

Korai endoszómától a reciklizációig: a SNARE-fehérjék szerepének tisztázása

37. OTDK Biológia Szekció

Bodor Iván József

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Biológia BSc III. évfolyam

ELTE TTK Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék

Témavezetők:

Dr. Lőrincz Péter

Hargitai Dávid



ELTE
EÖTVÖS LORÁND
TUDOMÁNYEGYETEM



TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítésjegyzék	2
Összefoglaló.....	3
Bevezető és célkitűzések.....	4
Eredmények	6
Syx7, SNAP29 vagy Ykt6 csendesített sejtekben kisebbek a késői endoszómák	6
Syx7 vagy SNAP29 hiányában lecsökken a felvett anyag mennyisége	10
Syx7, SNAP29 vagy Ykt6 csendesítése esetén lecsökken az endocitózis hatékonysága	11
Ykt6 hiánya esetén csökken a lakúnaborítottság, míg a Syx7 vagy SNAP29 csendesítése esetén megnövekszik	13
Ykt6 hiányában lecsökken, míg SNAP29 és Syx7 hiányában megnő a reciklizációt végző plazmamembránfelszín	15
Ykt6 episztatikus a SNAP29 felett	15
Összegzés és kitekintés	16
Anyagok és módszerek.....	18
Szerzői hozzájárulás.....	20
Függelék	20
Köszönetnyilvánítás	21
Irodalomjegyzék.....	22

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

Arl- ADP-ribosylation factor-like protein

Bet- Blocked early in transport

BSA- bovine serum albumin

DCR- dicer

ER- endoplazmatikus retikulum

FCS- fetal bovine serum

FITC- fluorszcein-izotiocianát

Gal- galactose-responsive transcription factor

Gos- Golgi SNARE

HOPS- homotypic fusion and protein sorting

Luc- luciferáz

M3- Shields and Sang M3 insect medium
miniCORVET- mini class C core vacuole/endosome tethering
PBS- phosphate buffered saline
PBTX- phosphate buffered saline with Triton X-100
PM- plazmamembrán
Q- glutamin
R- arginin
Rab- Ras-associated binding protein
RNSi = Ri- RNS interferencia
Sec- Secretory
SNAP24/25/29- Synaptosomal-associated protein 24/25/29kDa
SNARE- Soluble *N*-ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Protein Receptor
STX, Syx- Syntaxin
(n)Syb- (neuronal)Synaptobrevin
UAS- upstream activating sequence
Use- Unconventional SNARE in the ER
UV- ultraviola
Vamp- Vesicle-associated membrane protein
Vti- Vesicle transport through interaction with t-SNAREs

ÖSSZEFOGLALÓ

Az endocitózis során a sejt a környezetéből és a plazmamembránból anyagokat vesz fel. Ezek először az endoszómákba jutnak, majd vagy a lizoszómák által lebomlanak, vagy reciklizáció révén visszakerülnek. Mindkét útvonalon membránfúziós lépések zajlanak, melyeket a SNARE-fehérjék hajtanak végre. Azonban az egyes lépésekben részt vevő SNARE-ek a mai napig tisztázatlanok.

Kutatásom során az összes ismert *ecetmuslica* SNARE szerepét vizsgáltam a korai endoszómális fúziókban. Ehhez kiváló modell a lárvális garland nefrocita, amely felépítését tekintve nagyon hasonló az emlős podocitához. A garland nefrocita a hemolimfából képez szűrletet, miközben intenzív endocitózist végez. SNARE RNSi-t kifejező nefrocitákban immuncitokémiai és egyéb módszerekkel (felvételi próbákkal) vizsgáltam a korai endoszómális kompartmentet, valamint az endocitózis és reciklizációs folyamatok dinamikáját.

Azt tapasztaltam, hogy a Syx7, a SNAP29 és az Ykt6 hiányában elmarad a korai endoszómák homotipikus fúziója, így a lebontás sérül. Feltételezhető, hogy e három SNARE egymással kölcsönhatva működik, egy korábban ismeretlen SNARE-komplex részeként. További kísérleteim alapján valószínű, hogy az Ykt6 a korai endoszómális fúzió mellett a reciklizációban is szerepet játszik, így a két útvonal közös elemeként működhet.

Kutatásunk révén közelebb kerültünk az endolizoszómális lebontás és a reciklizáció közötti kapcsolat, valamint az itt szerepet játszó SNARE-fehérjék mélyebb megértéséhez.

BEVEZETŐ ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Az endolizoszómális kompartment többféle vezikulatípusból álló rendszer, amelynek végállomása lehet a lebontás, vagy reciklizáció¹. Az endocitózis befejezése után az endoszómák különböző érési folyamatokon mennek keresztül, és végül eljuttatják a lebontandó anyagot a lizoszómákba, vagy az adott anyagot visszairányítják a plazmamembrán (PM) felé. Előfordul az is, hogy az anyag retrográd módon a Golgi-apparátus irányába halad, majd később innen szekretálódik. Tehát az endolizoszómális rendszer irányít, szortíroz; majd lebont, szekretál vagy reciklizál. Ezen szerteágazó funkciókat a sok ponton való szabályozhatóság teszi lehetővé.

Endocitózis során a sejt a PM egy darabjának betűródésén és lefűződésén keresztül anyagokat vesz fel az őt körülvevő folyadéktérből, és magából a plazmamembránból, minek leggyakoribb formája a receptor-mediált endocitózis². Ennek során a lefűződött és zárult klatrin-burkos membránból a burok távozását követően endocitotikus vezikula keletkezik. Több endocitotikus vezikula egymással egyesülve kialakítja a korai endoszómákat. Az endoszómák ezt követően érési folyamaton mennek keresztül, melynek során megváltozik a lipid- és fehérjeösszetételük, ezáltal a membránidentitásuk, ami meghatározza a vezikula további sorsát. Ilyen identitásmeghatározó molekulák a lipidek közül például a foszfatidil-inozitol-foszfátok, illetve a fehérjék közül a kis GTP-áz fehérjék Rab és Arl családjai. Különböző vezikulákon eltérő Rab fehérjé(k) található(k). A korai endoszómára a Rab5 jellemző, a későire a Rab7; a reciklizálódó endoszómán Rab4 (közvetlen reciklizáció) vagy Rab11 (közvetett reciklizáció) található³.

A korai endoszóma vezikulotubuláris struktúra, feladata az internalizált anyag válogatása, irányítása. Beltartalmuk szortírozása közben az érés is végbemegy, ami az identitást meghatározó Rabok és lipidek kicserélődésén át valósul meg. A szortírozás során a reciklizációra szánt anyagok tubuláris membránrészekbe kerülnek, míg a lebontásra szánt membránkomponensek intralumináris vezikula képződése során az endoszóma belsejébe jutnak

annak membránjából befűződve. A szortírozást követően a reciklizálandó anyagokat tartalmazó részek lefűződnek, míg az intralumináris vezikulák képződésének befejeztével a korai endoszóma multivezikuláris, Rab7 pozitív késői endoszómává válik. A késői endoszómák lizoszómákkal egyesülnek, így megvalósul a felvett anyagok lebontása. A plazmamembránban még szükséges anyagokat tartalmazó vezikulák pedig képződési helyük és tartalmuk szerint Rab4 vagy Rab11 pozitívak lesznek és visszafordulnak a PM felé, majd azzal fuzionálnak.

A fenti folyamatok mindegyikében membránfúziós lépések szerepelnek, mely az egyesülő membránok identitása szerint lehet homo- vagy heterotipikus. A fehérjékből álló fúziós gépezet elemei a pányvázó faktorok és a SNARE-fehérjék⁴. A pányvázó faktorok a vezikulák membránfelszínének bizonyos lipidjeit és Rab fehérjeit felismerve képesek azokat összekapcsolni, fizikai közelségbe hozni. Ezután a SNARE-fehérjékből álló komplex összeszerelődik és a két membránt egymás felé mozdítja, majd ezek egyesülnek.

A SNARE-fehérjék családjának minden tagjában megtalálható a SNARE-motívum. A SNARE-motívum és a komplexben betöltött pozíció alapján ezen fehérjék Qa-, Qb-, Qc-, Qbc- és R-SNARE-ek lehetnek. A Q és R csoportosítást⁵ a motívum α -hélixben kialakított ionos kötést létrehozó aminosav-oldallánca alapján hozták létre: Q (glutamin) és R (arginin). Egy komplex létrejöttéhez mind a 4 motívumból (Qa, Qb, Qc és R) egy szükséges. Egyes esetekben a Qb- és Qc-SNARE helyett egy Qbc-SNARE veszi át azok helyét. Az ilyen SNARE-ekben két SNARE-motívum is található.

Korábbi kutatások csak egyes SNARE-fehérjék vagy komplexek endoszómális folyamatokban betöltött szerepét vizsgálták. Ezen publikációk bár rámutattak egyes szövettípusok közti különbségekre, de sosem tanulmányozták az egész endoszómális folyamatot átfogóan.

Kutatásunknak éppen ez volt a célja. Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) garland nefrociták kiváló modelljei az endolizoszómális rendszer vizsgálatának. E sejtek funkcionálisan az emlős vese podocitáinak megfeleltethetők. A szűrletet a testfolyadékból mindkét sejt egy fehérjékből álló szűrő segítségével állítja elő, amelynek felépítése és összetétele teljesen ortológ. emiatt az ecetmuslica garland sejtek kiváló emlős podocita betegségmodellek^{6,7}. Az eltérés köztük, hogy a garland sejtek a képzett szűrletet nem elkülönült sejtközötti téren keresztül juttatják a külvilágba, hanem intenzív endocitózis révén felveszik. A nefrociták speciális képletei, az úgynevezett lakúnák, szűrőmembránnal lezárt felületnövelő PM-betűródések. A kiválasztó funkciót végző sejtek endocitotikus útvonalainak feltárása igencsak fontos, mert ezek a folyamatok szabályozzák a szűrőmembránt is, melynek hibás működése súlyos kórképekhez vezethet⁷. Kutatásom során ezen speciális sejtípust segítségével szeretnénk

volna felderíteni, mely SNARE-fehérjék játszanak szerepet az endocitózis folyamatában. Kiváltképp a korai lépésekre fókuszáltam, mert az itt lezajló membránfúziókban szereplő SNARE-ek még kevésbé ismertek, illetve a szűrőmembrán elemeinek szabályozásában ezen lépések a legjelentősebbek⁸. Céлом volt a korai endoszómák fúzióját végrehajtó SNARE-komplex tagjainak feltárása, illetve a reciklizációban részt vevő SNARE-ek azonosítása.

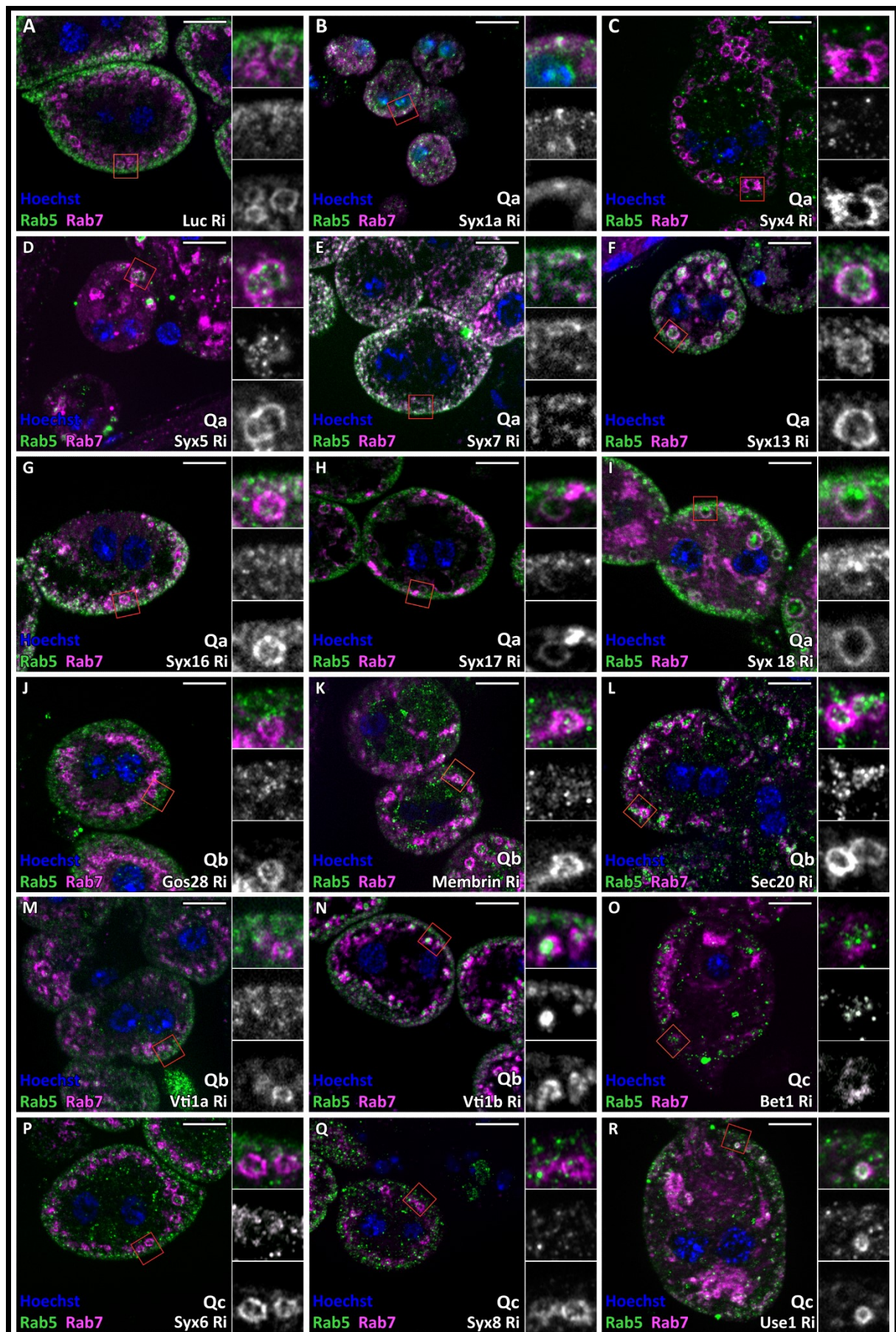
EREDMÉNYEK

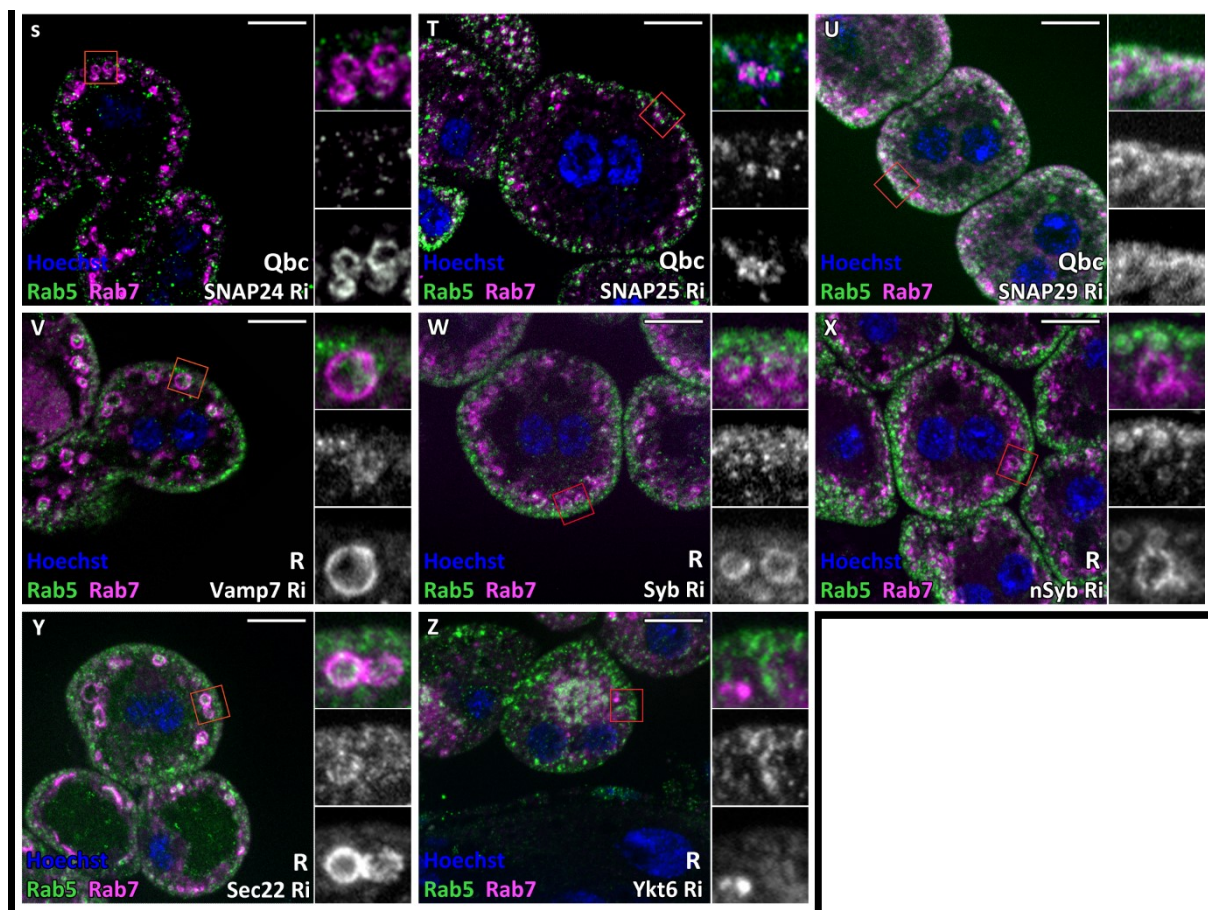
Syx7, SNAP29 vagy Ykt6 csendesített sejtekben kisebbek a késői endoszómák

Annak érdekében, hogy megtaláljuk a korai endocitózisban szerepet játszó SNARE-fehérjéket, genetikai szűrést végeztünk az egyes muslica SNARE-eken. Ezt vándorló stádiumú lárvák garland sejtjeiben egyes SNARE-fehérjéket csendesítve, Rab5 és Rab7 elleni kétlépcsős immunfestés segítségével végeztük. A genetikai szűrés során a legtöbb kereskedelemben elérhető SNARE-fehérjét célzó RNS interferencia konstrukciót megvizsgáltuk (82 db konstrukció). A vizsgálatot még témavezetőim kezdték (53 db konstrukció), majd én folytattam (29 db konstrukció) és összegeztem az eredményeket: a tapasztalt fenotípusokat több kategóriába soroltam és azokat a szakirodalom alapján értelmeztük. A szűrés eredménye az 1. ábrán látható, amelyen minden SNARE-RNSi esetében a legjellemzőbb fenotípus van feltüntetve. Az itt nem bemutatott további RNSi konstrukciókkal kapott eredményeket a 3. táblázat (függelék) foglalja össze szöveges formátumban.

A Luciferáz Ri sejtek (1/A) szolgáltak kontrollként: bennük közvetlenül a plazmamembrán alatt helyezkednek el a Rab5 pozitív vezikulák (korai endoszómák), alattuk pedig a Rab7 pozitív késői endoszómák. Egyes esetekben megfigyeltem kettősen (Rab5, Rab7) pozitív vezikulák is, ezek korai-késői átmeneti állapotban vannak.

Syx5 (1/D), Syx18 (1/I), Gos28 (1/J), Membrin (1/K), Bet1 (1/O) vagy Use1 (1/R) csendesítése esetén viszonylag nagyméretű késői endoszómák láthatók, melyek sejten belüli pozíciója részben megváltozik, gyakran csoportosulnak a sejt belsejében. Az említett SNARE-ekről tudjuk, hogy Golgi-ER közötti transzport funkcióval rendelkeznek⁹, amely hibája a lizoszómák képződését is elronthatja, ezért a továbbiakban ezeket nem vizsgáltuk.





1. ábra: Rab5-Rab7 immunfestett, SNARE-csendesített garland sejtek.

A kék csatorna a sejtmagot, a zöld a Rab5 pozitív korai endoszómákat, a magenta a Rab7 pozitív késői endoszómákat mutatja. A piros négyzet kiemelései minden esetben fentről a következők: kompozit, zöld csatorna (Rab5), magenta csatorna (Rab7).

A: Luciferáz RNSi (kontroll konstrukció), B: Syx1a RNSi, C: Syx4 RNSi, D: Syx5 RNSi, E: Syx7 RNSi, F: Syx13 RNSi, G: Syx16 RNSi, H: Syx17 RNSi, I: Syx18 RNSi, J: Gos28 RNSi, K: Membrin RNSi, L: Sec20 RNSi, M: Vti1a RNSi, N: Vti1b RNSi, O: Bet1 RNSi, P: Syx6 RNSi, Q: Syx8 RNSi, R: Use1 RNSi, S: SNAP24 RNSi, T: SNAP25 RNSi, U: SNAP29 RNSi, V: Vamp7 RNSi, W: Syb RNSi, X: nSyb RNSi, Y: Sec22 RNSi, Z: Ykt6 RNSi. Qa-SNARE-ek: B-I. Qb-SNARE-ek: J-N. Qc-SNARE-ek: O-R. Qbc-SNARE-ek: S-U. R-SNARE-ek: V-Z. A méretvonal 10 μ m.

A Syx4 (1/C), Syx13 (1/F), Syx17 (1/H), Sec 20 (1/L), Vamp7 (1/V) vagy Sec22 (1/Y) RNSi-t kifejező sejtekben szintén megnagyobbodott késői endoszómákat találtunk, melyek helyzete normális volt. Ezt neveztük késői endoszómális fenotípusnak, amely hasonlít a HOPS pányvázó faktor hiányában látottakhoz, mely esetben a késői endoszóma-lizoszóma fúzió elmarad^{10,16}. Ez alapján ezek a SNARE-ek késői endoszómális fúziós lépésekhez lehetnek

szükségesek, amely eredményt a csoportunk egy korábbi tagja a Sec20 esetén már sikeresen le is publikált¹¹.

A dolgozat megírásáig a Syx1a SNARE-nek csak egy RNSi konstrukcióját tudtuk megvizsgálni (1/B), mert a többi RNSi konstrukció kifejeztetése embrióként elpusztította az állatokat, ugyanis a nefrocita driverek sajnos minden esetben, néhány idegsejtben is bekapcsolnak.

Kontrollszerű fenotípus Vti1b (1/N), Syx8 (1/Q), SNAP24 (1/S), SNAP25 (1/T), Syb (1/W) vagy nSyb (1/X) hiányában volt megfigyelhető. Ezek szakirodalom alapján a szekrécióban és a lizoszómális fúziókban játszanak szerepet^{9,12}, ugyanakkor eredményeink alapján csak korlátozott hatásuk lehet az endocitotikus lebontásra.

A korai endocitózis lépéseiben már vannak korábban leírt SNARE-fehérjék (ezek a Vti1a, STX6, STX12 és VAMP4 humán SNARE-ek⁹, legközelebbi ecetmuslica ortológjai a Vti1a, Syx6 és Syx13 ebben a sorrendben¹³). Érdekes módon vizsgálataink során ezek legtöbbje kontrollszerű fenotípust mutatott (Vti1a (1/M), Syx6 (1/P) és Syx13 (1/F)).

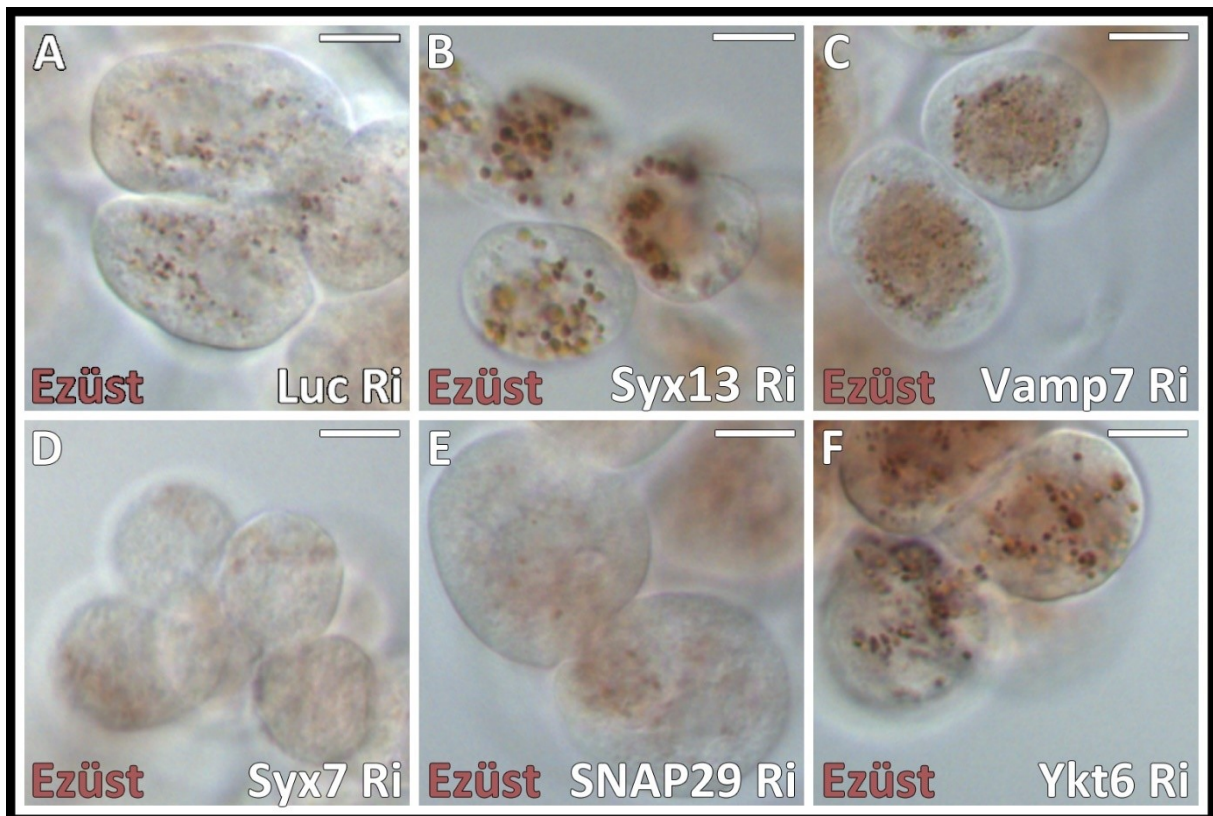
Kísérleteink során a Q SNARE-ek közül egyedül a Syx1 (Qa), Syx7 (Qa) és a SNAP29 (Qbc) esetében láttunk olyat, hogy a Rab7 pozitív késői endoszómák kisebbek és szétszórtak voltak, amely hasonlít a korábban már megfigyelt, korai endoszómális pályvázó faktor, a miniCORVET hiányának esetében tapasztaltakhoz¹⁶. A Syx1 RNSi a sejtek többségét elpusztítja, a túlélők pedig nagyon kicsik, így szerintünk az endoszómákon látott hatás inkább emiatt történhet. Viszont a másik két esetben a sejtméret normális, így ezekben valószínűleg a korai endoszómák homotipikus fúziói elmaradnak, amelyek így nem képesek megfelelően késői endoszómákká érni. Ezt a szakirodalom is alátámasztja, mert ezekről már írtak le korai endoszómális funkciókat^{14,15}.

Egy funkcionális SNARE-komplex azonban a Qa- és Qbc-SNARE (Syx7 és SNAP29) mellett egy R-SNARE-fehérjét is igényel⁵. A szakirodalom által javasolt Vamp7 (1/V) késői endoszómális fenotípust mutatott, míg a szekrécióban leírt Syb (1/W) és nSyb (1/X) RNSi-k kontrollszerűek voltak. A kontrollhoz képest kissé megnagyobbodott késői endoszómákat mutató Sec22-t (1/Y) Golgi-endoplazmatikus retikulum funkcióval írták le¹⁷. Az egyetlen kisebb késői endoszómákat okozó R-SNARE az Ykt6 (1/Z), de ennek fenotípusa sem volt teljesen azonos Syx7 (1/E) vagy SNAP29 (1/U) csendesített sejtekben láthatókkal.

Ezen megfigyelésekből kiindulva ezen három SNARE volt további vizsgálataim fókuszpontjában. Szerettem volna az említett különbséget jobban megvizsgálni, illetve a korai endoszómális funkciót más módszerekkel igazolni.

Syx7 vagy SNAP29 hiányában lecsökken a felvett anyag mennyisége

Az immuncitokémiai vizsgálat a vezikulák méretét, számosságát és eloszlását is megmutatja, de azok működéséről kevés információt ad. A nyomkövető (tracer) felvételi próbákkal azonban élettani szempontból is jellemezhető a sejtek endoszómális kompartmentje. Ehhez kiváló vizsgálati módszer, ha ezüst-nitrát (AgNO_3) tartalmú táptalajon tartjuk az állatokat¹⁶. Mivel az ezüst nehézfém, a lárvákba bekerülő ezüstionokat -élettani funkciójuk révén- a garland nefrociták felveszik a hemolimfából. Viszont mivel lebontani nem tudják, ezek a lizoszómákban felhalmozódnak. Az *ex vivo* fixált sejtekben rövid ideig (10 s) tartó, UV fénnel történő megvilágítás hatására az ezüstionok barna csapadékként kiválnak, látható fényben vizsgálhatóak.



2. ábra: Az ezüsttartalmú táptalajon nevelt lárvák *ex vivo* garland sejtjei, az ezüstionok láthatóvá tétele után (barna csapadék).

A: kontroll, B: Syx13 RNSi, C: Vamp7 RNSi sejtekben jól látható a felvett, lizoszómákban raktározott ezüst, amely D: Syx7 RNSi és E: SNAP29 RNSi sejtekben jóval kisebb mértékű. Ezzel szemben F: Ykt6 RNSi sejtekben is kimutatható az ezüst. A méretvonal 10 μm .

A kontroll esetben (2/A) megfigyelhetők apró, a sejt belsejében szétszórt ezüst tartalmú vezikulák, vélhetően terminális lizoszómák. Késői endoszómális defektust okozó Syx13 (2/B) vagy Vamp7 (2/C) RNSi esetén megfigyelhető ezen vezikulák feldúsulása. Syx13 esetében az

ezüst vélhetően a késői endoszómáig jut el, míg Vamp7 hiányában feltételezhetően a késői endoszómák és -a korábban általunk elektronmikroszkópiával detektált- denz lizoszómális eredetű vezikulákban halmozódik fel (nem bemutatott eredmény). Az endocitózis bennük működik, feltehetőleg a késői hatású funkcióik nincsenek hatással a korai lépésekre.

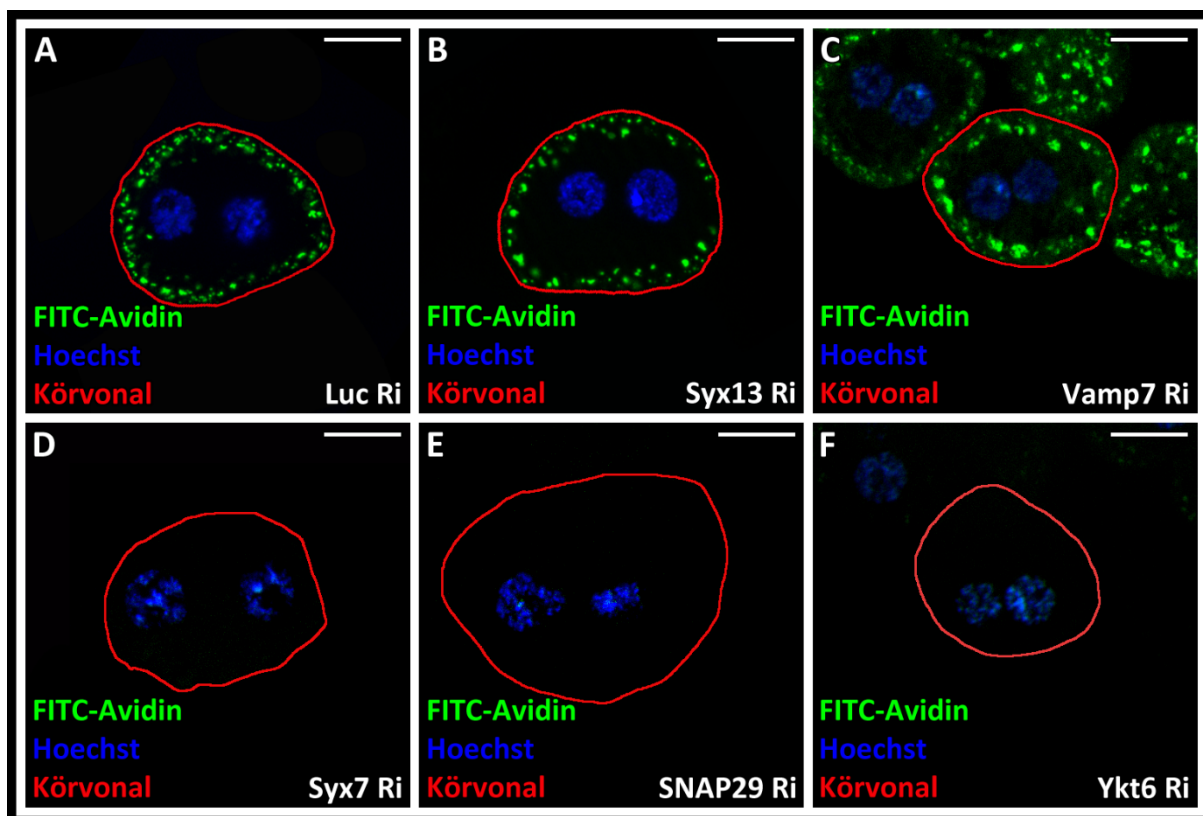
Érdekes azonban, hogy Syx7 (2/D) vagy SNAP29 (2/E) csendesítése során a sejtekben halvány, felhőszerű elrendeződést mutat a csapadék, ami arra utalhat, hogy ezen sejtekben a felvétel megtörténik, azonban az adott állapotban sejtben található ezüst mennyisége jelentősen kisebb a kontrollnál. Ezt két dolog magyarázhatja: a felvételi hatékonyság csökkent le vagy a felvett tracer reciklizálódott. Érdekes módon az Ykt6 (2/F) RNS interferencia kifejeztetése mellett a kontrolléval nagyjából azonos mennyiségű ezüst található a sejtekben. Ez arra utalhat, hogy a felvétel hatékonysága itt a Syx7-tel és SNAP29-cel szemben nem csökken, vagy arra, hogy a reciklizáció mértéke lecsökken.

Mivel az *in vivo* ezüst felvételi próba időbelisége nem szabályozható, ezért a felvételi hatékonyság további vizsgálata érdekében „*ex vivo*” teszteket is végeztem.

Syx7, SNAP29 vagy Ykt6 csendesítése esetén lecsökken az endocitózis hatékonysága

Az előbbieken kiválasztott genotípusokon elvégeztem FITC-Avidin jelölőanyaggal egy *ex vivo* felvételi próbát. A kiboncolt sejtek 25°C-on 5 percig a tracert tartalmazó oldatban inkubálódtak (5 perc pulse), majd ennek letelte után gyors mosást követő fixálással, megakadályoztam a felvett tracermennyiség továbbhaladását az endoszómális kompartmentben (0 chase). Tehát ebben az elrendezésben a FITC-Avidin kizárólag az endocitotikus vezikulákban és korai endoszómákban található meg¹⁸, melyet a 3. ábra szemléltet.

A kontroll (3/A) esetben jól látható, hogy a piros vonal által kijelölt sejtmembrán alatt közvetlenül található meg a tracert tartalmazó vezikulák. Ezt a mennyiséget tekintettem a normál endocitózis során felvett mennyiségnek. A pozitív kontroll RNSi-k (Syx13 (3/B) vagy Vamp7 (3/C)) kontrollszerűek voltak. Vagyis a vélhetőleg késői endoszómák fúziójában részt vevő SNARE-ek csendesítése esetén nem változik az endocitózis korai lépéseinek dinamikája.



3. ábra: FITC-Avidin felvételi próba garland sejteken

A: Luciferáz RNSi (kontroll), B: Syx13 RNSi, C: Vamp7 RNSi, sejtekben kimutathat a felvett tracer, szemben a D: Syx7 RNSi, E: SNAP29 RNSi, F: Ykt6 RNSi Sejtekkel. A méretvonal 10 μ m.

Syx7 (3/D), SNAP29 (3/E) vagy Ykt6 (3/F) RNS interferenciát kifejező sejtekben szinte alig van kimutatható jelölőanyag. Ez az ezüst felvételi vizsgálattal összevetve arra utalhat, hogy bár a felvétel megtörténik, de sokkal lassabb és kisebb mértékben. Mivel ez utóbbi három SNARE típusaik alapján (Qa, Qbc és R) képesek lehetnek egy funkcionális komplexet létrehozni, a fenotípusaik alapján feltételezzük, hogy egy ez valóban meg is történik.

Az Ykt6 RNSi esetében azonban érdekes kettősség alakul ki a felvételi próbákat együtt értelmezve. A FITC-Avidin felvétel során alacsony mennyiségű tracert tartalmaznak a sejtek, de ezüsttel vizsgálva a sejtek kontrollszerűek. Ez arra utal, hogy az Ykt6 csendesítést kifejező sejtek vélhetően dinamikailag eltérnek a Syx7 vagy SNAP29 csendesített sejtektől. Ennek oka lehet, hogy az Ykt6 a reciklizációban is szerepet játszhat. Ebben az esetben hiányakor az ezüstfelvétel során a felvett vezikulák gyorsan reciklizálódni sem tudnak, ezért felhalmozódnak. Ennek tesztelésére a lakúnarendszer kiváló lehetőséget nyújt.

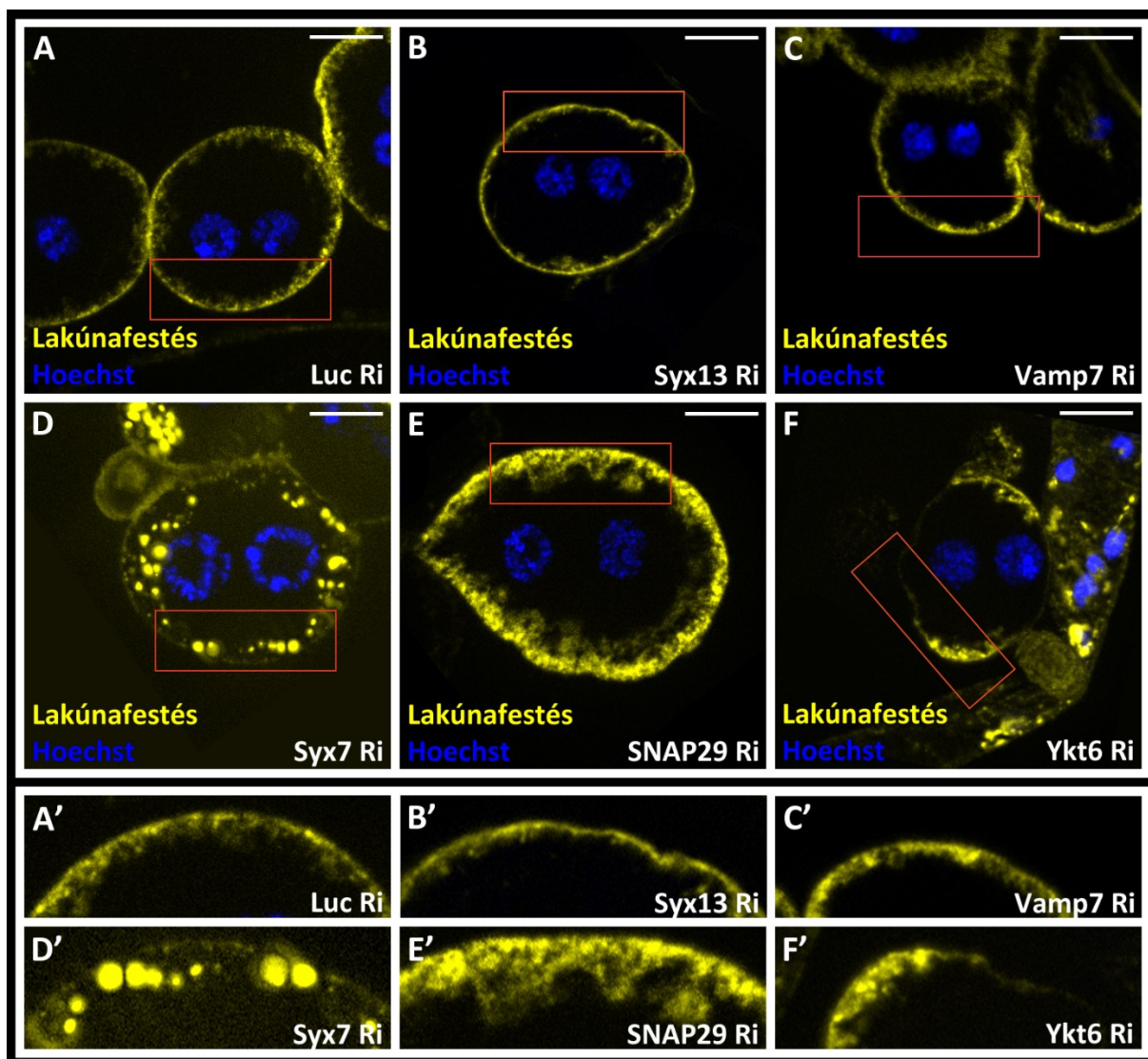
Ykt6 hiánya esetén csökken a lakúnaborítottság, míg a Syx7 vagy SNAP29 csendesítése esetén megnövekszik

Az endoszómális útvonal lebontó oldala mellett kiemelten fontos a reciklizáció is. A FITC-Avidin és ezüst felvételi próba során tapasztalt ellentmondás feloldásának érdekében célszerűnek gondoltuk a reciklizációt is vizsgálni. Erre a lakúnák hosszának vizsgálata a szakirodalmi adatok alapján közvetetten alkalmas¹⁹, ugyanis a lakúnahosszt az elérhető membránmennyiség függvényében az endocitózis csökkenti (a vezikulák ennek membránfelületéből fűződnek le), a reciklizáció növeli (a lakúnák membránjába fuzionálnak). Vagyis a lakúnahosszt az endocitózis és reciklizáció aránya állítja be. Ezzel összhangban ismert, hogy ha az exocyst komplex (reciklizáló endoszómák pályvázó faktora) tagjait csendesítik, a lakúnák jelentős megrövidülése tapasztalható²⁰. Ugyanis ezekben a sejtekben az endocitózis folyamatosan rövidíti a lakúnahosszt, de a reciklizáló endoszómák plazmamembránnal történő fúziójának elmaradása miatt azok nem növelik a lakúnák membránfelületét.

Szerencsére ismerünk egy olyan, viszonylag egyszerű módszert, amellyel a lakúnák fluoreszcens módon megjelölhetőek²¹. A plazmamembránnál zajló transzportfolyamatokat a sejtek rövid idejű fixálásával megakaszthatjuk, majd a mintát BSA-647 jelölőanyaggal inkubáljuk. Ekkor a tracer a lakúnákba diffundál, amelyet ismételt fixálással a lakúnákba rögzíthetünk. Így megfigyelhető a lakúnák hosszúsága és a sejtek lakúnaborítottsága (4. ábra).

Kontroll (4/A), illetve Syx13 (4/B) és Vamp7 (4/C) RNSi sejtekben a lakúnák közel azonos mélységűek, a két feltételezhetően késői lépésben szereplő SNARE csendesítése nem változtatta meg a lakúnák hosszát. Ez arra utal, hogy a reciklizáció és az endocitózis aránya nem áll szoros összefüggésben a tényleges lebontás mértékével.

Syx7 (4/D) és SNAP29 (4/E) RNSi-t kifejező sejtekben a lakúnák hosszának jelentős megnövekedése volt tapasztalható. A Syx7 csendesített fenotípusra jellemzőek a mély, kitágult lakúnák (4/D'), míg SNAP29 Ri sejtekben (4/E') keskeny és hosszú lakúnák voltak megfigyelhetők. Ez arra utalhat, hogy ezekben a sejtekben a reciklizáció a kontroll esethez képest intenzívebben zajlik.



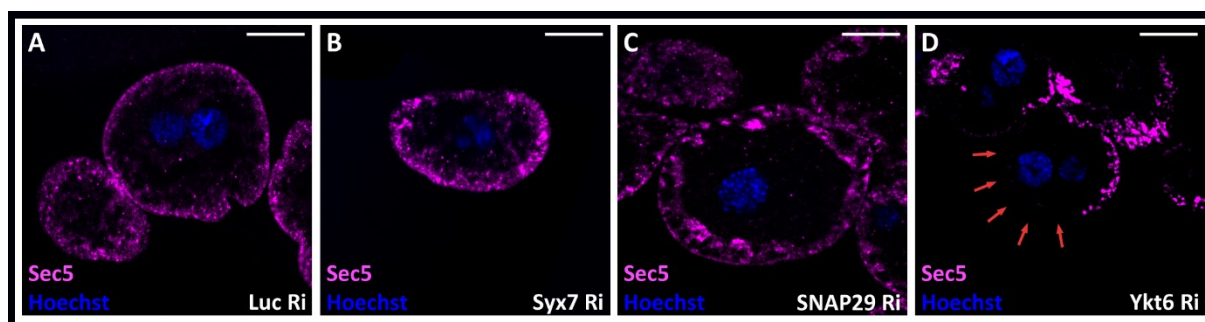
4. ábra: Lakúnafestett garland sejtek.

A: kontroll, B: Syx13 RNSi, C: Vamp7 RNSi sejtekben a lakúnahossz nem változik, ezzel szemben D: Syx7 RNSi, E: SNAP29 RNSi sejtekben a lakúnamélység látványosan megnő, F: Ykt6 RNSi sejtekben lakúnák általi lefedettség jelentősen csökken. A méretvonal 10 μm.

Ykt6 (4/F) hiányában a lakúnák általi lefedettség jelentősen csökken, van olyan PM-rész, ahol teljesen eltűnnek. Ahol viszont vannak lakúnák, ott hosszuk kontrollszerű. A lakúnafestés alapján tehát arra következtethetünk, hogy Ykt6 hiányában a reciklizáció lecsökken. Mivel a lakúnahossz csak indirekt mutatja a reciklizáció mértékét, ezért a reciklizációra alkalmas PM mennyiségét ennél direkter módon is szerettem volna megvizsgálni.

Ykt6 hiányában lecsökken, míg SNAP29 és Syx7 hiányában megnő a reciklizációt végző plazmamembránfelszín

Az exocyst a reciklizációban és szekrécióban működő pányvázó komplex²⁰. Mivel az exocyst toborzódása csak akkor történik meg, ha épp szekréció vagy reciklizáció történik, ezért a pányvázó faktor jelenléte kijelöli az ily módon aktív plazmamembránt^{20,21}. Szerencsére birtokunkban van az exocyst Sec5 alegységére specifikus ellenanyag, amellyel így ez jól vizsgálható.



5.ábra: Sec5 immunfestett garland sejtek

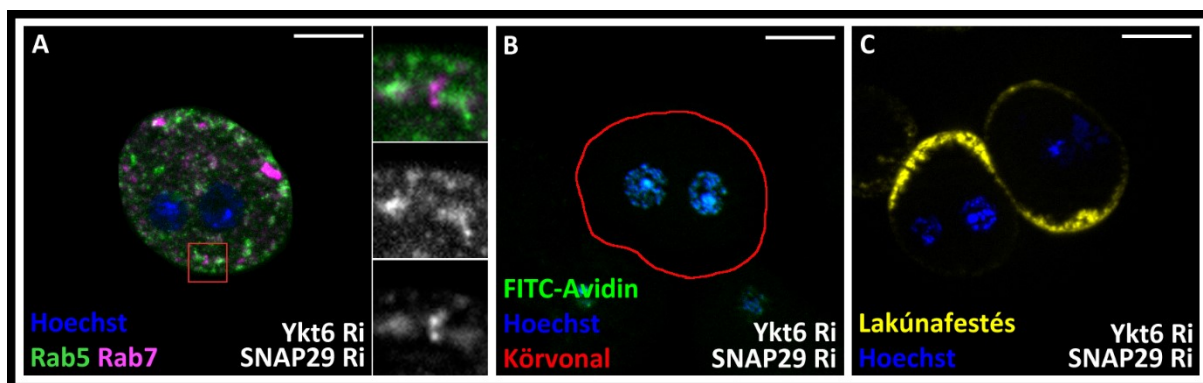
A: Luciferáz RNSi (kontroll), B: Syx7 RNSi, C: SNAP29 RNSi, sejtekben a PM teljes része (a lakúnákat is beleértve) Sec5 pozitív D: Ykt6 RNSi sejtekben vannak olyan PM részek (nyilak), ahol nincs kimutatható exocyst

A kontroll (5/A) sejtekben jól látható, hogy a PM teljes felületén és a lakúnákban intenzív reciklizáció zajlik, Syx7 (5/B) vagy SNAP29 (5/C) csendesített sejtekben látványosan látható, hogy a Sec5 jel mélyen benyúlik a plazmamembrán alá, ami a lakúnafestéssel összhangban intenzív reciklizációra utal. Ezzel szemben az Ykt6 (5/D) RNSi sejtekben jól látható, hogy nem a teljes plazmamembránfelszín toboroz exocystot, ami ugyancsak a reciklizáció csökkenésére utal. Tehát ezen eredmények alapján az Ykt6-nak a korai endoszómális fúziók mellett a reciklizációban is szerepe van.

Ykt6 episztatikus a SNAP29 felett

Az Ykt6 szerepének megvizsgálása céljából episztázisanalízist végeztem. Hipotézisem szerint Ykt6 részt vesz a korai endoszómák homotipikus fúzióiban és a reciklizációban is. Ha ez valóban így van, akkor SNAP29-cel együtt csendesítve Ykt6-szerű fenotípust kell látnunk, mert a felvételt követően a reciklizáció is elmarad. Ennek eldöntésére az Ykt6-SNAP29 kettős

RNSi sejteken elvégeztem a Rab5-Rab7 immunfestést, a FITC-Avidin felvételi próbát és a lakúnafestést, melyek eredményét az 6. ábra mutatja.



6. ábra: Az Ykt6-SNAP29 kettős géncsendesített sejteken elvégzett kísérletek.

A: Rab5-Rab7 immunfestés, B: FITC-Avidin felvételi próba, C: lakúnafestés. Magyarázat részletesen a szövegben. A méretvonal 10 μ m.

A Rab5-Rab7 immunfestéssel detektált (6/A) fenotípus hasonlít az Ykt6 egyszeres RNSi sejteknél látott szétszórt, SNAP29 esetén tapasztaltnál kissé nagyobb endoszómákhoz. A felvételi próbánál (6/B) alig jut a sejtbe a tracerből: a kontrollhoz képest szintén csökkent az endocitózis hatékonysága. A lakúnafestés (6/C) esetében jól látható a lakúnaborítottság Ykt6-hoz hasonló csökkenése. A SNAP29-Ykt6 kettős csendesített sejtekben kimutatható lakúnák hossza viszont kontrollszerű, az Ykt6 csendesített sejteknél látottakhoz hasonlóan. Mindezek azt mutatják, hogy Ykt6 RNSi hatása epiztatikus a SNAP29 RNSi hatása felett.

Ezen eredmények alátámasztják a hipotézisünket, mely szerint az Ykt6-nak kettős szerepe van: a korai homotipikus fúziókban, illetve a reciklizációban is részt vehet. Továbbá azt is igazolja, hogy SNAP29 hiányában nem az endocitózis jelentős lassulása okozza a lakúnahossz megnövekedését és a sejtekben detektálható tracer lecsökkent mennyiségét, hanem a felgyorsult reciklizáció. Ennek igazolása azonban még további kísérleteket igényel.

ÖSSZEGZÉS ÉS KITEKINTÉS

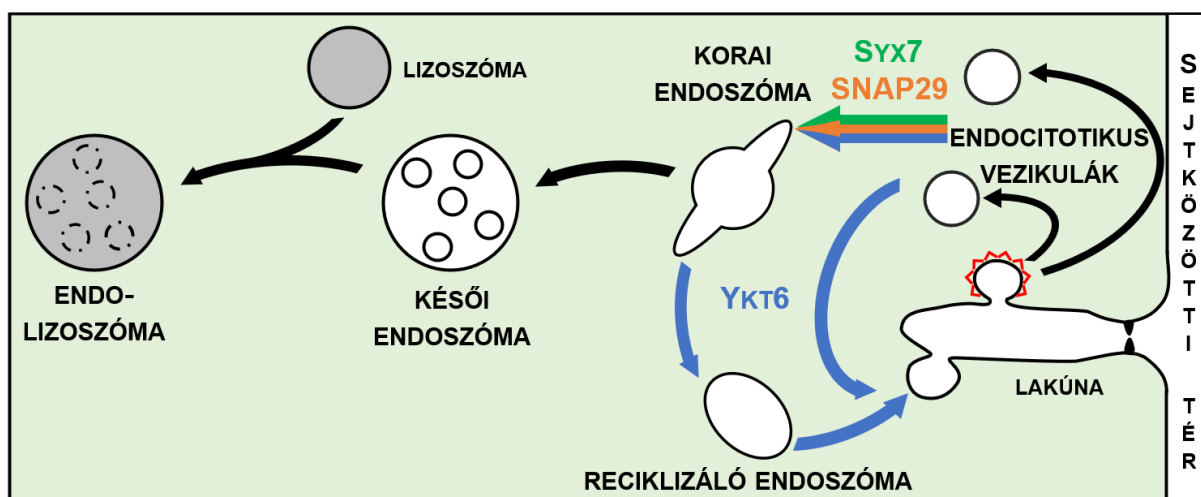
Kutatásom során célom volt a garland nefrocitákban átfogóan megvizsgálni az összes SNARE-fehérje funkcióját. Szerettem volna azonosítani a korai endoszómák fúziójában részt vevő, illetve a reciklizációban szerepet játszó SNARE-eket. Az ennek érdekében elvégzett genetikai szűrés Rab5-Rab7 immunfestéssel nyert eredményei (1. ábra) további kutatásaink kiindulópontjaként szolgálnak, számos érdekes fenotípust detektáltunk. Amennyiben csak a korai endoszómákra fókuszálunk, azt tapasztaltuk, hogy a Syx7 vagy SNAP29 RNSi sejtekben csak kisméretű, vélhetően nem megfelelően érett endoszóma látható, amelyekben feltehetően a

homotipikus korai endoszómális fúziók elmaradhatnak. Ez a szakirodalmi adatokkal jól összhangban van^{14,15}, feltehetően egy komplex részei, viszont az R-SNARE még nem ismert.

Az R-SNARE-ek közül egyedül az Ykt6 csendesítés adott hasonló fenotípust, amelyben kisebbek voltak az endoszómák. Viszont érdekes módon az Ykt6 Ri sejtek nem teljesen hasonlítottak a Q-SNARE RNSi sejtekre, ugyanis bennük több terminális lizoszóma alakul ki, és picit nagyobb és több endoszóma van bennük. Mivel a FITC-Avidin felvételi próba alapján az endocitózis sebessége azonos mértékben lassul mindhárom SNARE RNSi esetében, így arra gondoltunk, hogy az Ykt6-nak egy másik, Syx7 és SNAP29 független szerepe is lehet az endolizoszómális rendszerben: a reciklizáció²².

Ezt lakúnafestéssel (4. ábra), exocyst festéssel (5. ábra) és episztázisanalízissel (6. ábra) is megerősítettük, kísérleteink arra is fényt derítettek, hogy a Syx7 és SNAP29 RNSi sejtekben a felvett, de lizoszómákkal egyesülni képtelen endoszómák intenzíven reciklizálódnak.

Kapott eredményeim összegzéseként feltételezhetjük, hogy a Syx7, SNAP29 és Ykt6 egy közös, új SNARE-komplexben működhetnek, mely a korai endoszómák homotipikus fúzióját hajtja végre. Valószínűsíthető, hogy Syx7 és SNAP29 hiányában a korai endoszómák homotipikus fúziójának elmaradása miatt a vezikulák nem vesztik el a reciklizációhoz szükséges molekuláris mintázatot. Ezért érés hiányában gyorsan reciklizálódnak, hiszen Ykt6 jelen van ezekben a sejtben (7. ábra). Emiatt a reciklizáció felé képes eltolódni az endoszóma-útvonalak egyensúlya. Ez rendkívül érdekes megfigyelés, hiszen még sosem vizsgálták egy adott SNARE-fehérje két kapcsolódó funkcióját is egy sejttypusban⁹.



7. ábra: Az általunk felállított modell a vizsgált SNARE-ek szerepéről az endolizoszómális rendszerben, részletes magyarázat a szövegben.

Mindemellett fontos felismerésnek tartom, hogy kísérleteink alapján lehetséges, hogy a korábbi elképzeléssel szemben nem a reciklizáció és maga a lebontás, hanem a reciklizáció és

a korai endocitotikus érés alkot egy kapcsolt és egyensúlyban álló rendszert, hiszen a feltételezhetően késői endoszóma-fúzióban részt vevő Syx13 és Vamp7 RNSi esetben a lakúnahossz kontrollszerű maradt, vagyis valószínűleg nem befolyásolta a reciklizációt. Ez az elképzelés azonban további vizsgálatokat igényel.

További terveim közt szerepelnek olyan vizsgálatok, amelyek igazolhatják a korai endoszómális SNARE-komplex létezését biokémiai módszerekkel (koimmunoprecipitáció, pull down módszer), illetve az Ykt6 reciklizációban betöltött szerepét. Szeretném megtalálni a reciklizációban részt vevő Q-SNARE-eket, ezáltal feltárni a reciklizációs SNARE-komplex tagjait is.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Törzsek fenntartása: A törzsek standard tartási körülmények között, vagyis 25°C-on, 12 óra megvilágítás és 12 óra sötétség váltakozása mellett vannak tartva. Az alkalmazott táptalaj a standard kukoricaliszt-agar-élesztő.

Az alkalmazott törzsek, reagensok:

A vizsgált törzsek genotípusa		
Genotípus	RNSi törzsszám	Ábra
+; UAS-DCR-2/Syx7 KK; Prospero>Gal4/+	107264	1., 2., 3., 4., 5.
+; UAS-DCR-2/+; Prospero>Gal4/Syx13 JF	1920	1., 2., 3., 4., 5.
+; UAS-DCR-2/+; Prospero>Gal4/SNAP29 JF	1883	1., 2., 3., 4., 5.
+; UAS-DCR-2/+; Prospero>Gal4/Vamp7 GL	43543	1., 2., 3., 4., 5.
+; UAS-DCR-2/Ykt6 KK; Prospero>Gal4/+	105648	1., 2., 3., 4., 5.
+; UAS-DCR-2/Ykt6 KK; Prospero>Gal4/SNAP29 JF	-	6.

1. táblázat: Alkalmazott törzsek

Használt reagens neve	Hivatkozás	Hígítás
elsődleges antitest		
nyúl poliklonális anti-Rab5	abcam, AB31261	1:1000
egér monoklonális anti-Rab7	DSHB, AB_2722471	1:10
egér monoklonális anti-Sec5	Invitrogen, 1C11G2	1:1000
másodlagos antitest		
kecske anti-nyúl AlexaFluor 488	Sigma, SAB4600234	1:900
ló anti-egér AlexaFluor 568	Sigma, SAB4600082	1:900
konjugált fehérjék		
BSA-AlexaFluor 647	Invitrogen, A34785	1:10
FITC-Avidin	Invitrogen, A821	1:100

2. táblázat: Alkalmazott reagensok

Immuncitokémia: A PBS-ben kiboncolt garland nefrocitákat 4%-os formalin oldatban fixáltam 45 percig szobahőmérsékleten (25°C). 3-szor mostam ki a fixáló oldatot PBS-sel, majd 15 percig 0,1%-os PBTX (detergenstartalmú) oldatban permeabilizáltam a sejteket. Ezután 30 percig 5%-os FCS-PBTX blokkolóoldatban inkubáltam a mintát az aspecifikus fehérjekötő helyek telítése érdekében, majd a mintákat áthelyeztem 60 µl elsődleges antitest-oldatba, és egész éjszakán át 4°C-on inkubáltam. Másnap ezt 4%-os NaCl sózóoldatra cseréltem 15 percre az aspecifikusan kötődő antitestek eltávolítása érdekében. Ezt 3-szor PBTX öblítés követte, majd 15 perc inkubálás PBTX-ben. Ismét 5%-os FCS blokkolóoldatban inkubálódott a minta, majd a sejteket a másodlagos antitest-oldatba helyeztem 3 órára szobahőmérsékleten. A 3 óra elteltével 3-szor PBTX-szel mostam át a mintákat, majd 15 percre Hoechst tartalmú, 4%-os NaCl oldatba helyeztem. Ezután ismét 3-szor PBTX mosás következett, 15 perc inkubációval a 3. után. Végül 4-szer kimostam a mintát PBS-sel, majd ebben tároltam a fotózásig.

Felvételi próba: A garland sejteket M3 médiumban boncoltam, majd 350 µl 0.05 mg/ml FITC-Avidint tartalmazó médiumba helyeztem őket. 25 °C-on inkubáltam a mintát 5:00 percig, majd ennek letelte után azonnal M3-mal 3X kimostam, és 4%-os formalin oldattal 45 percig fixáltam szobahőmérsékleten a sejteket. Ezután 4-szer mostam a mintát PBS-sel.

Lakínafestés: Az M3 médiumban boncolt nefrocitákat 4%-os formalin oldattal 5 percig fixáltam szobahőmérsékleten. Ezt 3-szor 5 perc PBS-sel történő mosás követte, majd a sejtekhez hozzáadtam a 0,2 mg/ml koncentrációjú BSA-Alexa Fluor 647 festéket oldatot. Ebben 15 percig inkubáltam őket 25 °C-on. Ennek leteltével M3-mal átöblítettem a mintát, majd ismét 4%-os formaldehid oldatra cseréltem az M3 médiumot, 45 percre. A fixálót 4-szer egymás utáni PBS-öblítéssel mostam ki²¹.

Ezüst: Az ezüsfelvételi próbához korábban kidolgozott protokollt használtam¹⁶. Az alkalmazott tápközeg kukoricaliszt helyett 0,005% ezüst-nitrátot (AgNO₃) tartalmazott. A vándorló stádiumú (L3) lárvákat PBS-ben kiboncolva, 30 percig 4%-os formalin oldatban fixáltam. 10 másodperces ultraviola (358 nm) fénnel való megvilágítás után az ezüstcsapadék láthatóvá vált, látható fényt alkalmazva fotóztam a mikroszkóppal.

Előkészítés, mikroszkópia: A kész mintákat fedőmédiumban (1 rész 10X PBS, 9 rész glicerin, 0,1 rész 20%-os propil-gallát dimetil-szulfoxidban oldva) fedve fotóztam. A használt epifluoreszcens mikroszkóp típusa AxioImager M2 (Carl Zeiss), AxioCam MRm kamerával felszerelve. Emellett a rendszer egy szemikonfokális ApoTome1 készüléket is tartalmazott. A

használt objektívek: Plan-Neofluar 40x, 0,75 NA (ezüsfelvételi teszt) és 63x, 1,4 NA immerziós (minden egyéb kép). Szoftverek: Zeiss ZEN PRO, Adobe Photoshop CS4.

SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

- A törzseket törzsközpontokból szereztük be. A törzsek fenntartását és keresztezéseiket én végeztem.
- 29 db RNS interferencia Rab5-Rab7 immunfestését; az ezüst és FITC-Avidin felvételi próbákat, lakúna festést, Sec5 immunfestést én végeztem el.
- A mikroszkópos fényképeket, a dolgozatban szereplő ábrákat én készítettem és állítottam össze.

FÜGGELÉK

SNARE\fenotípus kategória	kontrollszeű	kis Rab7+ endoszómák	nagy Rab7+ endoszómák
Syx1a		JF01829	
Syx4	HMS44054, KK102466, JF01714, JF01460	-	GD32413
Syx5	-	-	GD3859, JF03330
Syx7	-	KK107264, GD5413, 5081R-4, JF02436	-
Syx13	GD13120, HSM38525	-	KK102432, JF01920
Syx16	JF01924, GD8644	-	KK19504, HMC03430
Syx17	-	-	JF01937, KK108825, GD36595
Syx18	GD1209	-	KK105113, JF2263
Gos28	HMS01203, KK100289	-	GD12152
Membrin	KK109404, GLC01633	-	R-3, GD44534
Sec20	-	-	HMS34693, KK100264
Vti1a	HMS01727	-	-
Vti1b	HMC06083	-	-
Bet1	HMJ22351	-	GD8420
Syx6	JF03125, KK104795, GD1501	-	-

Syx8	JF26013, GD47154, KK107014	-	-
Use1	GLC01442	-	KK100019, GD42549
SNAP24	JF03146, GD48033, KK108209	-	-
SNAP25	HMS34377, JF02615	-	-
SNAP29	HMC, GD18172	JF01883, KK107947	-
Vamp7	-	-	1599R-1, GL43543, HMS01762, GD13317
Syb	GD30605, 38234, HSM02728, HMS01678, HMS01987	-	KK102922
nSyb	GD49202, KK104531, JF31983, GD49201	-	-
Sec22	GD9888	-	HMS01238, KK100766
Ykt6	HMS, HMJ21032	1515R-1, KK105648, GD19329	-

3. táblázat: A Rab5-Rab7 immunfestéssel elvégzett genetikai szűréshez használt törzsek.

A SNARE-csoportok színek szerint: *Qa*- lila, *Qb*-sárga, *Qc*-narancs, *Qbc*-kék és *R*-piros.

Az egyes SNARE-eknél az 1. ábrán bemutatott képeken látható interferenciák zölddel szedve.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőimnek, Dr. Lőrincz Péternek és Hargitai Dávidnak irányításukat, a rengeteg szakmai segítséget, támogatást, mely nélkül ezen dolgozat nem készülhetett volna el. Hálás vagyok odaadó munkájukért, amivel utamat vezették a projekt során. Továbbá köszönöm a labor többi tagjának is segítőkészségüket.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Cullen PJ, Steinberg F. To degrade or not to degrade: mechanisms and significance of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(11):679-696. doi:[10.1038/s41580-018-0053-7](https://doi.org/10.1038/s41580-018-0053-7)
2. Schwartz AL. Receptor Cell Biology: Receptor-Mediated Endocytosis. *Pediatr Res.* 1995;38(6):835-843. doi:[10.1203/00006450-199512000-00003](https://doi.org/10.1203/00006450-199512000-00003)
3. Fu Y, Zhu J yi, Zhang F, Richman A, Zhao Z, Han Z. Comprehensive functional analysis of Rab GTPases in Drosophila nephrocytes. *Cell Tissue Res.* 2017;368(3):615-627. doi:[10.1007/s00441-017-2575-2](https://doi.org/10.1007/s00441-017-2575-2)
4. Stanton AE, Hughson FM. The machinery of vesicle fusion. *Current Opinion in Cell Biology.* 2023;83:102191. doi:[10.1016/j.ceb.2023.102191](https://doi.org/10.1016/j.ceb.2023.102191)
5. Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT, Jahn R. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1998;95(26):15781-15786. doi:[10.1073/pnas.95.26.15781](https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15781)
6. Hermle T, Braun DA, Helmstädter M, Huber TB, Hildebrandt F. Modeling Monogenic Human Nephrotic Syndrome in the Drosophila Garland Cell Nephrocyte. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2017;28(5):1521. doi:[10.1681/ASN.2016050517](https://doi.org/10.1681/ASN.2016050517)
7. Helmstädter M, Huber TB, Hermle T. Using the Drosophila Nephrocyte to Model Podocyte Function and Disease. *Frontiers in Pediatrics.* 2017;5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2017.00262>
8. Lang K, Milosavljevic J, Heinkele H, et al. Selective endocytosis controls slit diaphragm maintenance and dynamics in Drosophila nephrocytes. Daehn IS, Zaidi M, Daehn IS, Juhász G, eds. *eLife.* 2022;11:e79037. doi:[10.7554/eLife.79037](https://doi.org/10.7554/eLife.79037)
9. Dingjan I, Linders PTA, Verboogen DRJ, Revelo NH, ter Beest M, van den Bogaart G. Endosomal and Phagosomal SNAREs. *Physiological Reviews.* 2018;98(3):1465-1492. doi:[10.1152/physrev.00037.2017](https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2017)
10. Lőrincz P, Kenéz LA, Tóth S, et al. Vps8 overexpression inhibits HOPS-dependent trafficking routes by outcompeting Vps41/Lt. Merz AJ, Malhotra V, Merz AJ, Ungermann C, eds. *eLife.* 2019;8:e45631. doi:[10.7554/eLife.45631](https://doi.org/10.7554/eLife.45631)

11. Lakatos Z, Lőrincz P, Szabó Z, et al. Sec20 Is Required for Autophagic and Endocytic Degradation Independent of Golgi-ER Retrograde Transport. *Cells*. 2019;8(8):768. doi:[10.3390/cells8080768](https://doi.org/10.3390/cells8080768)
12. Gordon DE, Chia J, Jayawardena K, Antrobus R, Bard F, Peden AA. VAMP3/Syb and YKT6 are required for the fusion of constitutive secretory carriers with the plasma membrane. *PLOS Genetics*. 2017;13(4):e1006698. doi:[10.1371/journal.pgen.1006698](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006698)
13. Kloepper TH, Kienle CN, Fasshauer D. SNAREing the Basis of Multicellularity: Consequences of Protein Family Expansion during Evolution. *Molecular Biology and Evolution*. 2008;25(9):2055-2068. doi:[10.1093/molbev/msn151](https://doi.org/10.1093/molbev/msn151)
14. Lu, H., Bilder, D. Endocytic control of epithelial polarity and proliferation in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 7, 1232–1239 (2005). <https://doi.org/10.1038/ncb1324>
15. Morelli E, Ginefra P, Mastrodonato V, et al. Multiple functions of the SNARE protein Snap29 in autophagy, endocytic, and exocytic trafficking during epithelial formation in *Drosophila*. *Autophagy*. 2014;10(12):2251-2268. doi:[10.4161/15548627.2014.981913](https://doi.org/10.4161/15548627.2014.981913)
16. Lőrincz P, Lakatos Z, Varga Á, et al. MiniCORVET is a Vps8-containing early endosomal tether in *Drosophila*. Schekman R, ed. *eLife*. 2016;5:e14226. doi:[10.7554/eLife.14226](https://doi.org/10.7554/eLife.14226)
17. Adnan M, Islam W, Zhang J, Zheng W, Lu GD. Diverse Role of SNARE Protein Sec22 in Vesicle Trafficking, Membrane Fusion, and Autophagy. *Cells*. 2019;8(4):337. doi:[10.3390/cells8040337](https://doi.org/10.3390/cells8040337)
18. Kim S, Wairkar YP, Daniels RW, DiAntonio A. The novel endosomal membrane protein Ema interacts with the class C Vps–HOPS complex to promote endosomal maturation. *Journal of Cell Biology*. 2010;188(5):717-734. doi:[10.1083/jcb.200911126](https://doi.org/10.1083/jcb.200911126)
19. Milosavljevic J, Lempicki C, Lang K, Heinkele H, Kampf LL, Leroy C, Chen M, Gerstner L, Spitz D, Wang M, et al. (2022). Nephrotic syndrome gene TBC1D8B is required for endosomal maturation and nephrin endocytosis in *Drosophila*. *J Am Soc Nephrol* 33, 2174–2193.
20. Langevin J, Morgan MJ, Rossé C, et al. *Drosophila* Exocyst Components Sec5, Sec6, and Sec15 Regulate DE-Cadherin Trafficking from Recycling Endosomes to the

Plasma Membrane. *Developmental Cell*. 2005;9(3):365-376.

doi:[10.1016/j.devcel.2005.07.013](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.07.013)

21. Maruzs T, Feil-Börcsök D, Lakatos E, et al. Interaction of the sorting nexin 25 homologue Snazarus with Rab11 balances endocytic and secretory transport and maintains the ultrafiltration diaphragm in nephrocytes. *MBoC*. 2023;34(9):ar87. doi:[10.1091/mbc.E22-09-0421](https://doi.org/10.1091/mbc.E22-09-0421)
22. Linnemannstöns K, Witte L, Karuna M P, et al. Ykt6-dependent endosomal recycling is required for Wnt secretion in the Drosophila wing epithelium. *Development*. 2020;147(15):dev185421. doi:[10.1242/dev.185421](https://doi.org/10.1242/dev.185421)