

A szekréción granulumok membránfehérjéinek dinamikája ecetmuslica lárvális nyálmirigyében

37. OTDK Biológia Szekció

Készítette:

Farkas Erika

Biológus másodéves MSc hallgató,
Eötvös Loránd Tudományegyetem

Témavezető:

Dr. Csizmadia Tamás

egyetemi adjunktus,
Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék,
Eötvös Loránd Tudományegyetem



Budapest 2024.

Tartalomjegyzék

1. Összefoglaló	3
2. Rövidítésjegyzék	4
3. Bevezetés	6
4. Célkitűzések	9
5. Anyagok és módszerek	9
5.1. <i>Drosophila melanogaster</i> törzsek	9
5.2. Fluoreszcens riporterrendszerek	10
5.3. Mintaelőkészítés és képalkotás	11
6. Eredmények	12
6.1 Az mCD8 referenciafehérje és a Szinaptotagmin jelenlétének vizsgálata a szekréciós granulumok membránján	12
6.2 A potenciális szekréciós granulum membránfehérje lebontó folyamatok vizsgálata	14
6.3 A szekréciós granulum membrán asszociált Snap24 lokalizációja	21
7. Diskusszió	23
8. Szerzői Hozzájárulás	25
9. Köszönetnyilvánítás	26
10. Irodalomjegyzék.....	27

1. Összefoglaló

Az *ecetmuslica* fejlődése során a lárvális nyálmirigy sejtekben felhalmozódó szekréciós granulumok tartalma a bábozódáskor kiürül. A szekréció után a sejtben maradt váladékszemcsék lizoszómákkal fuzionálva bontódnak le (krinofágia), ennek molekuláris háttere kevésbé ismert. Izgalmas kérdés, hogy mi lesz a sorsa a citoplazmában maradó váladékszemcsék exocitózishoz szükséges membránfehérjéinek.

Kutatásom során megvizsgáltam egy, a szekréciós granulumok membránját kijelölő, és abban állandóan jelen lévő (referencia) transzmembrán fehérjét, a GFP-vel jelölt humán mCD8 lokalizációját a fejlődés során, összehasonlítva azt az exocitózisban szereplő transzmembrán, illetve membrán asszociált fehérjékével (Szinaptotagmin, Snap24). Sikertelenül kimutattam egyrészt, hogy a szekrécióhoz szükséges membránfehérjék már nem mutathatóak ki normál körülmények között a krinoszómákon, másrészt pedig a krinofágia gátlása során azok a lebontásra nem kerülő granulumok membránjában maradnak. Mindezek alapján feltételezzük, hogy a szekréciós granulumok membránfehérjéinek eltávolítása azok tartalmának degradációjával szorosan összefüggő folyamat.

Ezen mechanizmusok feltárásával pedig nem csak nagyobb betekintést kaphatunk az említett folyamatról, de a krinofágiával kapcsolatos, jelenleg még gyógyíthatatlan betegségek kezelésében is segíthet, például a Crohn betegség és a pancreatitis esetében.

2. Rövidítésjegyzék

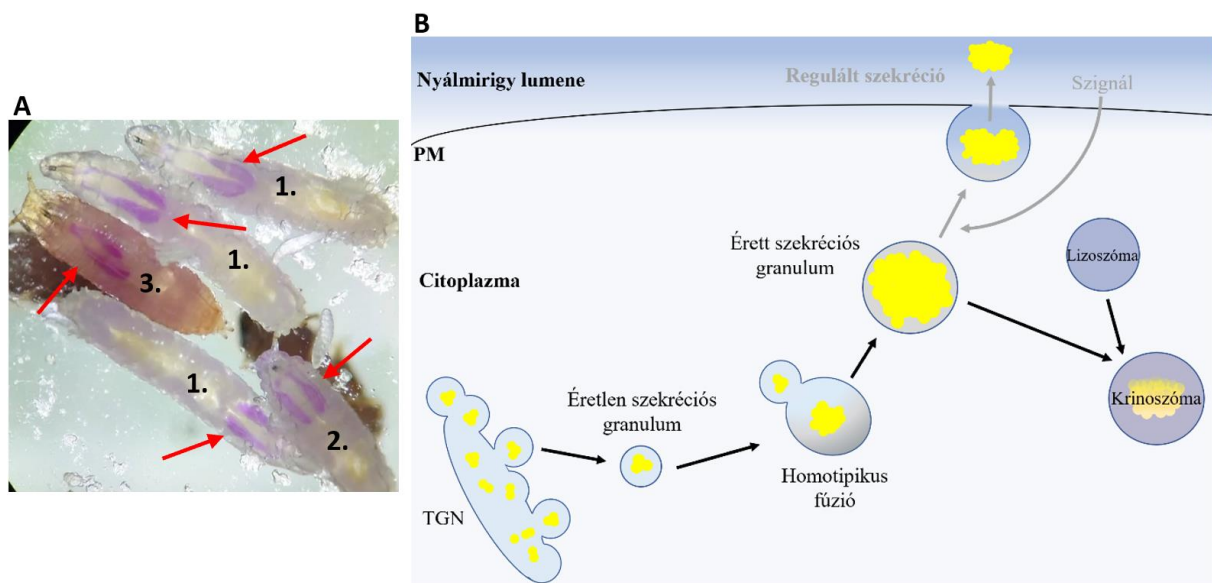
Rövidítés	Angol	Magyar
ATP-áz	Adenosine Triphosphatase	Adenozin-Trifoszfataáz
DsRed	Discosoma sp. red fluorescent protein	Discosoma faj piros fluoreszcens fehérje
ESCRT	Endosomal Complexes Required for Transport	Transzporthoz szükséges endoszómális komplex
fkh	fork head	-
GAL4	Galactose 4 regulon	Galaktóz 4 regulon
GF	Glue Flux	-
GFP	Green Fluorescent Protein	Zölden fluoreszkáló fehérje
-	glue	ragasztó fehérje
GTP-áz	Guanosine triphosphatease	Guanozin-trifoszfataáz
h	hour	óra
HOPS komplex	Homotypic fusion and protein sorting complex	Homotipikus fúzió és fehérje válogató komplex
Hrs	Hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate	Hepatocita növekedési faktor által szabályozott tirozin kináz szubsztát
Lamp1	Lysosomal associated membrane protein 1	Lizoszómához kapcsolódó membránfehérje 1
LR	Lamp-Ring	-
PBS	Phosphate Buffered Saline	Foszfát-pufferelt sóoldat
pH	pondus hydrogenii	-
RNAi	RNA interference	RNS-interferencia
Sgs3	Salivary gland secretion 3	-
Syb	Synaptobrevin	Szinaptobrevin
Syt1	Synaptotagmin 1	Szinaptotagmin 1
Rab 2; 7	Ras-associated binding protein 2; 7	Ras-féle kötő fehérje 2; 7
Snap29; Snap24	soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) protein 29	Oldható N-etilmaleimid érzékeny-faktor Kötő Fehérje Receptor fehérje 29
SNARE	Soluble N-ethylmaleimidesensitive-factor Attachment Protein Receptor	Oldható N-etilmaleimid érzékeny-faktor Kötő Fehérje Receptor
Syx13	Syntaxin 13	Szintaxin 13
TGN	Trans-Golgi Network	Transz-Golgi hálózat
TM	Transmembrane	Transzmembrán
UAS	Upstream Activating Sequence	Feljebb lévő Aktiváló Szekvencia
Vamp7	Vesicle-associated membrane protein 7	Vezikula-asszociált membránfehérje 7
Vha16-1	Vacuolar H ⁺ ATPase 16kD subunit 1	Vakuoláris H ⁺ ATP-áz 16kD alegység 1

Vps16a; Vps26; Vps32	Vacuolar protein sorting 16a; 26; 32	Vakuoláris fehérje válogató 16a; 26; 32
----------------------	---	--

3. Bevezetés

A sejten belüli megannyi organelum és molekuláris partner között végbemenő transzport folyamatok megfelelő működése esszenciális szerepet tölt be az élő szervezetek homeosztázisának fenntartása érdekében. Az általam vizsgált folyamat központjában a szekréciós útvonalak, legfőképp a szabályozott szekréció áll. A regulált szekréciós útvonal adott váladék termelésére és kiürítésére specializálódott sejtekre jellemző, melyek a szervezet számára hasznos anyagokat termelnek, majd szükség esetén azt egy szignál hatására a sejten kívülre juttatják (1, 2).

Ezen folyamat vizsgálatához ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) lárvális és fiatal báb nyálmirigyét használtam (1. A. ábra). Az ecetmuslica metamorfózisa során ekdizon hormon hatására, a lárvális nyálmirigy sejtjeiben mukopoliszacharid tartalmú ragasztóanyag (glue) tartalmú szekréciós granulumok kezdenek kialakulni a transz-Golgi hálózatról (TGN) lefűződő vezikulák révén (1, 3). Ezen váladékszemcsék még éretlen szekréciós granulumok, vagyis átmérőjük csupán 0,05-0,1 μm . A muslica bábozódásához közelebbi időpontban azonban már kevesebb, de jelentősen nagyobb méretű, 2,5-3,5 μm átmérőjű glue granulumok láthatóak a nyálmirigysejtekben, azok egyesülése (homotipikus fúziója) révén (1. B. ábra) (4). A bábozódás előtt pár órával a sejtekből ekdizon hormon impulzusra, merokrin szekrécióval a nyálmirigy lumenébe kerül ez a speciális glikoprotein tartalmú váladék. Ezt követően, a bábozódás pillanatában a nyálmirigy kivezetőcsövén keresztül ürül a homogén váladék a külvilágba, a báb és az adott felület közé, ahova odatapasztja magát a muslica, ami tehát a megfelelő, nyugodt környezetet biztosítja az imágó kifejlődése számára (2, 5). A nyálmirigy és ezáltal a sejtekben maradt glue granulumok lebontása egy kevésbé ismert autofág folyamat, krinofágia révén zajlik le. A folyamat során a sejtben maradt váladékszemcsék savas belterű, savas hidroláz tartalmú lizoszómákkal egyesülve, ezáltal krinoszómákat létrehozva degradálódnak (1. B. ábra). A krinofágia tehát egy fejlődésgenetikailag meghatározott módon zajlik le a muslicák nyálmirigysejtjeiben (5).



1. ábra: Az ecetmuslica posztembrionális fejlődése során a lárvális (A;1.), korai (A;2.) és késői báb (A;3.) nyálmirigy sejtjeiben lezajló, váladékszemcsékhez kötődő főbb folyamatokat mutatom be. A lárvális nyálmirigy sejtjeiben a TGN-ről lefűződő szekréciós granulum kezdemények egymással való egyesülése révén eléri a megfelelő fejlettségüket és méretüket a szekrécióhoz, amikor a bábozódáshoz szükséges szekréció kijut, kezdetben a nyálmirigy lumenébe, majd az állat és az adott felület közé. Később a sejtben maradt szekréciós granulumok lizoszómákkal történő egyesülés révén degradálódnak (krinofágia) (B).

A krinofágiát 1966-ban fedezték fel, amely elsősorban a sérült, előregedett vagy feleslegessé vált szekréciós granulumok eliminálásának egyik fő formája. A krinofágia folyamatát szabályozó legelső molekulákat megfelelő modellrendszer hiányában azonban csak később 2018-ban írták le (5). Felfedezték a folyamathoz szükséges kis GTP-ázokat (Guanozin-triphosphatase), a Rab2-t és a Rab7-et (Ras-associated binding protein 2; 7), melyek a HOPS (Homotypic fusion and protein sorting) pányvázó komplex fehérjepartnereinek toborzásához szükségesek. Végül a Syntaxin 13 (Syx13, Snap29 és Vamp7 tartalmú SNARE (Soluble N-ethylmaleimidesensitive-factor Attachment Protein Receptor) komplex is elengedhetetlennek bizonyult a lizoszómák és a glue tartalmú szekréciós granulumok fúziója során (5). Fontos továbbá megemlíteni, hogy társszerző lehettem egy olyan 2022-es publikációban, melyben a fejlődési programtól függetlenül aktiválódó, korai krinofágiát vizsgáltuk ecetmuslicák nyálmirigyjeiben. A retrográd transzportot akadályozva gátoltuk bizonyos anyagok visszajutását az endoszómákból a TGN-be, ezáltal már a lárvális nyálmirigy sejtjeiben elsavasodnak a szekrécióra képtelen, rendkívül apró, éretlen fejlődési stádiumban rekedt váladékszemcsék. Korábbi tanulmányokban leírták már, hogy a váladékszemcsék normál érési folyamataikhoz nélkülözhetetlen a rendben zajló retrográd transzport (6). Ezenfelül egy glue granulum membránon megtalálható fehérje (ami az exocitózishoz és a retrográd transzporthoz szükséges R típusú SNARE komponens), a Szinaptobrevin (Syb) lokalizációját is megvizsgáltuk. Normál

muslica nyálmirigy sejtekben a Syb a lárvális állapotban még a granulumokon kimutatható, azonban fiatal báb állapotukban már lekerül a váladékszemcsék membránjáról azok lebontása során (7).

A fentebb említett muslica nyálmirigyben lezajló folyamatok további megértése céljából érdekesnek tartottam, egy még nem vizsgált folyamat, a szekrécióhoz szükséges, váladékszemcséken lévő membránfehérjék eltávolítását és későbbi lebontását megfigyelni. Ezen kutatáshoz egy többnyire az idegtudományból ismert, szinaptikus vezikulák exocitózisában részt vevő, kalciumszenzor fehérje, a Szinaptotagmin vizsgálatát (Syt1) tűztem ki célul (8). Továbbá az exocitózishoz nélkülözhetetlenek a SNARE fehérjék is, ezért egy, a szekréciós folyamatokból már jól ismert Qbc típusú SNARE-t, a Snap24 membrán asszociált fehérjét is megvizsgáltam abból a szempontból, hogy azok milyen módon kerülhetnek le a ki nem ürült, tehát sejtben maradó váladékszemcsék membránjáról a szekréció végeztével. Egy 2018-as publikációban megfigyelték, hogy a Syt1 és a Snap24 fehérjéket késői endoszómák bontják le *hobbit* (amely egy endoplazmás retikulum fehérjét kódoló gén) mutáns muslicákban, melytől az állatok fejlődése is komoly zavart szenved és emiatt kisebb testméretet eredményez (9). Azonban ezen membránfehérjék lebontásához szükséges más útvonalakat, illetve esetleges molekuláris partnereket nem ismerünk.

Ahogy említettem a szekréciós granulumok ecetmuslica fiatal bábok nyálmirigyében krinofágia útján degradálódnak, így elképzelhető ezen folyamat szerepe a szekrécióhoz elengedhetetlen membránfehérjék eltávolításának esetében is. Kutatásaim során kíváncsi voltam tehát, hogy a szekrécióhoz szükséges membránfehérjék milyen módon távolítódnak el a sejtben maradó váladékszemcsék membránjáról. Krinoszómává kell-e alakuljanak a szekréciós granulumok, hogy a szekrécióhoz nélkülözhetetlen membránfehérjék is eltávolításra és lebontásra kerüljenek? Ha igen, szükségesek lehetnek-e ehhez a már jól ismert lizoszómákhoz köthető mechanizmusok (multivezikuláris lizoszómák képződése, lizoszóma reformáció), ha nem, milyen más folyamatok szabályozhatják? Éppen ezért fontosnak tartom ezen folyamatokhoz köthetően a szekréciós granulum-lizoszóma fúzióban feltárt gének vizsgálatát (HOPS komplex alegységeit kódoló gének, Syx13, Snap29, Rab7), valamint az ESCRT komplex (endosomal complexes required for transport) (Hrs, Vps32) lehetséges szerepét felderíteni a folyamatban. Az ESCRT komplex ugyanis a késői endoszóma/lizoszóma membránját úgy hajlítja meg, hogy azok belsejébe kisebb vezikulák formájában fel tudják venni a lebontásra szánt citoplazmatikus anyagokat, illetve az endoszóma/lizoszóma membránkomponenseit, ezzel multivezikuláris endoszómákat létrehozva (10). Emellett a lizoszóma reformációban szerepet játszó retromer komplex szerepének vizsgálatát is célul

tűztem ki. Egy 2021-ben a retromer komplex (Vps26) szerepét vizsgálva *Drosophila* lárvális nyálmirigyben megfigyelték ugyanis, hogy Szinaptotagmint képes reciklizálni a glue granulumok felszínéről, hogy azok részt vegyenek az újabb váladékszemcsék kialakításában (11).

A felsorolt folyamatok megértése mellett, megemlítem az orvosbiológiai relevanciáját ezen kutatásoknak. Kiemelném a krinofágia működésével összeköthető diabéteszt és a jelenleg is igen súlyos problémát okozó, ma még gyógyíthatatlan Crohn betegséget és a nagy mortalitású akut pancreatitist (12).

4. Célkitűzések

Elsősorban szeretném beazonosítani a folyamatot, ami által a szekréciós granulumok exocitózishoz szükséges membránfehérjének delokalizációja történik azok membránjáról, a merokrin szekréciót követően. A váladékszemcsék lizoszómává alakulva, a szekréciót követően már nem tartalmazzák a szekrécióhoz nélkülözhetetlen membránfehérjéket, így a krinofágia egy potenciális mechanizmus lehet ezen fehérjék eltávolítására is. Ehhez a Szinaptotagmin, egy a granulumok membránján fellelhető fehérje lokalizációjának változását fogom megfigyelni és nyomon követni a krinofágiához szükséges molekuláris partnerek csendesítése folyamán. Továbbá esszenciális megvizsgálni más lehetséges lizoszómához köthető folyamatok szerepét a membránfehérjék eltávolítása során. Valamint elengedhetetlennek tartom a további, szekréciós granulumok membránján előforduló fehérjéknek a eltávolítódását is feltérképezni, illetve nem csak túltermelt törzseket használni, hanem esetleg immunfestéssel is megfigyelni a membránfehérje lokalizációját. Fontos kérdés továbbá, hogy mi lesz ezeknek a membránfehérjéknek a sorsa a sejtben a szekréció végeztével: reciklizálódnak, vagy degradálódnak?

5. Anyagok és módszerek

5.1. *Drosophila melanogaster* törzsek

Sgs3-GFP (Glue-GFP)^{5884, 5885}, Sgs3-DsRed (Glue-Red), UAS-GFP-Lamp1, fkh-GAL4. További törzsek a Bloomington *Drosophila* Stock Center-ből: AB1-GAL4¹⁸²⁴, UAS-Syt1-GFP⁶⁹²⁶, UAS-mCD8-GFP⁵¹³⁷, Snap29^{JF25862}, Vps16a^{GD23769}, Vha16-1^{GD49290}, Hrs^{JF28026},

Vps26^{GD18396}. Valamint a Vienna *Drosophila* Resource Center-ből: Syx13^{GD8361}, Vps32^{KK106823}(5).

Az állatokat élesztő és kukoricaliszt keverékéből előállított táptalajon, tenyésztőcsövekben 25 °C-on tartottam. Következtetéseimet minden vizsgált genotípusból minimum 7 pár *Drosophila* nyálmirigy megfigyelése alapján tettem. A muslicák nyálmirigyét különböző időpontjukban vizsgáltam meg, az általam -6h-ásnak jelölt állatok, bábozódásuk előtt körülbelül 6 órával lettek megfigyelve, ezen állatok már a táptalajból előbújtak és az üvegcső falára másztak. Továbbá megfigyeltem -2h-ás, a muslica bábozódása előtt körülbelül 2 órával megegyező nyálmirigyeket, ezen állatok már egyhelyben tartózkodva láthatóak az üveg falán, boncolás után pedig látható nyálmirigyük lumenében a glue. A 0h-ás állatoknak a fehér bebábozódott egyedeket vettem, illetve még 2h-ás nyálmirigyét is megfigyeltem, ezen állatokat bebábozódáskor megjelöltem és 2 óra elteltével vizsgáltam őket.

5.2. Fluoreszcens riporterrendszerek

Az UAS-transzsgént tartalmazó fehérjemarkerek és a túltermelt törzsek kifejeződése érdekében, egy nyálmirigy specifikus, GAL4 transzsgént használok. A GAL4 az UAS enhanszere, tehát ahogy a GAL4 az UAS-hez kötődik, az UAS-t követő gének elkezdenek átíródni.

A szekréciós granulumok savasodását követő Glue Flux (GF) rendszer, ennek genotípusa: Sgs3-GFP (Glue-GFP), Sgs3-DsRed (Glue-Red); valamint egy nyálmirigy specifikus GAL4 forrás. Lárvális muslica nyálmirigy sejtekben a glue granulumok mind GFP-re és mind DsRed-re pozitívak lesznek, ezek a kompozit képeken fehér színnel mutatkoznak meg. Azonban az állat bebábozódása után a pH érzékeny GFP jele kioltódik a lizoszóma savas hidroláz hatásától, a granulumokkal való fúziója következtében, ezért innentől kezdve már csak DsRed-re lesznek pozitívak.

A szekréciós granulum lizoszómával történő fúzióját követő rendszer, a Lamp Ring (LR) genotípusa: Sgs3-GFP, UAS-GFP-Lamp1; valamint egy nyálmirigy specifikus GAL4 forrás. A muslicák nyálmirigy sejtjeiben bábozódásuk előtt 2 órával (-2h) kezdődik el a granulum-lizoszóma fúzió, ekkor a GFP-Lamp1 gyűrűk jelennek meg a váladékszemszék membránját kijelölve, utalva a sikeres késői endoszóma/lizoszóma fúzióra. Mivel a Lamp1 C-terminálisán található a GFP, a krinoszóma membránjában így a luminális oldal felé tekint, ezáltal bábokban

már nem fog látszódní a gyűrű a GFP levágódása és reverzibilis inaktiválódása végett, a krinoszómákban.

Az állandó (referencia) szekréciós granulumok membránját kijelölő fehérje rendszer és annak genotípusa: Sgs3-DsRed (Glue-Red); UAS-mCD8-GFP, fkh-GAL4. A muslica bábozódása előtt 6, illetve 2 órával (-6h, -2h) és annak bábozódásakor (0h), valamint bábozódása után 2 órával (2h) is folytonos lokalizációt láthatunk a kontroll nyálmirigyek sejtjeiben a váladékszemcsék körül.

A váladékszemcsék exocitózisához szükséges granulum membránfehérje rendszere és genotípusa: Sgs3-DsRed (Glue-Red); UAS-Syt1-GFP, valamint egy nyálmirigy specifikus GAL4 forrás. A glue granulumok körül gyűrűt alkot a Szinaptotagmin 1 (Syt1) -6h-ás és -2h-ás állatok nyálmirigyében, ezzel szemben 0h-ás és 2h-ás ecetmuslicában már nem található meg a váladékszemcsék membránján.

5.3. Mintaelőkészítés és képalkotás

Az adott genotípusú és megfelelő stádiumú *Drosophila melanogaster* állatokat Zeiss Stemi DV4 sztereomikroszkóp alatt boncoltam, 20% formaldehidet tartalmazó PBS-ben (Phosphate Buffered Saline). Ezt követően minimum 10 percig hagyom 9:1 arányú PBS-10% Triton és a hozzáadott 1:100 Hoechst (magfestés) elegyben, majd lefedem.

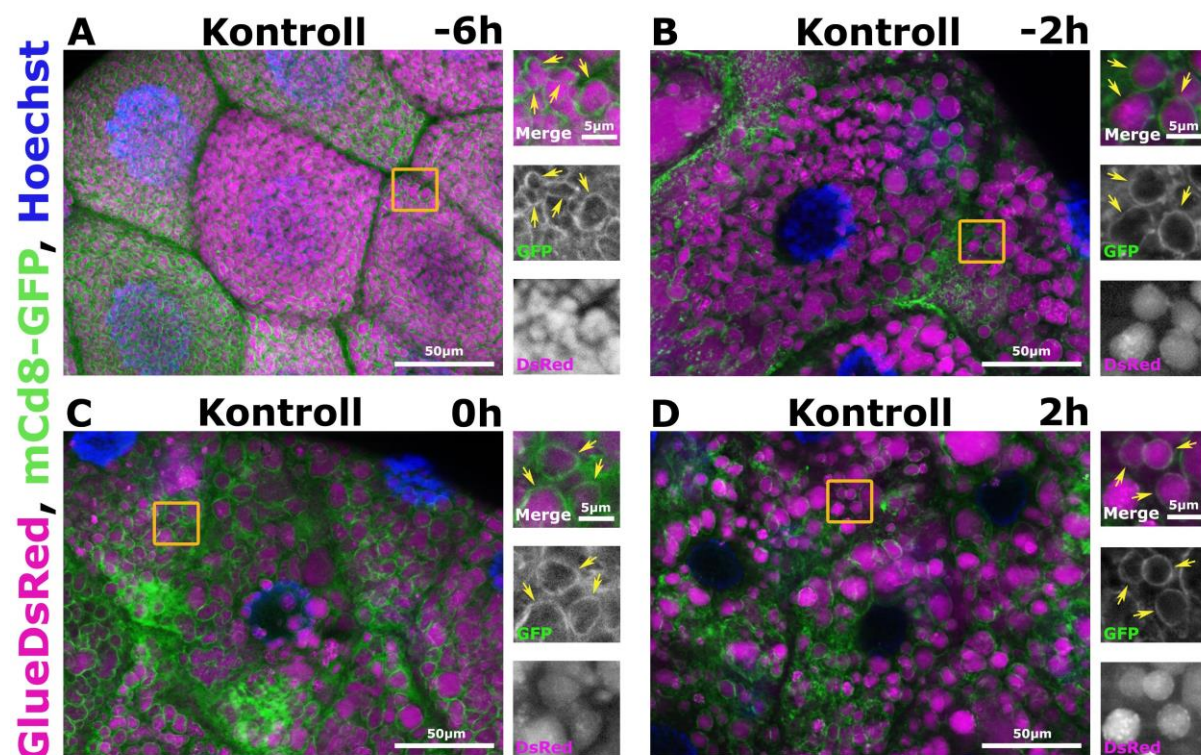
Az immunfestéshez PBS-ben boncoltam Sgs3-GFP; egy nyálmirigy specifikus GAL4 forrás és Sgs3-DsRed; fkh-GAL4 genotípusú ecetmuslicákat, majd 0,05%-os PBTX-Doc (1:1 arányú 0,1%-os PBTX-Doc (0,1% Triton x-100, 0,05% nátrium-deoxikolát PBS-ben oldva) + PBS) oldatba helyeztem őket, ezután 3x PBS-el öblítettem és 4%-os formaldehid-PBS oldatban fixáltam 40 percig. Az idő leteltével újból PBS-el öblítettem és mostam át a mintákat, majd 1 órán át blokkoltam 10%-os FCS-PBTX-Doc-ban. Ezt követően a mintákat áttettem az előbb említett oldatba, ami már tartalmazta az elsődleges antitestet is (1:50 anti-Rabbit Snap24) (13) és 4 °C-on 2 éjszakán keresztül tároltam. A két éjszaka letelte után, friss 0,1%-os PBTX-Doc oldatba tettem és ezzel öblítettem át a mintákat, majd 30 percig blokkoltam 10%-os FCS-PBTX-Doc-ban. Utána 3 órát hagytam a másodlagos antitestet tartalmazó blokkoló oldatban (1:1000 anti-Rabbit-Red). Az idő leteltével PBTX-Doc öblítés után, 15 percig 4%-os NaCl, 0,1%-os PBTX-Doc és Hoechst elegybe rakom, végül 0,1%-os PBTX-Doc, majd PBS öblítés és mosás után fedem le a mintákat.

Utána Carl Zeiss AxioImager Z1 ApoTome-mal felszerelt epifluoreszcens mikroszkóp 40x-es nagyítású EC Plan-NeoFluar objektívét használtam, majd AxioVision 4.8.2 szoftverrel tettem láthatóvá a felvételeket.

6. Eredmények

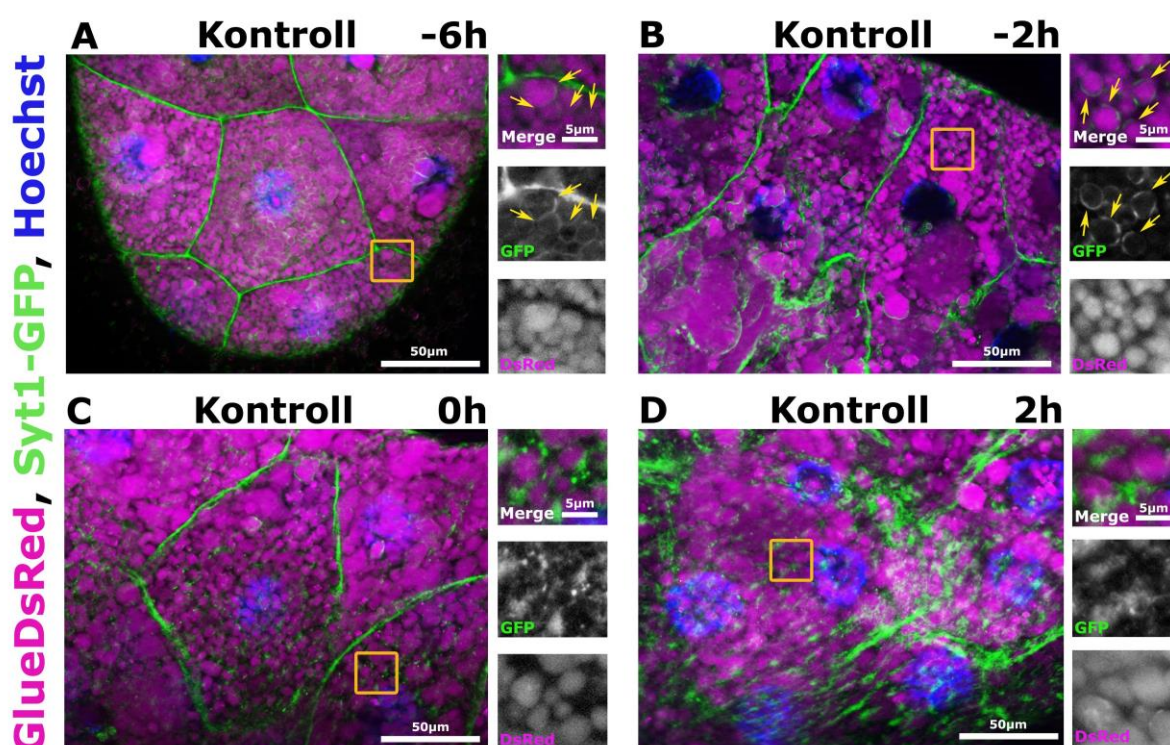
6.1. Az mCD8 referenciafehérje és a Szinaptotagmin jelenlétének vizsgálata a szekrécións granulumok membránján

A szekrécións granulum membránfehérjék lebontásának megfigyeléséhez, alkalmaztam egy referencia transzmembrán markert, az mCD8-at, amely kijelöli a membránokat (így az intakt és a lebomló váladékszemescsék membránját is) a sejtekben. Létrehoztam egy vizsgálati rendszert, melyben az mCD8 GFP-vel, a glue granulumok pedig DsRed markerrel vannak megjelölve. Az mCD8 a kontroll *Drosophila* nyálmirigy sejtekben a szekrécións granulumokat jelöli ki. Látható ahogy különböző fejlődési stádiumokban kimutatható az mCD8 a glue granulumok membránján. A szekrécións granulumok krinofágia általi lebontásának ellenére (5) a vándorló, késői lárvális (2. A. és B. ábra) és a fiatal bábok állapotában (2. C. és D. ábra) is megmarad a mCD8 gyűrű.



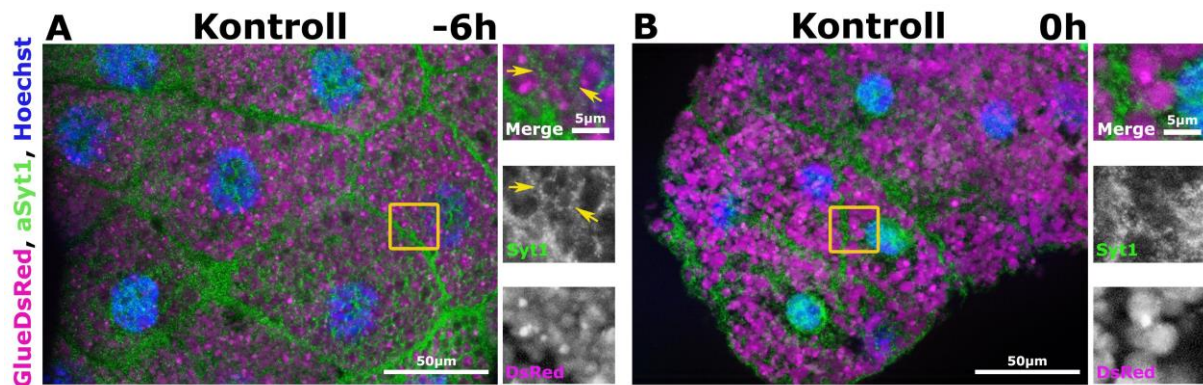
2. ábra: A zölddel jelölt humán mCD8 láthatóan kirajzolja a DsRed pozitív intakt és a degradálódó szekrécións granulumok membránját (sárga nyíl) kontroll muslica nyálmirigy sejteiről készült idősorozatban (A-D).

Készítettem egy *Drosophila* konstrukciót, az előzőhöz hasonlóan, csak ez esetben a Szinaptotagmin 1-el (Syt1), amelyről tudjuk, hogy szükséges a váladékszemcsék fejlődéséhez és ürítéséhez is. Ebben a rendszerben a Syt1-GFP-vel, a glue granulumok pedig DsRed-el látszódnak. Az mCD8-al ellentétben a Syt1 szekréciónak szükséges membránfehérje az ürítés előtti időpontig, a vándorló és késői lárvális nyálmirigyben lokalizál a váladékszemcsék felszínén (3. A. és B. ábra). Az mCD8-al ellentétben a szekréciónak szükséges granulumok exocitózisa után, tehát a muslica bábozódásakor és utána, már nem található meg azok membránján a Syt1 fehérje (3. C. és D. ábra).



3. ábra: A zölddel jelölt exocitózishoz szükséges membránfehérje, a Szinaptotagmin 1 (Syt1) kirajzolja a DsRed jelölt glue granulumok membránját kontroll vándorló muslica nyálmirigy sejtjeiben (sárga nyíl) (A, B). Azonban a bábok nyálmirigy sejtjeiben már nem látható zöld Syt1 gyűrű a granulumok körül (C, D).

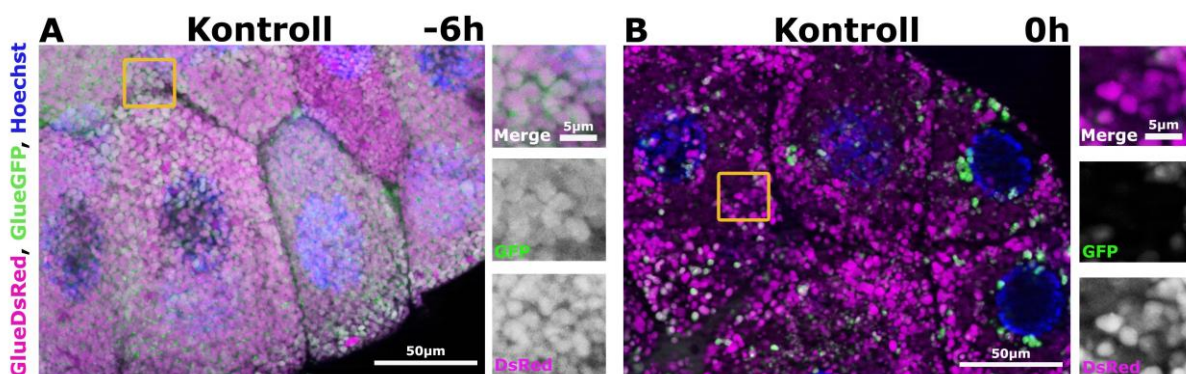
Mivel a fentebb bemutatott rendszerben a Syt1-GFP túl van termelve a mirigysejtekben, ezért szükségesnek láttam, hogy az endogén Syt1 lokalizációt immunfestéssel is ellenőrizsem. Láthatóan a lárvális nyálmirigy sejtek (-6h) váladékszemcséin kimutatható az endogén Syt1 (4. A. ábra), azonban bábozódás pillanatában (0h) már nem láthatóak (4. B. ábra).



4. **ábra:** Immunfestés által zölddel jelölt Szinaptotagmin 1 (Syt1) lokalizációja figyelhető meg a glue granulumok körül (sárga nyíl) kontroll lárvális nyálmirigyben (A). Mindazonáltal a Syt1 gyűrű már nem látható a DsRed jelölt granulumok körül kontroll báb nyálmirigyében (B).

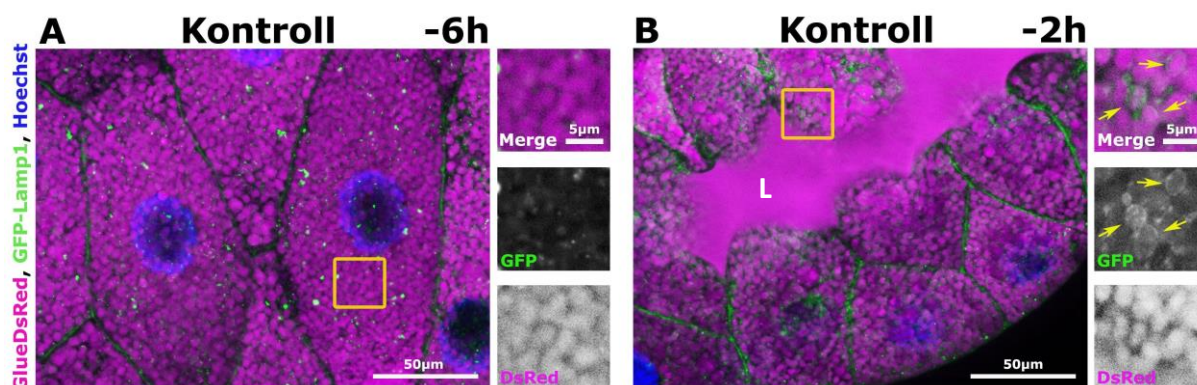
6.2. Potenciális szekréciós granulum membránfehérje lebontó folyamatok vizsgálata

Szeretném elsősorban a krinofágia megfelelő működéséhez szükséges fehérjéket bemutatni, ehhez azonban először is bemutatnom a krinofágia normál mechanizmusát a kontroll nyálmirigyekben. A krinofágia során a degradálódó váladékszemcsék elsavasodását vizsgáló rendszereként a Glue Flux-ot (GF) mutatom be. A glue váladék GFP és DsRed markerrel is rendelkezik, így vándorló (-6h)-ás lárvák nyálmirigyében ezek a kompozit képeken fehéres színnel láthatóak (5. A. ábra). A muslica bábozódásakor (0h) a sejtben maradó szekréciós granulumok lizoszómákkal egyesülve bontódnak le és ezen lizoszomális enzimek miatt, a savas pH-n a GFP marker kioldódik, így csak DsRed-el látszódnak a krinoszómák (5. B. ábra).



5. **ábra:** A Glue Flux (GF) fluoreszcens riporterrendszer idősorozata kontroll muslica nyálmirigyben. A muslica bábozódása előtt 6 órával (-6h) a glue granulumok GFP-DsRed kettős pozitivitást mutatnak (A). Ellenben a bábozódás pillanatában (0h) többnyire már csak DsRed jelölt granulumok láthatóak, mivel a GFP kioldódott a lizoszóma savas pH-jának hatására (B).

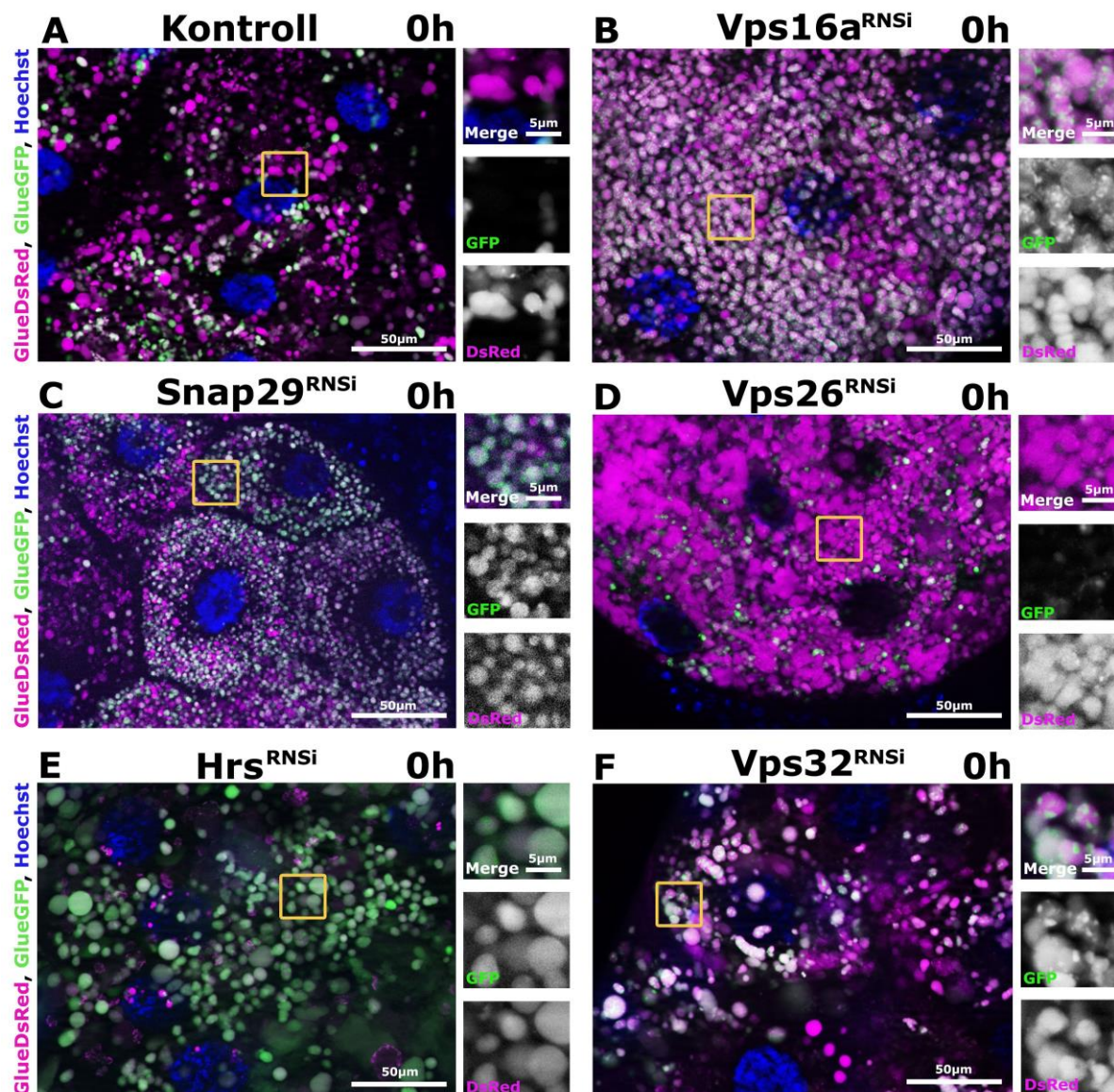
A krinofágia folyamata még inkább jobban követhető egy másik rendszerrel, az általunk Lamp Ringnek nevezett rendszerrel (LR). Ezzel jobban figyelhető maga a lizoszóma-granulum fúziója, ugyanis a Lamp1-GFP jelzi a lizoszómák membránját, amely a granulumokkal történő fúzió után, azok felszínén gyűrűt rajzol ki. Kontroll -6h-ás állatok nyálmirigy sejtjeiben a DsRed jelölt granulumok körül még nem alakult ki a GFP-Lamp1 gyűrű, amely a késői endoszómákat/lizoszómákat jelöli, ugyanis a krinofágia még nem indult be (6. A. ábra). Ellenben bebábozódás előtt mintegy 2 órával (-2h) már megjelennek a GFP-Lamp1 gyűrűk a váladékszemcsék körül, jelezve a szekréciós granulum-lizoszóma fúzió, azaz a krinofágia folyamatát (6. B. ábra).



6. ábra: A Lamp Ring (LR) fluoreszcens riporterrendszerben a glue granulumok DsRed-del, a késői endoszómák/lizoszómák membránja pedig GFP-Lamp1-el van megjelölve, melynek idősorozata látható kontroll muslica nyálmirigyben. A vándorló lárvákban még nem alakulnak ki zöld gyűrűk a granulumok körül (A), azonban azon nyálmirigy sejtekben, ahol már a nyálmirigy lumenébe (L) szekretálódott a granulumok egy részének beltartalma, de még nem került kiürítésre a külvilágba (-2h), már megfigyelhető a zöld Lamp1 gyűrű (sárga nyílak) (B).

A továbbiakban bemutatom, hogy a krinofágiához szükséges gének csendesítése során milyen fenotípust láthatunk, illetve a retromer és az ESCRT komplex esetében, hogy milyen hatással vannak erre a lebontó folyamatra. A GF rendszert tehát összekeresztettem első körben a korábban már azonosított krinofágiához szükséges molekuláris partnerek közül egy nem HOPS specifikus alegység, a Vps16a (Vacuolar protein sorting 16A) (7. B. ábra) és egy SNARE, a Snap29 (7. C. ábra) RNS interferenciát (RNSi) tartalmazó törzsekkel. Látható, ahogy a kontrolltól eltérően nem savasodnak el a 0h-ás bábokból kiboncolt nyálmirigyekben a szekréciós granulumok, hanem továbbra is fehéres színűek a kompozit képeken, ugyanis a krinofágia általi lebontást akadályoztam meg ezekkel. Más potenciális membránfehérje delokalizáló folyamat vizsgálatához az ESCRT komplexet vizsgáltam, illetve a membrán reciklizációban is szereplő retromer komplexet. Megfigyeltem a Vps26-ot (Vacuolar protein sorting 26), amely a retromer komplex egyik esszenciális alegysége, ezesetben a kontrollhoz hasonló módon savasodtak el a glue granulumok (7. D. ábra). Továbbá két ESCRT komplex

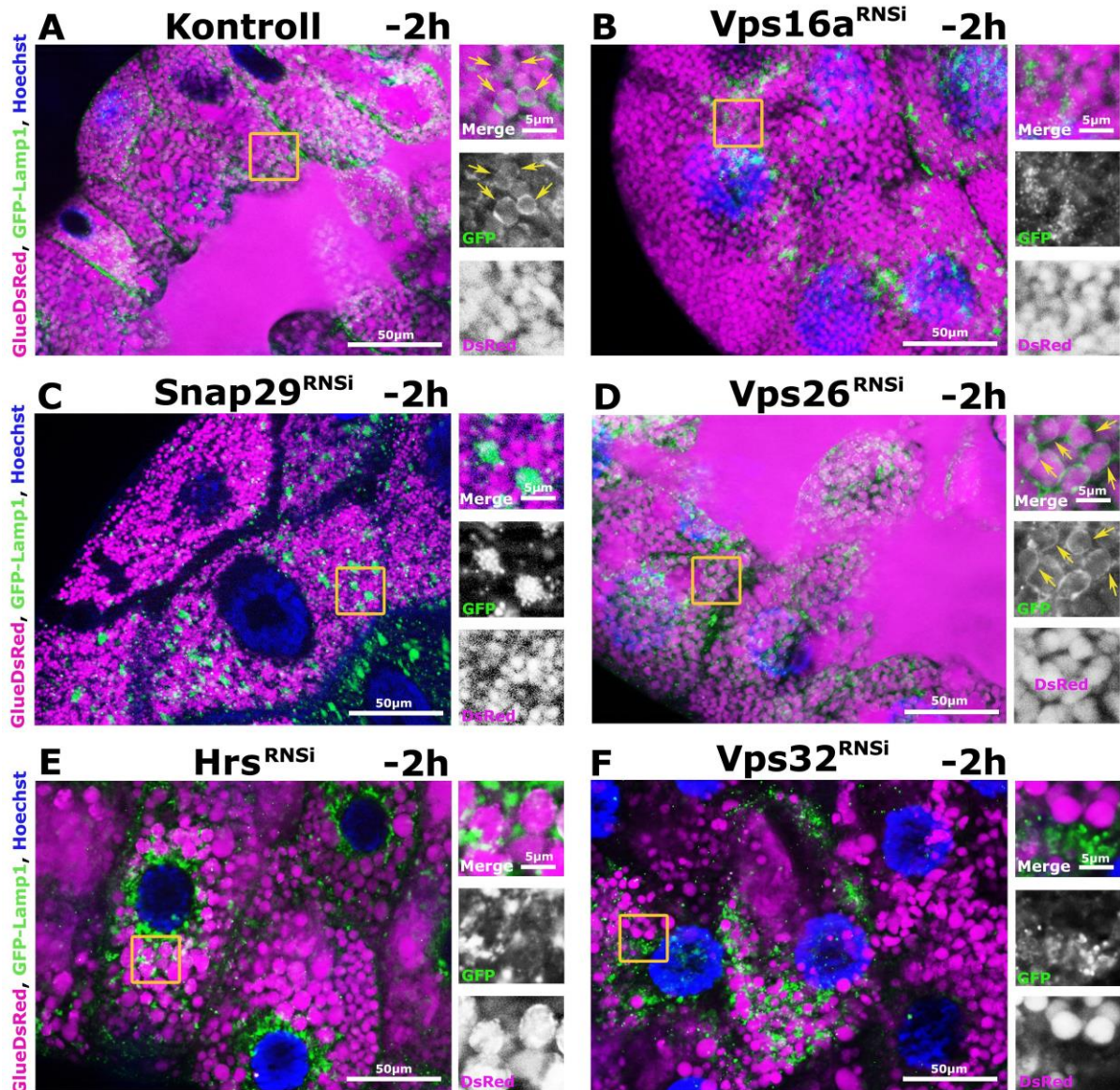
alegységet kódoló gént is leteszteltem, a Hrs-t (Hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate) és a Vps32-t (Vacuolar protein sorting 32) a GF rendszerrel és meglepő módon ebben az esetben savasodásbeli defektust láthatunk. Ebből következik, hogy a Vps16a, a Snap29, a Hrs és a Vps32 csendesítése során hibát szenved a krinofágia lebontás folyamata.



7. **ábra:** A GF rendszer kontroll 0h-ás báb esetében (A), és különböző RNS interferenciák keresztezésével (B-F). A krinofágiához szükséges fehérjék, a Vps16a (B) és a Snap29 (C) nem megfelelő működése láthatóan savasodási defektust okoz. Azonban kontrollhoz hasonlóan, már csak DsRed pozitívak a krinoszómák a Vps26 RNSi esetében (D), tehát a retromer komplex nem tűnik szükségesnek a krinofágiához. Ellenben az ESCRT komplex elemei, a HRS (E) és a Vps32 (F) is úgy tűnik savasodási defektust okoz, és szerepet játszanak a granulumok lebontásában.

Az előbb említett géncsendesítéseket megvizsgáltam az LR rendszerrel is. A Vps16a (8. B. ábra), Snap29 (8. C. ábra), ahogy azt már korábban leírták a GFP-Lamp1 pozitív gyűrűk megjelenése helyett a granulumok körül annak pontszerű felhalmozódását tapasztaltam. Meglepő és eddig nem ismert módon a Hrs (8. E. ábra) és Vps32 RNSi (8. F. ábra) esetében is

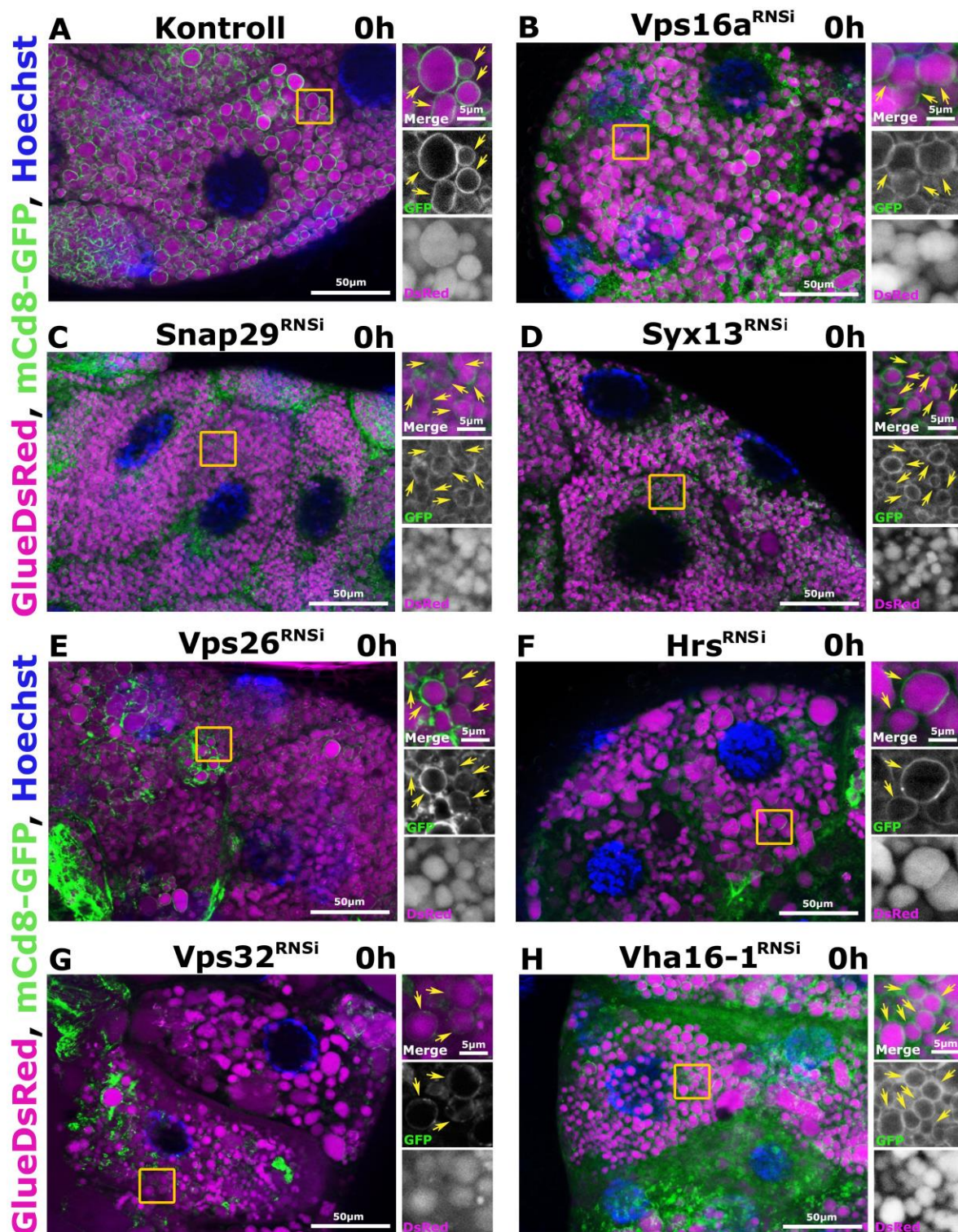
a kontrolltól eltérő eredményt láthatunk a -2h-ás állatok nyálmirigysejtjeiben. Tehát a felsorolt gének csendesítése során nem alakulnak ki a GFP-Lamp1 gyűrűk a váladékszemcsék körül, hanem feltorlódnak a citoszolban, a váladékszemcsék körül, vagyis a szekréciós granulum-lizoszóma fúzió sérül (8. ábra). A Vps26 RNSi (8. D. ábra) esetében ismét a kontrollhoz hasonló eredményt láthatunk, GFP-Lamp1 gyűrűk találhatók a glue granulumok körül, tehát a Vps26 nem szükséges a krinofágia folyamatához, így ezt a fehérjét a továbbiakban csak a reciklizáció szempontjából vizsgálom.



8. ábra: A LR rendszer kontroll -2h-ás lárvális muslica nyálmirigy sejtek (A) összehasonlítva több RNS interferencia keresztezéssel (B-F). A Vps16a (B), Snap29 (C), Hrs (E) és Vps32 (F) esetében nem alakulnak ki gyűrűk, így a granulum-lizoszóma fúzió sérül. A Vps26 RNSi-t (D) alkalmazva azonban a kontrollnak megfelelően kialakulnak a GFP-Lamp1 gyűrűk.

A továbbiakban az mCD8 rendszerrel figyeltem meg a krinofágiához, ESCRT-hoz és a retromer komplexhez kapcsolódó gének csendesítése utáni fenotípusokat, ugyanis szerettem

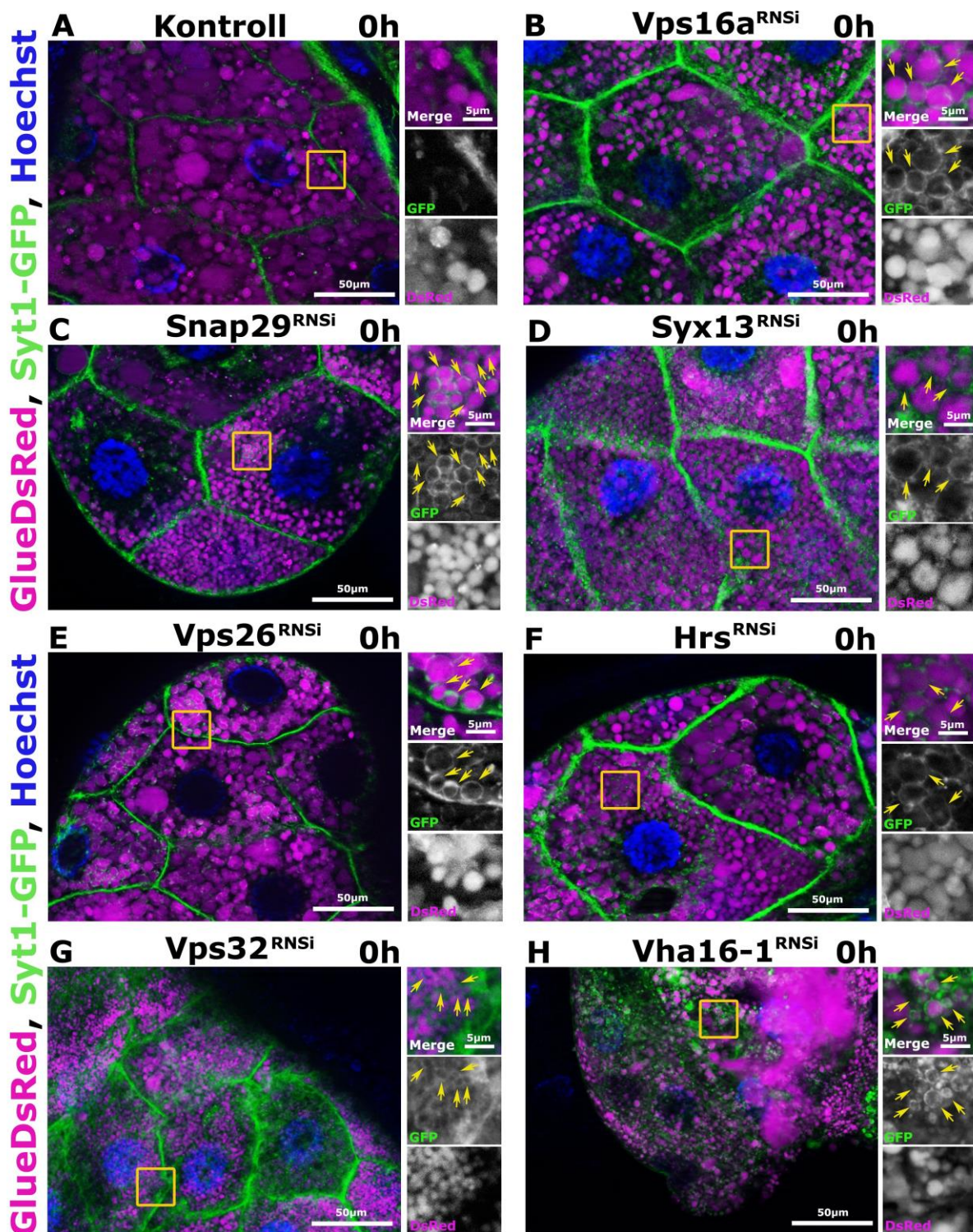
volna prezentálni az általam használt géncsendesítések fenotípusát egy referenciafehérjével, az összehasonlítás elősegítése céljából. Ezesetben 0h-ás állatokat vizsgáltam a krinofágiához szükséges gének csendesítése során, ehhez Vps16a-t (9. B. ábra), Snap29-et használtam (9. C. ábra) és megvizsgáltam még egy másik SNARE komplex génnel, a Syx13-al (9. D. ábra). A Syx13-at azért választottam, mivel úgy gondoltam a lehetséges krinofágia általi lebontást jobban támasztaná alá még egy, az említett folyamathoz szükséges fehérje csendesítés fenotípusának bemutatása. Keresztettem ugyanúgy a Vps26-al (9. E. ábra), a Hrs-el (9. F. ábra) és a Vps32-vel (9. G. ábra). Ezenfelül Vha16-1 (Vacuolar H⁺ ATPase 16kD subunit 1) RNSi törzssel is megfigyeltem az mCD8 rendszert, a lizoszómális lebontás ellenőrzése végett. A Vha16-1 egy vakuoláris hidrogén ATP-áz (Adenosine Triphosphatase), ami az anyagok lebontásában játszik szerepet. A kontrollnak megfelelően (9. A. ábra), egyik csendesítés során sem került le az mCD8 a granulumok membránjáról (9. ábra).



9. **ábra:** A humán mCD8-GFP jelenléte a kontrollnak (A) megfelelően kirajzolja a DsRed jelölt szekréciós granulumok membránját (sárga nyíl) a fentebb bemutatott gének csendesítése (RNSi) ellenében is (B-H).

A fentebb felsorolt géncsenedesítésre alkalmas törzseket összekeresztettem a Syt1 rendszerrel is, hogy megfigyeljem a Szinaptotagmin jelenlétét a granulumokon a különböző fehérjék működésének korlátozása mellett. Meglepő módon minden említett gén csendesítése

során, a 0h-ás kontrolltól eltérően megmaradtak a Syt1 gyűrűk a granulumok körül (10. ábra). Ez azt jelenti, hogy a krinofágia molekuláris partnerei, tehát maga a folyamat, az ESCRT és a retromer komplex is szerepet játszhat a szekréciónak szükséges Szinaptotagmin granulumokról való eltüntetésében és később azok lebontásában.



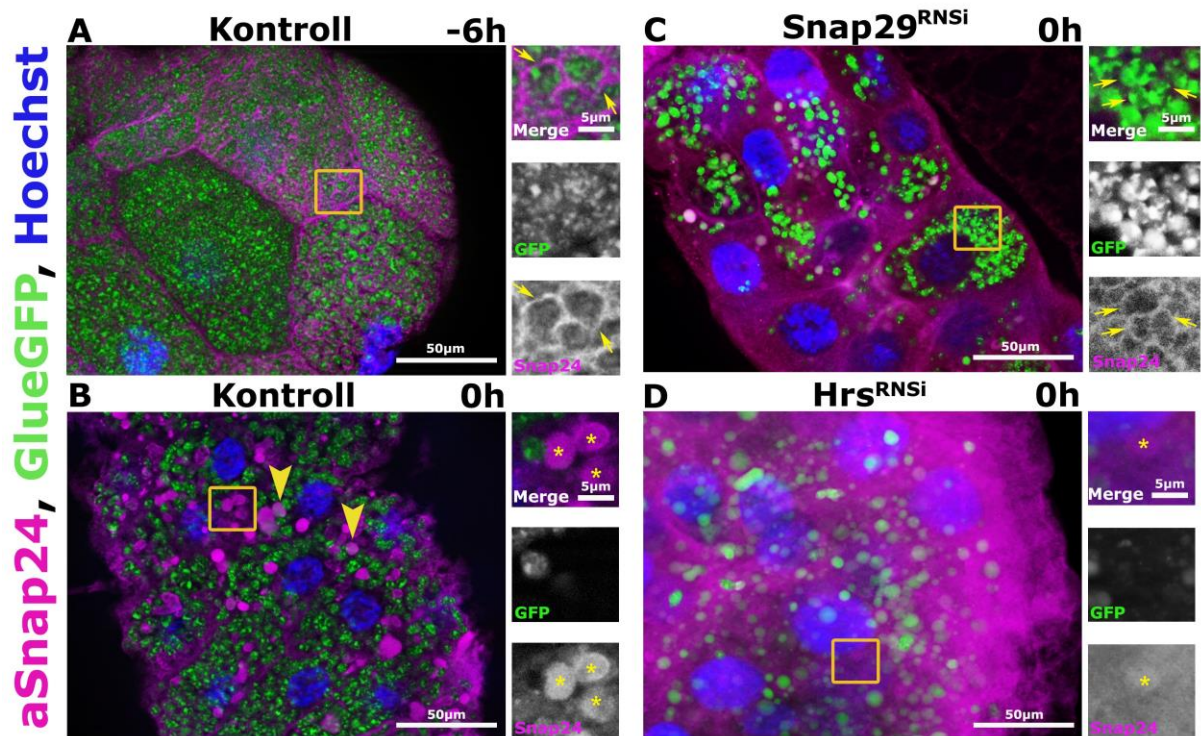
10. ábra: Az exocitózishoz szükséges Szinaptotagmin 1 (Syt1) a kontroll (A) báb muslica nyálmirigytől eltérően kialakít gyűrűket a glue granulumok körül (sárga nyíl) a különböző RNS interferenciák (RNSi) alkalmazásánál (B-H).

6.3. A szekréciós granulum membrán asszociált Snap24 lokalizációja

Megvizsgáltam egy másik, a váladékszemcséken megtalálható membrán asszociált fehérje, a Snap24 lokalizációját is, mivel egyrészt ez nincs túltermelve, másrészt meg szerettem volna vizsgálni több, szekrécióhoz szükséges fehérje sorsát is, harmadrészt pedig ez a fehérje a Syt1-el ellentétben nem tartalmaz TM domént. Immunfestéssel pirossal jelöltem a Snap24-et, illetve a glue granulumok ez esetben GFP-vel látszódnak. A kontroll -6h-ás nyálmirigyekben gyűrűként jelenik meg a Snap24 a váladékszemcsék körül (11. A. ábra), tehát a Snap24 a váladékszemcsék membránján lokalizál. Meglepő módon, a Syt1 esetében tapasztaltakkal ellentétben 0h-ás állatokban azonban már a granulumok lumenében láthatjuk (11. B. ábra), valószínűleg a Syt1 lebontás céljából. Kiemelném azt a jelenséget is, amikor a báb állatok szekréciós granulumai még halványan GFP pozitívak, de már a piros Snap24 is látható a granulumok belsejében (11. B. ábra piros nyíl), ez valószínűleg a korai fázisát jelzi a Snap24 degradációjának.

Megvizsgáltam továbbá Snap29 csendesítéssel is a Snap24 lokalizációját, vizsgálva ezzel a krinofágiát, mint potenciális lebontó útvonalat. A 0h-ás báb nyálmirigyekben a Snap29 csendesítés miatt még mindig megtalálhatóak a Snap24 gyűrűk a granulumok körül, feltehetően azok a krinofágia általi lebontás defektusa miatt maradnak meg (11. C. ábra).

A Snap24 lehetséges lebontását tovább vizsgálva az ESCRT komplex egyik egységét, a Hrs szerepét figyeltem meg. Meglepő módon a Hrs csendesített 0h-ás bábokban a kontrollhoz hasonlóan láthatunk csak Snap24-re pozitív organelumokat, melyek azonban mégis jóval halványabb intenzitással nyilvánulnak meg. Megfigyeléseim alapján úgy tűnik tehát, hogy a Snap24 endoszómákba való felvétele a lebontás céljából ESCRT függő folyamat lehet és a Hrs csendesítés megakadályozza ezt. Továbbá azon szempontból is különbözik a kontrolltól, hogy a citoplazmában sokkalta nagyobb mennyiségben megmaradt a Snap24, mivel a lebontáshoz szükséges endoszómákba kerülése hibát szenvedett (11. D. ábra).



11. **ábra:** A membrán asszociált Snap24 immunfestés eredménye, hogy a kontroll vándorló muslicák nyálmirigy sejtjeiben a Snap24 a glue granulumokra lokalizál (sárga nyilak) (A), míg a bábokban ez nem látható jelenség, ez esetben több piros Snap24 jelölt organellumot látunk (sárga csillag) (B). A bábokban megfigyelhető továbbá az a jelenség is, amikor a glue GFP-je még nem oltódott ki teljesen, de már a Snap24 piros jel lokalizációja a granulum belsejében is megtalálható (piros nyíl) (B). Fiatal báb nyálmirigyek Snap29 csendesítése során megmaradnak a Snap24 gyűrűk (sárga nyíl) (C), ellenben a Hrs csendesítéssel, ahol Snap24 gyűrű nem marad meg, azonban a kontrolltól eltérő intenzitással jelennek meg a csak piros Snap24-re pozitív sejtszervecskék (sárga csillag) (D).

7. Diszkusszió

A lebontó útvonalak, főként a krinofágia egy olyan potenciális kutatási terület, melynek nagyon sok ma még meg nem fejtett aspektusa van. Jelen dolgozatomban nem csak a krinofágia témakörében próbál új, fel nem fedezett mechanizmusokat és kötőpartnereket beazonosítani, hanem a szekréciós tevékenységet végző sejtek váladékot tartalmazó granulumjain található, szekrécióhoz nélkülözhetetlen membránfehérjéinek még nem ismert folyamatait feltárni. Az eddigi kutatások a krinofágia folyamatát, valamint a szekréciós granulum lebomlásának mechanizmusát célozták meg (5, 7, 14). Kevés szakirodalom létezik a szekréciós granulumokon fellelhető membránfehérjéről, legfőképp azok lebontásáról, mely kutatási eredményeim alapján a krinofágiával szorosan összefüggő mechanizmus.

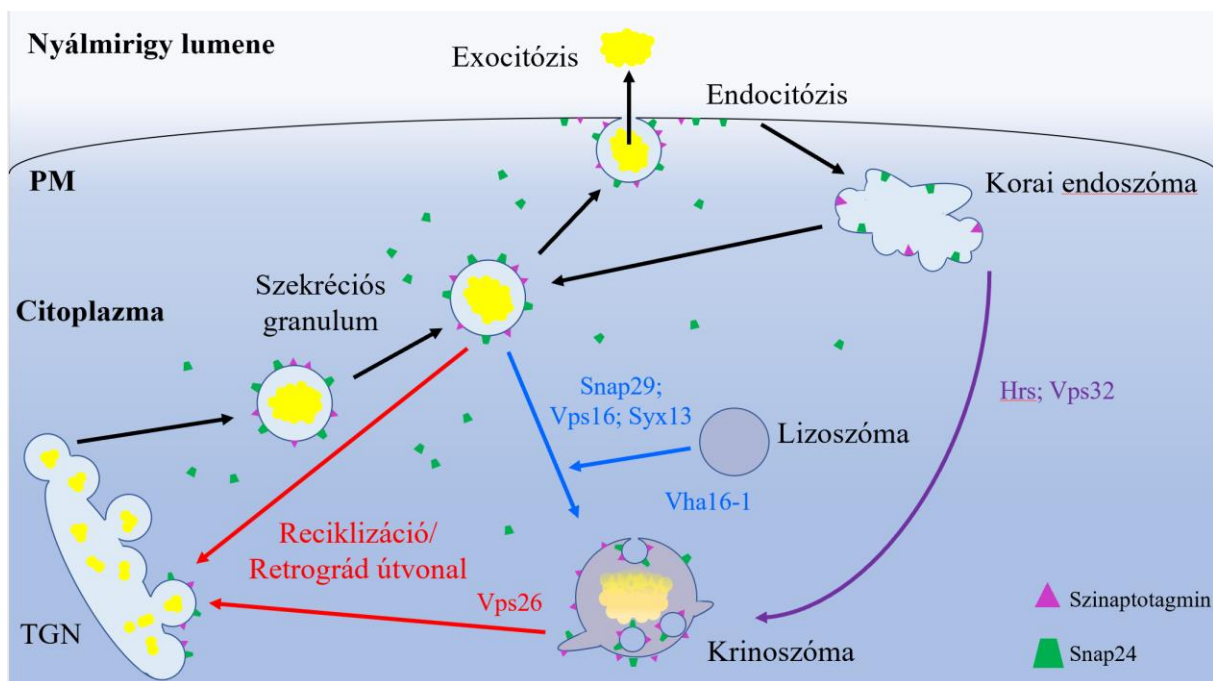
Jelenlegi dolgozatomban arra a megfigyelt jelenségre kerestem a választ, hogy a szekréciós granulum exocitózishoz szükséges membránfehérjei milyen módon kerülnek eltávolításra a degradálódó váladékszemcsék membránjáról a szekréció után. Bemutattam egy a váladékszemcséken megtalálható kalciumszenzor membránfehérje, a Szinaptotagmin lehetséges eliminálási útvonalát. Normál esetben az *ecetmuslica* lárvális nyálmirigy sejtjeiben a Szinaptotagmin a granulumok membránjára lokalizál, azonban a glue granulumok szekréciója után, az állat bebábozódása után, már nem található meg a sejtben maradó váladékszemcsék felszínén. Kezdetben a granulumok elsavasodását is okozó, krinofágia degradációs útvonalat vizsgáltam, mint potenciális membránfehérje eltávolító/lebontó mechanizmus. Néhány, a krinofágiához szükséges gént lecsendesítve (*Vps16a*; *Snap29*; *Syx13*), a kontrolltól eltérő fenotípust tapasztaltam. A Szinaptotagmin rajta maradt a granulumok felszínén, tehát annak eltávolítása a granulum membránról nem ment végbe. Mivel ebből az következik, hogy a váladékszemcsének feltétlen szekunder lizoszómává (krinoszómává) kell alakulnia ahhoz, hogy az ürítéséhez nélkülözhetetlen membránfehérjék eltávolíthatóan azok felszínéről, így megfigyeltem további, lizoszomák membrándinamikáját szabályozó gének csendesítését is, ilyen a retromer komplex egyik alegysége, a *Vps26*, illetve az ESCRT komplexek *Hrs* és *Vps32* alegységei. Az előbb említettek esetében sem tudott lekerülni a Szinaptotagmin a granulumok felszínéről. Továbbá az alacsony pH kialakításához és fenntartásához nélkülözhetetlen *Vha* komplex 16-os alegysége (*Vha16-1*) a szerepét is megvizsgáltam az említett folyamat során. A *vha16-1* csendesített, bábozódó állatokból (0h) származó mirigysejtekben a váladékszemcséken még kimutatható volt a *Syt1-GFP*, de a többi fenotípussal ellentétben némileg annak belsejében is felhalmozódott, ami a mikroautofág útvonal, ezáltal pedig az ESCRT szerepét is alátámasztja ezen membránkomponensek eliminációjában. Ez az útvonal

pedig valószínűleg inkább a lebontás felé tereli ezeket a membránfehérjéket a reciklizáció helyett. Ennek fényében fontos megemlíteni, hogy a vps26 (retromer alegység) csendesített sejtekben is a váladékszemcséken maradt a GFP-Syt1, jelezvén, hogy ezen fehérje membránból való eltávolítása nem csupán ESCRT függő (tehát nem korlátozódik a lebontási útvonalra), hanem jelentős része újrahasznosításra kerülhet a citoplazma felé való membránlefűződés útján a retromer komplex segítségével.

Az eddig említett kutatást túltermelt Szinaptotagmin GFP jelölt törzzsel folytattam, ezért fontosnak tartottam egy másik membránfehérjével is alátámasztani ezen lehetséges eltávolítódási és lebontási útvonalakat, illetve ezt immunfestéssel végeztem, a pontosabb lokalizációt figyelembe véve a granulumok felszínén. A Snap24 granulum membrán asszociált SNARE fehérjével figyeltem meg a krinofágia (Snap29) és az ESCRT komplex (Hrs) lehetséges szerepét annak eltávolítódásában, illetve lebontásában. Kontroll lárvális nyálmirigyben a Snap24 a granulumok membránjára lokalizál, hasonlóan a Syt1-GFP-hez, amely eltűnik azok felszínéről a már bebábozódott állatokban. Az endogén Snap24 a granulumok felszínéről a már kezdetleges elsavasodásban (krinofágia) részt vevő váladékszemcsék belterébe kerül, vélhetően lebontás céljából. Ez jelentősen eltér a Syt1-GFP-vel tapasztaltaktól, hiszen Vha16-1 csendesített háttéren nem tapasztaltam ekkora mértékű GFP felhalmozódást a képződő, de inaktív krioszómák lumenében. Ezt bizonyítottam a Snap29 csendesítéssel, mely gátolja a krinofágia folyamatát, ezért is találtunk továbbra is a bábok nyálmirigyében Snap24 gyűrűket a granulumok felszínén. Az ESCRT komplex szerepét is megvizsgáltam, mivel feltételeztem, hogy a kontroll esetben tapasztalt rendkívüli Snap24 felhalmozódás a képződő krinoszómák lumenében nem csak a membrán kötött, de a citoplazmatikus Snap24 mikroautofág úton való felvételéhez is szükséges (a Snap24-nek nincsen TM doménje). Eredményeim szerint a specifikusan Hrs géncsendesített bábokban a Snap24 citoszolikus felhalmozódik a granulumok/lizoszomális struktúrák körül és nagyon kis mértékben kerülnek csak be a lebontást végző organellek lumenébe, mint ahogy azt normál esetben az ESCRT komplex véghez tudná vinni (12. ábra).

Végző soron tehát a szekréciós granulumok exocitózisához esszenciális membránfehérjék lebontása és reciklizációja történhet az ESCRT, illetve a retromer komplex segítségével is, attól függően, hogy az adott membránfehérje lebontásra vagy reciklizálásra kerül majd a sejtben, mindehhez pedig nélkülözhetetlen a krinofágia mechanizmusa. Utóbbi, mivel minden fehérjeszekréciós tevékenységet végző sejtben fellelhető, számos betegség kezelésében és megszüntetésében is kulcsfontosságú információval szolgálhat.

Remélem sikerült érzékeltetnem az olvasóval ezen kutatásom fontosságát és még megannyi potenciális lehetőségét, mind a lebontási folyamatok megismeréséhez, mind a membránfehérjék további kötőpartnereinek kikutatása érdekében.



12. ábra: A dolgozatomban kutatási eredményeimet összefoglaló ábra, feltüntetve a szekrációs granulum membránfehérjéinek potenciális lebontási és reciklizációs útvonalait.

8. Szerzői Hozzájárulás

Feladat	Felkészítés után önállóan végeztem a dolgozathoz szükséges mennyiségben (%-ban megadva)	Folyamatos segítséggel végeztem a dolgozathoz szükséges mennyiségben (%-ban megadva)
A vizsgált állatok és állattörzsek fenntartása	100	0
A megfelelő állatok válogatása, keresztezése és a vizsgált törzsek létrehozása	100	0
A fénymikroszkópos minták előkészítése és fényképezése	100	0
Immunhisztokémiai vizsgálat végzése	100	0

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm elsősorban témavezetőmnek, Dr. Csizmadia Tamásnak a már többéves szakmai segítséget és támogatást a jelenlegi dolgozat létrejötté érdekében. Továbbá az ELTE Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék minden munkatársának a hozzájárulását a kutatásaimhoz. Végző soron páromnak, családomnak és barátaimnak vagyok hálás, hogy ebben az utóbbi számomra zavaros időben is segítettek megteremteni a megfelelő környezetet ezen dolgozat megírásához, kiemelve Dósa Anna barátnőmet és volt csoporttársamat, hogy mai napig immáron egy másik országból is azonnali tanácsokkal lát el.

10. Irodalomjegyzék

1. Ponnambalam S, Baldwin SA. Constitutive protein secretion from the trans-Golgi network to the plasma membrane. *Mol Membr Biol.* 2003;20(2):129-39.
2. Li K, Zhang JH, Yang YJ, Han W, Yin H. Morphology and fine organization of the midgut of *Gampsocleis gratio* (Orthoptera: Tettigoniidae). *PLoS One.* 2018;13(7):e0200405.
3. Biyasheva A, Do TV, Lu Y, Vaskova M, Andres AJ. Glue secretion in the *Drosophila* salivary gland: a model for steroid-regulated exocytosis. *Dev Biol.* 2001;231(1):234-51.
4. Farkas R, Suáková G. Developmental regulation of granule size and numbers in larval salivary glands of *Drosophila* by steroid hormone ecdysone. *Cell Biol Int.* 1999;23(10):671-6.
5. Csizmadia T, Lőrincz P, Hegedűs K, Széplaki S, Lőw P, Juhász G. Molecular mechanisms of developmentally programmed crinophagy in. *J Cell Biol.* 2018;217(1):361-74.
6. Ma CJ, Yang Y, Kim T, Chen CH, Polevoy G, Vissa M, et al. An early endosome-derived retrograde trafficking pathway promotes secretory granule maturation. *J Cell Biol.* 2020;219(3).
7. Csizmadia T, Dósa A, Farkas E, Csikos BV, Kriska EA, Juhász G, et al. Developmental program-independent secretory granule degradation in larval salivary gland cells of *Drosophila*. *Traffic.* 2022;23(12):568-86.
8. Bowers MR, Reist NE. Synaptotagmin: Mechanisms of an electrostatic switch. *Neurosci Lett.* 2020;722:134834.
9. Neuman SD, Bashirullah A. Hobbit regulates intracellular trafficking to drive insulin-dependent growth during. *Development.* 2018;145(11).
10. Li M, Rong Y, Chuang YS, Peng D, Emr SD. Ubiquitin-dependent lysosomal membrane protein sorting and degradation. *Mol Cell.* 2015;57(3):467-78.
11. Neuman SD, Terry EL, Selegue JE, Cavanagh AT, Bashirullah A. Mistargeting of secretory cargo in retromer-deficient cells. *Dis Model Mech.* 2021;14(1).
12. Csizmadia T, Juhász G. Crinophagy mechanisms and its potential role in human health and disease. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2020;172:239-55.
13. Niemeyer BA, Schwarz TL. SNAP-24, a *Drosophila* SNAP-25 homologue on granule membranes, is a putative mediator of secretion and granule-granule fusion in salivary glands. *J Cell Sci.* 2000;113 (Pt 22):4055-64.
14. Li M, Feng F, Feng H, Hu P, Xue Y, Xu T, et al. VAMP4 regulates insulin levels by targeting secretory granules to lysosomes. *J Cell Biol.* 2022;221(10).