg, hogy a lebontandó anyag eljut-e lizoszómákhoz, és megtörténik-e az emésztés. Ennek vizsgálatára *ex vivo* nyomjelzőanyag-felvételi (tracer uptake) kísérleteket végeztünk. Kíváncsiak voltunk, hogy meddig jut el a tracer az endoszomális rendszerben. Hol akad el, ha elakad? Hiszen az elakadás helyéből következtethetünk a hiba okára.

Mivel az endoszomális érés későbbi lépéseinek nyomon követése volt a cél, ezért GFP-Rab7 riportert expresszáló, élő nefrocitákat vizsgáltunk, amelyekkel *ex vivo* BSA-Alexa Fluor 647 fluoreszcens konjugátumot (a továbbiakban csak BSA647) vetettünk fel, majd konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk őket. Az úgynevezett „pulse-chase” módszert alkalmaztuk. Ez esetben 5 percig hagytuk a sejteket a BSA647-et tartalmazó tápoldatban (pulse) majd friss tápoldattal mostuk őket és 20 perc inkubációs időt (chase) követően vizsgáltuk a sejteket, hogy a tracer biztosan eljusson a késői endoszómákig.

A kontroll sejtekben a tracer a GFP-Rab7 által körülvevett, zöld körökként megjelenő vezikulumokat és további Rab7-negatív, szabálytalan alakú, tubulációra utaló jeleket mutató struktúrákat töltött ki (13. ábra, A-A'). Az ilyen tubulusokat az aktívan emésztő lizoszómák jellemzőinek tekintjük, amelyek a nefrociták perinukleáris régiójában, az úgynevezett terminális lizoszómahálózatot alkotják (Lund és mtsai., 2018). Az *snz* KD sejtek esetében a BSA647 a GFP-Rab7 által jelölt, késői endoszomális kompartmentumban halmozódott fel, ami azt mutatja, hogy ezek a megnagyobbodott késői endoszómák fogadják a beérkező szállítmányt (13. ábra, B-B'). Megfigyelhető a megnagyobbodott vezikulumok kontrollhoz hasonló tubulációja is, ami arra utal, hogy az *snz* KD nefrocitákban is vannak aktívan emésztő lizoszómák.



13. ábra: A késői endoszómák vizsgálata BSA647 nyomjelzőanyag segítségével

A GFP-Rab7 által kijelölt késői endoszómák, sok esetben magenta BSA647 tracerrel töltöttek, azaz fogadják a bejövő szállítmányt (A-B). A kontroll (A-A') és az snz KD (B-B') között csak az endoszómák méretében találunk különbséget. Mindkét esetben látható az endoszómákból kinyúló tubulusok jelenléte (A'-B' sárga nyílhegyek), melyek az aktívan emésztő lizoszomális rendszer jellemzői. A skála a képeken 5 μm -t jelöl.

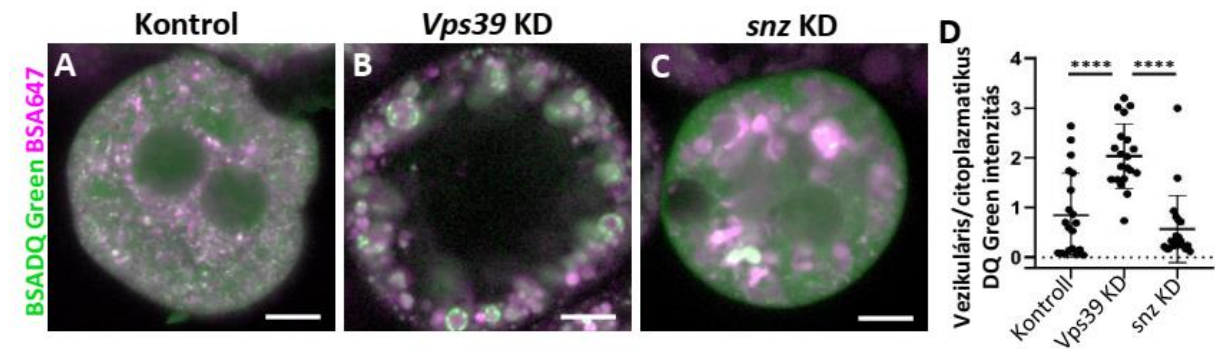
Következő kísérletünk a proteázok működőképességének vizsgálatát célozta. Ezért ez esetben a BSA647 mellé DQTM Green BSA tracer (a továbbiakban csak DQ Green) isadtunk a nefrociták tápoldatához. A DQ Green működésének alapja, hogy intakt formában nem bocsát ki mérhető fluoreszcenciát, viszont a proteázok általi hasítást követően fluoreszkáló peptidekké hidrolizál, így segítségével hatékonyan kimutatható az aktívan emésztő proteázok jelenléte.

Az élő nefrocitáknak 5 perc felvételi időt hagytunk, majd DQ Green mentes tápoldatba helyeztük át őket és 1 órás chase időt kaptak, hogy a tracereknek biztosan elég ideje legyen eljutni a lizoszómákig. A kontroll nefrocitákban a DQ Green fluoreszcenciája kimutatható a változó méretű vezikulumokban és a citoszolban is, ami azt jelzi, hogy a bomlástermékek jelen vannak a lizoszómákban, majd a teljes tartalom emésztését követően felszabadulnak a lizoszómákból és a citoplazmába jutnak (14. ábra, A).

Pozitív kontrollként a jól karakterizált HOPS komplex alegységet, a Vps39-et kódoló gén leütését használtuk (14. ábra, B). Vps39 hiányában a késői endoszómák nem képesek a

lizoszómákkal fúzionálni, így nem történik meg a lizoszomális lebontás, emiatt a tracer a nefrociták perifériáján található megnagyobbodott késői endoszómákban reked. A citoszólban nem detektálható zöld fluoreszcencia, tehát nem szabadult fel bomlástermék. A késői endoszómák perifériáján olykor tapasztalhatunk zöld fluoreszcenciát, de az valószínűleg az endoszomális érési folyamat részeként már jelen levő proteázok aktivitásának eredménye, és nem az endoszóma-lizoszóma fúzióból származik.

Megmértük a DQ Green fluoreszcenciájának mértékét a vezikulumokban és a citoplazmában egyaránt (14. ábra, D). Ezek aránya mutatja meg a lizoszomális lebontás mértékét. Ez az érték a *Vps39* KD sejtekben a kontroll nefrocitákhoz képest szignifikánsan magasabb volt. Az *snz* KD sejtek esetében viszont nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a kontrollhoz viszonyítva, hiszen jelentős mértékű citoszólikus jelet mértünk. Továbbá a vezikulumok perifériáján sem tapasztalható intenzív fluoreszcencia, mint a *Vps39* KD esetében (14. ábra, C). Ezekből az eredményekből az endolizoszomális hálózat normális működésére következtetünk.



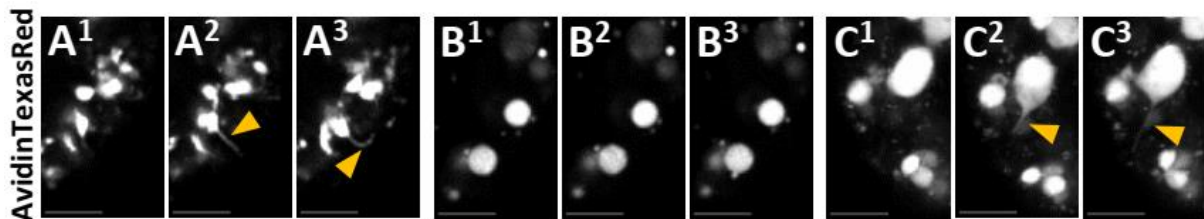
14. ábra: Lizoszomális proteáz aktivitás vizsgálat DQ Green BSA segítségével

Az *snz* KD nefrociták (C) citoplazmájában a kontrollhoz (A) hasonló zöld fluoreszcenciát látunk, szemben a *Vps39* csendesítéssel (B), ahol az endoszóma-lizoszóma fúzió hiányában nem történik meg a lizoszomális proteázok általi lebontás. A grafikonon (D) a DQ Green vezikulumokban mért intenzitását arányosítottuk a citoplazmában mért intenzitással. Az *snz* KD a kontrollhoz hasonló értékeket mutat, mely szignifikánsan eltér a *Vps39* csendesítés eredményeitől. A szignifikáns különbségek *-gal jelölve: * esetén $P < 0,05$, ** esetén $P < 0,01$, *** esetén $P < 0,001$, **** esetén $P < 0,0001$. A skála a képeken $5 \mu\text{m}$ -t jelöl.

Végül mindezeket a kísérleteket élő sejteken végzett videómikroszkópiával is kiegészítettük. Tracerként a BSA647-hez nagyon hasonló Avidin-Texas Red konjugátumot vetettünk fel a sejtekkel, majd 30 perc chase időt követően videóztuk őket. A kontroll sejtekben tracer-pozitív vezikulumok és tubulusok kiterjedt, rendkívül dinamikus viselkedésű hálózatát

láttuk (15. ábra, A¹-A³). (Az eredeti videók megtekinthetők az MBoC oldalán Maruzs et al., 2023 cikk kiegészítő videók között: <https://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.E22-09-0421>.)

A *Vps39* KD sejtekben viszont csak a szabályos kör alakú vezikulumok látszanak az Avidin-Texas RedTM által kijelölve, a kontrollnál tapasztalt tubulációnak semmi jelét sem sikerült felfedezni, ez pedig az aktívan emésztő lizoszómák hiányára utal (15. ábra, B¹-B³). Az *snz* KD sejtek esetében gyakran megfigyelhetőek a megnagyobbodott késői endoszómákból kitüremkedő nyúlványok, melyek dinamikusan mozognak, egymásba alakulnak a tracer pozitív organellek hálózatában (15. ábra, C¹-C³). Tehát a kontrollhoz hasonlóan itt is megtörténik a dinamikus tubuláció, ami az emésztő lizoszómákba történő hatékony transzportra utal.



15. ábra: Pillanatképek az Avidin-Texas RedTM tracer nyomkövetéséről

Fehérrel az Avidin-Texas RedTM tartalmú endoszómákat látjuk, melyek a kontroll (A¹-A³) és az *snz* KD (C¹-C³) esetében gyakran tubulusokat képeznek, és melyeket az aktívan emésztő lizoszomális hálózat jellemzőiként ismerünk. Az endoszóma-lizoszóma fúzióra képtelen *Vps39* csendesítés esetében sosem látunk tubulusokat képző endoszómákat (B¹-B³). A skála a képeken 5 μ m-t jelöl.

Kísérleteink alapján elmondható, hogy vannak lizoszómáknak tekinthető savas struktúrák az *snz* KD sejtekben, melyek rendelkeznek működőképese emésztőenzimekkel és képesek az endoszóma-lizoszóma fúzióra, így a megnagyobbodott endoszómák megjelenése nem a lebontási útvonal hibájából ered.

4.1.3 Az *Snz* hiányában fokozódik az endocitotikus aktivitás

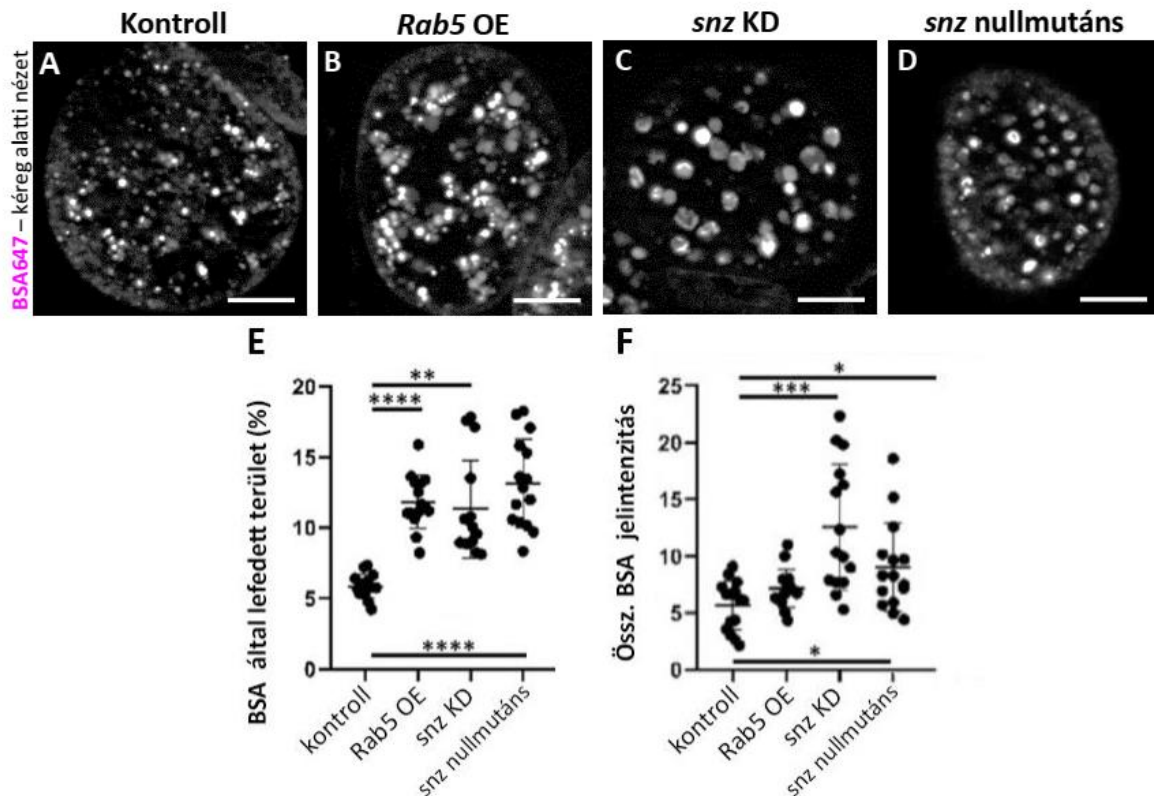
A késői endoszómák megnövekedésének egy másik lehetséges oka a beérkező szállítmány mennyiségének megnövekedése, amelyet nem képes lekövetni az endoszomális hálózat. Ezért a következő kísérletünkben a korai endoszómák állapotára voltunk kíváncsiak, melyet szintén tracer felvételi kísérlettel vizsgáltunk.

Az élő nefrocitákkal ismét BSA647-et vetettünk fel, viszont mivel most az endocitózis kezdeti lépéseinek kinetikáját szeretnénk volna láthatóvá tenni - a szakirodalomból tudjuk, hogy a korai endoszómák kb. 10 percig fogadják a bejövő szállítmányt (Maxfield & McGraw, 2004) - ezért 1 perc pulse és 9 perc chase időt hagytunk a sejteknek. A viszonylag rövid chase során bizonyosan nem jut el a tracer a perinukleárisan elhelyezkedő lizoszómákig. Ezért a sejtekben a tracer által kijelölt endoszómák korai endoszómáknak tekinthetőek, melyek jellemzően a plazmamembrán alatt helyezkednek el (16. ábra).

A nyomjelző mennyiségének meghatározásához két adatot vettünk figyelembe: a tracer pozitív területet (16. ábra, E), illetve a sejtben mért fluoreszcencia összintenzitását (16. ábra, F).

A *Rab5* esetében ismert, hogy overexpressziója növeli az endocitotikus aktivitást (Atienza-Manuel és mtsai., 2021; Bucci és mtsai., 1992), ezért pozitív kontrollként alkalmaztuk, és a fenti paraméterek szignifikáns növekedését tapasztaltuk (16. ábra, B) a kontrollhoz viszonyítva (16. ábra, A).

Az *snz* KD (16. ábra, C) és az *snz* nullmutáns (16. ábra, D) esetében a BSA647 pozitív terület statisztikailag szignifikáns növekedést mutat a kontroll sejtekhez képest. Mindkét esetben megemelkedett a mért fluoreszcencia intenzitás is, de a növekedés csak a KD esetében volt szignifikáns a kontrollhoz viszonyítva (16. ábra, F). A megnagyobbodott korai endoszómákat a nefrociták szubkortikális vagy kéreg alatti régiójában figyelhetjük meg leginkább, melyek fokozott endocitotikus aktivitásra utalnak az *snz* funkcióvesztés esetében (16. ábra, C-D), hasonlóan a *Rab5* overexpresszió hatásához (16. ábra, B).



16. ábra: Korai endoszómák vizsgálata BSA647 nyomjelzőanyag segítségével

A nefrociták korai endoszómáit célozva BSA647 nyomjelzőanyagot adtunk az élő sejtekhez 1 percen keresztül, majd 9 perc chase periódus után vizsgáltuk őket. A kontrollhoz (A) képet a korai endoszómák mennyiségi növekedését láthatjuk a Rab5 overexpresszió (B), az snz KD (C) és az snz nullmutáns (D) esetében közvetlenül a plazmamembrán alatti régióban. A nyomjelző mennyiségének meghatározásához számszerűsítettük a sejtben a tracer által lefedett területet (E), illetve a fluoreszcencia intenzitást is (F). Az snz funkcióvesztéses genotípusok esetében a BSA647 által lefedett terület statisztikailag szignifikáns növekedést mutat a kontroll sejtekhez képest (E). Mindkét esetben megemelkedett a mért fluoreszcencia intenzitás is, de a növekedés csak a nullmutáns esetében volt szignifikáns a kontrollhoz viszonyítva (F). A szignifikáns különbségek *-gal jelölve: * esetén $P < 0,05$, ** esetén $P < 0,01$, *** esetén $P < 0,001$, **** esetén $P < 0,0001$. A skála a képeken $5 \mu\text{m}$ -t jelöl.

4.2 Garland nefrocitákban az Snz nem része az ER-PM-LD érintkezési pontoknak, viszont kölcsönhat a Rab11 fehérjével

4.2.1 Az Snz kolokalizál a Rab11 fehérjével

Ezután elemeztük az Snz lokalizációját a nefrocitákban, hogy megértsük az endoszomális rendszerben betöltött szerepét. Különböző endomembrán kompartmentumokat immunfestettünk a GFP-jelölt, teljes hosszúságú Snz riportert expresszáló nefrocitákban. Ezekből a kísérletekből kitűnik, hogy az Snz-GFP a sejtek kortikális vagy kérgi régiójában

helyezkedik el, és szabálytalan alakú, tubulo-vezikuláris struktúrákból álló hálózatot jelöl ki, amelyek mérete néhány száz nm és 2-3 μm között változik (17-18. ábra).

Elsőként szeretnénk volna megvizsgálni, hogy a garland nefrocitákban jelen vannak-e a zsírtestsejtekben leírt vagy ahhoz hasonló membrán érintkezési pontok. A lárvális zsírtestekben az Snz fehérjét, mint az ER ciszternák, a plazmamembrán és a perifériás lipidcseppek által alkotott hármas membrán érintkezési pontok részeként írták le, ahol a lipidmetabolizmus fontos szabályozójaként funkcionál (Ugrankar és mtsai., 2019). Az ER-PM érintkezési pontok megjelöléséhez Prof. Mike Henne rendelkezésünkre bocsátotta az általuk zsírtestben használt dMAPPER-Cherry (*Drosophila* membrane-attached peripheral ER) riportert, mely intenzíven fluoreszkáló, diszkrét pontszerű jelet ad a zsírsejtek perifériáján. Ezzel szemben nefrocitákban alkalmazva a riportert, az két, egymástól szinte független, diffúz, fluoreszkáló sávot jelölt ki a sejt középsíkjában nézve (17. ábra, A'). A jel széteszik közvetlenül a plazmamembrán alatt, illetve jóval beljebb is látható a perinukleáris régióban, vélhetőleg az ER ciszternákat kijelölve. Ennek megerősítésére ugyanazon a mintán immunfestést végeztünk a Calnexin99A (Cnx99A) ER markerrel is (17. ábra, B-B'), ami a dMAPPER-Cherry által kijelölt területekkel megegyező eredményt adott. Mind a dMAPPER, mind pedig a Cnx99A festés az Snz-GFP jeltől eltérő régióit jelöli ki a sejtnek, azaz az Snz-GFP nem mutat kolokalizációt az ER-rel, és megfigyeléseink alapján úgy tűnik, hogy a zsírsejtekkel ellentétben a nefrociták nem tartalmaznak olyan ER-PM érintkezési pontokat, amelyek a dMAPPER-Cherry-t toboroznák, ezért ez a riportert az egész ER-ben eloszlik.

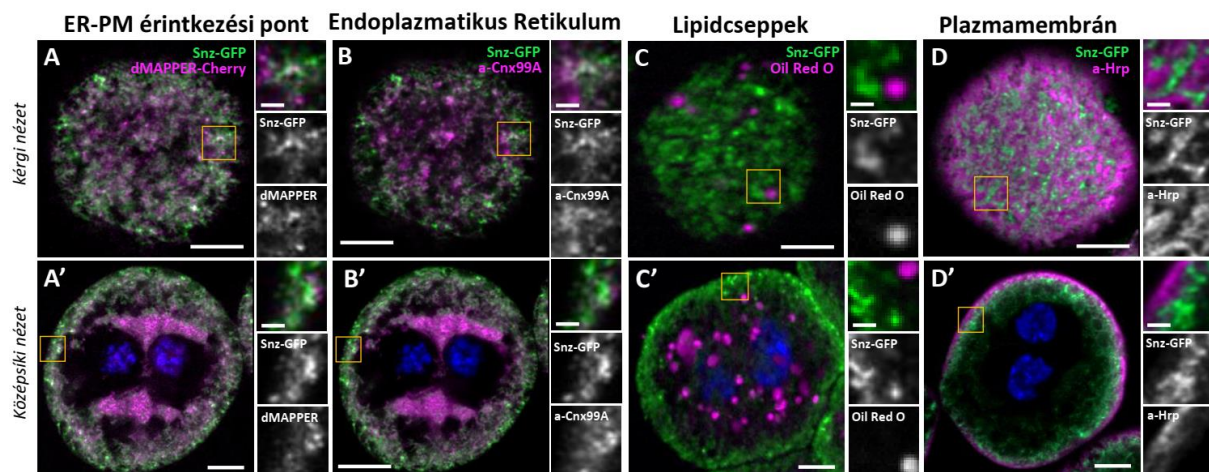
Ezt követően a lipidcseppek helyzetét vizsgáltuk meg a Snz-GFP-hez viszonyítva (17. ábra, C-C'). A funkcionális különbségből egyértelműen adódik, hogy a zsírsejtekhez képest jóval kevesebb lipidcseppet találunk a garland sejtekben. Oil Red O neutrális zsírsavfestéssel jelölve a lipidcseppeket az is kiderült, hogy a nefrocitákban az Snz a sejt perifériáján van, míg a lipidcseppek a sejt belső régióiban helyezkednek el. A sejtek perifériáján nem, vagy csak nagyon ritkán találkozunk lipidcseppekkel és egyáltalán nem tapasztaltunk kolokalizációt az Snz-GFP-vel.

Ezekből az eredményekből arra következtetünk, hogy a garland sejtek nem rendelkeznek a zsírtestsejtek esetében leírt, Snz-t is tartalmazó ER-PM-LD érintkezési pontokkal és ezekben a sejtekben az Snz a lipidcseppekhez köthető lipidmetabolizmustól független funkcióval rendelkezik.

Az Snz szerepének megértéséhez plazmamembrán festést és további endomembrán kompartmentumokat jelölő immunfestéseket végeztünk.

A plazmamembránt az anti-Hrp (anti-horseradish peroxidase) tormaperoxidáz ellenanyaggal jelöltük, amely a tormaperoxidáz növényi glikoprotein ellen termeltetett antitest, de mintegy huszonöt évvel ezelőtt felismerték, hogy specifikusan fest bizonyos állati szöveteket, köztük a *Drosophila* idegsejtek és garlandsejtek plazmamembránját (Paschinger és mtsai., 2009).

A nefrocitákat mediális nézetben vizsgálva csupán egy vékony, sejt körüli fluoreszkáló sávot kapunk a Hrp-festéssel (17. ábra, D'). Ellenben kérgi nézetben már jól kivehető, rücskösnek tűnő struktúrát ad, amely egyértelműen jelzi a garland sejtek plazmamembrán betűrődéseit (17. ábra, D). A Snz-GFP-hez viszonyítva kolokalizáció nem mutatható ki, sőt a két jel adta mintázat egymást kiegészíti, egymás komplementerei. Ez arra utal, hogy az Snz-GFP nincs jelen a plazmamembránban, viszont közvetlenül alatta helyezkedik el és a plazmamembrán által létrehozott csatornák közötti térben található (17. ábra, D).

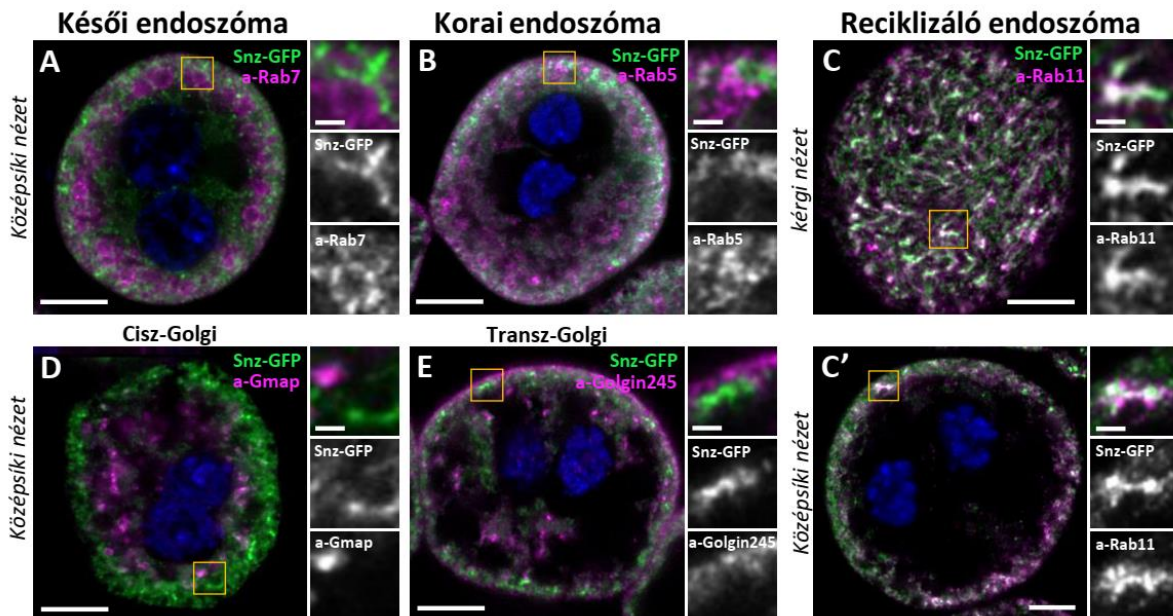


17. ábra: Különböző sejtalkotók festése az Snz lokalizációjának megértéséhez I.

Az snz-GFP-t (zöld) expresszáló nefrocitákban immunjelöltük a különböző sejtalkotókat (minden esetben magentával bemutatva). Három csatornás festést végeztünk az ER-PM érintkezési pontok és az Snz kapcsolatának vizsgálatára. Párónként bemutatva az Snz-GFP nem mutat átfedést sem az ER-PM érintkezési pontokat jelölő dMAPPER-Cherryvel (A-A'), sem pedig Cnx99 ER markerrel (B-B'). Nefrocitákban a dMAPPER-Cherry és a Cnx99 szinte azonos jelet ad, mely alapján úgy tűnik, hogy a dMAPPER riporter az egész ER-ben eloszlik. Az Snz-GFP a sejtek periferiáján helyezkedik el, ennek ellenére nem mutat átfedést a plazmamembránt jelölő Hrp-vel (D-D'), sem pedig a jóval beljebb látható Oil Red O-val festett lipidcseppekkel (C-C'). A skála a teljes sejtet bemutató képeken 5 μm -t, míg a nagyításokon 1 μm -t jelöl.

A Rab kis GTP-ázok immunjelölésével tettük láthatóvá a különböző endoszómapopulációkat. Meglepő módon, annak ellenére, hogy az Snz hiánya milyen nagymértékű változást okoz a késői endoszómák méretében, a késői endoszóma marker Rab7-tel nem mutat kolokalizációt (18. ábra, A). Sőt, a két jel a sejtek különböző régióit foglalja el. Az Snz-GFP perifériásabban helyezkedik el, mint a késői endoszómák alkotta réteg. A Rab5-pozitív korai endoszómák közel találhatóak a Snz-GFP-pozitív struktúrákhoz a sejtperiférián, és a két jel enyhe átfedése látható (18. ábra, B). Végül a Rab11 jelölésével a reciklizáló endoszómákat tettük láthatóvá, amelyek a korai endoszómákból a plazmamembrán irányába végzik a szállítást, ezért közvetlenül a plazmamembrán alatt helyezkednek el. A reciklizáló endoszómák eloszlása nagyon hasonló az Snz-GFP mintázatához, és a két jel nagymértékben átfed egymással (18. ábra, C).

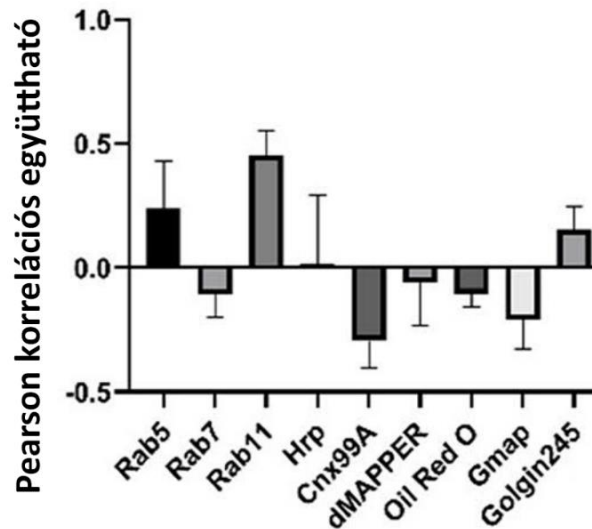
Az endoszómális rendszerrel kétirányú kapcsolatban lévő Golgi hálózat mindkét oldalát, a cisz- és transz-régiót külön ellenanyaggal jelöltük. A cisz-Golgi kimutatásához anti-Gmap ellenanyagot használtunk, mely nem mutatott átfedést az Snz-GFP-vel (18. ábra, D). A transz-Golgi esetében alkalmazott anti-Golgin245 ellenanyaggal viszont nagyon ritkán, de kaptunk átfedő jelet (18. ábra, E).



18. ábra: Különböző sejtalkotók festése az Snz lokalizációjának megértéséhez II.

Az Snz-GFP-t (zöld) expresszáló nefrocitákban immunfestettük a különböző sejtalkotókat (magenta). Az Snz-GFP a sejt periferiáján helyezkedik el. Az Snz-GFP nem kolokalizál a késői endoszóma marker Rab7-tel (A), de enyhe kolokalizációt mutat a korai endoszómális Rab5-tel (B). Nagymértékű átfedést találtunk a reciklizáló endoszómákat jelölő Rab11 markerrel (C-C'). A Golgi hálózat cisz oldalát jelölő Gmap-pal nem mutat kolokalizációt, míg a transz oldalát jelölő Golgin245-tel ritkán, de kolokalizál az Snz (D). A skála a teljes sejtet bemutató képeken $5\ \mu\text{m}$ -t, míg a nagyításokon $1\ \mu\text{m}$ -t jelöl.

Az egyes esetekben az Snz-GFP és az általunk vizsgált markerek közötti kolokalizáció mértéket a Pearson-féle korrelációs együtthatók markerenkénti meghatározásával számszerűsítettük. A mért értékek alapján elmondható, hogy nefrocitákban az Snz-GFP nem kolokalizál a Rab7-pozitív késői endoszómákkal, a Cnx99A-pozitív ER-rel, az ER-PM érintkezési pontokat jelölő dMAPPER-rel, a cisz-Golgit jelölő Gmap riportterrel, sem pedig a lipidcseppekkel, melyeket az Oil Red O festéssel tettünk láthatóvá. Ellenben határozott kolokalizációt mutat a Rab11 reciklizáló endoszóma markerrel, valamivel kisebb átfedést pedig a Rab5-pozitív korai endoszómákkal és Golgin245 TGN riportterekkel.



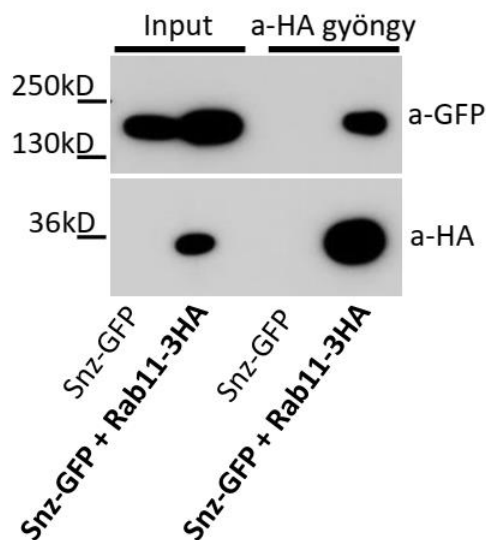
19. ábra: A kolokalizációs adatok számszerűsítése Pearson korreláció segítségével

A Snz-GFP zöld fluoreszcens jelét összevetettük a vizsgált riporterek esetében mért jellel és az ImageJ segítségével kiszámítottuk a Pearson-féle korrelációs együtthatókat. A +1 jelenti a tökéletes kolokalizációt, a 0 a véletlen a kolokalizációs eseményekre utal, míg a negatív korrelációs értékek esetében nincs kolokalizáció, a jelek elkerülik egymást. A mért értékek alapján elmondható, hogy nefrocitákban az Snz nem kolokalizál a Rab7, Cnx99A, dMAPPER, Gmap riporterekkel, sem pedig az Oil Red O festékkel. Ellenben határozott kolokalizációt mutat a Rab11, valamivel kisebb átfedést pedig a Rab5 és Golgin245 riporterekkel.

4.2.2 Az Snz és a Rab11 kölcsönhatása

Kíváncsiak voltunk, hogy a mikroszkóp által látott kolokalizáció mögött valóban fizikai kapcsolat áll-e. Ennek kimutatására koimmunoprecipitációs kísérletet végeztünk egész állatokból nyert lizátummal. A vizsgálathoz két genotípusból készült lizátum fehérjéinek HA-kötési affinitását hasonlítottuk össze mágneses anti-HA gyöngyök segítségével. Megvizsgáltuk az *snz* mutáns háttéren *tub-Gal4* driverrel hajtott, UAS vezérelt Snz-GFP-t önmagában és Rab11-3xHA transzgénnel egyidejűleg hajtvva.

A lizátumokat 4 órán át inkubáltuk együtt az anti-HA gyöngyökkel, majd nem redukáló SDS pufferrel eluáltuk és SDS-gélen futattuk. Az input sávban kapott jelek bizonyítják, hogy a lizátum tartalmazta a vizsgált transzgéneket. Az anti-HA gyöngyök viszont csak mindkét transzgén jelenléte esetén kötötték még az Snz-GFP-t, tehát a Rab11-3xHA fehérjén keresztül. A koimmunoprecipitáció segítségével jól láthatóvá vált a tényleges fizikai kölcsönhatás a teljes hosszúságú Snz-GFP és a Rab11-3xHA fehérjék között, hiszen mindkét ellenanyagra pozitív jelet kaptunk az SDS gélképen (20. ábra).



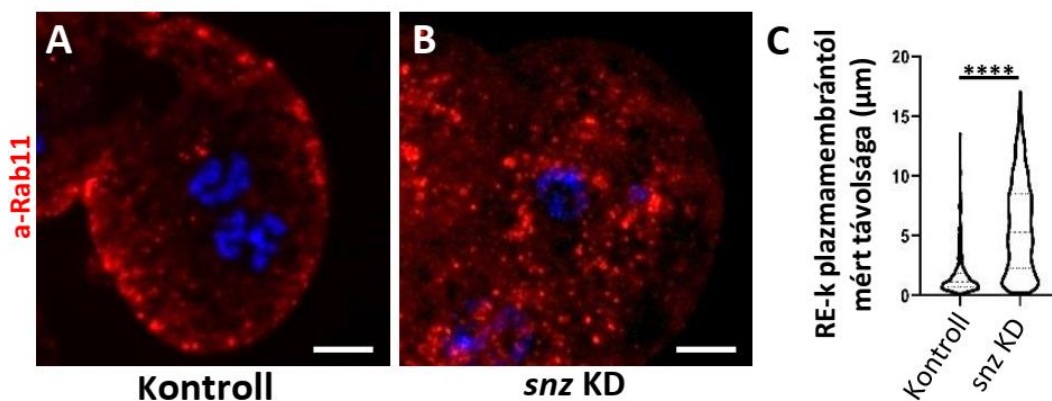
20. ábra: Az Snz és a Rab11 közötti kölcsönhatás kimutatása

Koimmunoprecipitáció segítségével láthatóvá tettük az Snz és a Rab11 közötti kölcsönhatást. Az input bizonyítja, hogy a lizátumok tartalmazták az általunk használt transzszéneket. Az Snz-GFP önmagában nem képes az anti-HA gyöngyökhöz kötődni, így itt nem kaptunk jelet az SDS gélen. A két transzszént egyidejűleg kifejező állatokból származó minta esetén a Rab11-3xHA fehérje kötődött az anti-HA gyöngyökhöz és magával hozta az Snz-GFP-t is, tehát közöttük valós kölcsönhatás van.

4.2.3 Az Snz hatással van a reciklizáló endoszómák nefrocitán belüli elhelyezkedésére

Tekintettel az Snz és a Rab11 kolokalizációjára és a kimutatott fizikai kölcsönhatására, szeretnénk volna látni, hogyan hat a reciklizáló endoszómák elhelyezkedésére az Snz hiánya, ezért *snz* KD nefrocitákon végeztünk anti-Rab11 immunfestést. A kontroll sejtekhez képest az endogén Rab11 fehérjére pozitív struktúrák a sejt periferiájáról a nefrociták belső régiójába helyeződnek át, ahol a citoplazmában szétszórtnak látjuk őket (21. ábra, A-B).

Megmértük a Rab11-pozitív struktúrák plazmamembrántól mért távolságát, hogy számszerűsíthessük az átrendeződés mértékét (21. ábra, C). A Rab11-pozitív struktúrák plazmamembrántól mért távolsága jelentősen megnő az *snz* KD sejtekben a kontroll sejtekhez viszonyítva. (A kontroll esetében átlagosan 1,7 μm a reciklizáló endoszómák plazmamembrántól mért távolsága, míg az *snz* KD esetében 5,8 μm). Mindebből arra következtetünk, hogy a nefrocitákban a reciklizáló endoszómák megfelelő eloszlása Snz függő.



21. ábra: A reciklizáló endoszómák sejten belüli eloszlásának vizsgálata

A kontroll nefrocitákban a Rab11-pozitív struktúrák a sejt perifériáján helyezkednek el (A), míg az snz KD sejtekben, a citoplazmában szétszóródó mintázatot mutatnak (B). A grafikon a reciklizáló endoszómák plazmamembrántól mért távolságát mutatja (C). A snz KD nefrocitákban szignifikánsan nagyobb mértékben tapasztaltunk a plazmamembrántól távol eső Rab11 jelet a kontrollhoz viszonyítva. A szignifikáns különbségek * -gal jelölve: * esetén $P < 0,05$, ** esetén $P < 0,01$, *** esetén $P < 0,001$, **** esetén $P < 0,0001$. A skála a képeken 5 μm -t jelöl.

A fenti kísérletek összefoglalásaként elmondható, hogy nefrocitákban az Snz az ER-PM-LD érintkezési pontoktól független funkcióval rendelkezik, továbbá kolokalizál a Rab11-gyel. Feltehetően az Snz feladata a Rab11 szabályozásához köthető és normál működése szükséges a reciklizáló endoszómák megfelelő sejten belüli elhelyezkedéséhez.

4.3 Az Snz a Rab11 szabályozásán keresztül fontos szerepet játszik a nefrocita diafragma integritásának fenntartásában

Szerettük volna feltárni a Rab11 és az Snz között fennálló kapcsolat funkcionális hátterét. Ezért most a reciklizáció, az exocitózis egy formája felől közelítettük a kérdést. A garland sejtek a korábbiakban bemutatott összetett diafragma hálózattal bírnak, amit a plazmamembrán szabályozott betűrodései és a szűrőrendszer kapufehérjéi, a diafragma fehérjék hoznak létre meghatározott mélységben. A nefrocita diafragma komponensei folyamatos kicserélődésben vannak, amelyhez ép endoszomális rendszerre van szükség, különös tekintettel a korai és az reciklizáló endoszómák közötti együttműködésre. A diafragma mintázatában bekövetkező változások potenciálisan a nefrociták károsodott endoszomális rendszerét tükrözik, ami a megváltozott Rab5 vagy Rab11 funkciók következménye lehet. Ennek vizsgálatához immunhisztokémiával jelöltük az Sns és Pvd diafragma fehérjéket, hogy

láthatóvá tegyük a nefrocita diafragmát (22. ábra). Az *Sns* hatékony kimutathatóságának érdekében hőfixálásos eljárást alkalmaztunk, az ellenanyagot előállító kutatócsoport ajánlása alapján (Hochapfel és mtsai., 2017).

A kontroll nefrociták kérgi régióját megfigyelve egy ujjenyomatszerű struktúrát láthatunk, amelyet a diafragma fehérjék szigorúan szervezett, párhuzamosan együtt haladó vonalszerű jelei alkotnak (22. ábra, A). A hézagokat a plazmamembrán alkotta falként, míg a jelet a lakúnak bejárataként értelmezhetjük (Weavers és mtsai., 2009; Zhuang és mtsai., 2009). Mediális keresztmetszetben a *Pyd* jel a szorosan rendezett diafragma egységek következtében egy vékony sejtkontúrként jelennek meg (22. ábra, A').

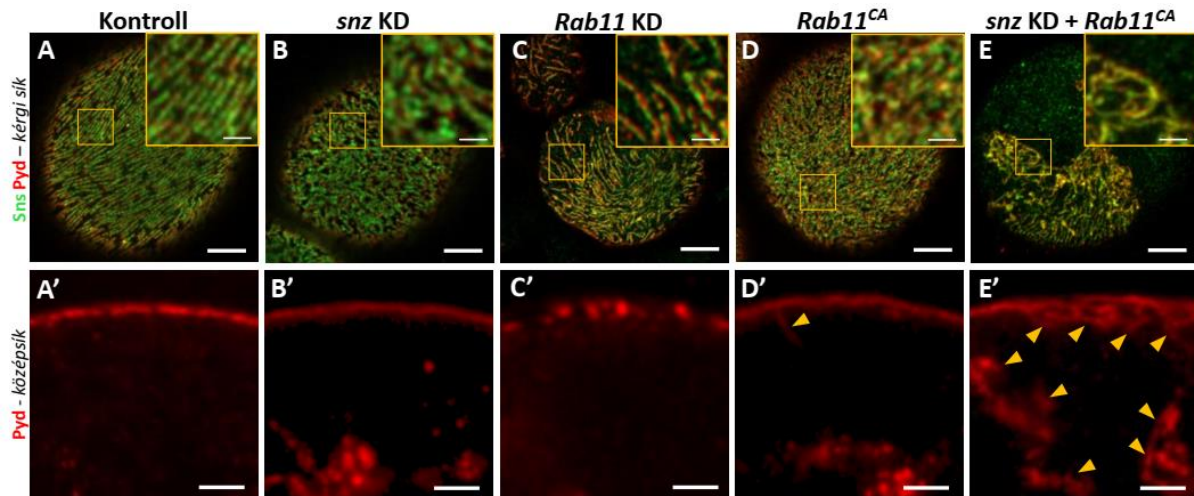
Az *snz* KD nefrociták kortikális régiójában a kontrollnál tapasztalt szigorúan rendezett ujjenyomatszerű szerveződés felborul, a diafragma fehérjék megközelítőleg párhuzamos rendeződése megszűnik, mintázatuk egymásba fordul, tekergőzövé válik (22. ábra, B). Tehát az *Snz* hiánya befolyásolja a lakúnarendszer szerveződését. Mediális keresztmetszetben vizsgálva az *snz* KD sejtek belső régiójában felhalmozódott *Pyd* pozitív csomókat találunk (22. ábra, B'), ami arra utal, hogy az *Snz* részt vesz a diafragma fehérjék helyzetének szabályozásában vagy a sejten belüli útjuk, újrahasznosulásuk szabályozásában.

A *Rab11* csendesítése során a nefrociták kérgi régiójában a diafragma más típusú struktúrális megváltozását figyelhetjük meg. Hiszen a diafragma egységek közötti távolságok megnőnek a kontrollhoz képest. (22. ábra, C). Ellenben a középsíki nézetben nem tapasztalunk sejten belüli *Pyd* felhalmozódást (22. ábra, C'), mint az *snz* funkcióvesztéskor.

Érdekes módon a *Rab11* EYFP-jelölt, GTP-kötött és konstitutívan aktív formáját (Zhang és mtsai., 2007) (az egyszerűség kedvéért a továbbiakban *Rab11^{CA}*) expresszáló nefrocitákban hasonló diafragma átrendeződést és intracelluláris *Pyd* felhalmozódást figyeltünk meg (22. ábra, D), mint az *snz* KD esetén. Ebből arra következtetünk, hogy az *Snz* és a *Rab11* ellentétes módon hatnak az exocitózisra.

Az ektopikus, azaz nem élettani helyükön előforduló nefrocita diafragma-egységek *Pyd*-pozitív intracelluláris nyúlványokként figyelhetők meg a *Rab11^{CA}*-t kifejező nefrocitákban (22. ábra, D'). Az ektopikus diafragmák kialakulásáról a közelmúltban már beszámolt a szakirodalom (Atienza-Manuel és mtsai., 2021; Kampf és mtsai., 2019), és a *Rab11* túlműködés következtében fokozódó exocitózis eredményeként értelmezték. A fentebb leírt fenotípusnak a súlyosbodását tapasztaltuk, amikor az *snz* csendesítést a *Rab11^{CA}* expresszióval kombináltuk (22. ábra, E-E'). Kérgi nézetében a sejt egy részén egymásba tartó csomókat alkotnak a

diafragma fehérjék, míg a sejt többi területéről eltűnnek (22. ábra, E). Középsíki nézetben vizsgálva a sejteket, közvetlenül a sejtfelszín alatt Pyd pozitív betüremkedéseket figyelhetünk meg, majd mélyebben a sejt belsejében ismét megjelennek az Pyd jelek és hálózatos struktúrát alkotnak (22. ábra, E').

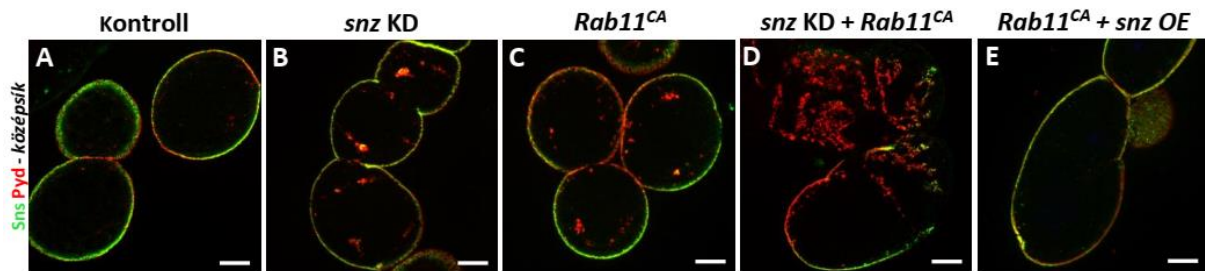


22. ábra: Az Snz és a Rab11 kapcsolatának értelmezése a diafragma fehérjék immunjelölésével I.

Az Sns (zöld) és Pyd (piros) diafragma fehérjék hőfixálós immunfestésével láthatóvá tettük a nefrocita diafragmát. Kérői nézetben (A-E) a sejtfelszíni diafragma mintázat látható, ami a kontroll (A) esetében egységes ujjlenyomatszerű struktúrát alkot, míg az snz KD (B), a Rab11 KD (C) és a Rab11^{CA} (D) esetében a sávok elhelyezkedése, és iránya rendezetlenné válik. Az snz KD (B) és a Rab11^{CA} (D) hasonló fenotípust mutat, a diafragma egységek egymásba fordulnak, az általunk kirajzolt vonalak közötti távolság lecsökken, ellenben a Rab11 KD (C) esetében a vonalak közötti párhuzamos irányultság megmarad, csak a köztük lévő távolság nő meg. Az snz KD és a Rab11^{CA} egyidejű expressziója (E) esetében ez a rendezetlenség tovább fokozódik, és a diafragma fehérjék a sejt egy területére tömörülnek, míg más részéről eltűnnek. Középsíki nézetben (A'-E') a nefrociták mélyebb régióiba láthatunk be. A sárga nyílhegyek az ektopikus diafragmákra mutatnak. A kontroll (A') esetében a Pyd (piros) jel élénken kijelöli a sejthatárt, a citoplazmában pedig nincs jelen. Ezzel szemben az snz KD (B') esetében intenzíven fluoreszkáló Pyd pozitív struktúrák jelennek meg a citoplazmában, hasonlóan a Rab11^{CA}-hoz (D'). A Rab11 KD (C') esetében is megváltozik a Pyd festés, szakadozottá válik a sejthatáron, de nem látható a citoplazmában. Az snz KD és a Rab11^{CA} egyidejű expressziója (E) esetében mind a sejthatárnál mélyen benyúló Pyd jelet, mind pedig a citoplazmában sűrű Pyd pozitív struktúrákat láthatunk. A skála a kérői síkban (A-E) 5 μ m-t, a nagyításokban pedig 1 μ m-t, míg középsíki nézetben (A'-E') 2 μ m-t jelöl.

Az Snz és a Rab11 között kimutatott kölcsönhatással és a diafragma struktúrájában okozott ellentétes hatásukkal - miszerint az snz funkcióvesztés (23. ábra, B) a Rab11 funkciónyeréssel (23. ábra, C) megegyeztethető fenotípust eredményezett -, összhangban van, hogy a Rab11^{CA}-t expresszáló sejtekben az intracelluláris Sns és Pyd felhalmozódás

menekíthető az *snz-GFP* koexpressziójával (23. ábra, E), tehát a *Rab11* túlműködés hatását ellensúlyozza az *snz* magasabb szintű expressziója.



22. ábra: Az *Snz* és a *Rab11* kapcsolatának értelmezése a diafragma fehérjék immunjelölésével II.

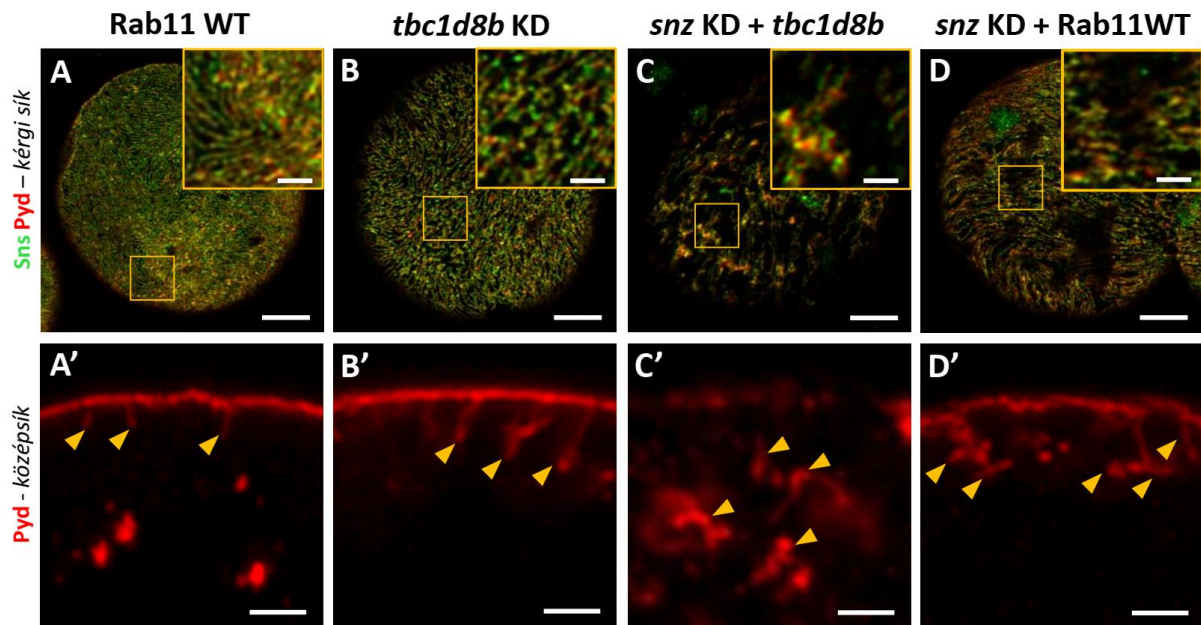
Az *Sns* (zöld) és *Pyd* (piros) diafragma fehérjék hőfixálásos immunfestésével láthatóvá tettük a nefrocita diafragmát, mely középsíki nézetben csak egy vékony sejtkontúrként jelenik meg a kontroll sejteknél (A). Az *snz* KD (B) és a *Rab11^{CA}* (C) esetében a sejt belsejében is láthatunk ektopikus diafragmákat. Az *snz* KD és a *Rab11^{CA}* (D) egyidejű expressziója esetén a sejthatárok gyakran elmosódnak, felismerhetetlenné válnak, míg a sejt belsejében rendezetlenül nagy mennyiségű diafragma fehérje mutatható ki. A *Rab11^{CA}* + *snz* OE kombinációja (E) esetében eltűnnek a sejten belüli diafragma aggregátumok.

Szerettük volna a *Rab11^{CA}* esetében látott fenotípusokat más, *Rab11* túlműködést okozó konstrukciókkal is alátámasztani. Elsőként a vad típusú *Rab11* overexpressziót alkalmaztunk (*Rab11^{WT}* OE) (24. ábra, A-A'), majd csendesítettük a *Rab11* egy ismert GAP-jét, a *tbc1d8b*-t (TBC1 Domain Family Member 8B) (Kampf és mtsai., 2019) (24. ábra, B-B'). Ez a fehérje elősegíti a *Rab11*-hez kötött GTP GDP-vé történő hidrolízisét, ezáltal inaktiválva a *Rab11* molekulát. Tehát a csendesítést követően az GTP-GDP hidrolízis nem tud megtörténni, így a *Rab11* folyamatosan GTP kötött, aktív állapotban marad.

Mindkét esetben a *Rab11^{CA}* formájánál látott fenotípussal összeegyeztethető (22. ábra, D), nagyon hasonló fenotípust kaptunk. A várakozásoknak megfelelően mind a *Rab11^{WT}* túltermeltetése, mind pedig a *tbc1d8b* funkcióvesztés ektopikus diafragma-egységek kialakulásához vezet (24. ábra, A'-B'), és csak csekély hatással van a kérgi diafragma mintázatára (24. ábra, A-B). Mindkét esetben elvégeztük az *snz* KD-val való kombinálást is, hogy összeegyeztethessük a korábbi, *Rab11^{CA}* és *snz* KD egyidejű expressziója esetén kapott eredményekkel.

Az *snz* KD-val kombinálva, a *tbc1d8b* csendesítése a diafragma sokkal súlyosabb szerkezeti átrendeződéséhez vezet, ami a kérgi régióban (24. ábra, C) nagy kiterjedésű üres területek megjelenésében, a nefrociták mediális régiójában (24. ábra, C') pedig ektopikus

diafragmafehérje-lerakódásokat tartalmazó membránbemélyedések kialakulásában nyilvánul meg. Ez a hatás nagymértékben hasonlít a Rab11^{CA} (22. ábra, E-E'), illetve a Rab11^{WT} OE snz KD-vel kombinált hatására (24. ábra, D-D'). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a Rab11 funkciónyerése megzavarja a diafragma integritását, ami még súlyosabbá válik Snz hiánya mellett. Ebből és a koimmunoprecipitáció segítségével a Rab11 és az Snz között kimutatott fizikai kapcsolatból arra a következtetésre jutottunk, hogy az Snz, mint a Rab11 fehérje negatív szabályozója funkcionálhat a garland nefrocitákban.



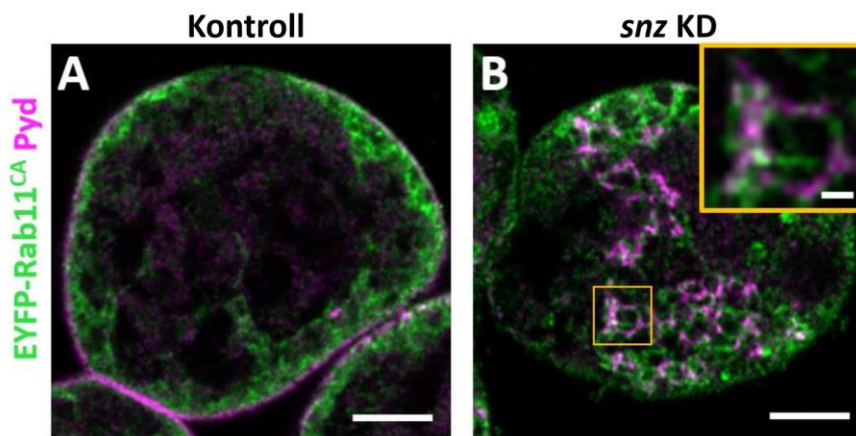
24. ábra: A Rab11^{CA} fenotípusának ellenőrzése a Rab11 túlaktiváció különböző formáival

A vad típusú Rab11 expressziójának növelése (A-A'), illetve a Rab11 GAP-jének, a tbc1d8b-nek a csendesítése (B-B') a Rab11^{CA}-hoz (22. ábra, D) hasonlóan a kérgei mintázatot csak enyhén befolyásolta (A-B), de mediális nézetben már megjelennek az ektopikus diafragmák (A'-B'). Az snz KD-vel történő kombinációjuk adta fenotípus megfeleltethető (C,C'-D,D') az snz KD + Rab11^{CA} (22. ábra, E) formájánál látottakkal. Mediális nézetben a sárga nyílhegyek az ektopikus diafragmákat jelölik. A skála a kérgei síkban (A-D) 5 μ m-t, a nagyításokban 1 μ m-t, míg középsíki nézetben (A'-D') 2 μ m-t jelöl.

4.4. Nefrocitákban az Snz és a Rab11 együttesen szabályozzák a lakúnák mélységét

Szerettük volna egyidejűleg bemutatni a Pyd diafragma fehérje és az EYFP-vel fuzionált Rab11^{CA} egymáshoz viszonyított lokalizációját, ezért normál (nem hőfixálós) immunfestést is végeztünk (25. ábra). A kontroll sejtekben (25. ábra, A) a Rab11 és Pyd jel egyaránt a sejt periferiáján található, a Pyd nem jelöl ki bemélyedéseket, míg a Rab11-EYFP esetében már

láthatóak betüremkedések a sejt belseje felé, amely valószínűleg megfeleltethető a lakúnáknak. A EYFP-vel fuzionált Rab11^{CA} riporter plazmamembrán kötött állapotban marad, miután az általa szabályozott reciklizáló endoszóma a plazmamembránnal egyesült, ebből kifolyólag némileg eltérő mintázatot adhat az endogén Rab11 jelöléshez képest. Azt találtuk, hogy *snz* KD háttéren kifejezve a Rab11^{CA} formáját (25. ábra, B) mindkét jel mélyen benyúlik a sejtbe, egy a sejten átívelő hálózatot hozva létre. A Rab11 és a Pyd jel átfedésben vannak, ami arra utal, hogy a Rab11 jelölte mély membránbetüremkedések magukkal rántják a bennük lévő transzmembrán fehérjéket a sejt belseje felé. Ebben a festési eljárásban is jól látható, hogy a betüremkedések egy irányba csoportosulnak, oda toborozzák a Pyd fehérjét, és vélhetőleg más diafragma fehérjéket is, így immunjelöléseinkkel nem festődő, nagy, egybefüggő régiók jelölik a sejt többi részét.



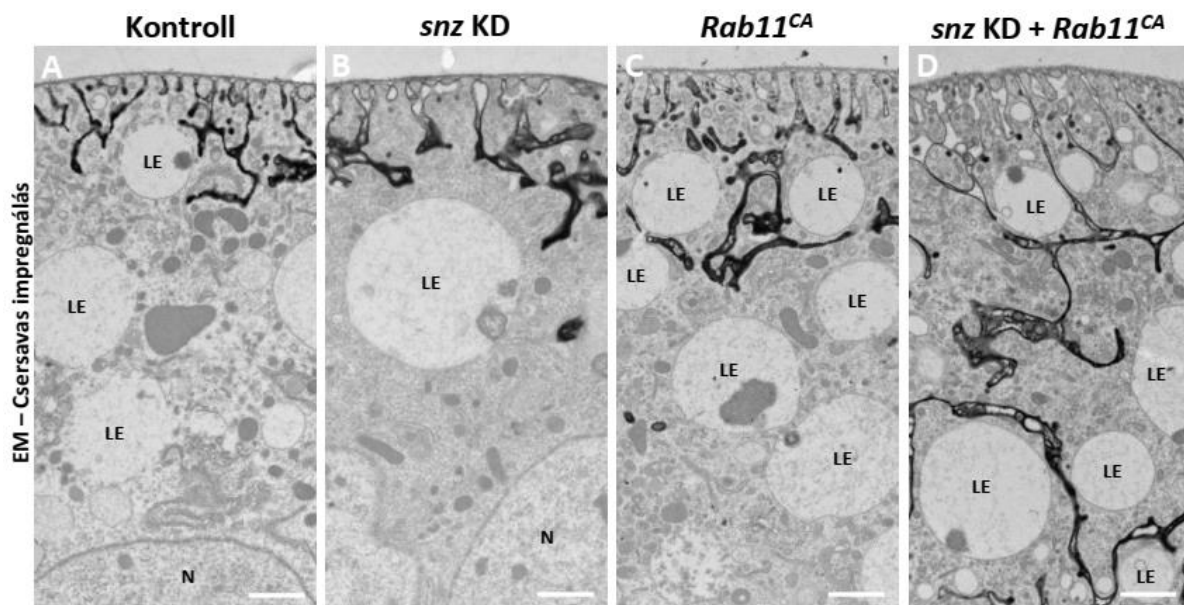
25. ábra: Pyd diafragma fehérje és a Rab11^{CA} fehérje lokalizációja

Kontroll esetben (A) a Pyd (magenta) jel a sejt perifériáját jelöli ki, míg a Rab11 (zöld) jele a lakúnahálózattal megfeleltethető mélységben látható. Az *snz* KD nefrociták esetében (B) a Pyd jel mélyen a sejt citoplazmájába nyúlik, és mintázatát nagyrésztben leköveti a Rab11 jel is. A skála a képeken 5 μm -t, míg a nagyításban 1 μm -t jelöl.

A fenti fenotípusok esetében a diafragma fehérjék által kijelölt perifériás betüremkedéseket abnormálisan megnyúlt lakúnáknak tekinthetjük, ahol a megnyúlás következtében mélyebbre hatolnak a diafragma fehérjék. Ez két esetben alakulhat ki. Amikor gátolt az endocitózis, így az exocitózissal kikerült membrán felesleg nem tud lefűződéssel visszajutni a sejt belsejébe, így a membrán többlet befelé nyomul, vagy amikor az exocitózis túlműködik, és ezt a plazmamembránba érkező membrán felesleget nem tudja elég gyorsan az endoszomális transzportba forgatni a sejt (Atienza-Manuel és mtsai., 2021; Kampf és mtsai., 2019). A nefrociták lakúnahálózatának láthatóvá tétele érdekében csersavas impregnálást

végeztünk, majd EM segítségével elemeztük az eredményeket. Az eljárás során a csersav nem hatol át a plazmamembránon, így csak az olyan membrán közötti régiókat képes kitölteni, amelyek kapcsolatban állnak az extracelluláris térrel (Kosaka & Ikeda, 1983).

A csersavas impregnálás adta fekete kontúr segítségével jól látható, hogy a kontroll nefrociták (26. ábra, A) esetében a lakúnák átlagosan 2-3 μm mélységbe nyúlnak be a sejt belsejébe. Az *snz* KD (26. ábra, B) és a *Rab11^{CA}* (26. ábra, C) nefrociták esetében a lakúnák mélysége enyhén megnövekszik, a két genotípus kombinációjakor (26. ábra, D) pedig ez a megnyúlás a sokszorosára nő. Ezekben a sejtekben a csersavval kijelölt membrán betüremkedések mélyen behatolnak a nefrociták belsejébe, és ott lakúnák átláthatatlan hálózatát alkotják. Ezek a membrán invaginációk megfelelnek a korábban bemutatott, Sns-Pyd festéssel foltárt ektopikus diafragma hálózatnak.

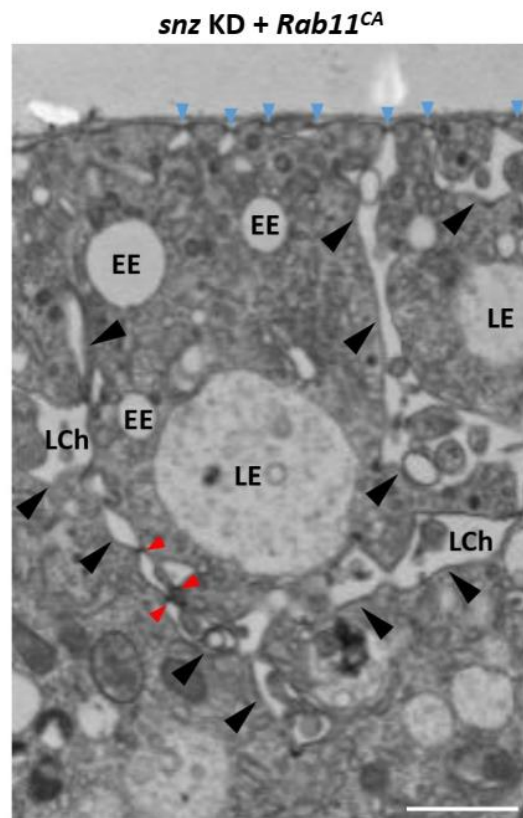


26. ábra: Nefrocita részleteket bemutató EM felvételek csersavas impregnálást követően

A csersav feltölti a nefrociták lakúnahálózatát, és mint elektron-denz struktúra emeli ki őket. A kontroll esetben (A) a lakúnák mélysége átlagosan 2-3 μm , ehhez képest az *snz* KD (B) és a *Rab11^{CA}* (C) esetében enyhén megnyúlt lakúnákat láthatunk. Az *snz* KD és a *Rab11^{CA}* együttes expressziója (D) drasztikusan megnöveli a lakúnák mélységét. A képeken az N: a sejtmagot, LE: a késői endoszómákat, a skála 1 μm -t jelöl.

Az *snz* KD és a *Rab11^{CA}* kombinálása esetében bemutatott csersav mentes EM képen (27. ábra) egyidejűleg megfigyelhetők a normál helyzetű diafragmák, melyek közvetlenül a bazális membrán alatti elektronlucens betűrődésekként látható lakúnák bejáratát zárják (kék nyílhegyek), illetve a sejt különböző régióiban található ektopikus diafragmák, melyek kis

elektronenz hidakat hoznak létre (piros nyílhegyek) a sejtbe mélyen benyúló lakúnában (fekete nyílhegyek).



27. ábra: Ektopikus diafragma és megnyúlt lakúnák nefrocita EM felvételén

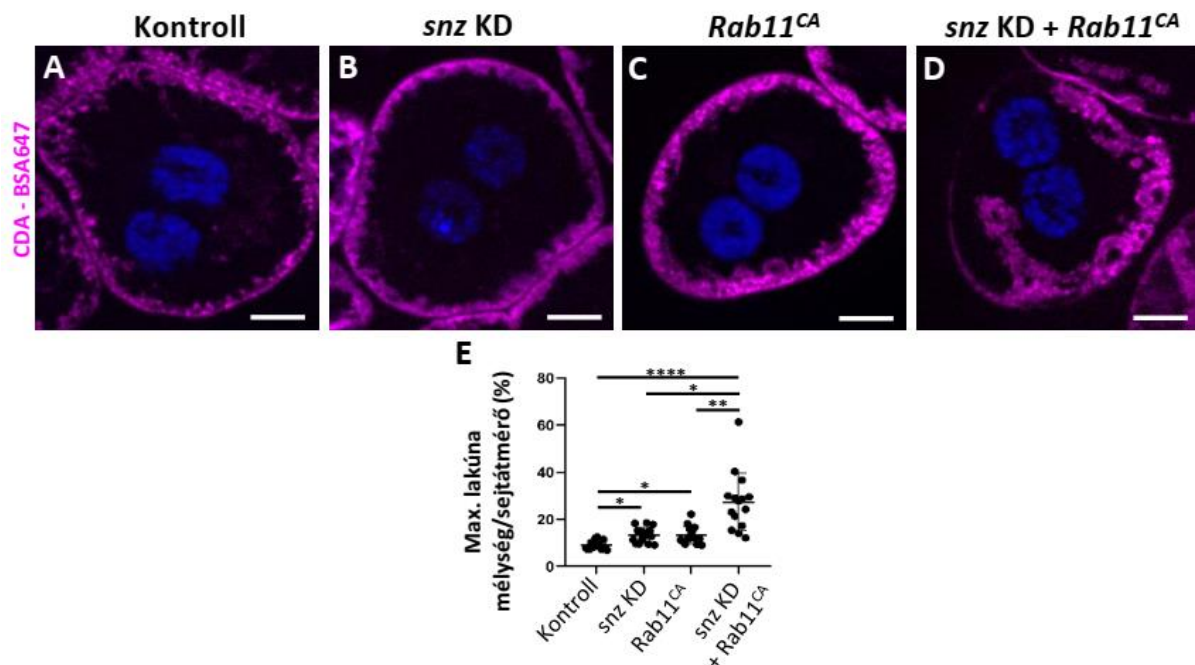
Az *snz KD + Rab11^{CA}* nefrocita EM felvételén az EE: a korai endoszómákat, LE: a késői endoszómákat, LCh: a lakúnákat jelöli. A kék nyílhegyek a bazális membrán alatti diafragma fehérjékre, a fekete nyílhegyek a megnyúlt lakúnákra, míg a piros nyílhegyek a megnyúlt lakúnákban látható ektopikus diafragma fehérjékre mutatnak. A skála 1 μm -t jelöl.

A lakúnarendszer közvetlen jelölésére az úgynevezett Channel diffusion Assay-t (CDA) alkalmaztuk (Milosavljevic és mtsai., 2022). Az eljárás alapja, hogy két lépésben kell fixálni a mintákat. Az első egy rövid előfixálás, mely segítségével leállítjuk az endocitózist, így a kis molekulatömegű fluoreszcens fehérjék passzívan átjutnak a nefrocita diafragmán, viszont nem kerülhetnek be a sejtek belsejébe, így a csatornákat, de csakis a csatornákat tökéletesen feltölti a festék, melyet a második fixálási lépés stabilizál (28. ábra). Eredményében nagyban hasonlít a csersavas impregnáláshoz, viszont ez esetben fluoreszcens festékkel (BSA Alexa-647) dolgozhatunk, és elkerülhetőek vele az EM vizsgálatok hátrányai, mint a hosszas minta fixálás, a gyantába ágyazás, az ultravékony metszetek készítése és az utóbbiból adódó szűkebb mozgástér. Az EM metszetek készítése során némileg bizonytalan a számunkra megfelelő sík

eltalálása, míg a fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok esetében a teljes sejt rendelkezésünkre áll, és az élesség állítóval precízen választhatjuk ki a számunkra megfelelő síkot.

Számszerűsítettük a legmélyebb lakúna mélységét és a sejtátmérő arányát, hogy egymással összehasonlítható, reális mélység adatokat kapjunk (28. ábra, E). A kontrollhoz képest csak enyhe növekedést találtunk az *snz* KD-t vagy a *Rab11^{CA}*-t expresszáló sejtekben. Ellenben, amikor a *Rab11^{CA}*-t *snz* KD háttéren expresszáltuk - hasonlóan az előzőekhez -, bizonyos területeken a sejt belseje felé mélyen benyúló csatornákat találtunk. A sejt más részein azonban gyakorlatilag eltűnnek a lakúnák, és a membrán szinte kisimul, mert csak egy vékony fluoreszcens vonal látható, amely a sejthatárt jelzi. Ez valószínűleg a bazális membrán és a plazmamembrán között bent rekedt fluoreszcens BSA-ból adódik.

A kapott eredményekből arra a következtetésre jutottunk, hogy az *Snz* szükséges az nefrocita diafragma és a lakúnahálózat integritásának fenntartásához, valószínűleg a *Rab11* által közvetített reciklizáció és a plazmamembrán felé történő exocitózis korlátozása révén.



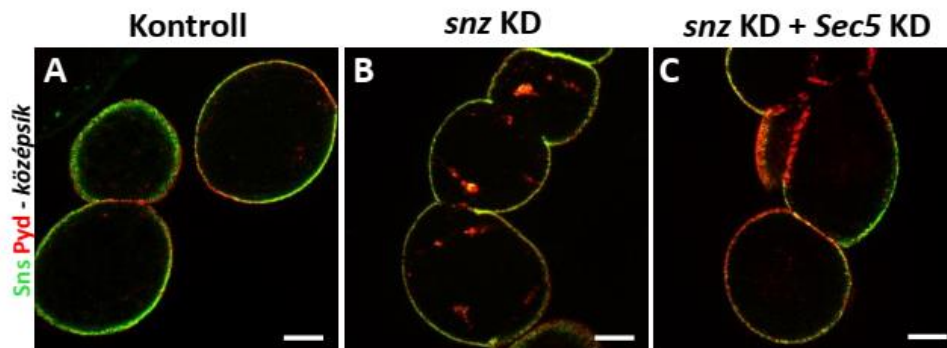
28. ábra: Nefrociták lakúnahálózatának láthatóvá tétele CDA módszerrel

A kontrollhoz (A) viszonyítva a lakúnák mélysége enyhe növekedést mutat az *snz* KD (B) és a *Rab11^{CA}* (C) esetében. Az *snz* KD + *Rab11^{CA}* együttes expressziójakor (D), vélhetően a hatás összeadódásának következtében feltűnően mélyebbre nyúlnak a lakúnák a sejt belsejében. A grafikon a maximális lakúnamélység és a sejtátmérő arányát mutatja az egyes genotípusok esetében. A szignifikáns különbségek *-gal jelölve: * esetén $P < 0,05$, ** esetén $P < 0,01$, *** esetén $P < 0,001$, **** esetén $P < 0,0001$. A skála a képeken $5 \mu\text{m}$ -t jelöl.

4.5 Az Snz az exocitózis negatív szabályozója

4.5.1 Az exocitózis lassítása menekíti az *snz* funkcióvesztéses fenotípust

Kíváncsiak voltunk, hogy az exocitózis folyamatának lassításával menekíthető-e az *snz* csendesítés következtében létrejött intracelluláris diafragma fehérje feldúsulás. A kísérlethez funkcionálisan elrontottuk az exocyst komplexet, az egyik alegységének, a Sec5-nek csendesítésén keresztül. Az exocyst egy evolúciósan konzervált, nyolc fehérjéből álló komplex, amely elősegíti a szekréciós vezikulumok és a reciklizáló endoszómák plazmamembránhoz kötődését, hogy létrejöhessen a membrán fúzió (Lipschutz & Mostov, 2002). Az *snz* KD sejtekben egyidejűleg csendesítettük a Sec5 exocyst komplex alegységét, és ennek eredményeképpen eltűntek a sejten belüli Sns és Pyd fehérje felhalmozódások (29. ábra C). Ebből az eredményből arra következtetünk, hogy az exocitózis sebességének csökkentése kompenzálja az Snz elvesztésének hatását.



29. ábra: A Sec5 exocyst komplex tag csendesítésének hatása az *snz* KD nefrociták diafragmájára

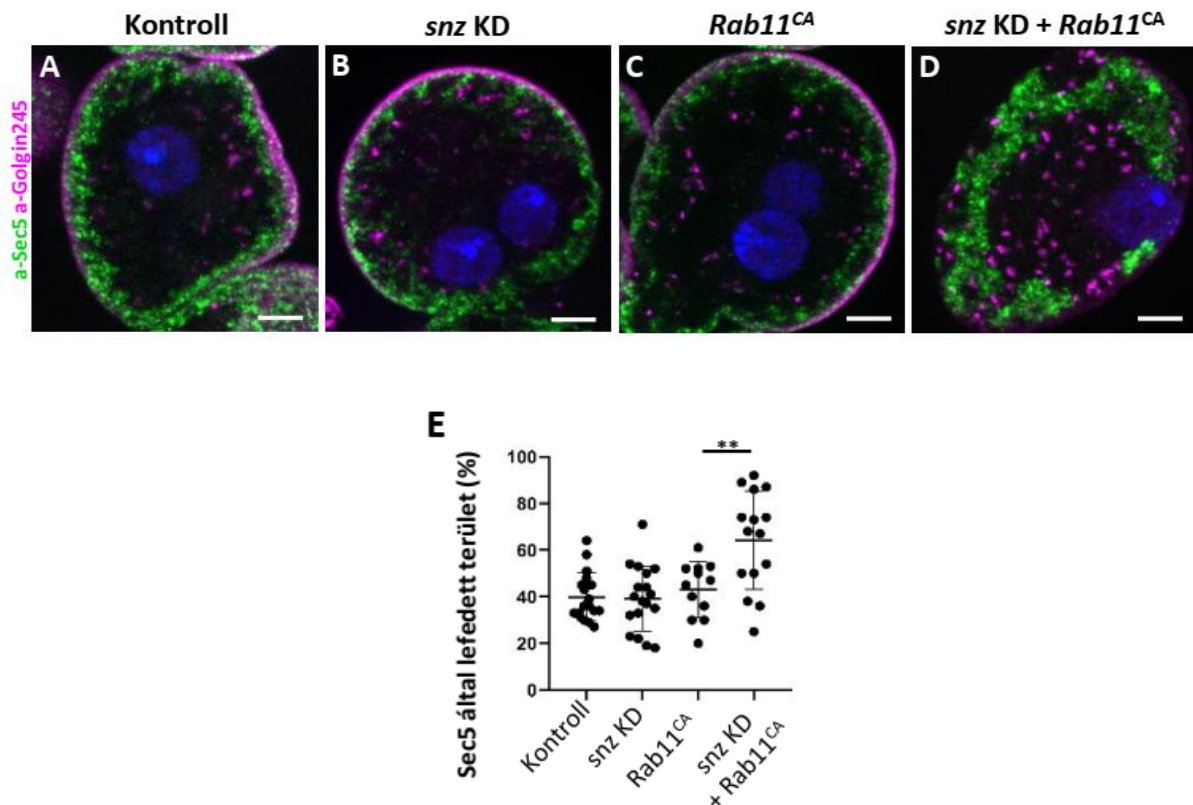
A kontroll (A) esetben az Sns (zöld) és Pyd (piros) diafragma fehérjék a sejt perifériáját jelölik ki, ezzel szemben az *snz* KD sejtek (B) citoplazmájában Pyd- és Sns-pozitív struktúrák figyelhetők meg. Az *snz* KD fenotípust menekíti az exocyst komplex elrontása, hiszen az *snz* KD és Sec5 KD együttes expressziója (C) visszaállítja a kontrollnál látott fenotípust. A skála a képeken 10 μ m-t jelöl.

4.5.2 Az exocitózis fokozódása megváltoztatja az exocyst komplex és a TGN sejten belüli elhelyezkedését

Az eddigi kísérleteink alapján azt feltételezzük, hogy az Snz hiányában tapasztalt membránbetüremkedések létrejötte a megnövekedett exocitózis következménye. Ezért a következő kísérlet során az exocitózis folyamatában jelentős struktúrákat, mint az exocyst komplex és a Golgi-apparátus transz oldala tettük láthatóvá, hogy megfigyelhessük milyen

hatással van rá az *Snz* és a *Rab11* fehérje megváltozott expressziója. Előbbit a *Sec5* exocyst komplex alegység, utóbbit *Golgin245* ellenanyag segítségével jelöltük. A *Golgin245* a Golgi-apparátus transz oldalának megfestésére alkalmas, ahonnan az ER-ben szintetizált, a Golgiban módosított fehérjék szekretálódnak, és vezikuláris transzporttal a plazmamembránba jutnak.

A kontroll sejtekben a *Golgin245* jel főként a nefrociták perifériáját jelöli ki, illetve a sejt mélyebb régióiban kis foltoszerű struktúrákat alkot. (30. ábra, A). A *Sec5* jel a két *Golgin245* pozitív régió között a legsűrűbb, de gyakran látható a perifériás *Golgin245* jellel átfedésben is. Ugyan, az *snz KD* esetében látszik, hogy a fluoreszcens jelek elhelyezkedése megváltozott, felfedezhető a *Sec5* jel ritkulása, és perifériás egységekbe rendeződése, melyet lekövet a *Golgin245* jel is, de összességében elmondható, hogy nem látunk nagyléptékű átrendeződést (30. ábra, B), hasonlóan a *Rab11^{CA}*-t expresszáló sejtekhez (30. ábra, C). Csupán a két genotípus kombinációja mutatja meg az egy irányba mutató szabályozás hiányának mértékét, mely a két jel elrendeződésének teljes felborulásához vezet (30. ábra, D). A *Sec5*-pozitív terület jelentősen megnövekedett a többi genotípushoz képest (30. ábra, E). Ez jelezheti a szekréción vezikulumok megnövekedett számát, amelyek a megnyúlt lakúnahálózat által létrejött mély membránbetűródések mentén oszlanak el. Érdekes módon a *Golgin245*-pozitív struktúrák eloszlása is megváltozik ezekben a sejtekben. A perifériás *Golgin245* jel a legtöbb sejtben csökkent vagy teljesen hiányzik, míg a mélyebb régiókban a foltok száma jelentősen megnőtt a kontrollhoz képest. Ezeket az eredményeket a TGN kiterjesztéseként és átszervezéseként értelmezzük a *Rab11^{CA}*-t is kifejező *snz KD* nefrocitákban. Ez az *snz* csendesítés és a *Rab11* túlműködés szinergikus hatását jelzi a nefrociták szekréción rendszerében.

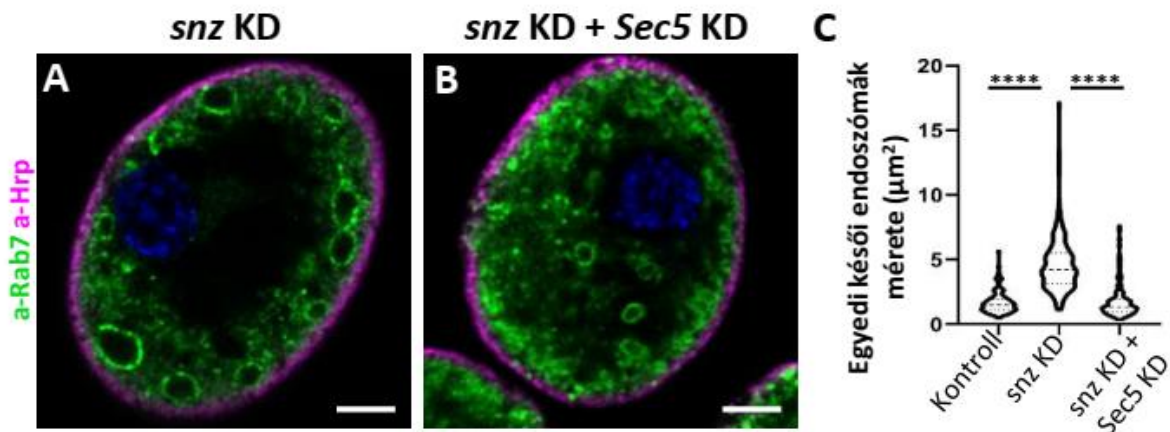


30. ábra: Az exocyst komplex és a TGN láthatóvá tétele

Egyidejűleg immunfestettük a Sec5 (zöld) exocyst komplex alegység és Golgin245 (magenta) TGN markereket. Az snz KD nefrocitákban (B) és a Rab11^{CA} (C) esetében alig fedezhető fel változás a két jel sejten belüli pozíciójában a kontrollhoz (A) viszonyítva, viszont az snz KD + Rab11^{CA} együttes expressziója (D) esetében teljesen átalakult a két jel sejten belüli elhelyezkedése, mely vélhetően a két transzgen kifejeződésének összeadó hatására utal. A grafikon a Sec5 jel által lefedett területet mutatja az egyes genotípusokban. A szignifikáns különbségek *-gal jelölve: * esetén $P < 0,05$, ** esetén $P < 0,01$, *** esetén $P < 0,001$. A skála a képeken 5 μm -t jelöl.

4.5.3 A Sec5 csendesítése menekíti az snz KD legfeltűnőbb fenotípusát, a késői endoszómák méretnövekedését

Mivel az Snz hiányában a legfeltűnőbb, legrobosztusabb fenotípus a késői endoszómák méretnövekedése volt, ezért kíváncsiak voltunk, hogyan kapcsolható ez a jelenség az exocitózishoz. Ehhez az snz és Sec5 kettős csendesítését végeztük el garland sejtekben. Anti-Rab7-tel jelöltük a késői endoszómákat, így láthatóvá vált, hogy a kettős csendesítés (31. ábra, B) hatására az snz KD-nál (31. ábra, A) tapasztalt megnagyobbodott késői endoszómaméret visszaállt a normális mérettartományba. Tehát bizonyosan szükség van az exocyst komplex megfelelő működésére, hogy létrejöhessenek a megnagyobbodott késői endoszómák az snz KD nefrocitákban.



31. ábra: Az *Snz* excitózishoz kapcsolt vizsgálata *Rab7* festésen keresztül

Immunfestettük a *Hrp* (magenta) plazmamembrán, és *Rab7* (zöld) késői endoszóma markereket. Az *snz* KD (A) nefrocitákban jól láthatóak a nagyméretű késői endoszómák, melyek az *snz* KD + *Sec5* KD (B) együttes expressziója esetén visszaállnak a normális, kontrollhoz hasonló mérettartományba. A grafikon (C) a késői endoszómák egyedi méreteit mutatja a különböző genotípusokban. Az *snz* KD-re jellemző késői endoszóma méret szignifikánsan nagyobb mind a kontroll, mind pedig az *snz* KD + *Sec5* KD nefrocitákhoz viszonyítva. A szignifikáns különbségek *-gal jelölve: * esetén $P < 0,05$, ** esetén $P < 0,01$, *** esetén $P < 0,001$, **** esetén $P < 0,0001$. A skála a képeken $5 \mu\text{m}$ -t jelöl.

4.5.4 Az *Snz* excitózist szabályozó szereppel bír a nyálmirigyben is

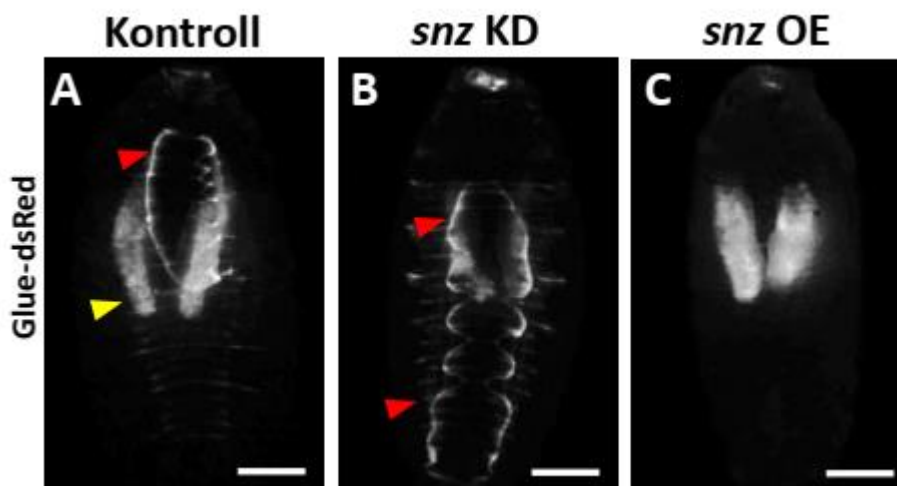
Az *Snz* excitózist szabályozó hatását szeretnénk volna egy eleve aktív szekréciót folytató szövetben is kimutatni. Mivel az excitózist egyik formája a szekréció, ezért a *Drosophila* lárvális nyálmirigyét választottuk az excitózist modellezésére. A lárvális nyálmirigy nagy mennyiségű ragasztóanyagot szekretál a bábképződés során, ezért *in vivo*, a lárvák felboncolása nélkül is könnyen megfigyelhető a szekrécióban bekövetkező változás. Ezen elv alapján *fork head-Gal4* (*fkh-Gal4*) driver által hajtott fluoreszcens DsRed ragasztóanyag riportert expresszáló lárvákat használtunk a kísérleteink során, hogy láthatóvá tegyük a lárva által szekretált ragasztóanyag mennyiségét.

Mikroszkóp alatt figyeltük az azonos korú előbábok glue szekrécióját. A fluoreszcens DsRed riportert expresszáló lárvák nyálmirigyében maradó és a tenyésztő fiola falán látható, már szekretált glue mennyiségét detektáltuk. A kontroll állatok esetében jól látható a felszabadult ragasztóanyag a báb és az üveg felszíne között, illetve a feleslegben termelődött mennyiség a nyálmirigyekben (32. ábra, A).

Az *snz* KD állatok esetében a felszabaduló ragasztóanyag sokkal nagyobb felületet fed le a fiola felszínén, míg a nyálmirigyekben alig detektálható a maradék glue által kibocsátott fluoreszcencia (32. ábra, B). Ez arra utal, hogy *Snz* hiányában a glue szekrécója felfokozódik és igen kevés ragasztóanyag marad a nyálmirigyekben.

Kíváncsiak voltunk, hogy mi történik ellenkező esetben, amikor nagyobb mennyiségű *Snz* expresszálódik a nyálmirigyekben. Az előbáb alatt egyáltalán nem találtunk szekretált ragasztóra utaló nyomokat, míg a nyálmirigyben nagymértékű DsRed intenzitást figyeltünk meg, ebből arra következtetünk, hogy az *Snz* túltermelés következtében a ragasztóanyag képtelen volt felszabadulni a nyálmirigysejtekből (32. ábra, C).

Ezek az eredményeink alátámasztják a nefrocitákban tapasztalt megfigyeléseket, és arra utalnak, hogy hasonló, exocitózist szabályozó szereppel rendelkezik az *Snz* a nyálmirigyekben is.



32. ábra: Az *Snz* hatása a nyálmirigy szekrécións képességére

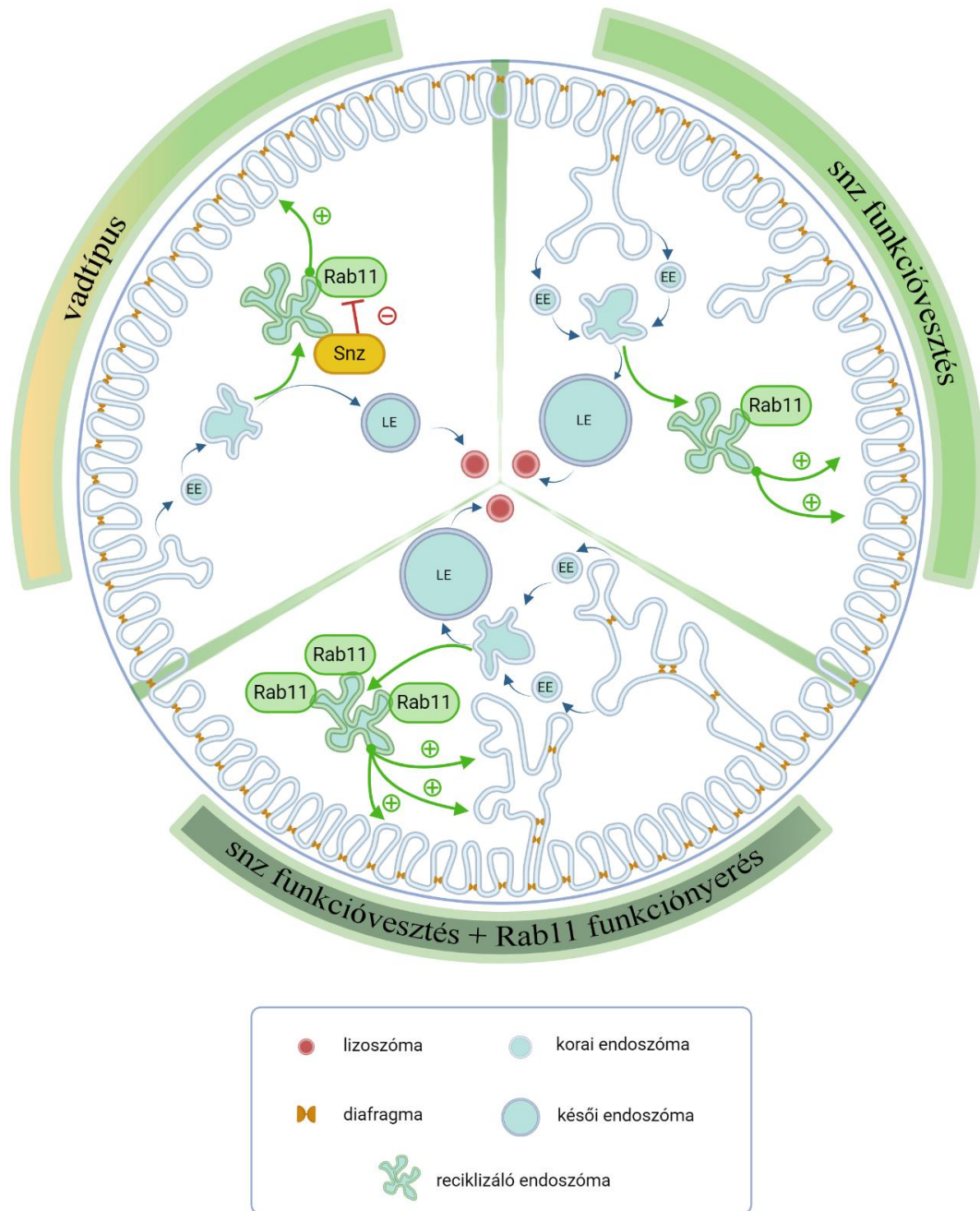
Fluoreszcens DsRed riporter segítségével követtük nyomon a nyálmirigyben maradó és a szekretált glue mennyiségét. A kontroll (A) esetben az intenzív fehér sáv (piros nyílhegy) jelöli a már szekretált ragasztóanyagot, mely a báb és a fiola fala között terül el, szürkével (sárga nyílhegy) pedig a nyálmirigyekben feleslegben maradt glue-t láthatjuk. *snz* KD (B) esetében nagy mennyiségű glue szekretálódott (piros nyílhegy) és legfeljebb elenyésző mennyiség maradhatott a nyálmirigyekben. Az *snz* OE (C) esetében nem látunk szekrécóra utaló nyomot, feltehetőleg a teljes glue mennyiség a nyálmirigyekben maradt. A skála a képeken 1 mm-t jelöl.

5. Eredmények megvitatása

5.1 Az Snz fehérje mint az endocitózis és az exocitózis egyensúlyának szabályozója garland nefrocitákban

A dolgozatomban leírt eredmények alapján elmondható, hogy feltártuk az Snz fehérje egy új funkcióját *Drosophila melanogaster*-ben. Feltételezésünk szerint nefrocitákban az Snz, mint a reciklizációs vezikulumok szabályozója van jelen, és hatását a Rab11 fehérje negatív szabályozásán keresztül fejt ki (33. ábra). Vad típusú nefrocitákban az endoszomális válogatás következményeként a plazmamembrán újrahasonosításra kerülő alkotói, a Rab11 szabályozása alatt álló reciklizáló vezikulumokba kerülnek, majd ismét a plazmamembrán részévé válnak exocitózisuk eredményeképpen. Mindeközben az Snz gyenge gátló hatást fejt ki a Rab11-re, hogy annak aktivitása egyensúlyban legyen a sejt igényeivel. Snz hiányában ez a gátlás megszűnik, és a Rab11 aktivitása elszabadul, ami nagyobb intenzitású reciklizációt eredményez. Az így keletkező membrántöbbletet a sejt úgy próbálja meg eliminálni, hogy növeli az endocitózis mértékét, hogy fenntarthassa a garland sejtek megfelelő működéséhez nélkülözhetetlen lakúnarendszer struktúráját. Ezt a folyamatot kompenzációs endocitózisnak nevezzük. Az endocitózis fokozódásával megnő a degradációs útvonal felé terelődő anyagok mennyisége is, azonban ezt a többletet a lizoszomális lebontás nem tudja ilyen mértékben lekövetni. Ez bizonyos fokú anyagfelhalmozódással jár, ami a korai és a késői endoszómák méretnövekedésében nyilvánul meg.

Feltételezésünk egyik legfontosabb alapja az az eredményünk, mely szerint az *snz* funkcióvesztéssel egyidejűleg megnövelt *Rab11* expresszió súlyosabb fenotípust mutat, mint a két hatás külön-külön, és a megnövekedett endoszómák mellett megjelenik a plazmamembránba kerülő membrántöbblet következtében létrejövő megnyúlt, torz lakúnahálózat is.



33. ábra: Az Snz a Rab11 által közvetített reciklizáció negatív szabályozója a *Drosophila* nefrocitákban.

Az egyszerűsített séma a különböző genotípusú garland nefrociták részleteit mutatja, az endoszomális rendszerre fókuszálva. A vad típusú nefrocitákban a lakúnahálózat és a diafragma integritását az endo- és exocitózis egyensúlya tartja fent. snz funkcióvesztés esetén ez az egyensúly felborul, mivel a Rab11 felszabadul a negatív szabályozás alól és ennek következtében fokozódik az exocitózis. A nagymennyiségű membrán felesleget a sejt az endocitózis fokozásával kompenzálja, melynek eredménye a megnövekedett késői endoszóma méret. Az snz funkcióvesztést a Rab11 funkciónyeréssel kombinálva a membrán forgalom egyensúlya felborul, a sejt képtelen kompenzálni a túlzott exocitózist, így a membrántöbblet miatt a lakúnák megnyílnak, magukkal rántva a diafragma fehérjéket is. További részletek a szövegben. EE: korai endoszóma; LE: késői endoszóma. Az ábrát a BioRender.com segítségével készítettem.

5.2 A lebontási útvonal működése nem sérül Snz hiányában, de az endocitózis fokozódik

Az Snz endoszomális rendszerben betöltött funkciójának feltárásához a *Drosophila* garland nefrocitákat használtuk modellként. A garland sejtek előnye, hogy folyamatos, aktív endocitózissal veszik fel a hemolimfából átszűrt anyagokat és bennük az endoszomális érés fázisai egy egyszerű immunfestési eljárással jól elkülöníthető rétegekként jelennek meg (Lőrincz és mtsai., 2016). Ennek a szigorú rendezettségnek a felborulásából következtethetünk az általunk vizsgált fehérje szerepére. Vizsgálataink kezdetén korai endoszóma marker (Rab5) és késői endoszóma marker (Rab7) festéseket végeztünk, amiből azonnal látszott az endoszomális rendszer zavara Snz hiányában.

Elsőként az Snz hiányában tapasztalt robusztus fenotípus, a késői endoszómák szemmel látható méretnövekedése keltette fel a figyelmünket, ezért a kísérletek tervezése során végigvettük a lehetséges okokat, amelyek következtében ilyen mértékű késői endoszóma megnagyobbodás jöhet létre. Az irodalomban nem egyedi fenotípus a késői endoszómák méretnövekedése, gyakori jele az endoszomális szállítás akadályozottságának, mint például a késői endoszóma-lizoszóma fúziót elősegítő HOPS komplex egy alegységének hiánya esetén (Lőrincz és mtsai., 2016) vagy a Rab7 fehérje domináns negatív mutációja következtében (Rink és mtsai., 2005). A garland nefrocitákban a késői endoszómák és a lizoszómák sokszor nehezen elkülöníthetőek, hiszen folyamatosan egymásba alakulnak, így dinamikus hálózatot hoznak létre (Lund és mtsai., 2018). Ezért kísérleteinket úgy terveztük, hogy ne csak egy endoszomális sejtalkotót emeljünk ki a rendszerből, és annak a jelenlétét támasszuk alá, hanem több egymást erősítő, a rendszert bemutató kísérletből alkothassunk konklúziót.

A lebontási útvonal lehetséges hibáinak feltárására elsőként Lysotracker Red festést alkalmaztunk. A Lysotracker Red egy széleskörűen elterjedt lizoszomális festék, ami a sejten belüli savas struktúrákban halmozódik fel, ezáltal fluoreszcensen kijelölve azokat. Ezzel igazoltuk a savas lizoszómák meglétét az *snz* funkcióvesztéses garland sejtekben. Mivel nem tapasztaltunk a kontroll sejtekhez viszonyítva jelcsökkenést, kijelenthetjük, hogy Snz hiányában is jelen vannak savas struktúrák a garland sejtekben.

Annak kimutatására, hogy ezek valóban funkcionáló lizoszómák, a Lamp1-GFP lizoszóma riportert alkalmaztuk. A Lamp1-GFP egy gyengén expresszáló kiméra riportert, melyet a lizoszómák működéséhez elengedhetetlen Lamp1 transzmembrán fehérje és a

fluoreszcens GFP fehérje fúziójával hoztak létre (Lőrincz és mtsai., 2016). Megfelelően működő lizoszómák esetén a GFP jelét a savas környezet kioltja, viszont lizoszomális hiba esetén intenzív fluoreszcencia detektálható. Snz hiányában igen alacsony GFP fluoreszcenciát tudunk csak detektálni, így kijelenthetjük, hogy a garland nefrocitákban Snz hiányában is jelen vannak a funkcionáló lizoszómák.

A rendszer komplexebb vizsgálatának érdekében nyomjelzőanyag felvételi kísérleteket végeztünk többféle kivitelben, a „pulse” és „chase” idők módosításával. „Pulse”-nak nevezzük azt az időintervallumot, amíg a sejtek a nyomjelzővel kiegészített tápoldatban vannak, és folyamatosan vehetik fel a nyomjelző molekulákat. Onnantól, hogy áthelyezzük őket friss M3 médiumba, indul a „chase” periódus, amikor már új nyomjelző felvétele nem történhet, csak a már felvett anyagok közlekedhetnek az endoszomális rendszerben. A hosszabb „chase” idővel kifejezetten a késői endoszóma-lizoszóma kapcsolatok létrejöttét, dinamikáját monitoroztuk, míg a rövidebb „chase” idővel a felvétel kezdeti lépéseit, a korai endoszómákat vizsgáltuk. Ezen kísérleteink növelik eredményeink értékét, hiszen *ex vivo* ugyan, de élő sejteket vizsgáltunk, és ezzel a kísérleti rendszerrel nem csak pillanatképeket készítettünk, hanem valós időben követtük nyomon a sejtek endoszomális rendszerét, illetve *konfokális minőségű* videókkal támasztottuk alá következtetéseinket. (Az eredeti videók megtekinthetők az MBoC oldalán: <https://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.E22-09-0421>, a Maruzs et al., 2023 cikk kiegészítő videói között.

Minden esetben, ahol hosszú „chase” periódust használtunk, azt tapasztaltuk, hogy az *snz* funkcióvesztéses sejtek a kontrollal megfelelően viselkednek, azt leszámítva persze, hogy jóval nagyobb késői endoszómákkal rendelkeznek. Snz hiányában is jelen vannak a kontroll sejteknél látott, a nyomjelzőre pozitív vezikulumokból kitüremkedő nyúlványok, melyek az aktívan emésztő, dinamikus egymásba alakuló terminális lizoszóma hálózat bizonyítékai (Lund és mtsai., 2018). Alkalmaztunk egy olyan kísérleti felállást is, amiben kétféle tracert vetettünk fel a sejtekkel, kifejezetten a lizoszomális proteázok emésztési képességének vizsgálatát célozva. A BSA647 tracert DQ Green nyomjelzőanyaggal is kiegészítettük, mely fluoreszcenciája csak a proteázok általi hasítást követően válik kimutathatóvá. Mivel itt is a kontrollhoz hasonló citoplazmatikus fluoreszcencia intenzitásadatokat kaptunk, így bizonyosak lehetünk benne, hogy Snz hiányában is jelen vannak a proteázok és működőképese is.

Kísérleteink alapján kimondhatjuk, hogy a késői endoszómák megnagyobbodása nem valamely, a degradációs útvonalat érintő hiba következménye. Hiszen Snz hiányában is jelen

vannak a savas lizoszómák a nefrocitákban, rendelkeznek aktívan emésztő proteázokkal, képesek a késői endoszóma-lizoszóma fúzióra, és ezt jól mutatja a dinamikus változó terminális lizoszóma hálózat megléte.

Ezt követően a korai endoszómák vizsgálatának irányába terelődött a figyelmünk. Rövidebb nyomjelző felvételi időt engedélyeztünk a sejteknek és azt tapasztaltuk, hogy a *Rab5* overexpresszióhoz (ami az endocitotikus aktivitás ismert fokozója) (Bucci és mtsai., 1992) hasonlóan, nagyméretű korai endoszómákban jelent meg a tracer az *snz* KD sejtekben. Ebből arra következtettünk, hogy az *snz* funkcióvesztés következtében elsőként tapasztalt fenotípus, a késői endoszómák megnagyobbodása a túlzott endocitózis következménye.

5.3 Garland sejtekben az Snz a Rab11-gyel kolokalizál, míg az ER-PM-LD érintkezési pontoktól független

Kolokalizációs vizsgálatainkkal két fontos megállapítást is tettünk, az egyik az Snz átfedése a Rab11 reciklizáló endoszóma markerrel. Egy tömegspektrometriai analízis találati listája alapján a két fehérje kölcsönhatásának lehetőségét ugyan korábban már Gillingham és munkatársai is felvetették, de általuk nem került megerősítésre az interakció (Gillingham és mtsai., 2014). A Rab GTP-ázok különböző perifériás membránfehérjékhez kapcsolódva szabályozzák az organellumok és vezikulumok sejten belüli mozgását. Ezeknek a specifikus Rab effektor fehérjéknek a feltérképezését célozta meg a Gillingham és munkatársai által végzett kísérletsorozat, mely során a Rab11 GTP-kötött formájával „halászták” ki az Snz fehérjét. Mi *Drosophila* lizátumokat használva, koimmunoprecipitációs vizsgálattal is alátámasztottuk, hogy valóban van kapcsolat a két fehérje között. Ez nagyban támogatja hipotézisünket, mely szerint az Snz a Rab11 fehérjén keresztül fejt ki membránegyensúly fenntartó hatását. Bár a pontos biokémiai mechanizmus még feltárássra vár, feltételezzük, hogy a csökkent Snz-funkció egy olyan, Rab11-hez köthető molekuláris lépés gátlását oldja fel az reciklizációs útvonalon, amely elősegíti a membrán áramlását az reciklizáló endoszómákból a plazmamembrán felé. Amennyiben vad típusú sejtekben az Snz valóban a Rab11 GTP-kötött formájához kapcsolódik, akkor elképzelhető, hogy az Snz a GTP hidrolízis serkentésén keresztül gátolja a Rab11 exocitózist támogató funkcióját. Bár ez csak egy, a háttérben álló lehetséges biokémiai mechanizmusok közül, alapul szolgálhat további kísérleteink tervezéséhez.

A másik fontos megállapításunk az, hogy az Snz nem mutat kolokalizációt a zsírcseppekkel. Ugrankar és munkatársai leírták, hogy a *Drosophila* zsírszövetben az Snz kölcsönhatásba lép a Desat1 zsírsav-deszaturázzal az ER-PM-LD érintkezési pontokon, ezáltal befolyásolva a lipidmetabolizmust (Ugrankar és mtsai., 2019). Továbbá kimutatták, hogy az Snz egyik humán ortológja, az SNX14 elősegíti az ER-lipidcsepp érintkezési pontok létrejöttét és a lipidcseppek érését, ezáltal befolyásolva a lipidanyagcserét humán sejtekben (Datta és mtsai., 2019, 2020). Egy AlphaFold2-alapú előrejelzést használó közelmúltbeli tanulmány arról számolt be, hogy az SNX-TM fehérjék PXA és PXC doménjei kölcsönhatásba lépnek egymással, és hidrofób zsebet képeznek, amelynek feltételezett funkciója a lipidkötés és/vagy lipidtranszfer (Paul és mtsai. 2022). Ezek az eredmények az SNX-TM fehérjék konzervált szerepét jelzik a lipidmetabolizmusban és a lipidtranszferben a membrán érintkezési pontokon keresztül.

A zsírsejtekben az ilyen kontaktusok jelenléte rendkívül előnyös, mivel a zsírsavak gyors mobilizációja révén hatékony választ tesznek lehetővé a megváltozott táplálkozási feltételekre. Bár a nefrociták is tartalmaznak lipidcseppeket, ezek a sejtek nem specializálódtak a lipidek tárolására és mobilizálására, ezért nem meglepő a zsírsejtekben leírt ER-PM-LD érintkezési pontok hiánya. Oil Red O festéseinkből egyértelműen kitűnik, hogy a garland nefrocitákban az Snz nincs átfedésben a lipidcseppekkel. Bemutattuk, hogy a lipidcseppek elsősorban a nefrociták belső régióiban helyezkednek el, míg az Snz-GFP a Rab11-pozitív reciklizáló endoszómákra lokalizálódik a sejtek periferiáján. A nefrocitákban a plazmamembrán betűródései által a lakúnak bonyolult hálózata alakul ki, amely dinamikus membránforgalmat bonyolít le, ezért természetesen lehetséges, hogy itt is jelen vannak az olyan membrán érintkezési pontok, amelyek lehetővé teszik a nem-vezikuláris membrántranszportot. Noha a nefrocitákban a dMAPPER-Cherry, az ER-PM érintkezési pontok riportere nem mutatott intenzív kolokalizációt az Snz-vel (a zsírtestsejtekkel ellentétben), eredményeink alapján nem zárhatjuk ki az ilyen érintkezési pontok létezését, hiszen az ER perifériás része jelen van közvetlenül a plazmamembrán alatti régióban látható ciszternák formájában. Sőt, ritkán részleges átfedés is tapasztalható az Snz-GFP és a dMAPPER-Cherry jelek között. E megfigyelés alapján elképzelhető egy olyan hipotézis is, amelyben az Snz az ER-PM érintkezési pontok részeként működik a nefrocitákban, miközben harmadik organelleként a lipidcseppek helyett a reciklizáló endoszómákat horgonyozza ki. Az Snz hiányában tapasztalt nagymértékű reciklizáló endoszóma pozíció-átrendeződés tükrözheti az Snz szerepét az ilyen érintkezési pontok stabilizálásában és a reciklizáló endoszómák plazmamembrán

betűrődésekhez való rögzítésében. Azonban ezzel a feltételezéssel ellentétben áll az anti-Hrp plazmamembrán és az anti-Cnx99A ER markerekkel kapott kolokalizációs eredményünk, melyek esetében nem, vagy csak nagyon ritkán látunk átfedést. Ugyan az anti-Hrp egy széles körben elfogadott nefrocita plazmamembrán marker (Atienza-Manuel és mtsai. 2021; Paschinger és mtsai. 2009), mi mégis úgy gondoljuk, hogy a lakúnak mélyebb régióit nem jelöli az ellenanyag. Így a jövőben érdemes lesz majd egy finomabb felbontású kísérletekhez is alkalmazható plazmamembrán marker alkalmazása, hogy biztosabban állíthassunk az Snz és az ER-PM érintkezési pontok kapcsolatáról.

Ugyan az általunk használt módszerekkel nem sikerült kimutatnunk, hogy az Snz-nek szerepe volna a membrán érintkezési pontokon keresztül történő direkt lipidmetabolizmusban (ahogyan azt több SNX-TM fehérje esetében is leírták), úgy gondoljuk, hogy indirekt módon, a Rab11 közvetítette vezikuláris lipidtranszferen keresztül mégis befolyásolja a tágabb értelemben vett lipidanyagcserét.

5.4 Az Snz szerepet játszik a nefrocita diafragma egységes szerkezetének fenntartásában a Rab11 szabályozásán keresztül

A lakúnarendszer viszonylag egyszerű láthatóvá tétele egy újabb előnye a garland nefrocitáknak a reciklizáció vizsgálata során, és a módszer nagy segítséget nyújtott a Rab11 és az Snz között fennálló kapcsolat funkcionális hátterének értelmezésében. A garland sejtek plazmamembrán komponensei és a diafragma fehérjék a folyamatos endo- és exocitózis révén állandó körforgásban vannak a sejt kiválasztó funkciójának betöltése érdekében. Vizsgálatainkhoz immunhisztokémiai eljárással jelöltük a lakúnak bejáratánál ülő Sns és Pvd diafragma fehérjéket, ezáltal láthatóvá téve a nefrocita diafragmát. A csatornák mélységét diffúzió alapuló feltöltést (CDA) követően tettük konfokális mikroszkóppal megfigyelhetővé, illetve elektronmikroszkóppal is megvizsgáltuk, csersavas impregnálás után.

Eredményeink azt mutatták, hogy az Snz csendesítése következtében felborul a diafragma fehérjék szigorú rendezettsége. Ektopikus, azaz nem élettani helyükön előforduló diafragma fehérjék jelennek meg a sejt középsíkjában, a sejt belseje felé mélyen benyúló lakúnak formálódása miatt. Az ektopikus diafragmák kialakulásáról a közelmúltban már beszámolt a szakirodalom (Atienza-Manuel és mtsai. 2021; Kampf és mtsai. 2019), és a Rab11-túltermelés következtében fokozódó exocitózis eredményeként értelmezték.

Kísérleteink során a *Rab11* funkciónyerékes formájának expressziója az *Snz* funkcióvesztéshez nagyon hasonló fenotípust eredményezett. Ebből arra következtetünk, hogy a két fehérje ellentétes módon szabályozza az exocitózist. A köztük kimutatott interakció pedig tovább erősíti ezt a feltételezést, mégpedig úgy, hogy vélhetőleg az exocitózis szabályozása a két fehérje egymásra hatásán keresztül valósul meg.

Az *Snz* és *Rab11* kapcsolatának pontosabb megértése céljából kombináltuk az *snz* csendesítést a *Rab11^{CA}* expresszióval, így a lakúnahálózat és a diafragma fehérjék szerkezetének az eddigieknél drasztikusabb átrendeződését tapasztaltuk. A nefrociták kortikális nézetéből ismert, diafragma fehérjék alkotta sűrű, ujjenyomatszerű hálózat szakadozottá vált; bizonyos pontokban besűrűsödött, a sejt más területeiről pedig mintha teljesen eltűnt volna. Mindeközben a sejtek mediális síkjában megjelentek az akár egész sejtet átívelő ektopikus diafragma régiók és az azokkal megfeleltethető, a sejt mélyébe hosszan benyúló lakúnák.

Hipotézisünket erősíti, hogy a *Rab11^{CA}*-t expresszáló sejtekben az intracelluláris *Sns* és *Pyd* felhalmozódás menekíthető az *snz* egyidejű overexpressziójával.

A *Rab11* kis GTPáz a sejt felszín fehérjeösszetételének fő szabályozója számos sejt típusban, mivel a plazmamembrán felé irányuló vezikuláris transzportútvonalak metszéspontjában hat (Welz et al., 2014). Ennek megfelelően a *Rab11* jelen van a reciklizáló endoszómákon, a Golgi-ból származó vezikulumokon és a transz-Golgi hálózatban is. Az aktivátor GEF és a deaktivátor GAP partnerek által szabályozott *Rab11* kölcsönhatásba lép számos effektor fehérjével, beleértve a különböző motorfehérje komplexeket és az ún. exocyst komplexet is (Welz et al., 2014). Ezen kölcsönhatások révén a *Rab11* számos alapvető sejt folyamatban vesz részt, mint például a receptorok és az adhézis fehérjék újrahasonosításában, a citokinézisben, vagy oogenezisben. A *Drosophila* *Rab11*-et széles körben vizsgálják, és funkcióját különböző szövetekben eltérő módszerekkel, de azonos irányba mutatóan, az exocitózishoz köthető folyamatokban írták le: nyálmirigyben a ragasztó granulumokéréséhez szükséges (Neuman és mtsai. 2021), a fotoreceptor sejtekben a rodopszin újrahasonosításáért felelős (Satoh és mtsai. 2005), valamint leírták már nefrocitákban is, mint a diafragma fehérjék rendezettségének szabályozója (Wen és mtsai. 2020).

5.5 Az Snz mint az exocitózis gátlója

Elméletben egy mérleget elképzelve könnyen összekapcsolható a kezdeti kísérleteink során tapasztalt robusztus késői endoszóma méretnövekedési fenotípus, melyet az endocitózis fokozásaként értelmeztünk, és a Rab11 aktiváció elszabadulásával létrejövő exocitózis fokozódás, hiszen az egyensúly érdekében, ha a mérleg egyik oldalán növeljük a mennyiséget, akkor a másikon is növelnünk kell, hogy ne billenjen ki. De hogyan mutatható ki ez sejtszinten?

Ehhez a *Sec5* exocyst komplex tagot csendesítettük az *snz* csendesítéssel egyidejűleg. A *Sec5* szükséges a komplex megfelelő működéséhez, a szekréciós vezikulumok és a reciklizáló endoszómák plazmamembránhoz kötődéséhez és a membránfúzió létrejöttéhez. A kettős csendesítés eredményeként helyreállt a késői endoszómák mérete a nefrocitákban. Mivel a *Sec5* csendesítése következtében csökkent az exocitózis, ezáltal Snz hiányában sem volt szükség oly mértékű kompenzációs endocitózissra, ami túlterhelné a lebontási útvonalat. Tehát bizonyosan szükség van az exocitózis normál működésére, hogy létrejöhessenek a megnagyobbodott késői endoszómák az *snz*-csendesített nefrocitákban.

Hipotézisünket a nagymértékű szekréciót folytató nyálmirigyek vizsgálata során kapott eredmények is alátámasztják, hiszen Snz hiányában a nyálmirigyekből a teljes ragasztóanyag felszabadult, ami megfeleltethető az exocitózis növekedésével, míg az Snz túltermelése következtében oly mértékű volt az exocitózis gátlása, hogy a teljes ragasztóanyag mennyiség a nyálmirigyekben maradt. Nyálmirigyben folytatott kísérleteink eredménye felveti annak a lehetőségét, hogy az Snz más, aktív szekréciót folytató szövetekben (mint például a bél) is jelentős szabályozó funkciót lát el. Mivel az SNX-TM fehérjék exocitózishoz kapcsolt szerepét eddig még nem vizsgálták, ezért érdemes volna kiterjeszteni a kérdést többféle szövettípusra, illetve más modellszervezetekre is.

5.6 Kitekintés, orvosbiológiai vonatkozások

Az SNX fehérjék szerepét a Rab11 által közvetített reciklizációban korábban nem írták le, bár számos SNX szerepe a különböző vezikuláris transzportfolyamatokban jól ismert. A PI(3)P-kötő PX domén jelenléte például eleve előrevetíti a SNX fehérjék korai endoszóma kapcsolt válogatási szerepét. Továbbá az SNX fehérjék a különböző szortírozó komplexek, például a retromer, a retriever és a recycler részeként hozzájárulnak számos transzmembrán fehérje újrahasonosításához a korai endoszómákból vagy késői endoszómákból az

endoszomális rendszer különböző állomásai felé (Chen, Healy, és Collins 2019; Zhou és mtsai. 2022). Érdekes módon mind az Snz, mind pedig a humán SNX25 nem kanonikus PX-domént tartalmaz, és a foszfolipidkötő felületükben bekövetkezett változások a kötőpartnereik spektrumát kiszélesítik a di- vagy trifoszforilált foszfatidilinozitol-foszfátok felé. Nem meglepő tehát, hogy az Snz nem kanonikus PX doménjén keresztül kölcsönhatásba lép a zsírsejtek plazmamembránjával, ahol a legnagyobb mennyiségben előforduló foszfatidilinozitol-foszfát a PI(4,5)P₂.

Amint azt a közelmúltban kimutatták, a Snz kettős szerepet tölt be a *Drosophila* zsírsejtekben, mivel részt vesz a lipidanyagcserében és az autofágiában is (Lauzier és mtsai. 2022; Ugrankar és mtsai. 2019), ami történhet a PI(3)P-hez való kötődésén keresztül is, amely jellemzően a kialakuló és érett autofagoszómákban is megtalálható. Így a *Drosophila* zsírsejtekben már ismert az Snz szerepe a vezikuláris és nem-vezikuláris lipidanyagcserében ugyanazon szöveten belül.

Az SNX-TM fehérjék másik érdekes tulajdonsága az RGS domén jelenléte, amiből adódik a feltételezés, hogy az Snz ezen a doménon keresztül közvetlenül szabályozhatja a Rab11-et a nefrocitákban. Ez a domén köztudottan GAP-ként működik a trimer G fehérje α -alegységein (Amatya és mtsai. 2021). Jövőbeli terveink közé tartozik kísérletesen ellenőrizni, hogy az Snz/SNX25 RGS doménje képes-e kötődni a Rab11-hez, és így közvetlenül inaktiválni ezt a kis GTPáz.

Bár az SNX25, az Snz humán ortológjának fiziológiai funkciója jelenleg még ismeretlen, már vannak tanulmányok a vezikuláris transzportban betöltött szerepéről. Azt találták, hogy az SNX25 képes kölcsönhatásba lépni a TGF- β receptorokkal, és fokozza a receptor lebomlását a klathrin-függő endocitózist követő lebontási útvonalon (Hao és mtsai. 2011). A humán SNX25 részt vesz az autofág fluxus szabályozásában is a VAMP8 endoszomális rendszerben történő szállításának szabályozásán keresztül (Lauzier és mtsai. 2022). A legújabb vizsgálatokban az SNX25-öt olyan betegségekkel hozták összefüggésbe, mint a temporális lebeny epilepszia (Du és mtsai. 2013), a vastagbélrák (Feng és mtsai. 2022), a pikkelysömör (Vecellio és mtsai. 2021) és a krónikus vesebetegség (Kim, Jin, és Eom 2021). Az utóbbi esetben az SNX25 mutáció a glomeruláris filtrációs ráta csökkenésével jár. Bár kísérleteik során az SNX25 mutációk humán podocita funkcióra gyakorolt hatását nem vizsgálták, tekintettel az Snz szerepére a *Drosophila* nefrocitákban, az SNX25 érintettsége a krónikus vesebetegségben különösen érdekes kérdés.

6. Összefoglalás

Az eukarióta sejtek figyelemre méltóan összetett endoszomális rendszerrel rendelkeznek, melyet számos fehérje szabályoz. Az egyik ilyen szabályozásért felelős fehérjecsalád a Sorting nexinek (SNX). A család közös jellemzője, hogy rendelkeznek egy konzervált PX (phox-homology) doménnel, amely megköti a foszfatidilinozitol-foszfátokat. Az SNX fehérjecsaládnak közel 50 tagja ismert emberben, míg *Drosophilában* mindössze tíz. Az SNX fehérjéket különböző alosztályokba csoportosítjuk az őket alkotó specifikus domének alapján, melyek molekuláris funkciójukat is meghatározzák. Az SNX-TM fehérjék alcsoportja egyedi doménszerkezettel rendelkezik, amely két N-terminális transzmembrán régióból és az ezeket követő PXA-RGS-PX-PXC doménekből áll. Az SNX-TM fehérjék hibáit különböző emberi megbetegedésekkel hozták kapcsolatba. Az alaposan vizsgált SNX14 fehérjét kódoló génben történő mutáció következménye például a cerebelláris ataxia szindrómák egyik típusának kialakulása. *Drosophilában* csak egyetlen Snx-TM fehérjét ismerünk, a Snzarust (Snz), mely legközelebbi humán megfelelője az SNX25. Az SNX25-öt az autofág fluxus szabályozójaként írták le humán sejtekben, továbbá kapcsolatba hozták a temporális lebeny epilepszia kialakulásával. *Drosophilában* az Snz molekuláris funkcióját mindeddig csak lárvális zsírtestsejtekben írták le. Eszerint az Snz részt vesz olyan membrán érintkezési pontok létrehozásában a plazmamembrán, az endoplazmatikus retikulum és a lipidcseppek között, amelyek lehetővé teszik a lipidek nem-vezikuláris transzportját, ezáltal befolyásolva a lipidmetabolizmust. Egy másik tanulmány, az SNX25 fehérjéhez hasonlóan, mint az autofág fluxus szabályozója azonosította az Snz-t zsírsejtekben.

Kutatásaink során célul tűztük ki a Snz endoszomális rendszerben betöltött szerepének megértését. Ehhez a *Drosophila* lárvális garland nefrocitákat alkalmaztuk modellként. Ezek a sejtek szerkezetileg és funkcionálisan nagyban hasonlítanak az emberi vese podocitáihoz, ezáltal alkalmasak lehetnek az emberi nefropátiák molekuláris hátterének megértéséhez. A nefrociták feladata a hemolimfa megtisztítása, összetételének szabályozása, ennek következtében folyamatosan aktív endo- és exocitózist folytatnak, és rendkívül szervezett endoszomális rendszerrel rendelkeznek. Az endoszomális érésben részt vevő fehérjék könnyen azonosíthatóak, hiszen hibájuk, vagy célzott kiütésük azonnal a szigorú rendezettség felborulásához vezet.

Immunfestézés kísérleteket végeztünk két egymástól független *prosGal4* hajtotta *snz* RNSi konstrukción és egy nullmutáns törzsön. Az *snz* funkcióvesztése a korai és késői endoszómák méretnövekedéséhez és eloszlásának megváltozásához vezetett. Ez a fenotípus azt sejtette, hogy *Snz* hiányában akadályozottá válik a lebontási útvonal. Ennek vizsgálatához a lizoszomális kompartmentumot célzó immunfestéseket és nyomjelző felvételi vizsgálatokat végeztünk. A kapott eredményekből kiderült, hogy a lizoszomális lebomlás normálisan megy végbe az *snz* funkcióvesztéses nefrocitákban, ellenben fokozódik az endocitózis, ami az endoszomális rendszer túlterhelődését eredményezi.

Ezt követően kolokalizációs kísérletekkel kimutattuk, hogy a garland nefrocitákban az *Snz* az ER-PM-LD érintkezési pontoktól független lokalizációt mutat, viszont határozottan átfed a Rab11-pozitív reciklizáló endoszómákkal. A két fehérje kölcsönhatását koimmunoprecipitációval is megerősítettük. A Rab11 közvetítette exocitózist a garland sejtek egy másik előnyös tulajdonságán keresztül vizsgáltuk. A nefrociták rendelkeznek egy szűrőgáttal, a nefrocita diafragmával, melynek fehérje komponensei folyamatosan cserélődnek az endo- és exocitózis segítségével. *Snz* hiányában azt tapasztaltuk, hogy a diafragma fehérjék rendezettsége felborul, megjelennek a sejt mélyebb régióiban az őket tartalmazó lakúnák megnyúlásának következtében. Hasonló fenotípust eredményezett a Rab11 túltermelése is, illetve a két genotípus kombinációja a fenotípus feltűnő fokozódását eredményezte. Kísérleteink során a *Rab11* funkcionyeréses formájának expressziója az *Snz* funkcióvesztéshez nagyon hasonló fenotípust eredményezett. Ebből arra következtetünk, hogy a két fehérje ellentétes módon hat.

A membránbetüremkedések kialakulása a nefrocitákban az endocitózis és az exocitózis közötti egyensúlyhiány eredménye. A hibás endocitózis vagy fokozott exocitózis ezeknek a mély betűrődéseknek a megjelenését eredményezi. Mivel ismert, hogy a Rab11 fokozott expressziója túlzott exocitózishoz vezet, úgy gondoljuk, hogy esetünkben az *Snz* hiánya tovább fokozza a Rab11 aktivitás megemelkedése következtében már amúgy is megnövekedett exocitózist. Így feltételezzük, hogy vad típusú sejtekben az *Snz* a Rab11 korlátozásán keresztül szabályozza az exocitózist. Az endocitotikus fenotípusok valószínűleg a kompenzációs endocitózisból származnak, amely feladata a membránfelesleg eltávolítása.

Az *Snz* exocitózist gátló hatásának alátámasztására a *Drosophila* lárvák nyálmirigjét vizsgáltuk, mely aktív exocitózist folytat. A lárvák a metamorfózis kezdetén nagy mennyiségű

ragasztóanyagot szabadítanak fel a nyálmirigyükből, hogy szilárd felszínhez rögzíthessék magukat, mely a bábképződés és a teljes átalakulás feltétele. Snz hiányában szinte a ragasztóanyag teljes mennyisége kiürült, míg a Snz túltermeltetése esetén, az exocitózis gátlásának következtében nem volt látható glue felszabadulás. Ez a kísérlet fontos része volt hipotézisünk megerősítésének és egy másik sejttípusban is bemutatta az Snz kulcsfontosságú szerepét.

Eredményeink szerint tehát az Snz felelős az endo- és exocitózis egyensúlyának fenntartásáért garland nefrocitákban. Ezzel összefüggésben szabályozza a membránegyensúlyt, illetve kritikus fontosságú a lakúnarendszer megfelelő mélységének kialakításához és a diafragma fehérjék helyes elrendeződéséhez. Mindezt a Rab11 fehérje aktivitásának ellensúlyozásán keresztül éri el. Eredményeink az Snz egy korábban ismeretlen funkcióját mutatják be garland nefrocitákban és újdonságot jelentenek az SNX-TM fehérjekutatás területén is.

7. Summary

Eukaryotic cells possess a complex endosomal system whose proper functioning is regulated by a number of proteins. One group of these important regulatory proteins belong to the Sorting nexin (SNX) family. SNX proteins contain a conserved PX (phox-homology) domain that binds phosphatidylinositol phosphates. Nearly 50 members of the SNX protein family are known in humans, while there are only 10 in *Drosophila*. SNX proteins are grouped into different subclasses based on their specific domains, which also determine their molecular function. The subgroup of SNX-TM proteins has a unique domain structure consisting of two N-terminal transmembrane regions and the following PXA-RGS-PX-PXC domains. Loss of Snx-TM protein functions have been linked to various human diseases. For example, the consequence of a mutation in the gene encoding the intensively studied SNX14 protein is the development of one type of cerebellar ataxia syndromes. In *Drosophila*, only one Snx-TM protein is known, Snazarus (Snz), whose closest human counterpart is SNX25. SNX25 has been described as a regulator of autophagic flux in human cells and has been linked to the development of temporal lobe epilepsy. In *Drosophila*, the molecular function of Snz has only been described in larval fat body cells so far. According to this, Snz is involved in the formation of membrane contact sites between the plasma membrane, the endoplasmic reticulum and lipid droplets. These contact sites allow non-vesicular transport of lipids, thereby influencing lipid metabolism. Another study also in fat body cells identified Snz as a regulator of autophagic flux, similar to the SNX25 protein.

During our research, we aimed to understand the role of Snz in the endosomal system. For this, we used *Drosophila* larval garland nephrocytes as a model. These cells are structurally and functionally very similar to human podocytes, which makes them remarkable model cells to understand the molecular background of human nephropathies. Nephrocytes are important in the filtration of the *Drosophila* hemolymph and in the regulation of its composition. As a result, they continuously engage in active endocytosis and have a highly organized endosomal system. The proteins involved in endosomal maturation are easy to identify in this model, since their dysfunction by targeted knockout immediately leads to disturbances in their strictly organized endosomal network.

We performed immunostaining experiments with two independent Snz RNAi lines and also with a nullmutant strain. Loss of Snz led to increased size and altered distribution of early

and late endosomes. This phenotype raised the possibility that the degradation pathway becomes obstructed in the absence of Snz. To investigate this, we performed several immunostainings and tracer uptake studies targeting the lysosomal compartment. The obtained results revealed that lysosomal degradation proceeds normally in nephrocytes with Snz loss-of-function, but the rate of endocytosis increases, resulting in an overload of the endosomal system.

After that, we demonstrated with colocalization experiments that Snz shows a localization independent of the ER-PM-LD contact sites in garland nephrocytes, but definitely overlaps with Rab11-positive recycling endosomes. The interaction of the two proteins was also confirmed by co-immunoprecipitation. Rab11-mediated exocytosis was investigated through another advantageous property of garland cells. Nephrocytes have a charge- and size-selective barrier for the filtration, the so-called nephrocyte diaphragm. It has protein components, which are constantly turned over with the help of endocytosis and exocytosis. In the absence of Snz, we found that the order of the diaphragm proteins is disturbed; they appear in the deeper regions of the cell as a result of the elongation of the lacunae containing them. The overexpression of Rab11 resulted in a similar phenotype, and the combination of the two genotypes resulted in a striking enhancement of the phenotype. During our experiments, the expression of the gain-of-function form of Rab11 resulted in a phenotype very similar to the effects of Snz loss. From this, we conclude that the two proteins act in opposite ways in the regulation of exocytosis.

The formation of membrane ingressions in nephrocytes is the result of an imbalance between endocytosis and exocytosis. Defective endocytosis or increased exocytosis result in the appearance of these deep ingressions. As it is known that increased expression of Rab11 leads to excessive exocytosis, we believe that the loss of Snz further enhances the already increased exocytosis rate due to the increase in Rab11 activity. Thus, in wild-type cells, Snz regulates exocytosis through the restriction of Rab11. The endocytotic phenotypes likely result from compensatory endocytosis, which is responsible for the removal of excess membrane from the cell surface.

We used *Drosophila* larval salivary glands as a tissue displaying active regulated exocytosis to support our model concerning the exocytosis-inhibiting effect of Snz. At the beginning of metamorphosis, the larvae release a large amount of adhesive material (glue) from their salivary glands in order to attach themselves to a solid surface, which is necessary for puparium formation and the following metamorphosis. In the absence of Snz, almost the entire

amount of glue was released, while in the case of overexpression of Snz, we experienced inhibition to such an extent that no glue release could be detected. This observation is an important confirmation of our hypothesis and demonstrates the key role of Snz during exocytosis in another cell type.

According to our hypothesis, Snz is responsible for maintaining the balance of endocytosis and exocytosis in garland nephrocytes. In this context, Snz regulates membrane balance and is critical for the formation of the appropriate depth of the lacunar system as well as for the correct arrangement of diaphragm proteins. Snz achieves all of this by counteracting the activity of the Rab11 protein. Our results demonstrate a previously unknown function of Snz in garland nephrocytes and represent a novelty in the field of Snx-TM protein research.

Irodalomjegyzék

- Akizu, N., Cantagrel, V., Zaki, M. S., Al-Gazali, L., Wang, X., Rosti, R. O., Dikoglu, E., Gelot, A. B., Rosti, B., Vaux, K. K., Scott, E. M., Silhavy, J. L., Schroth, J., Copeland, B., Schaffer, A. E., Gordts, P. L. S. M., Esko, J. D., Buschman, M. D., Field, S. J., ... Gleeson, J. G. (2015). Biallelic mutations in SNX14 cause a syndromic form of cerebellar atrophy and lysosome-autophagosome dysfunction. *Nature genetics*, 47(5), 528–534. <https://doi.org/10.1038/NG.3256>
- Amatya, B., Lee, H., Asico, L. D., Konkalmatt, P., Armando, I., Felder, R. A., & Jose, P. A. (2021). SNX-PXA-RGS-PXC Subfamily of SNXs in the Regulation of Receptor-Mediated Signaling and Membrane Trafficking. *International journal of molecular sciences*, 22(5), 1–17. <https://doi.org/10.3390/IJMS22052319>
- Arrese, E. L., & Soulages, J. L. (2010). Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. In *Annual Review of Entomology* (Köt. 55, o. 207–225). <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085356>
- Atienza-Manuel, A., Castillo-Mancho, V., de Renzis, S., Culi, J., & Ruiz-Gómez, M. (2021). Endocytosis mediated by an atypical CUBAM complex modulates slit diaphragm dynamics in nephrocytes. *Development (Cambridge)*, 148(22). <https://doi.org/10.1242/dev.199894>
- Bechtel, W., Helmstädter, M., Balica, J., Hartleben, B., Kiefer, B., Hrnjic, F., Schell, C., Kretz, O., Liu, S., Geist, F., Kerjaschki, D., Walz, G., & Huber, T. B. (2013). Vps34 deficiency reveals the importance of endocytosis for podocyte homeostasis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24(5), 727–743. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012070700/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Bierzynska, A., Soderquest, K., Dean, P., Colby, E., Rollason, R., Jones, C., Inward, C. D., McCarthy, H. J., Simpson, M. A., Lord, G. M., Williams, M., Welsh, G. I., Koziell, A. B., & Saleem, M. A. (2017). MAGI2 mutations cause congenital nephrotic syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology*, 28(5), 1614–1621. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016040387>
- Bonifacino, J. S., & Hurley, J. H. (2008). Retromer. In *Current Opinion in Cell Biology* (Köt. 20, Szám 4, o. 427–436). <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.03.009>
- Bucci, C., Parton, R. G., Mather, I. H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B., & Zerial, M. (1992). The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell*, 70(5), 715–728. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90306-W](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90306-W)
- Burrinha, T., Martinsson, I., Gomes, R., Terrasso, A. P., Gouras, G. K., & Almeida, C. G. (2021). Upregulation of APP endocytosis by neuronal aging drives amyloid-dependent synapse loss. *Journal of Cell Science*, 134(9). <https://doi.org/10.1242/jcs.255752>
- Chandra, M., Chin, Y. K. Y., Mas, C., Feathers, J. R., Paul, B., Datta, S., Chen, K. E., Jia, X., Yang, Z., Norwood, S. J., Mohanty, B., Bugarcic, A., Teasdale, R. D., Henne, W. M., Mobli, M., & Collins, B. M. (2019). Classification of the human phox homology (PX) domains based on their phosphoinositide binding specificities. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09355-y>

- Chen, K. E., Healy, M. D., & Collins, B. M. (2019). Towards a molecular understanding of endosomal trafficking by Retromer and Retriever. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 20(7), 465–478. <https://doi.org/10.1111/TRA.12649>
- Conner, S. D., & Schmid, S. L. (2003). *Regulated portals of entry into the cell*. www.nature.com/nature
- Cossart, P., & Helenius, A. (2014). Endocytosis of viruses and bacteria. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016972>
- Costantino, B. F. B., Bricker, D. K., Alexandre, K., Shen, K., Merriam, J. R., Antoniewski, C., Callender, J. L., Henrich, V. C., Presente, A., & Andres, A. J. (2008). A Novel Ecdysone Receptor Mediates Steroid-Regulated Developmental Events during the Mid-Third Instar of *Drosophila*. *PLOS Genetics*, 4(6), e1000102. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1000102>
- Csizmadia, T., Lorincz, P., Hegedus, K., Széplaki, S., Low, P., & Juhász, G. (2018). Molecular mechanisms of developmentally programmed crinophagy in *Drosophila*. *Journal of Cell Biology*, 217(1), 361–374. <https://doi.org/10.1083/jcb.201702145>
- D'agati, V. D., Kaskel, F. J., & Falk, R. J. (2011). Medical Progress Focal Segmental Glomerulosclerosis. In *N Engl J Med* (Köt. 365).
- Datta, S., Bowerman, J., Hariri, H., Ugrankar, R., Eckert, K. M., Corley, C., Vale, G., McDonald, J. G., & Henne, W. (2020). Snx14 proximity labeling reveals a role in saturated fatty acid metabolism and ER homeostasis defective in SCAR20 disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(52), 33282–33294. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2011124117>
- Datta, S., Liu, Y., Hariri, H., Bowerman, J., & Henne, W. M. (2019). Cerebellar ataxia disease-associated Snx14 promotes lipid droplet growth at ER-droplet contacts. *Journal of Cell Biology*, 218(4), 1335–1351. <https://doi.org/10.1083/jcb.201808133>
- Denholm, B., & Skaer, H. (2009). Bringing together components of the fly renal system. In *Current Opinion in Genetics and Development* (Köt. 19, Szám 5, o. 526–532). <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.08.006>
- Du, Y., Zou, Y., Yu, W., Shi, R., Zhang, M., Yang, W., Duan, J., Deng, Y., Wang, X., & Lü, Y. (2013). Expression pattern of sorting Nexin 25 in temporal lobe epilepsy: a study on patients and pilocarpine-induced rats. *Brain research*, 1509, 79–85. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2013.03.005>
- Engedal, N., & Mills, I. G. (2014). Endosomal signaling and oncogenesis. In *Methods in Enzymology* (Köt. 535, o. 179–200). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397925-4.00012-2>
- Feng, F., Sun, H., Zhao, Z., Sun, C., Zhao, Y., Lin, H., Yang, J., Xiao, Y., Wang, W., & Wu, D. (2022). Identification of APC Mutation as a Potential Predictor for Immunotherapy in Colorectal Cancer. *Journal of Oncology*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/6567998>
- Forgac, M. (2007). Vacuolar ATPases: Rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Köt. 8, Szám 11, o. 917–929). <https://doi.org/10.1038/nrm2272>

- Formica, M., Storaci, A. M., Bertolini, I., Carminati, F., Knævelsrud, H., Vaira, V., & Vaccari, T. (2021). V-ATPase controls tumor growth and autophagy in a *Drosophila* model of gliomagenesis. *Autophagy*, *17*(12), 4442–4452. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1918915>
- Fu, Y., Zhu, J. Y., Richman, A., Zhao, Z., Zhang, F., Ray, P. E., & Han, Z. (2017). A *Drosophila* model system to assess the function of human monogenic podocyte mutations that cause nephrotic syndrome. *Human Molecular Genetics*, *26*(4), 768–780. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw428>
- Gallon, M., & Cullen, P. J. (2015). Retromer and sorting nexins in endosomal sorting. *Biochemical Society Transactions*, *43*, 33–47. <https://doi.org/10.1042/BST20140290>
- Gerasimenko, J. V., Tepikin, A. V., Petersen, O. H., & Gerasimenko, O. V. (1998). Calcium uptake via endocytosis with rapid release from acidifying endosomes. *Current biology: CB*, *8*(24), 1335–1338. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(07\)00565-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(07)00565-9)
- Ghai, R., Mobli, M., Norwood, S. J., Bugarcic, A., Teasdale, R. D., King, G. F., & Collins, B. M. (2011). Phox homology band 4.1/ezrin/radixin/moesin-like proteins function as molecular scaffolds that interact with cargo receptors and Ras GTPases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(19), 7763–7768. https://doi.org/10.1073/PNAS.1017110108/-DCSUPPLEMENTAL/PNAS.1017110108_SI.PDF
- Gillingham, A. K., Sinka, R., Torres, I. L., Lilley, K. S., & Munro, S. (2014). Toward a Comprehensive Map of the Effectors of Rab GTPases. *Developmental Cell*, *31*(3), 358. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.10.007>
- Gruenberg, J. (2001). The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *2*(10), 721–730. <https://doi.org/10.1038/35096054>
- Hammond, G. R. V., & Balla, T. (2015). Polyphosphoinositide binding domains: Key to inositol lipid biology. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* (Köt. 1851, Szám 6, o. 746–758). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.02.013>
- Hao, X., Wang, Y., Ren, F., Zhu, S., Ren, Y., Jia, B., Li, Y. P., Shi, Y., & Chang, Z. (2011). SNX25 regulates TGF- β signaling by enhancing the receptor degradation. *Cellular Signalling*, *23*(5), 935–946. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.01.022>
- Helmstädter, M., Huber, T. B., & Hermle, T. (2017). Using the drosophila nephrocyte to model podocyte function and disease. In *Frontiers in Pediatrics* (Köt. 5). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fped.2017.00262>
- Hermle, T., Braun, D. A., Helmstädter, M., Huber, T. B., & Hildebrandt, F. (2017). Modeling monogenic human nephrotic syndrome in the drosophila garland cell nephrocyte. *Journal of the American Society of Nephrology*, *28*(5), 1521–1533. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016050517>
- Hernandez, L. D., Hueffer, K., Wenk, M. R., & Galán, J. E. (2004). Salmonella modulates vesicular traffic by altering phosphoinositide metabolism. *Science (New York, N.Y.)*, *304*(5678), 1805–1807. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1098188>
- Hochapfel, F., Denk, L., Mendl, G., Schulze, U., Maaßen, C., Zaytseva, Y., Pavenstädt, H., Weide, T., Rachel, R., Witzgall, R., & Krahn, M. P. (2017). Distinct functions of

- Crumbs regulating slit diaphragms and endocytosis in *Drosophila* nephrocytes. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 74(24), 4573–4586. <https://doi.org/10.1007/S00018-017-2593-Y>
- Hoepfner, S., Severin, F., Cabezas, A., Habermann, B., Runge, A., Gillooly, D., Stenmark, H., & Zerial, M. (2005). Modulation of receptor recycling and degradation by the endosomal kinesin KIF16B. *Cell*, 121(3), 437–450. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2005.02.017>
- Huang, H. S., Yoon, B. J., Brooks, S., Bakal, R., Berrios, J., Larsen, R. S., Wallace, M. L., Han, J. E., Chung, E. H., Zylka, M. J., & Philpot, B. D. (2014). Snx14 regulates neuronal excitability, promotes synaptic transmission, and is imprinted in the brain of mice. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098383>
- Huotari, J., & Helenius, A. (2011). Endosome maturation. In *EMBO Journal* (Köt. 30, Szám 17, o. 3481–3500). <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>
- Jefferies, H. B. J., Cooke, F. T., Jat, P., Boucheron, C., Koizumi, T., Hayakawa, M., Kaizawa, H., Ohishi, T., Workman, P., Waterfield, M. D., & Parker, P. J. (2008). A selective PIKfyve inhibitor blocks PtdIns(3,5)P₂ production and disrupts endomembrane transport and retroviral budding. *EMBO Reports*, 9(2), 164–170. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401155>
- Jovic, M., Sharma, M., Rahajeng, J., & Caplan, S. (2010). The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histology and histopathology*, 25(1), 99. <https://doi.org/10.14670/HH-25.99>
- Kampf, L. L., Schneider, R., Gerstner, L., Thünauer, R., Chen, M., Helmstädter, M., Amar, A., Onuchic-Whitford, A. C., Munarriz, R. L., Berdeli, A., Müller, D., Schrezenmeier, E., Budde, K., Mane, S., Laricchia, K. M., Rehm, H. L., MacArthur, D. G., Lifton, R. P., Walz, G., ... Hermle, T. (2019). TBC1D8B Mutations Implicate RAB11-Dependent Vesicular Trafficking in the Pathogenesis of Nephrotic Syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 30(12), 2338–2353. <https://doi.org/10.1681/ASN.2019040414>
- Kawasaki, Y., Matsumoto, A., Miyaki, T., Kinoshita, M., Kakuta, S., Sakai, T., & Ichimura, K. (2019). Three-dimensional architecture of pericardial nephrocytes in *Drosophila melanogaster* revealed by FIB/SEM tomography. *Cell and Tissue Research*, 378(2), 289–300. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03037-3>
- Kellermann, M., Scharfe, F., & Hensel, M. (2021). Manipulation of host cell organelles by intracellular pathogens. In *International Journal of Molecular Sciences* (Köt. 22, Szám 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22126484>
- Kerr, M. C., Lindsay, M. R., Luetterforst, R., Hamilton, N., Simpson, F., Parton, R. G., Gleeson, P. A., & Teasdale, R. D. (2006). Visualisation of macropinosome maturation by the recruitment of sorting nexins. *Journal of cell science*, 119(Pt 19), 3967–3980. <https://doi.org/10.1242/JCS.03167>
- Kim, H. R., Jin, H. S., & Eom, Y. Bin. (2021). Metabolite Genome-Wide Association Study for Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity Associated with Chronic Kidney Disease. *Genes*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/GENES12121905>
- Kosaka, T., & Ikeda, K. (1983). *Reversible Blockage of Membrane Retrieval and Endocytosis in the Garland Cell of the Temperature-sensitive Mutant of Drosophila*

melanogaster, *shibire* *tsl* (Köt. 97). <http://rupress.org/jcb/article-pdf/97/2/499/1641509/499.pdf>

- Kumar, A., Singh, A., & Ekavali. (2015). A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacological reports : PR*, 67(2), 195–203. <https://doi.org/10.1016/J.PHAREP.2014.09.004>
- Lauzier, A., Bossanyi, M. F., Larcher, R., Nassari, S., Ugrankar, R., Henne, W. M., & Jean, S. (2022). Snazarus and its human ortholog SNX25 modulate autophagic flux. *Journal of Cell Science*, 135(5). <https://doi.org/10.1242/jcs.258733>
- Lipschutz, J. H., & Mostov, K. E. (2002). Exocytosis: The Many Masters of the Exocyst. *Current Biology*, 12(6), R212–R214. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00753-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00753-4)
- Lovric, S., Ashraf, S., Tan, W., & Hildebrandt, F. (2016). Genetic testing in steroid-resistant nephrotic syndrome: When and how? In *Nephrology Dialysis Transplantation* (Köt. 31, Szám 11, o. 1802–1813). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfv355>
- Lőrincz, P., Lakatos, Z., Varga, Á., Maruzs, T., Simon-Vecsei, Z., Darula, Z., Benkő, P., Csordás, G., Lippai, M., Andó, I., Hegedűs, K., Medzihradzky, K. F., Takáts, S., & Juhász, G. (2016). MiniCORVET is a Vps8-containing early endosomal tether in drosophila. *eLife*, 5(JUNE2016). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.14226>
- Lund, V. K., Madsen, K. L., & Kjaerulff, O. (2018). Drosophila Rab2 controls endosome-lysosome fusion and LAMP delivery to late endosomes. *Autophagy*, 14(9), 1520–1542. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1458170>
- Luzio, J. P., Pryor, P. R., & Bright, N. A. (2007). Lysosomes: Fusion and function. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Köt. 8, Szám 8, o. 622–632). <https://doi.org/10.1038/nrm2217>
- Ma, L., Semick, S. A., Chen, Q., Li, C., Tao, R., Price, A. J., Shin, J. H., Jia, Y., Brandon, N. J., Cross, A. J., Hyde, T. M., Kleinman, J. E., Jaffe, A. E., Weinberger, D. R., & Straub, R. E. (2020). Schizophrenia risk variants influence multiple classes of transcripts of sorting nexin 19 (SNX19). *Molecular psychiatry*, 25(4), 831–843. <https://doi.org/10.1038/S41380-018-0293-0>
- Ma, M. P. C., & Chircop, M. (2012). SNX9, SNX18 and SNX33 are required for progression through and completion of mitosis. *Journal of cell science*, 125(Pt 18), 4372–4382. <https://doi.org/10.1242/JCS.105981>
- Maesako, M., Uemura, M., Tashiro, Y., Sasaki, K., Watanabe, K., Noda, Y., Ueda, K., Asada-Utsugi, M., Kubota, M., Okawa, K., Ihara, M., Shimohama, S., Uemura, K., & Kinoshita, A. (2015). High fat diet enhances β -site cleavage of amyloid precursor protein (APP) via promoting β -site APP cleaving enzyme 1/adaptor protein 2/clathrin complex formation. *PLoS ONE*, 10(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131199>
- Marsh, M., & Helenius, A. (2006). Virus entry: Open sesame. In *Cell* (Köt. 124, Szám 4, o. 729–740). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.007>
- Maruzs, T., Feil-Börcsök, D., Lakatos, E., Juhász, G., Blastyák, A., Hargitai, D., Jean, S., Lőrincz, P., & Juhász, G. (2023). Interaction of the sorting nexin 25 homologue Snazarus with Rab11 balances endocytic and secretory transport and maintains the

- ultrafiltration diaphragm in nephrocytes. *Molecular Biology of the Cell*, 34(9). <https://doi.org/10.1091/mbc.E22-09-0421>
- Maxfield, F. R. (2014). Role of endosomes and lysosomes in human disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016931>
- Maxfield, F. R., & McGraw, T. E. (2004). Endocytic recycling. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Köt. 5, Szám 2, o. 121–132). <https://doi.org/10.1038/nrm1315>
- Maxfield, F. R., & Yamashiro, D. J. (1987). Endosome acidification and the pathways of receptor-mediated endocytosis. *Advances in experimental medicine and biology*, 225, 189–198. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5442-0_16
- Mellman, I. (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annual review of cell and developmental biology*, 12, 575–625. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CELLBIO.12.1.575>
- Mellman, I., & Yarden, Y. (2013). Endocytosis and Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(12). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A016949>
- Miaczynska, M., Christoforidis, S., Giner, A., Shevchenko, A., Uttenweiler-Joseph, S., Habermann, B., Wilm, M., Parton, R. G., & Zerial, M. (2004). APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell*, 116(3), 445–456. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00117-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00117-5)
- Milosavljevic, J., Lempicki, C., Lang, K., Heinkele, H., Kampf, L. L., Leroy, C., Chen, M., Gerstner, L., Spitz, D., Wang, M., Knob, A. U., Kayser, S., Helmstädter, M., Walz, G., Pollak, M. R., & Hermle, T. (2022). Nephrotic Syndrome Gene TBC1D8B Is Required for Endosomal Maturation and Nephrin Endocytosis in Drosophila. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 33(12), 2174–2193. <https://doi.org/10.1681/ASN.2022030275>
- Mullock, B. M., Bright, N. A., Fearon, C. W., Gray, S. R., & Luzio, J. P. (1998). Fusion of Lysosomes with Late Endosomes Produces a Hybrid Organelle of Intermediate Density and Is NSF Dependent. In *The Journal of Cell Biology* (Köt. 140, Szám 3). <http://www.jcb.org>
- Murthy, M., Garza, D., Scheller, R. H., & Schwarz, T. L. (2003). Mutations in the exocyst component Sec5 disrupt neuronal membrane traffic, but neurotransmitter release persists. *Neuron*, 37(3), 433–447. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00031-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00031-X)
- Na, J., Sweetwyne, M. T., Park, A. S. D., Susztak, K., & Cagan, R. L. (2015). Diet-induced podocyte dysfunction in drosophila and mammals. *Cell Reports*, 12(4), 636–647. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.056>
- Neuman, S. D., Lee, A. R., Selegue, J. E., Cavanagh, T., & Bashirullah, A. (2021). A novel function for Rab1 and Rab11 during secretory granule maturation. *Journal of Cell Science*, 134(15). <https://doi.org/10.1242/JCS.259037/VIDEO-3>
- Nielsen, E., Severin, F., Backer, J. M., Hyman, A. A., & Zerial, M. (1999). Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nature cell biology*, 1(6), 376–382. <https://doi.org/10.1038/14075>

- Paschinger, K., Rendić, D., & Wilson, I. B. H. (2009). Revealing the anti-HRP epitope in *Drosophila* and *Caenorhabditis*. *Glycoconjugate journal*, 26(3), 385–395. <https://doi.org/10.1007/S10719-008-9155-3>
- Patrakka, J., Kestilä, M., Wartiovaara, J., Ruotsalainen, V., Tissari, P., Lenkkeri, U., Männikkö, M., Visapää, I., Holmberg, C., Rapola, J., Tryggvason, K., & Jalanko, H. (2000). Congenital nephrotic syndrome (NPHS1): Features resulting from different mutations in Finnish patients. *Kidney International*, 58(3), 972–980. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00254.x>
- Paul, B., Weeratunga, S., Tillu, V. A., Hariri, H., Henne, W. M., & Collins, B. M. (2022). Structural Predictions of the SNX-RGS Proteins Suggest They Belong to a New Class of Lipid Transfer Proteins. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 826688. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2022.826688/BIBTEX>
- Pelkmans, L., & Helenius, A. (2003). Insider information: What viruses tell us about endocytosis. In *Current Opinion in Cell Biology* (Köt. 15, Szám 4, o. 414–422). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(03\)00081-4](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(03)00081-4)
- Ponting, C. P. (1996). Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains? *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 5(11), 2353. <https://doi.org/10.1002/PRO.5560051122>
- Poteryaev, D., Datta, S., Ackema, K., Zerial, M., & Spang, A. (2010). Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell*, 141(3), 497–508. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.011>
- REYNOLDS, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of cell biology*, 17(1), 208–212. <https://doi.org/10.1083/JCB.17.1.208>
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., & Zerial, M. (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*, 122(5), 735–749. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2005.06.043>
- Rojas, R., Kametaka, S., Haft, C. R., & Bonifacino, J. S. (2007). Interchangeable but essential functions of SNX1 and SNX2 in the association of retromer with endosomes and the trafficking of mannose 6-phosphate receptors. *Molecular and cellular biology*, 27(3), 1112–1124. <https://doi.org/10.1128/MCB.00156-06>
- Ruppert, E. E. (1994). *Evolutionary Origin of the Vertebrate Nephron 1* (Köt. 34). <https://academic.oup.com/icb/article/34/4/542/144750>
- Saftig, P., & Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: Trafficking meets function. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Köt. 10, Szám 9, o. 623–635). <https://doi.org/10.1038/nrm2745>
- Satoh, A. K., O'Tousa, J. E., Ozaki, K., & Ready, D. F. (2005). Rab11 mediates post-Golgi trafficking of rhodopsin to the photosensitive apical membrane of *Drosophila* photoreceptors. *Development (Cambridge, England)*, 132(7), 1487–1497. <https://doi.org/10.1242/DEV.01704>
- Scott, R. C., Schuldiner, O., & Neufeld, T. P. (2004). Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Developmental cell*, 7(2), 167–178. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2004.07.009>

- Seaman, M. N. J., Mccaffery, J. M., & Emr, S. D. (1998). A Membrane Coat Complex Essential for Endosome-to-Golgi Retrograde Transport in Yeast. In *The Journal of Cell Biology* (Köt. 142, Szám 3). <http://www.jcb.org>
- Shafaq-Zadah, M., Dransart, E., & Johannes, L. (2020). Clathrin-independent endocytosis, retrograde trafficking, and cell polarity. In *Current Opinion in Cell Biology* (Köt. 65, o. 112–121). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.05.009>
- Shaughnessy, L. M., Hoppe, A. D., Christensen, K. A., & Swanson, J. A. (2006). Membrane perforations inhibit lysosome fusion by altering pH and calcium in *Listeria monocytogenes* vacuoles. *Cellular microbiology*, 8(5), 781. <https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2005.00665.X>
- Snead, W. T., Zeno, W. F., Kago, G., Perkins, R. W., Blair Richter, J., Zhao, C., Lafer, E. M., & Stachowiak, J. C. (2019). BAR scaffolds drive membrane fission by crowding disordered domains. *The Journal of cell biology*, 218(2), 664–682. <https://doi.org/10.1083/JCB.201807119>
- Sönnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J., & Zerial, M. (2000). Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *The Journal of cell biology*, 149(4), 901–913. <https://doi.org/10.1083/JCB.149.4.901>
- Steinman, R. M., Mellman, I. S., Muller, W. A., & Cohn, Z. A. (1983). Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *The Journal of cell biology*, 96(1), 1–27. <https://doi.org/10.1083/JCB.96.1.1>
- Suh, J. M., Stenesen, D., Peters, J. M., Inoue, A., Cade, A., & Graff, J. M. (2008). An RGS-containing sorting nexin controls *Drosophila* lifespan. *PLoS ONE*, 3(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002152>
- Takemura, S., Isonishi, A., Tanaka, T., Okuda, H., Tatsumi, K., Yamano, M., & Wanaka, A. (2020). Neural expression of sorting nexin 25 and its regulation of tyrosine receptor kinase B trafficking. *Brain Structure and Function*, 225(9), 2615–2642. <https://doi.org/10.1007/s00429-020-02144-0>
- Tanaka, T., & Nakamura, A. (2008). The endocytic pathway acts downstream of Oskar in *Drosophila* germ plasm assembly. *Development (Cambridge, England)*, 135(6), 1107–1117. <https://doi.org/10.1242/DEV.017293>
- Teasdale, R. D., & Collins, B. M. (2012). Insights into the PX (phox-homology) domain and SNX (sorting nexin) protein families: Structures, functions and roles in disease. In *Biochemical Journal* (Köt. 441, Szám 1, o. 39–59). <https://doi.org/10.1042/BJ20111226>
- Thomas, A. C., Williams, H., Setö-Salvia, N., Bacchelli, C., Jenkins, D., O’Sullivan, M., Mengrelis, K., Ishida, M., Ocaka, L., Chanudet, E., James, C., Lescai, F., Anderson, G., Morrogh, D., Ryten, M., Duncan, A. J., Pai, Y. J., Saraiva, J. M., Ramos, F., ... Stanier, P. (2014). Mutations in SNX14 Cause a Distinctive Autosomal-Recessive Cerebellar Ataxia and Intellectual Disability Syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 95(5), 611. <https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2014.10.007>
- Ugrankar, R., Bowerman, J., Hariri, H., Chandra, M., Chen, K., Bossanyi, M. F., Datta, S., Rogers, S., Eckert, K. M., Vale, G., Victoria, A., Fresquez, J., McDonald, J. G., Jean, S., Collins, B. M., & Henne, W. M. (2019). *Drosophila* Snazarus Regulates a

- Lipid Droplet Population at Plasma Membrane-Droplet Contacts in Adipocytes. *Developmental Cell*, 50(5), 557-572.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.07.021>
- Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2020). Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. In *Frontiers in Immunology* (Köt. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01066>
- van de Leemput, J., Wen, P., & Han, Z. (2022). Using *Drosophila* Nephrocytes to Understand the Formation and Maintenance of the Podocyte Slit Diaphragm. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 837828. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2022.837828/BIBTEX>
- Van Meel, E., & Klumperman, J. (2008). Imaging and imagination: understanding the endo-lysosomal system. *Histochemistry and Cell Biology*, 129(3), 253. <https://doi.org/10.1007/S00418-008-0384-0>
- Vecellio, M., Paraboschi, E. M., Ceribelli, A., Isailovic, N., Motta, F., Cardamone, G., Robusto, M., Asselta, R., Brescianini, S., Sacrini, F., Costanzo, A., De Santis, M., Stazi, M. A., Duga, S., & Selmi, C. (2021). DNA Methylation Signature in Monozygotic Twins Discordant for Psoriatic Disease. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.778677>
- Vieira, N., Rito, T., Correia-Neves, M., & Sousa, N. (2021). Sorting Out Sorting Nexins Functions in the Nervous System in Health and Disease. *Molecular neurobiology*, 58(8), 4070–4106. <https://doi.org/10.1007/S12035-021-02388-9>
- Wang, X., Zhao, Y., Zhang, X., Badie, H., Zhou, Y., Mu, Y., Loo, L. S., Cai, L., Thompson, R. C., Yang, B., Chen, Y., Johnson, P. F., Wu, C., Bu, G., Mobley, W. C., Zhang, D., Gage, F. H., Ranscht, B., Zhang, Y. W., ... Xu, H. (2013). Loss of sorting nexin 27 contributes to excitatory synaptic dysfunction via modulation of glutamate receptor recycling in Down syndrome. *Nature medicine*, 19(4), 473. <https://doi.org/10.1038/NM.3117>
- Weavers, H., Prieto-Sánchez, S., Grawe, F., Garcia-López, A., Artero, R., Wilsch-Bräuninger, M., Ruiz-Gómez, M., Skaer, H., & Denholm, B. (2009). The insect nephrocyte is a podocyte-like cell with a filtration slit diaphragm. *Nature*, 457(7227), 322–326. <https://doi.org/10.1038/nature07526>
- Wen, P., Zhang, F., Fu, Y., Zhu, J. Y., & Han, Z. (2020). Exocyst genes are essential for recycling membrane proteins and maintaining slit diaphragm in *Drosophila* nephrocytes. *Journal of the American Society of Nephrology*, 31(5), 1024–1034. <https://doi.org/10.1681/ASN.2019060591>
- Wu, L. G., Hamid, E., Shin, W., & Chiang, H. C. (2014). Exocytosis and endocytosis: modes, functions, and coupling mechanisms. *Annual review of physiology*, 76, 301–331. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-021113-170305>
- Yu, L., McPhee, C. K., Zheng, L., Mardones, G. A., Rong, Y., Peng, J., Mi, N., Zhao, Y., Liu, Z., Wan, F., Hailey, D. W., Oorschot, V., Klumperman, J., Baehrecke, E. H., & Lenardo, M. J. (2010). Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature*, 465(7300), 942–946. <https://doi.org/10.1038/NATURE09076>
- Zadka, Ł., Sochocka, M., Hachiya, N., Chojdak-Łukasiewicz, J., Dzięgiel, P., Piasecki, E., Leszek, J., Zadka, Ł., Sochocka, M., Piasecki, E., Hachiya, N., Chojdak-Łukasiewicz,

- J., Dzięgiel, P., & Leszek, J. (2023). Endocytosis and Alzheimer's disease. *GeroScience* 2023 46:1, 46(1), 71–85. <https://doi.org/10.1007/S11357-023-00923-1>
- Zhang, J., Schulze, K. L., Robin Hiesinger, P., Suyama, K., Wang, S., Fish, M., Acar, M., Hoskins, R. A., Bellen, H. J., & Scott, M. P. (2007). Thirty-One Flavors of Drosophila Rab Proteins. *Genetics*, 176(2), 1307–1322. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.106.066761>
- Zheng, B., Tang, T., Tang, N., Kudlicka, K., Ohtsubo, K., Ma, P., Marth, J. D., Farquhar, M. G., & Lehtonen, E. (2006). *Essential role of RGS-PX1 sorting nexin 13 in mouse development and regulation of endocytosis dynamics*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0607974103
- Zhou, C., Wu, Z., Du, W., Que, H., Wang, Y., Ouyang, Q., Jian, F., Yuan, W., Zhao, Y., Tian, R., Li, Y., Chen, Y., Gao, S., Wong, C. C. L., & Rong, Y. (2022). Recycling of autophagosomal components from autolysosomes by the recycler complex. *Nature cell biology*, 24(4), 497–512. <https://doi.org/10.1038/S41556-022-00861-8>
- Zhuang, S., Shao, H., Guo, F., Trimble, R., Pearce, E., & Abmayr, S. M. (2009). Sns and Kirre, the Drosophila orthologs of Nephrin and Neph1, direct adhesion, fusion and formation of a slit diaphragm-like structure in insect nephrocytes. *Development*, 136(14), 2335–2344. <https://doi.org/10.1242/dev.031609>

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Juhász Gábornak a bátorításért, mellyel elindított PhD hallgatói utamon, és melynek segítségével kitartottam ezen az úton. Továbbá hálás vagyok Neki, hogy kutatási munkámat ilyen színvonalas laborkörülmények között folytathattam.

Külön köszönettel tartozom Dr. Maruzs Tamásnak, aki nélkül a dolgozatom és az alapjául szolgáló publikáció nem születhetett volna meg. Szakmai segítségnyújtásán túl, emberileg is mindvégig támogatott. Neki köszönhetem, hogy az általunk létrehozott cikk társszerzői egy baráti kis közösséggé kovácsolódtak, ahova öröm tartozni. Kis csoportunktól mindig türelmet és támogatást kaptam, pedig sokszor nem lehetett könnyű, hiszen PhD munkámmal egyidejűleg vállaltam gyermeket, így az átlagosnál többször kellett újratervezni vagy sokszor egyedileg ütemezni a kísérleteket.

Hálával tartozom Lakatos Enikőnek, hiszen mindig és mindenben számíthatok rá. Vele a hosszú immunfestéssel töltött napok csak úgy elreppentek. Szakmai és baráti beszélgetéseink után mindig gazdagabbnak érzem magamat. A mindennapok rohanásában ő mindig a béke és nyugalom, akivel mindig öröm együtt dolgozni.

Köszönöm a belevetett munkát és energiát a dolgozatom alapjául szolgáló cikk minden további társszerzőjének: Blastyák Andrásnak, Juhász Gábornak, Hargitai Dávidnak, Lőrincz Péternek és Steve Jeannak. Köszönöm a technikai segítséget Truszka Mónikának. Mike W. Henne-től, Michael Krahn-től és Thomas L. Schwarz-tól hasznos javaslatokat és a kísérletek során használt fontos reagenseket kaptunk, amiért szintén hálás vagyok.

Örülök, hogy tagja lehetek a Juhász csoportnak, és köszönettel tartozom minden volt, és jelenlegi tagjának, hiszen hatással voltak rám és munkámra. Köszönöm tehát: Simon-Vecsei Zsófiának, akivel első klónozásaimat végeztem; Varga Katának, aki, mint kisgyermekes kutató is kiemelt példa volt előttem; Horváth V. Gábornak, akinek molekuláris biológiai ismereteim fejlődését köszönhetem. Szeretnék köszönetet mondani Bozsó Szilviának a légymunkában nyújtott segítségével, és azon túl, hiszen mozgatórugója a csoportunknak és mindent kézben tart, és a szíven visel. Köszönetemet szeretném kifejezni Kiss Viktóriának, Bernátskyné Boga Juditnak, Meg Mukaminak, Arindam Bhattaharjee-nak, Hussein Abu Ammar-nak, Harmatos-Ürmösi Adélnak, Jipa Andrásnak, Erdődi Ildikónak, Aishwarya Chhatre-nak, Szabó Áronnak,

Vincze Virágnak, Csordás Gábornak, Hevérné Laczkó-Dobos Hajnalkának, Asha Kiran-nak, Fehérné Juhász Erzsébetnek és Esküdt Zsombornak.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom családomnak, hiszen mindvégig mellettem álltak az első apró lárvától az utolsó leírt betűig. Külön köszönöm a kisfiamnak, Nimródnak, hogy megértette, és türelemmel fogadta, hogy hétvégén is be kell szaladnunk a legyekhez vagy, hogy anya még dolgozik a laptopon a mesenézéskor is. Köszönöm férjemnek, Feil Balázsnak, hogy az undok pillanataimban is elviselt, és bátorított. Köszönöm édesanyámnak és édesapámnak, hogy bármikor fordulhatok hozzájuk, legyen szó gyermekpsztrálásról, elromlott autóról, elfelejtett vacsoráról vagy csak egy kis feszültség oldó beszélgetésről.

A doktori dolgozatomhoz szükséges kísérletek elvégzését a következő pályázatok támogatták: Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH) által folyósított OTKA PD #135611, OTKA FK #138851, Élvonal KKP129797, ÚNKP-22-2-III-ELTE-702, 2022-2.1.1-NL-2022-00008, illetve az ELTE jóvoltából EKA 2022/045-P101-2.

Saját hozzájárulásom a munkához

- ✓ A felhasznált *acetabularia* törzsek fenntartása
- ✓ Az *acetabularia* nullmutánst menekítő törzs létrehozása
- ✓ Lárvális garland sejtek boncolása és immunfestése formaldehides fixálást követően
- ✓ Garland sejtek hőfixálásos immunfestése a diafragma fehérjék megfestésére
- ✓ Lysotracker Red festés
- ✓ Oil Red O festés
- ✓ Nyomjezőanyag felvételi kísérletek elvégzése
- ✓ Channel Diffusion Assay elvégzése
- ✓ Texas Red Avidin nyomjezőanyag követése mikroszkóp alatt videófelvétellel
- ✓ Mintaelőkészítés EM vizsgálatra
- ✓ Mikroszkópos elemzés és statisztikai analízis

Függelék

Rekombinációs keresztezés

$$\boxed{P} \quad \text{♀} \quad \frac{w^- ; + ; \text{tub-Gal4 [w}^+]}{w^- ; + ; \text{TM6Tb}} \quad \otimes \quad \text{♂} \quad \frac{w^- ; + ; \text{UAS-snz-GFP [w}^+]}{Y ; + ; \text{UAS-snz-GFP [w}^+]}$$

$$\boxed{F_1} \quad \text{♀} \quad \frac{w^- ; + ; \text{tub-Gal4 [w}^+]}{w^- ; + ; \text{UAS-snz-GFP [w}^+]} \quad \otimes \quad \text{♂} \quad \frac{w^- ; + ; \text{TM3SbSer}}{Y ; + ; \text{TM6Tb}}$$

$$\boxed{F_2} \quad \frac{w^- ; + ; \text{tub-Gal4 [w}^+]}{w^- ; + ; \text{TM balancer}}$$

$$\frac{w^- ; + ; \text{UAS-snz-GFP [w}^+]}{w^- ; + ; \text{TM balancer}}$$

$$\boxed{\frac{w^- ; + ; \text{tub-Gal4 [w}^+], \text{UAS-snz-GFP [w}^+]}{w^- ; + ; \text{TM balancer}}}$$

F1. ábra: Az snz-GFP rekombináns törzs létrehozásának bemutatása

A két lehetséges genotípusú F1 szűz közül a nem balanszeres egyedeket válogattuk le, és itt csak ezeket tűntettük föl. Az F1 generációban a Tubby ellen szelektáltunk és a hosszú testű szüzeket vittük tovább.

Az F2 generációban a két nem rekombináns genotípus mellől a rekombináns fluoreszkáló lárvákat szelektáltuk. Majd ezek közül a TM6Tb balanszereseket kereszteztük egymással. Ugyanez a keresztezés létrejött pros-Gal4 driver bevitelével is, azzal a különbséggel, hogy az F2 generációban a lárváknak csak a nyálmirigyében detektálható fluoreszcencia, ezért a rekombinánsok válogatását ere alapoztuk.

Nullmutáns és menekítő transzgén kombinálása

P ♀ $\frac{\text{snz}^{\text{KO}} ; + ; +}{\text{snz}^{\text{KO}} ; + ; +} \otimes \text{♂} \frac{\text{FM7cB} ; + ; \text{Sb}}{\text{Y} ; + ; \text{TM6Tb}}$

F₁ ♀ $\frac{\text{snz}^{\text{KO}} ; + ; +}{\text{FM7cB} ; + ; \text{TM6Tb}}$

P ♀ $\frac{\text{FM7cB} ; + ; \text{Sb}}{\text{daam}^{\text{ex68}} ; + ; \text{TM6Tb}} \otimes \text{♂} \frac{\text{w}^- ; + ; \text{tub-Gal4, UAS-snz-GFP}}{\text{Y} ; + ; \text{TM6Tb}}$

F₁ ♂ $\frac{\text{FM7cB} ; + ; \text{tub-Gal4, UAS-snz-GFP}}{\text{Y} ; + ; \text{Sb}}$

F₂ ♂ $\frac{\text{snz}^{\text{KO}} ; + ; \text{tub-Gal4, UAS-snz-GFP}}{\text{Y} ; + ; \text{TM6Tb}}$

♂ $\frac{\text{FM7cB} ; + ; \text{tub-Gal4, UAS-snz-GFP}}{\text{Y} ; + ; \text{TM6Tb}}$

♀ $\frac{\text{snz}^{\text{KO}} ; + ; \text{tub-Gal4, UAS-snz-GFP}}{\text{FM7cB} ; + ; \text{TM6Tb}}$

♀ $\frac{\text{FM7cB} ; + ; \text{tub-Gal4, UAS-snz-GFP}}{\text{FM7cB} ; + ; \text{TM6Tb}}$

F2. ábra: Nullmutáns és menekítő transzgén kombinálása

A zölddel jelölt egyedek két, párhuzamosan indított keresztezésből származnak, ezeket kereszteztük egymással és az F₂ generáció esetén a Tubby és nem Stubble egyedek lehetséges genotípusait tüntettük fel. Az F₂ generáció nem Bar szemű hímjeit kereszteztük az ugyanebből a generációból származó Bar szemű nőstényekkel. Az X kromoszóma homozigóta formába hozásához az F₃ generációban a nem Bar egyedeket kereszteztük egymás között.