

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biológia Doktori Iskola

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

PhD értekezés tézisei

Feil-Börcsök Dalma

Témavezető:

Dr. Juhász Gábor, DSc tudományos tanácsadó

HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai
Intézet



**HUN
REN**



Szeged

2024

Bevezetés

Az eukarióta sejtek figyelemre méltóan összetett endoszómális rendszerrel rendelkeznek, melyet számos fehérje szabályoz. Az egyik ilyen szabályozásért felelős fehérje család Sorting nexinek (SNX) néven ismert. Ennek a családnak a tagjai egy konzervált PX (phox-homology) domént tartalmaznak, 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 Snazarust (Snz), mely legközelebbi humán megfelelője az SNX25.

Az SNX25 fehérjét, mint az autofág fluxus szabályozója 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 helyek létrehozásában a plazmamembrán, az endoplazmatikus retikulum és a lipidcseppek (PM-ER-LD) 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 zsíresejtekben. Doktori munkám során az Snz fehérje garland nefrocitákban betöltött funkcióját vizsgáltam. Ezek a sejtek amellet, hogy kiváló podocita modellek, az endoszómális rendszer vizsgálatára is nagyszerűen alkalmasak.

Célkitűzés

1. Az Snz lokalizációjának meghatározása különböző sejtalkotókhoz viszonyítva.
2. Esetleges kölcsönható partnerek megismerése.

3. Az Snz lipidcseppekhez köthető funkciójának vizsgálata garland nefrocitákban.
4. A lizoszómális lebontás működésének vizsgálata több különböző módszerrel *snz* funkcióvesztéses nefrocitákban.
5. Az endoszómális rendszer dinamikájának vizsgálata videomikroszkópiával.
6. Statisztikai analízis.

Anyagok és módszerek

1. Immunhisztokémiai eljárással az endoszómális rendszerben jelentős szerepű sejtalkotó megfestése.
2. Elektronmikroszkópos vizsgálatok az *snz* funkcióvesztéses fenotípus megértésére, illetve a lakúnahálózat érintettségének vizsgálatára.
3. Channel Diffusion Assay és Csersavas impregnálás a garlandsejtek lakúnarendszerének láthatóvát tételére.
4. Koimmunoprecipitáció segítségével a Snz és a Rab11 kölcsönhatásának kimutatása

5. Nyomjelzőanyag követéses kísérleteket alkalmaztunk az endoszómális érés különböző lépéseinek megfigyelésére.
6. Oil Red O festést végeztünk a nefrocitákon belül található lipidcseppek kimutatására.
7. LysoTracker Red jelöléssel és Lamp-GFP riporterrel vizsgáltuk a lizoszómák savasodását.
8. Normál és hőfixálásos immunfestést végeztünk a diafragmafehérjék láthatóvá tételére.
9. Az aktívan emésztő lizoszómák vizsgálata videómikroszkópiával.
10. Ragasztóanyag (glue) szekréció vizsgálata nyálmirigyekben Fluoreszcens dsRed riporter segítségével.

Eredmények

1. A korai és a késői endoszómák immunfestésének segítségével azok méretnövekedését tapasztaltuk *snz* funkcióvesztéses nefrocitákban.
2. Különböző módszerekkel ellenőriztük az *Snz* hatását a lizoszómális lebontásra, és azt

tapasztaltuk, hogy Snz hiányában is normálisan megy végbe.

3. Fluoreszcens BSA647 nyomjelzőanyag felvételi kísérlettel kimutattuk, hogy *snz* funkcióvesztés esetén az endocitotikus aktivitás fokozódik garland nefrocitákban.
4. Kolokalizációs kísérleteinkkel több fontos megállapítást is tettünk. Meghatároztuk, hogy az Snz-GFP a nefrociták periferiáján helyezkedik el, mégis független az ER-PM-LD érintkezési helyektől. Ezáltal kijelenthető, hogy nem vesz részt a nem vezikuláris lipidtranszportban. Illetve kolokalizál a Rab11 pozitív reciklizáló endoszómákkal.
5. Az Snz és a Rab11 közötti fizikai kölcsönhatást koimmunoprecipitáció segítségével is megerősítettük.
6. Snz hiányában a Rab11 garland sejten belüli eloszlása megváltozik. A reciklizáló endoszómák plazmamembrántól mért átlagos távolsága a háromszorosára nő.

7. A nefrociták diafragma komponensei folyamatos körforgásban vannak, melyhez alapvető fontosságú a reciklizáló endoszómák megfelelő működése. Ezért a diafragma fehérjék és a lakúnák láthatóvá tételén keresztül vizsgáltuk az *Snz* hatását a *Rab11*-re. *Snz* csendesítés következtében felborul a diafragma fehérjék szigorú rendezettsége. Ektopikus diafragma fehérjék jelennek meg a sejt középsíkjában, a sejt belseje felé mélyen benyúló lakúnák formálódása miatt. Az *snz* KD és a *Rab11* OE egyidejű expressziója esetén a fenotípus drasztikus súlyosbodását tapasztaltuk. Ebből arra következtetünk, hogy a két fehérje ellentétes módon, de egymásra hatva szabályozza az exocitózist.
8. Az *Snz* és az exocitózis kapcsolatát a *Sec5* exocitózishoz szükséges *exocyst* komplex alegység elrontásán keresztül vizsgáltuk. A *Sec5* és az *snz* egyidejű csendesítése az *Snz* hiányában tapasztalt késői endoszóma méretnövekedést menekítette.

9. Nyálmirigyben fluoreszcens dsRed riporter segítségével követtük nyomon a szekretálódó glue granulomokat, és azt tapasztaltuk, hogy Snz hiányában a szekréció mértéke növekszik, míg Snz túltermeltetés esetén a glue nem képes felszabadulni a nyálmirigyekből.

Összefoglalás

Az exocitózis és endocitózis megfelelő egyensúlya fontos a plazmamembrán homeosztázisának fenntartásához. Ez különösen kritikus az emberi podociták és a hozzájuk nemcsak funkcionálisan, de szerkezetileg is nagyon hasonló *Drosophila* nefrociták esetében, amelyek a diafragmának nevezett összetett szűrőrendszerrel rendelkeznek. Doktori dolgozatomban a Sorting nexin fehérjecsalád egyik képviselője, a humán Snx25 homológ Snz fehérje endoszómális rendszerben betöltött szerepét vizsgáltam garland nefrocitákban.

Kísérleteink során azt találtuk, hogy garland sejtekben az Snz a Rab11 pozitív reciklizáló

endoszómákkal kolokalizál, ellentétben a zsírsejtekkel, ahol az ER-PM-LD érintkezési helyek részeként írták le. Az Snz hiányában tapasztalt késői endoszóma méretnövekedés vélhetően a kompenzációs endocitózisból adódik, hiszen kísérleteink alapján a lizoszómális lebontás normálisan megy végbe, ellenben az endocitózis fokozódik.

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. Mivel ismert, hogy a Rab11 fokozott expressziója túlzott exocitózishoz vezet, úgy gondoljuk, hogy esetünkben az Snz elvesztése 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. Továbbá kísérletesen

igazoltuk, hogy hasonló, exocitózist szabályozó szereppel bír a *Drosophila* lárvális nyálmirigyekben is.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az Snz egy eddig ismeretlen, új funkcióját írtuk le, mely a Rab11 közvetítette reciklizáció negatív szabályozása, azon keresztül pedig a membránegyensúly fenntartása

Summary

A proper balance of exocytosis and endocytosis is important for maintaining plasma membrane homeostasis. This is especially critical in the case of human podocytes and the functionally but also structurally very similar *Drosophila* nephrocytes, which both possess a complex filter system called the diaphragm. In my doctoral thesis, I investigated the role of the human Snx25 homologue Snz protein in the endosomal system of garland nephrocytes.

In our experiments, we found that in garland cells, Snz colocalizes with Rab11-positive recycling endosomes, in contrast to adipocytes, where it has been described as part of ER-PM-LD contact sites in which no recycling endosomes are involved. The late endosome size

increase observed in the absence of Snz is due to compensatory endocytosis, since, based on our experiments, lysosomal degradation takes place normally in *snz* loss-of-function cells.

In the absence of Snz, we found that the distribution of the diaphragm proteins is disturbed, as they appear in the deeper regions of the cells as a result of the elongation of the lacunae containing them. The overexpression of Rab11 also resulted in a similar phenotype, and the combination of the two genotypes resulted in a striking enhancement of this phenotype. As it is known that increased expression of Rab11 leads to excessive exocytosis, we believe that in our case the loss of Snz further enhances the already increased exocytosis due to increased Rab11 activity. Thus, we hypothesize that in wild-type cells, Snz regulates exocytosis through counteracting Rab11. Furthermore, we experimentally verified that Snz has a similar, exocytosis-regulating role in *Drosophila* larval salivary glands as well.

Based on our results, we have described a previously unknown, new function of Snz, which is the

maintenance of membrane balance via the negative regulation of Rab11-mediated recycling.

Saját közlemények jegyzéke

MTMT azonosító: 10085713

Összesített impakt faktor: 5,2

A fokozatszerzési eljárás alapját képző közlemények:

Interaction of the sorting nexin 25 homologue Snazarus with Rab11 balances endocytic and secretory transport and maintains the ultrafiltration diaphragm in nephrocytes.

Maruzs, T., Feil-Börcsök, D., Lakatos, E., Juhász, G., Blastyák, A., Hargitai, D., Jean, S., Lorincz, P., & Juhász, G.

Molecular Biology of the Cell, 2023, 34(9). IF: 3,1

Isolation and characterization of novel plekhm1 and def8 mutant alleles in *Drosophila*.

Maruzs, T., Lakatos, E., Feil-Börcsök, D., Lőrincz, P., & Juhász, G.

Biologia Futura, 2022 73(2), 149–155. IF: 2,1

Konferencia részvételek:

1; Poszter - Physiological effects of ophiobolins on inward rectifier ion channels comparing KAT1 channel in plants to Kir2.x channels in animals - FEPS 2014 Budapest

2; Poszter - Reorganization of Kir2.x ion channel complex under stress effects on cardiomyocytes and neuronal cells - Frontiers in CardioVascular Biology 2014 Barcelona

3; Előadás - In vitro lipidation assay for the investigation of autophagy regulatory factors - FIBOK 2018 Budapest

4; Előadás - Az Atg8 fehérje lipidációjának vizsgálata in vitro rendszerben - Kolozsvári Biológus Napok 2018 Kolozsvár

5; Poszter - Az Atg8 fehérje lipidációjának vizsgálata in vitro rendszerben - Straub Napok 2018 Szeged

6; Poszter - Investigation of sorting nexin functions in *Drosophila* tissues - Hungarian Molecular Life Science 2019 Eger

7; Poszter - Investigating the role of *Drosophila* Snx25 in the endomembrane system of nephrocytes - Straub Napok 2022 Szeged

8; Poszter - Interaction of the sorting nexin 25 homolog Snazarus with Rab11 balances endocytic and secretory transport and maintains the ultrafiltration diaphragm in nephrocytes - EDRC 2023

Nyilatkozat

Alulírott, Dr. Juhász Gábor, nyilatkozom, hogy Feil-Börcsök Dalma doktori disszertációjában bemutatott eredmények tükrözik a jelölt „Tamás Maruzs, Dalma Feil-Börcsök, Enikő Lakatos, Gábor Juhász, András Blastyák, Dávid Hargitai, Steve Jean, Péter Lőrincz, and Gábor Juhász 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 Vol. 34, No. 9” közleményben bemutatott hozzájárulását. A doktori értekezésben bemutatott eredményekben, valamint a további közlemények fokozatszerzéshez felhasznált anyagrészeiben a jelölt munkája meghatározó fontosságú, és más doktori fokozatszerzésben nem kerültek és a jövőben sem kerülnek felhasználásra

Szeged, 2024. 07. 01.

Dr. Juhász Gábor

Témavezető

Társszerzői nyilatkozat

Alulírott, Dr. Maruzs Tamás, nyilatkozom, hogy Feil-Börcsök Dalma doktori dolgozatában bemutatott eredmények tükrözik a jelölt „Tamás Maruzs, Dalma Feil-Börcsök, Enikő Lakatos, Gábor Juhász, András Blastyák, Dávid Hargitai, Steve Jean, Péter Lőrincz, and Gábor Juhász Interaction of the sorting nexin 25 homologues Snazarus with Rab11 balances endocytic and secretory transport and maintains the ultrafiltration diaphragm in nephrocytes” Molecular Biology of the Cell Vol. 34, No. 9” közleményben bemutatott hozzájárulását. A doktori értekezésben bemutatott eredményekben a jelölt munkája meghatározó fontosságú, és más doktori fokozatszerzésben nem kerültek és a jövőben sem kerülnek felhasználásra.

Szeged, 2024. 07. 01.

Dr. Maruzs Tamás

Társ-elsőszerző

Dr. Juhász Gábor

Témavezető