

37. OTDK Biológia Szekció

A PXo testek karakterizálása az endolizoszomális rendszerben

Csefkó-Kis Veronika

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Biológia MSc I. évfolyam

Témavezető:

Dr. Lőrincz Péter

ELTE TTK Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék



ELTE
EÖTVÖS LORÁND
UNIVERSITY

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék.....	3
Rezümé	4
Bevezető és célkitűzések	5
Eredmények és megvitatásuk	9
Az adult <i>Drosophila melanogaster</i> középbél epitélium kiterjedt endolizoszomális rendszerrel rendelkezik	9
A PXo testek többsége LysoTracker pozitív	10
A PXo testek nem pozitívak az endolizoszomális rendszerre jellemző molekulákra	11
A PXo testek nincsenek jelen lárvális szövetekben	12
A PXo testek változatos ultrastruktúrával rendelkeznek, valamint kimutatható bennük a savas foszfatáz enzim.....	14
A PXo jel az endoplazmatikus retikulum (ER) területén figyelhető meg a lárvális garland nefrocitákban és a felnőtt enterocitákban.....	16
Összefoglalás és kitekintés.....	18
Anyagok és módszerek	20
<i>Drosophila melanogaster</i> törzsek fenntartása	20
Felhasznált törzsek	20
Immuncitokémia	20
LysoTracker festés	22
Nílus vörös festés	22
Elektronmikroszkópia	22
Mintaelőkészítés, mikroszkópia.....	22
Adatok kiértékelése	23
Szerzői hozzájárulás	23
Köszönetnyilvánítás	23
Irodalomjegyzék	24

Rövidítésjegyzék

CD63: Cluster of Differentiation 63 (63-as differenciálódási csoport)

Cka: Connector of kinase to AP-1 (Kinázt az AP-1-hez kapcsoló fehérje)

Cnx: Calnexin (kalnexin)

DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindole (4',6-diamidino-2-fenilindol)

DMSO: Dimethyl sulfoxide (Dimetil-szulfoxid)

EGTA: Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (Etilén-glikol-bisz(2-aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraecetsav)

ELRO: Endolysosome-related organelle (Endolizoszóma rokon sejtszervecske)

ER: Endoplasmic Reticulum (Endoplazmatikus retikulum)

FCS: Fetal Calf Serum (Magzati borjúsérum)

GFP: Green Fluorescent Protein (Zöld fluoreszcens fehérje)

GlcNAc: N-Acetylglucosamine (N-acetil-glükózamin)

GTP: Guanosine Triphosphate (Guanozin-trifoszfát)

HA: Hemagglutinin

HOPS: HOMotypic fusion and vacuole Protein Sorting complex (Homotipikus fúzió és vakuoláris fehérje szortírozó komplex)

JNK: c-Jun N-terminal Kinase (c-Jun N-terminális kináz)

LAMP: Lysosome-Associated Membrane Protein (Lizoszóma asszociált membránfehérje)

LIMP: Lysosomal Integral Membrane Protein (Lizoszóma integráns membránfehérje)

LRO: Lysosome-Related Organelle (Lizoszómával rokon organellum)

LTR: LysoTracker Red (Vörös LysoTracker)

MHCII: Major Histocompatibility Complex Class II (Fő hisztokompatibilitási komplex II)

MVB: Multivesicular Body (Multivezikuláris test)

PBS: Phosphate-Buffered Saline (Foszfát-pufferes sóoldat)

PBTX: PBS containing Triton X-100 (Triton X-100 PBS-ben)

Pi: Inorganic Phosphate (Szervetlen foszfát)

PIPES: Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic Acid) (Piperazin-N,N'-bis(2-etánszulfonsav))

PXo: Pi-sensitive XPR1 Orthologue (Pi-érzékeny XPR1 ortológ)

Rab: Ras-Related Protein in Brain (Ras-hoz kapcsolt fehérje az agyban)

v-ATPáz: Vacuolar H⁺-ATPase (Vakuoláris H⁺-ATP-áz)

Vps: Vacuolar Protein Sorting (vakuoláris fehérje szortírozó)

XPR1: Xenotropic and Polytopic Retrovirus Receptor 1 (Xenotropikus és politropikus retrovírus receptor 1)

YFP: Yellow Fluorescent Protein (Sárga fluoreszcens fehérje)

Rezümé

A PXo test egy újonnan felfedezett sejtorganellum, amely a szervetlen foszfát (Pi) tárolása, majd felszabadítása által fontos résztvevője az intracelluláris Pi metabolizmusnak és a homeosztázis fenntartásának. Jelentős szerepe ellenére kevés ismerettel rendelkezünk róla, ugyanis kialakulása, illetve más sejtszervekkel való kapcsolata még egyáltalán nem feltárt.

Az adult ecetmuslica bélhámsejtekben megfigyelhető összes PXo test elektronmikroszkópos felvételek alapján multilamelláris szerkezetű és nagy hasonlóságot mutat más sejtekben megfigyelhető multilamelláris lizoszómák és egyes lizoszómával rokon organellumok (LRO-k) morfológiájához. Ez felvetette annak lehetőségét, hogy a PXo testek maguk is lizoszómák vagy LRO-k lehetnek.

Ennek megválaszolására munkánk során a PXo testek mellett az endolizoszomális rendszerre jellemző molekulákat jelöltük immuncitokémiai és egyéb festési eljárásokkal, valamint elektronmikroszkópos vizsgálatokat is végeztünk.

Az eredmények alapján a PXo testek savas pH-val rendelkeznek, valamint kimutatható bennük a savas foszfatáz enzim, azonban nem jellemzők rájuk a leggyakoribb endolizoszomális markerek. Mindez arra utal, hogy hipotézisünk részben helyes lehet, de az biztos, hogy a PXo testek nem klasszikus lizoszómák. Emiatt vizsgálatainkat más organellumokra is kiterjesztettük, és meglepő módon úgy találtuk, hogy a PXo testek endoplazmatikus retikulum eredetűek lehetnek.

A későbbiekben további organellumokra specifikus jelölésekkel fogjuk folytatni a PXo testek karakterizálását, valamint vizsgálni fogjuk a PXo testek képződését eltérő Pi koncentrációjú táptalajokon, illetve LRO vagy ER mutáns genetikai háttereken.

Bevezető és célkitűzések

A lizoszómák foszfolipid kettősmembránnal körülvett organellumok, melyek szerepe az endocitózis, a fagocitózis, vagy az autofágia során felvett makromolekulák és egyéb anyagok degradációja. Azonban a hagyományos lebontó szerepen kívül részt vesznek számos jelátviteli folyamatban, mellyel hozzájárulnak a sejt megfelelő működéséhez, adaptációjához és ezáltal a homeosztázis fenntartásához. Ilyenek például a membránjavítás, az immunsejtek jelátvittele és az anyagcsere. A lizoszómák működésének zavara súlyos kórképek kialakulásához vezethet, ilyenek többek között a lizoszomális tárolási betegségek, a neurodegeneratív betegségek, az anyagcsere betegségek és a rák (Perera és Zoncu, 2016). Mindez kihangsúlyozza az endolizoszomális rendszer normális működésének nélkülözhetetlenségét, ezzel alátámasztva az erre irányuló kutatás jelentőségét.

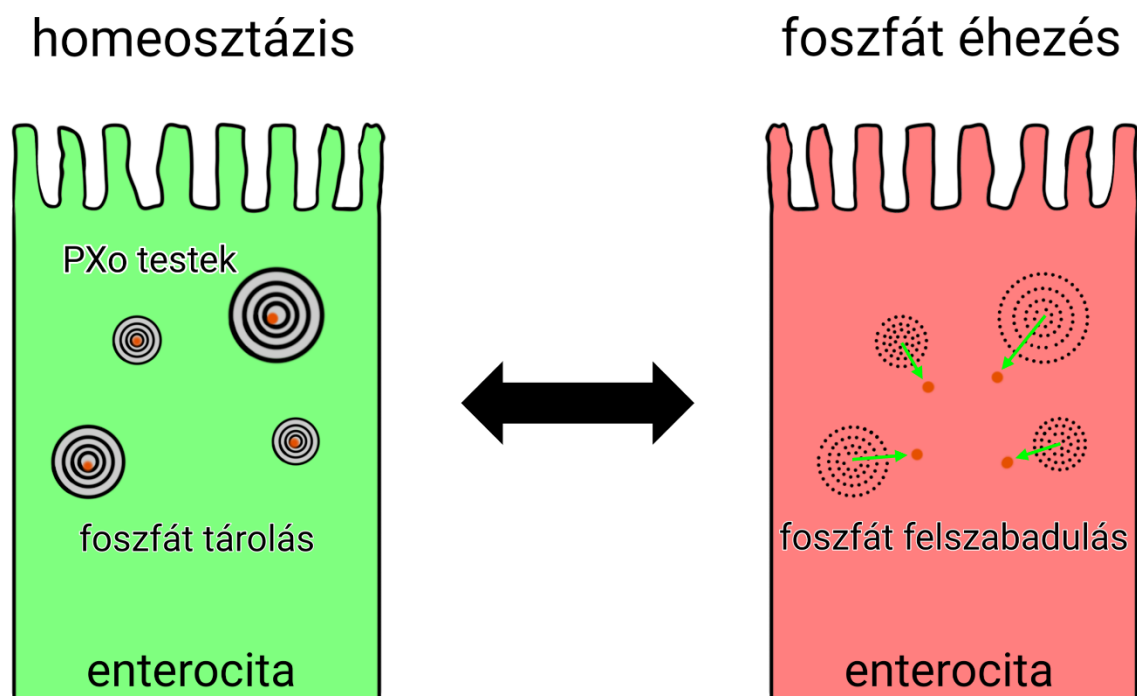
A lizoszómák az endomembrán rendszer részeként minden eukarióta sejtben megtalálható organellumok. Átmérőjük 0,1-1 μm között változik, de meg is haladhatja azt. Méretükön kívül számuk, alakjuk és funkciójuk is változatos. Ezek egyaránt függenek a fajtól, a sejttípustól, valamint a szállított anyagok minőségétől és bontottsági szintjétől. Elektronmikroszkópos képek alapján általában igen változatos morfológiájú struktúrák, például akár koncentrikus multilamelláris membrán struktúrákból is állhatnak (Klumperman és Raposo, 2014). A lizoszómák pH-ja 5 körül van, mivel ez a lizoszomális enzimeknek, a savas hidrolázoknak a pH optimuma. Ezt a vakuoláris ATPáz (v-ATPáz) tartja fenn, amely egy membránon átérő protonpumpa. A lizoszómák más organellumoktól való elkülönítésében további segítséget nyújt a rájuk jellemző membránfehérjék azonosítása. Ilyenek a lizoszóma asszociált membránfehérjék (LAMP) és a lizoszóma integráns membránfehérjék (LIMP) (Winchester, 2001). Ezek közül külön említésre méltó a tetraspanin szupercsaládba tartozó CD63, amely a késői endoszómákon, a lizoszómákon, valamint a lizoszómával rokon organellumokon (LRO) egyaránt megtalálható (Kobayashi és mtsai, 2000).

Az LRO-k olyan organellumok, amelyek membránja és tartalma részben az endolizoszomális rendszerből származik. A hagyományos lizoszómákkal ellentétben nem minden sejttípusban fordulnak elő, általában csak meghatározott feladat ellátására specializálódott sejtekben találhatók meg. Emiatt rendkívül sokféle, egymástól markánsan eltérő LRO-k ismertek. Ezek különbözhetnek a membránjukban megtalálható markerekben, illetve a lumenjükben található anyag felelős legtöbbször a sejt adott funkciójának az

ellátásáért. Ilyenek például a melanocitákban található melanoszómák, amelyek a melanin termelésben játszanak szerepet, ezzel kialakítva az emlősök bőrének és szőrének pigmentációját, valamint a 2-es típusú alveoláris hámsejtek lamelláris testei, amelyek surfactant-ot tartalmaznak, és ezek szekréciójával érhető el a felületi feszültség csökkentése a tüdőben, amely a normális légzőfunkciókhoz elengedhetetlen. Az LRO-k biogenezeise közös útvonalon zajlik, a Golgi-készüléket, a korai endoszómákat és multivezikuláris testeket (MVB) érintve, így tulajdonságaik részben a lizoszómáknak és a szekréciós granulumoknak is megfeleltethetők. Emiatt a nevezéktan pontosítása érdekében az endolizoszóma rokon organelum (ELRO) megnevezést javasolták (Delevoye és mtsai, 2019), azonban a szakirodalomban való elterjedés hiányában ezen dolgozat során a hagyományos elnevezésnél maradok. Az LRO biogenezis útvonal sérülése esetén, egyszerre több, különböző sejttypusban megtalálható LRO működése szenved zavart, ezzel az egész szervezetre jellemző tünetegyüttest okozva.

Szintén jelentős kutatási téma az intracelluláris szerves foszfát (Pi) metabolizmus és jelátvitel tanulmányozása, hiszen ez a molekula elengedhetetlen az élethez. A Pi számos biomolekula felépítésében vesz részt, ilyenek a nukleinsavak, a szénhidrátok és a lipidek. Ezáltal fontos szerepet játszik az örökítőanyag, valamint a biológiai membránok kialakításában. A Pi többek között szükséges a nukleotid-foszfátok (pl.: ATP, GTP) kialakulásához, ezáltal részt vesz számos jelátviteli folyamatban, valamint az energia metabolizmus központi résztvevője is.

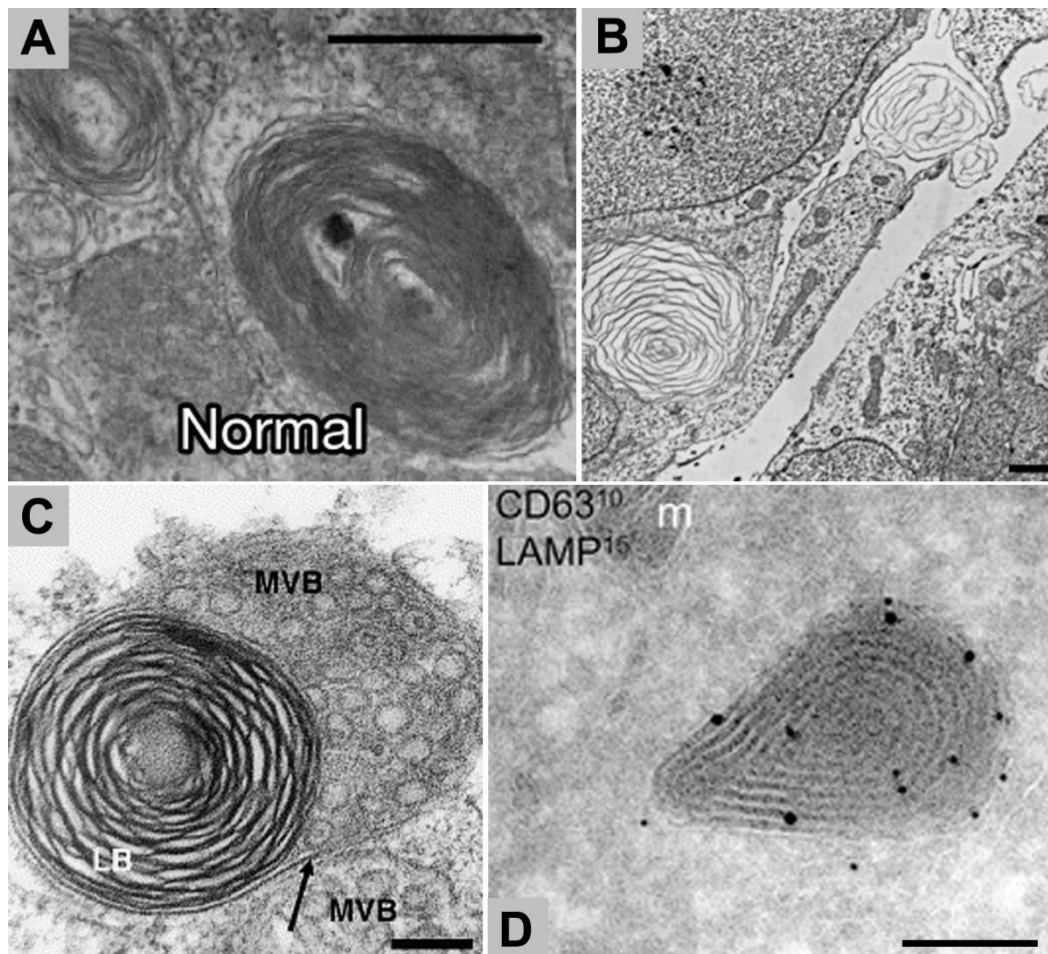
Az intracelluláris Pi metabolizmus és jelátvitel megértése céljából a Pi éhezés hatását vizsgálták adult *Drosophila melanogaster* középbelének epitéliumában. Ennek során azt figyelték meg, hogy a Pi éhezés hatására a PXo (Pi-érzékeny XPR1 ortológ) fehérje, amely egy Pi transzporter, termelése gátlás alá került, amely a középbeli sejteinek hiperproliferációjához vezetett, a PXo-Cka-JNK jelátviteli kaskád által (Xu és mtsai, 2023). Ezen folyamat tanulmányozása során felfedezték, hogy a PXo a Pi-t multilamelláris organelumokba szállítja, ahol az foszfolipidként kerül tárolásra. Ezt az újonnan felfedezett organelumot, amelyet egyik korábban ismert organelumnak sem tudtak megfeleltetni PXo testnek nevezték el (1. ábra) (Xu és mtsai, 2023).



1. ábra: A PXo testek szerepet játszanak az intracelluláris foszfát homeosztázis fenntartásában

Az ecetmuslica enterocitáiban homeosztázis esetén a P_i a PXo testekben tárolódik foszfolipidként. Foszfát éhezés hatására a PXo testek lebontódnak, ezáltal felszabadítva a P_i -t és helyreállítva a homeosztázist (saját ábra, Xu és mtsai, 2023 alapján).

A PXo test multilamelláris organelum lévén az endolizoszomális rendszer számos organelumára hasonlít (2. ábra). Ilyenek a multilamelláris lizoszómák és endoszómák, továbbá a lamelláris testek, melyek a 2-es típusú alveoláris hámsejtekben, valamint a keratinocitákban megtalálható LRO-k. A dendritikus sejtek érése során az MHCII kompartmentumot tartalmazó lizoszómák is multilamelláris struktúrát vesznek fel, amelyek szintén LRO-knak tekinthetők. Mindezt megfigyelve jelen dolgozat keretében a PXo testek endolizoszomális rendszerben való elhelyezkedésére kerestük a választ, szem előtt tartva a hipotézist, miszerint ezek az újonnan felfedezett organelumok lizoszómák vagy LRO-k lehetnek. A PXo testek vizsgálatával megismerhetjük az endolizoszomális rendszerrel alkotott kapcsolatukat, további belelátást nyerhetünk a P_i intracelluláris metabolizmusába, valamint a jövőben teret nyithatunk a PXo emlős ortológja, az XPR1 (xenotropikus és politropikus retrovírus receptor 1) által ismereteink klinikai alkalmazásának is.



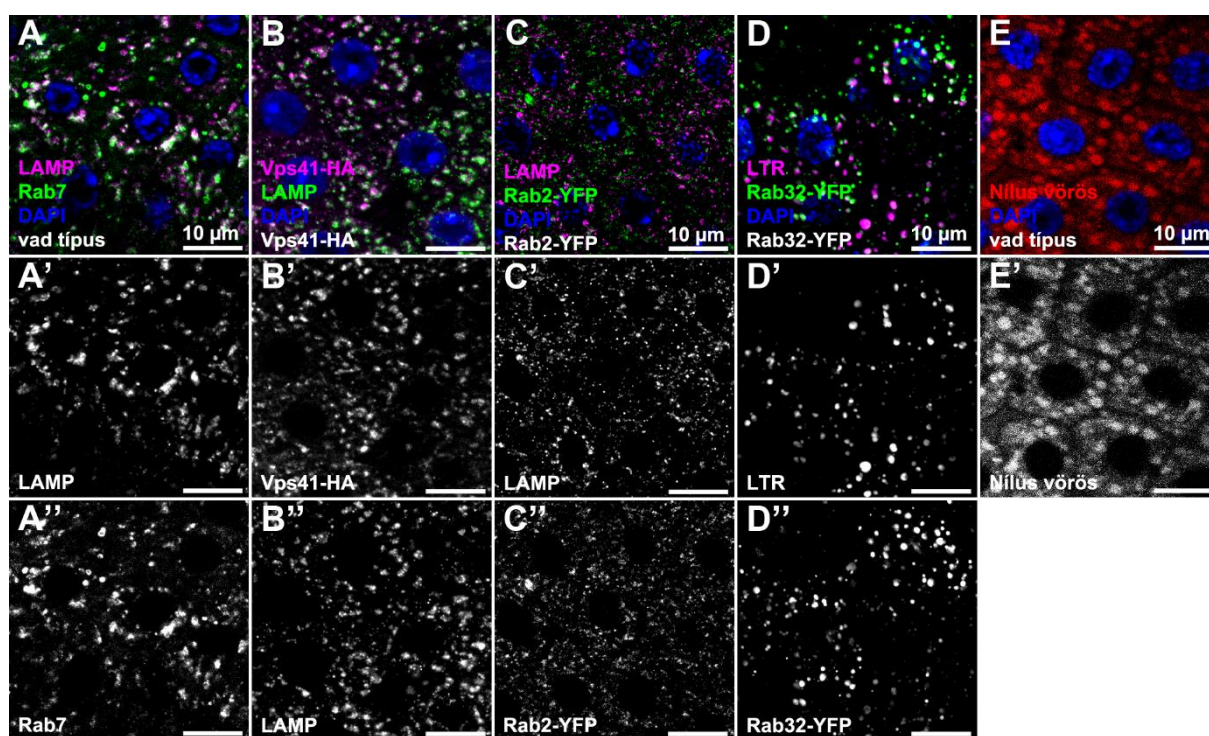
2. ábra: Különböző multilamelláris organellek összehasonlítása a PXo testekkel

- A:** PXo test *Drosophila melanogaster* középbél bélhámsejtben. Skála: 1 μ m. (Xu és mtsai, 2023)
- B:** Multilamelláris testek GlcNAc-TV-transzfectált klón M9 sejtben. Skála: 0,5 μ m. (Hariri és mtsai, 1999)
- C:** Lamelláris test (LB) főtális egér 2-es típusú alveoláris hámsejtben, amely egy multivezikuláris testtel (MVB) fuzionál. Skála: 200 nm. (Weaver és mtsai, 2002)
- D:** Lizoszóma éretlen dendritikus sejtekben, amely az MHCII kompartmentumok tárolásával vesz részt az immunválaszban. A CD63 (10 nm arany) és a LAMP1 (15 nm arany) is kimutatható benne, ezzel alátámasztva lizoszomális eredetét. Skála: 200 nm. (van der Wel és mtsai, 2003)

Eredmények és megvitatásuk

Az adult *Drosophila melanogaster* középbél epitélium kiterjedt endolizoszomális rendszerrel rendelkezik

A PXo testek és az endolizoszomális rendszer kapcsolatának megismerésének első lépéseként adult *Drosophila melanogaster* bélsejtjeiben végeztünk el vizsgálatokat, a számunkra új szövettípus megismerése érdekében. Az ecetmuslica bélrendszerének felépítése strukturálisan és funkcionálisan analóg az emberével. Középbelének epitéliumát négy sejtípus alkotja: a bélőssejtek enteroblasztokká alakulnak, amik vagy enterocitákká vagy enteroendokrin sejtekké differenciálódnak. Az enterociták morfológiája és funkciója a bél különböző szakaszain eltérő, alapvető feladatuk az emésztőenzimek szekréciója és a tápanyagok felszívása, majd transzportja (Capo és mtsai, 2019).



3. ábra: Különböző endolizoszomális markerek vizsgálata adult bélsejtben

A: vad típus; LAMP, Rab7 immunfestés. **B:** Vps41-HA; HA, LAMP immunfestés. **C:** Rab2-YFP; LAMP immunfestés. **D:** Rab32-YFP; LysoTracker (LTR) festés. **E:** vad típus; Nile red festés.

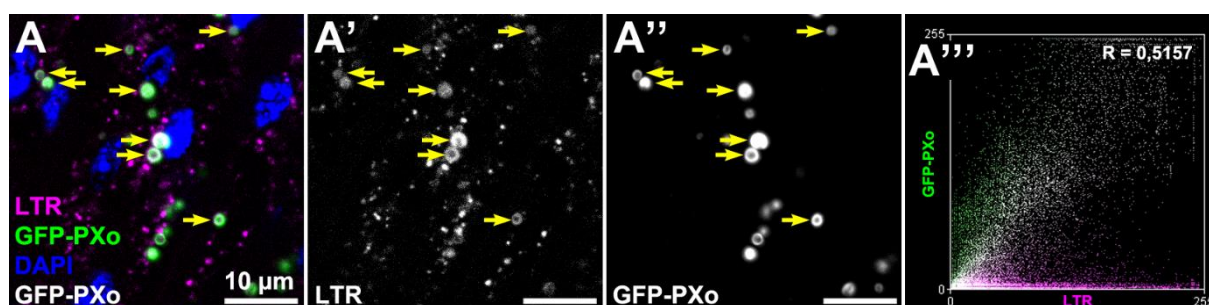
A sejten belül az egyes organelumokat a rájuk specifikusan jellemző molekulák alapján tudjuk megkülönböztetni. Ezek lehetnek például membránfehérjék, mint a LAMP, ami a lizoszómák membránjában található (3. ábra/A, B, C). A Rab kis GTPázok szintén segítenek a membránok identitásának meghatározásában. A Rab5 a korai endoszómákra, a Rab7 a késői

endoszómákra jellemző (3. ábra/A). A Rab2 az autofagoszóma-lizoszóma fúzióban vesz részt, így a lizoszómákra és autolizoszómákra jellemző (3. ábra/C) (Lőrincz és mtsai, 2017b). A Rab32 pedig az LRO-k biogenezésének fontos szereplője (3. ábra/D) (Bultema és Di Pietro, 2013). A Rab kis GTPázokhoz pályvázó faktorok kapcsolódnak a fúziós folyamatok során. Ilyen például a több alegységből álló (Vps39, Vps41, Vps18, Vps11, Vps16, Vps33) HOPS komplex, amely a Rab7-hez kapcsolódva a késői endoszómák és lizoszómák fúziójának fontos résztvevője (3. ábra/B). A LysoTracker a savas organellumokat festi meg, így ez kiválóan alkalmas a lizoszómák jelölésére (3. ábra/D). A Nílus vörös egy lipid festék, így az intracelluláris lipid cseppek jelölésére alkalmas (3. ábra/E), valamint a PXo testeket is megfesti (Xu és mtsai, 2023).

Mindezt figyelembe véve a 3. ábrát megfigyelve látható, hogy a bélhám felszívó funkciója kiterjedt endolizoszomális kompartmentumot igényel, számos endoszóma, lizoszóma, autolizoszóma és LRO található meg benne. Továbbá az is megfigyeltük, hogy ezek mintázata és a sejtek mérete a középből különböző szakaszain eltérő.

A PXo testek többsége LysoTracker pozitív

A felnőtt ecetmuslica bélsejtjeinek endolizoszomális rendszerének megismerése után, a PXo testek tanulmányozása következett, aminek során a PXo testek és a lizoszómák vagy LRO-k egyező tulajdonságait kerestük. A szerzőktől elkértük az általuk előállított PXo testeket kijelölő reagenseket, muslicatörzseket. Ezek közül a GFP-PXo-t kifejező működött a legjobban, amin LysoTracker festést végeztünk el. A LysoTracker a savas organellumokat jelöli ki, így ezzel az eljárással a PXo testek pH-járól nyertünk információt.



4. ábra: LysoTracker festés GFP-PXo törzsön

A: GFP-PXo, LysoTracker festés. Sárga nyilak: PXo és LTR kolokalizáció. A''': n=7 sejtől származó jel-eloszlás átlagos scatter plot és a sejtekből számolt átlagos Pearson koefficiens, R=0,5157.

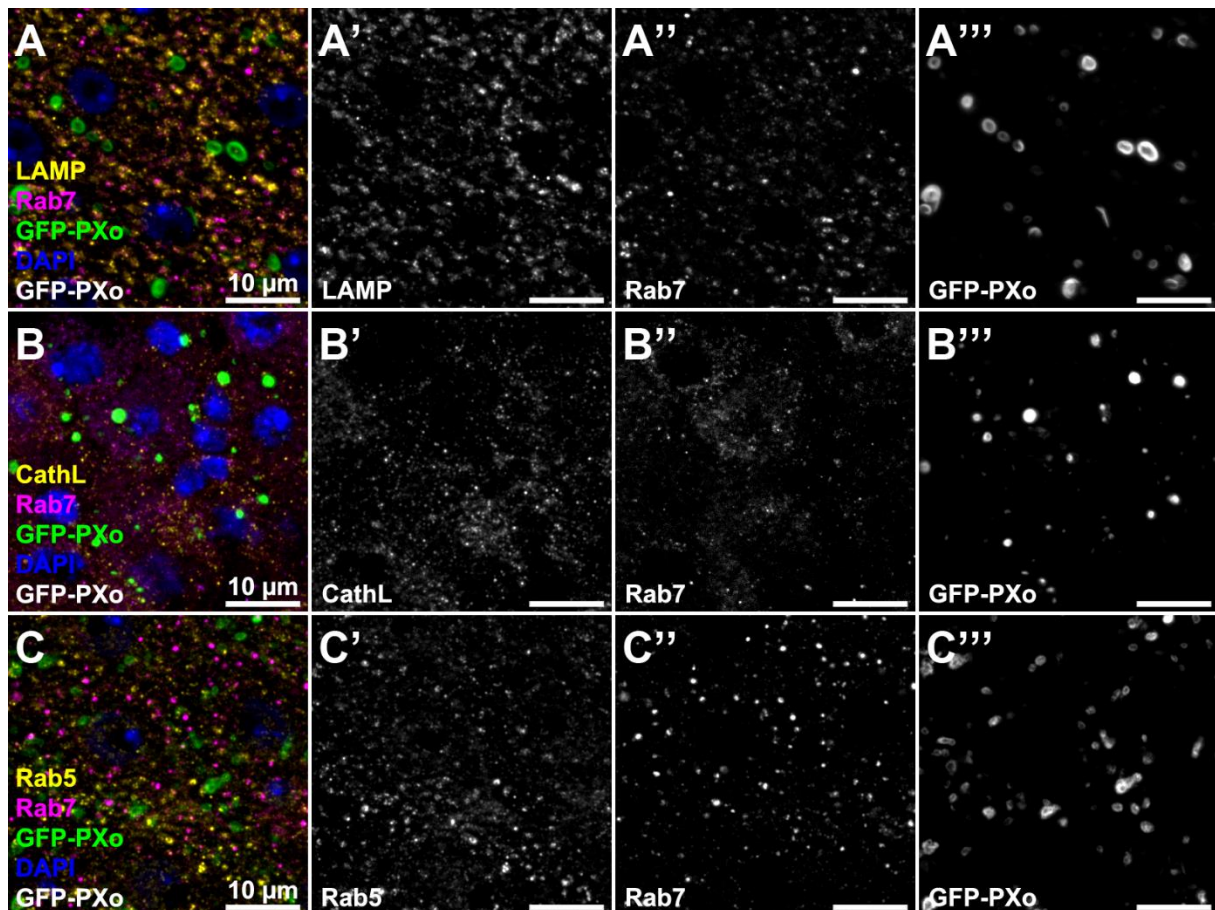
A 4. ábrán jól látható, hogy a PXo testek többsége kolokalizál a LysoTrackerrel, amit az eloszlás scatter plot és a pozitív Pearson koefficiens ($R=0,5157$) is alátámaszt. Ezen PXo testek tehát savas pH-val rendelkeznek. A sejtekben legjellemzőbb savas organelumok a lizoszómák, ezért ezzel a festéssel könnyen azonosíthatók, azonban érdemes szem előtt tartani, hogy az LTR pozitív organelumok nem feltétlenül lizoszómák. Két lehetséges magyarázat a megfigyelésre, hogy az LTR pozitív PXo testek lizoszómákkal fuzionáltak a degradáció érdekében, vagy maguk is savasak és bontás folyik bennük, emiatt lizoszómáknak tekinthetők. A savasságuk mértéke pedig függhet a lizoszómával való fúziótól, vagy az érettségi állapotuktól, ami magyarázatot adhat a nem festődött PXo testekre. Ezek meghatározására további vizsgálatok szükségesek, amelyekben lizoszóma és endoszóma specifikus jelöléseket alkalmaztunk.

A mikroszkópos felvételek készítése során érdekes dologra lettünk figyelmesek. A PXo testek nagyobb számban voltak jelen azokon a bélszakaszokon, ahol az a boncolás során megsérült, elszakadt. Ennek a jelenségnek az okára nincs pontos magyarázat, de úgy gondoljuk, hogy a látszólagos ellentmondás ellenére, a szöveti homeosztázist fenntartó PXo-Cka-JNK jelátviteli kaszkád lehet a felelős érte, amelynek regeneratív szerepe van.

A PXo testek nem pozitívak az endolizoszomális rendszerre jellemző molekulákra

A PXo testek további jellemzése érdekében további immunfestéseket végeztünk el, aminek során az endolizoszomális rendszerre jellemző molekulákat jelöltük. Ezek között szerepelt a Rab5, ami a korai endoszómákat, a Rab7, ami a késői endoszómákat, valamint a LAMP és a katepszin (CathL), ami a lizoszómákat jelöli ki. A kísérletek során a GFP-PXo törzs felnőtt egyedeit vizsgáltuk.

A 5. ábrán jól látható, hogy a PXo testek nem kolokalizálnak egyik általunk vizsgált endolizoszomális markerrel sem. Ebből arra következtethetünk, hogy a PXo testek nem klasszikus lizoszómák, és nem szerepelnek a klasszikus endocitotikus lebontó útvonalban.



5. ábra: A PXo testek nem kolokalizálnak az endolizoszomális rendszerre jellemző markerekkel

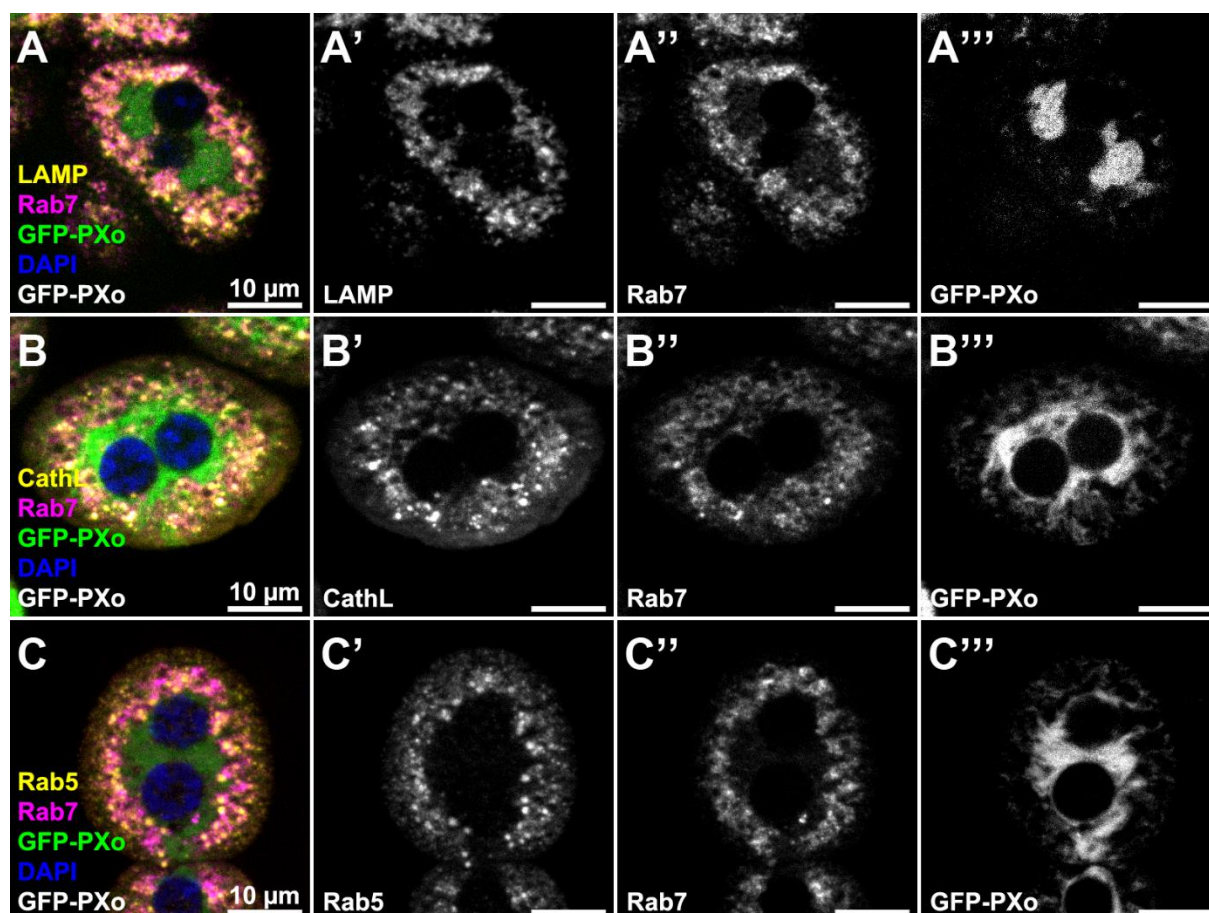
A: GFP-PXo, Rab7, LAMP immunfestés. B: GFP-PXo, Rab7, CathL immunfestés. C: GFP-PXo, Rab7, Rab5 immunfestés.

A PXo testek nincsenek jelen lárvális szövetekben

Az *ecetmuslica* kiváló genetikai, fejlődésbiológiai és sejtbiológiai modellszervezetnek bizonyul, többek között könnyű fenntarthatósága, gyors egyedfejlődése, magas szaporodóképessége, és biológiai útvonalainak konzerváltsága miatt. A kutatócsoport egyéb kutatásai során lárvális szövetekkel dolgozik, hiszen ezek gyorsabban elérhetőek, mint a felnőtt egyedek, továbbá a garland sejt nefrociták és a zsírtestek kiválóan alkalmasak az endocitózis, az autofágia és egyéb endolizoszomális folyamatok résztvevőinek tanulmányozására. Xu és munkatársai csak felnőtt bélsejtekben vizsgálták a PXo testeket, lárvális szövetekben nem, a fentebb említett okok miatt azonban fontosnak tartottuk megvizsgálni a PXo testek jelenlétét ezekben a sejt típusokban is.

A garland sejt nefrociták a nyelőcső körül formálnak gyűrűt. Molekuláris, ultrastrukturális és funkcionális értelemben egyaránt hasonlítanak a gerinces podocitákra, így a vesebetegségek kiváló modelljeként szolgálnak. A kiválasztó szerv funkciót az

endocitózis által töltik be, aminek során az ecetmuslica véréből, vagyis hemolimfájából vesznek fel anyagokat. Ezután a lebontandó anyagok a lizoszómaiba kerülnek és degradálódnak, a hasznos anyagok pedig reciklizálódnak a hemolimfába (Helmstädter és mtsai, 2017). A garland sejt nefrociták két sejtmagja körül koncentrikus körökben jelennek meg a különböző érettségű endolizoszomális sejtalkotók, ami további előny ezen rendszer vizsgálata során.



6. ábra: A PXo testek nem kolokalizálnak az endolizoszomális rendszerre jellemző markerekkel a lárvális garland nefrocitákban

A: GFP-PXo, Rab7, LAMP immunfestés. **B:** GFP-PXo, Rab7, CathL immunfestés. **C:** GFP-PXo, Rab7, Rab5 immunfestés.

A garland nefrociták immuncitokémiai vizsgálata során jól elkülöníthető PXo testeket nem figyeltünk meg, így az endolizoszomális rendszerrel való kolokalizációjuk sem volt megfigyelhető (6. ábra). A GFP-PXo jel a sejtmag körül helyezkedett el, azon a területen, ami ebben a sejtípusban az endoplazmatikus retikulumra (ER) jellemző. Ennek magyarázata lehet, hogy a PXo valóban az ER-ben helyezkedik el, vagy hogy a PXo testek biogenezeise során innen szállítódik a fehérje az organelumokba. A jelenség másik lehetséges

magyarázata, hogy a detektált jel csupán műtermék, amely az ER-ben elakadt túltermelt riportert jelöli ki.

Az *ecetmuslica* zsírtestjei szintén kiválóan alkalmasak a sejttani folyamatok vizsgálatára. Ezek közül kiemelkedő szereppel bír az autofágia tanulmányozása, ugyanis a zsírtestek tápanyagraktárként szolgálnak, így éhezés esetén lipideket, szénhidrátokat, és aminosavakat juttatnak a hemolimfába, ezzel fenntartva a homeosztázist. Ennek köszönhetően a zsírtestekben éheztetéssel indukálható az autofágia, ami megkönnyíti ennek a folyamatnak a tanulmányozását. További előnyei ennek a sejtípusnak, hogy a zsírtestet alkotó két lebenyben egy vagy legfeljebb két sejtrétegben helyezkednek el a sejtek, így mikroszkóppal könnyen vizsgálhatók (Lőrincz és mtsai, 2017a).

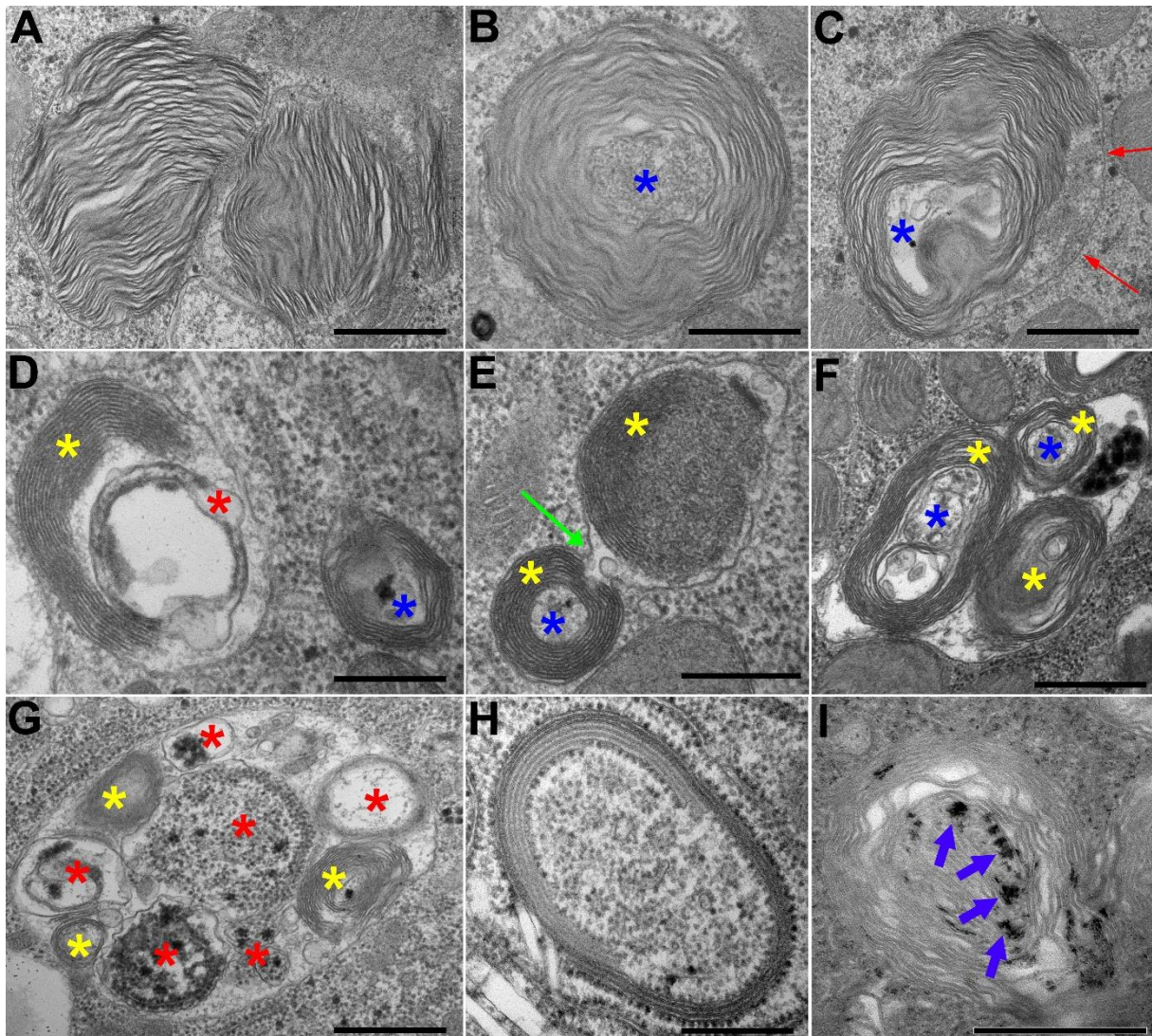
A zsírtestek immuncitokémiai vizsgálata során ugyanazokat az endolizoszomális markereket vizsgáltuk, mint a garland nefrociták esetében, vad típusú és PXo-HA *ecetmuslicákban*. Ebben az esetben azonban egyik vizsgált törzsben sem találtunk értékelhető jelet.

A lárvális szövetek vizsgálatának eredményeit összegezve arra a megállapításra jutottunk, hogy azok nem alkalmasak a PXo testek tanulmányozására, mivel bennük a PXo testek vagy nincsenek jelen, vagy az ER-hez lokalizálódnak.

A PXo testek változatos ultrastruktúrával rendelkeznek, valamint kimutatható bennük a savas foszfatáz enzim

A PXo testek tanulmányozása során elektronmikroszkópos vizsgálatokat is végeztünk az ultrastrukturális és morfológiai elemzés érdekében, vad típusú felnőtt középbeleken. E során elvégeztük a savas foszfatáz enzimcitokémiai vizsgálatot is, amely a lizoszomális enzim, a savas foszfatáz kimutatására alkalmas.

Az elektronmikroszkópos vizsgálataink alátámasztják Xu és mtsai eredményét, miszerint a PXo testek multilamelláris morfológiájúak. Viszont ezen felül számos új megfigyelést tettünk: például a PXo testekben a lamellák párhuzamosan, vagy koncentrikusan helyezkednek el a metszésiránytól függően. A 7. ábrán megfigyelhető, hogy a PXo testek rendkívül változatos formában jelennek meg. Alakjuk a keresztmetszeti képeken kerek vagy elnyúlt. Sokszor tartalmaznak különböző citoplazma részleteket (7. ábra/B, C). Valamint különböző érettségű lizoszómákban is megtalálhatók (7. ábra/D-G).



7. ábra: A PXo testek ultrastrukturális vizsgálata és a savas foszfatáz enzimcitokémiai vizsgálat

Az összes ábrán felnőtt ecetmuslica vad típusú bélhámsejteket vizsgáltunk. Skála: A, F, G, I esetben 0,5 μ m, B, C, D, E, H esetben 0,25 μ m. **A:** Koncentrikusan multilamelláris PXo testek, melyek nem tartalmaznak citoplazma részleteket. **B és C:** Citoplazma részleteket (kék csillag) tartalmazó PXo test szerű organelumok. A piros nyilak a határoló membránt jelölik. **D-G:** Autolizozómába zárt degradálódó PXo testek (sárga csillag) és degradálódó membránnal körülvett citoplazma részletek (piros csillag), amelyek a lebontás különböző szakaszaiban vannak. **E:** PXo test és lizoszóma fúzió (zöld nyíl). **H:** Formálódó PXo test, amely membránján riboszómák figyelhetők meg. **I:** Savas foszfatáz enzimcitokémiai vizsgálat, a kék nyilak a PXo testben kimutatható savas foszfatázt jelölik. (A részletes magyarázat a törzsszövegben olvasható.)

A PXo testek fuzionálhatnak a lizoszómákkal, a 7. ábra/E jól mutatja ezt a folyamatot, amelyen a bal alul látható citoplazma részletet tartalmazó PXo test fuzionál a jobb felül található lizozómával, amelyben a kevésbé kifejezett lamellák alapján egy bontáson keresztülmentő PXo test figyelhető meg. Mindez arra utal, hogy a PXo testek lebontása lizoszomális úton megy végbe. A PXo testek lamelláinak száma is változatos, amely az organelum érettségi, vagy lizoszomális degradáció esetében a bontottsági szintjével van összefüggésben. Például a 7. ábra/D esetén a PXo test előrehaladottabb bontottsági

állapotban van, így kevesebb lamellával rendelkezik, míg a 7. ábra/F, G esetben a lizoszómában megtalálható PXo testekre a kevésbé bontott forma jellemző. A 7. ábra/H képen látható kevesebb lamellát tartalmazó struktúra emlékeztet a PXo testekre, viszont fontos megfigyelni, hogy ez a feltehetően még éretlen, éppen képződő PXo test rendkívül közel helyezkedik el a durva felszínű ER-hez, valamint, hogy a szélső lamellákon a DER-hez hasonlóan szintén megfigyelhetők a riboszómák. Mindez arra is utalhat, hogy a PXo testek valójában az ER-ből képződnek, ami megmagyarázná a bennük sokszor megjelenő citoplazma részleteket, valamint az előző vizsgálatok során a lizoszomális markerek hiányát, továbbá a garland nefrocitákon végzett vizsgálatokon a PXo riporter elhelyezkedését.

Nagyon fontos eredményünk, hogy az érett PXo testekben kimutatható a savas foszfatáz enzim (7. ábra/I). A savas foszfatáz jelenléte, lizoszomális enzim lévén, megerősíti azt a feltételezésünket, hogy kapcsolat van a PXo testek és a lizoszómák között.

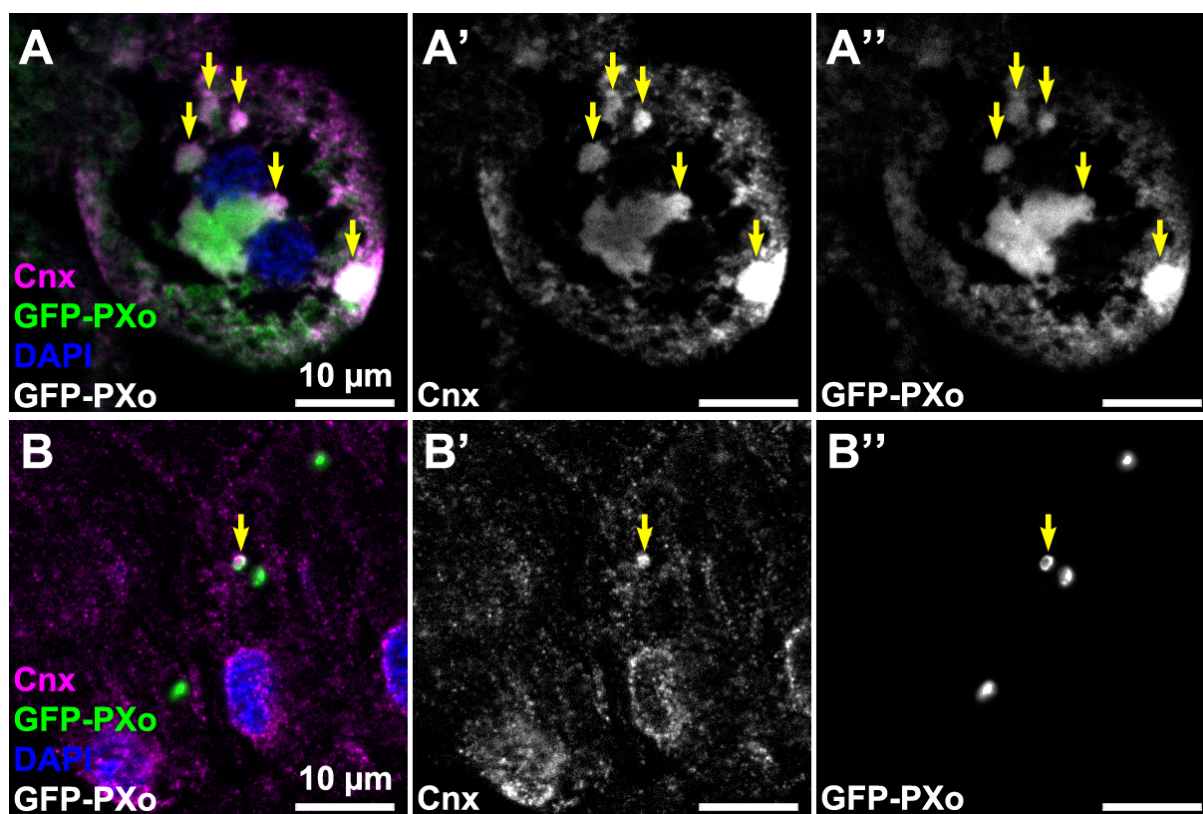
Az elektronmikroszkópos vizsgálatok eredményei alapján felállítható a hipotézis, miszerint a PXo testek kialakulásuk után éretlen formában vannak jelen, majd ezután lizoszómával egyesülhetnek, aminek hatására érett állapotba kerülnek, elsavasodnak, és jelen lesz bennük a savas foszfatáz enzim, amely felszabadíthatja a bennük tárolt foszfátot.

A PXo jel az endoplazmatikus retikulum (ER) területén figyelhető meg a lárvális garland nefrocitákban és a felnőtt enterocitákban

A korábban bemutatott eredmények alapján a PXo jel a garland sejtek immuncitokémiai vizsgálata során az ER területén volt megfigyelhető (6. ábra). Az elektronmikroszkópos vizsgálat során a felnőtt enterocitákban valószínűleg éppen érésen keresztülmenő PXo test (7. ábra/H), pedig szintén az ER közelében, arról lefűződve volt megfigyelhető. Ez a két megfigyelés hívta fel a figyelmünket a lehetséges kapcsolatra a PXo testek és az ER között.

Az ER rendkívül fontos feladatot lát el egy sejt életében, többek között itt mehet végbe a fehérjék szintézise, érése és a rájuk jellemző poszttranszlációs módosítások egy része is itt kerül rájuk, valamint az ER kalcium raktárként is szolgál, ezáltal jelátviteli útvonalakban is részt vesz.

Annak bizonyítására, hogy az ER-ben elhelyezkedő PXo jel valós, és nem csupán műtermék, ahogy azt korábban feltételeztük, immuncitokémiai vizsgálatot végeztünk el a GFP-PXo lárvális garland nefrocitákon és felnőtt bélsejteken, amelynek során a kalnexint (Cnx) jelöltünk ki, amely egy ER-re jellemző integráns membránfehérje.



8. ábra: A PXo jel kolokalizál az ER-rel a lárvális garland nefrocitákban és a felnőtt enterocitákban

A: GFP-PXo, lárvális garland nefrocita, Cnx immunfestés. **B:** GFP-PXo, felnőtt enterocita, Cnx immunfestés.

Az 8. ábra jól mutatja, hogy a garland nefrocitákban a PXo jel, a felnőtt enterocitákban pedig a PXo testek egy része kolokalizál az ER markerrel. Ez és az elektronmikroszkópos megfigyelés alátámasztotta a PXo testek és az ER közötti kapcsolatot. Eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a PXo testek az ER-ről lefűződve képződnek, így éretlen állapotukban megtalálható rajtuk a kalnexin, majd érett állapotukban függetlenné válnak az ER-től és elveszítik ezt az ER-re jellemző fehérjét.

Összefoglalás és kitekintés

A PXo test a *Drosophila melanogaster* középbél hámsejtjeiben megtalálható újonnan felfedezett multilamelláris organellum (Xu és mtsai, 2023), amely a Pi tárolásával és szabadon bocsátásával a Pi metabolizmus és homeosztázis fontos résztvevője. Kialakulása és más sejtszervekkel való kapcsolata ezelőtt teljesen ismeretlen volt, így ezen dolgozat keretében az endolizoszomális rendszerrel való kapcsolatát vizsgáltuk, az egyes LRO-kkal és multilamelláris lizoszómákkal alkotott morfológiai hasonlósága miatt.

Előzetes kutatómunkánk során megerősítettük, hogy az *ecetmuslica* bélhámsejtek kiterjedt endolizoszomális rendszerrel rendelkeznek, számos endoszóma, lizoszóma és LRO megtalálható bennük, így kiválóan alkalmasak a kutatásunk elvégzésére.

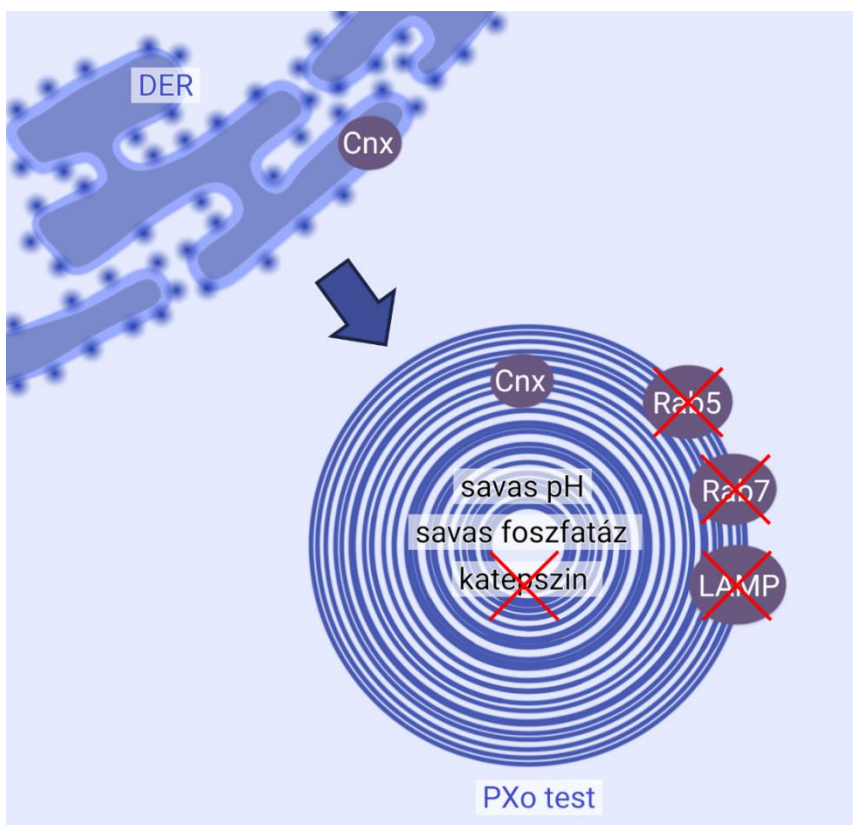
A LysoTracker festés alkalmazásával bebizonyítottuk, hogy a PXo testek nagy része savas pH-val rendelkezik. Azonban az immuncitokémiai módszerek alapján a PXo testek nem kolokalizálnak egyik általunk vizsgált (LAMP, CathL, Rab7, Rab5) endolizoszomális markerrel sem. Ezeket a kísérleteket lárvális szövetekben, a zsírtestekben és a garland nefrocitákban is elvégeztük. Előbbi során PXo testek nem voltak megfigyelhetők, utóbbi során a PXo jel pedig az ER területén volt megfigyelhető. A PXo testek hiányában arra a következtetésre jutottunk, hogy ezek a szövetek nem alkalmasak a PXo testek vizsgálatára. A középbélben megfigyelhető PXo testek ultrastrukturális vizsgálatának elvégzése fényt derített ezen organellum változatos morfológiájára. A savas foszfatáz enzimcitokémiai vizsgálat kimutatta, hogy a PXo testekben jelen van a savas foszfatáz lizoszomális enzim.

Eredményeink alapján arra következtettünk, hogy az endolizoszomális markerek hiányában a PXo testek nem klasszikus lizoszómák, azonban savas pH-juk és savas foszfatáz tartalmuk miatt nem zárható ki, hogy egy újfajta LRO típusról van szó. Az ultrastrukturális vizsgálat bebizonyította, hogy a PXo testek és a lizoszómák között fúzió mehet végbe. Ezzel bebizonyult, hogy a PXo testek lizoszomális úton degradálódnak, viszont felmerült annak a lehetősége is, hogy a PXo testeknek két fejlődési állapota lehet: egy éretlen forma, amely nem savas, és savas foszfatázt sem tartalmaz, és egy lizoszómával fuzionált, érett forma, amelyben a pH savas és jelen van a savas foszfatáz enzim, ezáltal benne feltehetően foszfát felszabadítás történik. Ezt alátámasztja az is, hogy bár számos PXo test savas, vannak kevésbé savas és semleges pH-jú PXo testek is. Emellett az ultrastrukturális vizsgálat során egy esetben azt figyeltük meg, hogy a PXo test a DER közelében képződik, és szélső

membránjaiban megtalálhatók a DER-re jellemző riboszómák. Ez felvetette a PXo testek ER eredetét, amelyet a garland nefrocitákon immuncitokémiával elért eredmény is alátámasztott, így eredeti munkatervünkől eltérve az ER-re is fókuszáltunk későbbi vizsgálatainkban. Azt tapasztaltuk, hogy a PXo jel valóban kolokalizál az ER-rel, a lárvális garland nefrocitákban és a felnőtt enterocitákban egyaránt, ezáltal tovább erősítve a feltételezésünket, miszerint a PXo testek az ER-ből származnak (9. ábra).

A továbbiakban folytatjuk a PXo testek karakterizálását és biogenezisük tisztázását. Mindezt immuncitokémiai módszerekkel visszük majd véghez, amely során LRO és ER specifikus jelöléseket fogunk alkalmazni, a továbbiakban LRO és ER mutáns genetikai háttereken. Ezen kívül szeretnénk megvizsgálni a PXo testek képződését Pi éhezés és Pi többlet esetén is, amihez majd eltérő Pi koncentrációjú táptalajokat veszünk igénybe.

A PXo testek képződésének, tulajdonságainak és kapcsolatainak feltárásával mélyebb betekintést nyerhetünk az intracelluláris Pi metabolizmusba és homeosztázis fenntartásába, amely elengedhetetlen a normális életfolyamatok fennmaradásához.



9. ábra: Eredményeinket összefoglaló ábra

A PXo testek multilamelláris organellek, amelyek savas pH-val rendelkeznek, és megtalálható bennük a savas foszfatáz enzim. Az általunk vizsgált endolizoszomális markerek, a katepszin, a Rab5, a Rab7 és a LAMP nem voltak megfigyelhetők a PXo testeken. Viszont jellemző rájuk az ER membránfehérje, a kalnexin, amely arra utal, hogy a PXo testek ER eredetűek. Mindezek által arra következtetünk, hogy a PXo testek nem klasszikus lizoszómák, azonban LRO létüket nem tudjuk elvetni.

Anyagok és módszerek

Drosophila melanogaster törzsek fenntartása

A *Drosophila melanogaster* törzseket standard tartási körülmények között, 25 °C-on, átlag 12 órás megvilágítás mellett tartottuk kukoricaliszt-agar-élesztő alapú táptalajon.

Felhasznált törzsek

Törzs	Forrás	Törzs azonosítója vagy referencia
Vad típus, w ¹¹¹⁸	BDSC	5905
Expressziós rendszerek		
Myo1AGal4	Norbert Perrimon	Xu és mtsai, 2023
prospero-Gal4	BDSC	80572
Riporter törzsek		
Vps41-HA	Lőrincz Péter	Lőrincz és mtsai, 2019
Rab2-YFP	BDSC	23246
Rab32-YFP	BDSC	62558
GFP-PXo	Norbert Perrimon	Xu és mtsai, 2023
PXo ^{2xHA}	Norbert Perrimon	Xu és mtsai, 2023

1. táblázat: Felhasznált törzsek

BDSC: Bloomingtoni *Drosophila* Törzsközpont

Immuncitokémia

Az adult nőstény *Drosophila melanogaster* középbélmintákat szén-dioxidos altatás, majd dekapitalás után, PBS-ben boncoltuk, majd 4% formalin PBS-ben fixáltuk szobahőmérsékleten 45 percen keresztül, majd 3 PBS öblítés után, 15 percig inkubáltuk 0,1% PBTX-ben. Ezután 30 percen át blokkoló oldatban (5% FCS, 0,1% PBTX-ben) inkubáltuk. Ezután az elsődleges antitesteket tartalmazó oldatban egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk (5% FCS, 0,1% PBTX-ben).

A lárvális garland nefrocitákat és zsírtesteket 45 percen keresztül, szobahőmérsékleten 3,7% formalin és 0,25% glutáraldehid tartalmú oldattal fixáltuk, amely 80 mM Na-PIPES, 5 mM EGTA és 1 mM MgCl₂ tartalmú pufferben volt oldva. Ezután 2 percig 2 mg/ml nátrium-borohidrid oldatban inkubáltuk, majd 10 percig mostuk PBS-ben. Ezután 15 percig inkubáltuk 50 mM ammónium-kloridot és 50 mM glicin tartalmazó Tris pufferben, majd 30 percen át blokkoló oldatban (5% FCS, 0,1% PBTX-ben) inkubáltuk. Ezután az elsődleges antitesteket tartalmazó oldatban egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk (5% FCS, 0,1% PBTX-ben).

Az immuncitokémia második napján az elsődleges antitest oldatot Hoechst 33342 és 4% NaCl oldatra cseréltük, amelyben a mintákat 15 percig inkubáltuk, majd kétszer 15 percig 0,1% PBTX-ben mostuk. Ezután 30 percig blokkoló oldatban inkubáltuk (5% FCS, 0,1% PBTX-ben), majd a másodlagos ellenanyagot tartalmazó oldatban inkubáltuk (5% FCS, 0,1% PBTX-ben) 3 órán keresztül, letakarva, szobahőmérsékleten. Ezután újból Hoechst 33342 és 4% NaCl oldatban inkubáltuk 15 percig, majd kétszer 15 percig 0,1% PBTX-ben mostuk. Ezután 3 PBS öblítés, majd kétszer 15 perc PBS-ben való mosás következett. A mintákat a tárgylemezre való kihelyezésig PBS-ben tároltuk 4 °C-on.

Név	Hivatkozás/forrás	Hígítás
Elsődleges ellenanyag		
nyúl poliklonális anti-Rab5	Abcam: ab31261	1:100
egér monoklonális anti-Rab7	DSHB: Rab7	1:10
nyúl poliklonális anti-HA	Sigma-Aldrich: H6908	1:50
patkány monoklonális anti-HA	Roche: 3F10	1:50
nyúl poliklonális anti-LAMP	Andreas Jenny (Chaudhry és mtsai, 2022)	1:100
nyúl poliklonális anti-CathL	Abcam: ab58991	1:100
nyúl poliklonális anti-PXo	Norbert Perrimon (Xu és mtsai, 2023)	1:200
egér monoklonális anti-Cnx99A	DSHB: Cnx99A 6-2-1	1:10

Másodlagos ellenanyag		
Alexa Fluor 568 ló anti-egér	Invitrogen	1:900
Alexa Fluor 647 számár anti-nyúl	Invitrogen	1:900
Alexa Fluor 568 kecske anti-nyúl	Invitrogen	1:900
Alexa Fluor 488 kecske anti-nyúl	Invitrogen	1:900
Alexa Fluor 568 kecske anti-patkány	Invitrogen	1:900

2. táblázat: Az immuncitokémia során alkalmazott reagentsek

LysoTracker festés

A középbélmintákat PBS-ben boncoltuk, majd 3 percig inkubáltuk LysoTracker Red PBS-ben (1:1000, Thermo Fisher Scientific), ezután PBS-sel öblítettük, majd végül 5 µg/ml Hoechst, glicerín és PBS oldatában (8:2 arányban) fedtük, és azonnal lefényképeztük.

Nílus vörös festés

A középbélmintákat 4% formalin PBS-ben fixáltuk szobahőmérsékleten 30 percig, ezután háromszor öblítettük PBS-ben, majd 15 percig 2 µg/ml Nílus vörös (Thermo Fisher Scientific) PBS-ben inkubáltuk, végül 5 µg/ml Hoechst, glicerín és PBS oldatában (8:2 arányban) fedtük.

Elektronmikroszkópia

Az elektronmikroszkópiát és a savas foszfatáz enzimcitokémiai vizsgálatot a hivatkozott cikkben leírt protokoll alapján végeztük, Dr. Lőrincz Péter és Pálfia Sarolta közreműködésével (Lőrincz és mtsai, 2014).

Mintaelőkészítés, mikroszkópia

A mintákat fedőmédiummal (10X PBS-t, glicerint, és propil-gallátot 1:9:0,1 arányban oldva DMSO-ban) fedtük a képkészítést megelőzően. A képek készítéséhez Axiolmager M2 epifluoreszcens mikroszkópot (Carl Zeiss) és Orca Flash 4.0 LT sCMOS kamerát (Hamamatsu Photonics) alkalmaztunk, amelyek ApoTome2 grid konfokális egységgel (Carl Zeiss) voltak felszerelve. A használt objektívek: EC Plan-Apochromat 40x/0.95 Air (zsírtestek) és Plan Apochromat 63x/NA=1.40 immerziós (középbel és garland sejtek). A használt szoftverek: Zeiss ZEN 2.3, Adobe Photoshop CS6.

Adatok kiértékelése

A kolokalizációs elemzéshez az LTR festés esetén az ImageJ szoftvert alkalmaztuk, a Pearson korrelációs együttható (R) kiszámítását a coloc 2 plug-in segítségével, a scatter plot létrehozását pedig a Manders-koefficiens plug-in segítségével végeztük el. 7 sejtről, 3 bélből (n=7) generáltunk plotokat és számoltunk R-t. A scatter plotok átlagolását Adobe Photoshop CS6 segítségével végeztük el.

Szerzői hozzájárulás

- Az ecetmuslicák fenntartását és keresztezését én végeztem.
- A használt törzsek egy részét törzsközpontokból szereztük be, a GFP-PXo és a PXo-HA törzset Prof. Norbert Perrimon bocsátotta rendelkezésünkre.
- Az immuncitokémiai vizsgálatokhoz a teljes protokollt én végeztem, a képeket én készítettem.
- Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz az ecetmuslicákat én boncoltam és fixáltam, a protokoll további lépéseit Pálfia Saroltával és témavezetőmmel, Dr. Lőrincz Péterrel közösen végeztük.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Lőrincz Péternek, a rengeteg segítséget, iránymutatást, motivációt és türelmet, amelyet a kísérletek kivitelezése és a dolgozat megírása során nyújtott, nélküle ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Köszönöm a segítséget Pálfia Saroltának az elektronmikroszkópos minták előkészítésében.

Köszönöm Dr. Lőw Péter tanszékvezetőnek, hogy ilyen kiváló környezetben készíthettem el a dolgozatot. Továbbá köszönöm a tanszék összes dolgozójának a segítőkészségüket.

Köszönöm a kutatócsoport tagjainak a rengeteg segítséget, türelmet és befogadó légkört, amit nap, mint nap nyújtanak, ezzel hozzájárulva a fejlődésemhez. Köszönöm az értelmes válaszokat az értelmetlen kérdéseimre, a megnyugtató válaszokat az aggodalmas kérdéseimre.

Végül, köszönöm szeretteimnek, hogy mindenben támogatnak.

Irodalomjegyzék

- Bultema, J. J., & Di Pietro, S. M. (2013). Cell type-specific Rab32 and Rab38 cooperate with the ubiquitous lysosome biogenesis machinery to synthesize specialized lysosome-related organelles. *Small GTPases*, 4(1), 16–21. <https://doi.org/10.4161/sgtp.22349>
- Capo, F., Wilson, A., & Di Cara, F. (2019). The Intestine of *Drosophila melanogaster*: An Emerging Versatile Model System to Study Intestinal Epithelial Homeostasis and Host-Microbial Interactions in Humans. *Microorganisms*, 7(9), 336. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090336>
- Chaudhry, N., Sica, M., Surabhi, S., Hernandez, D. S., Mesquita, A., Selimovic, A., Riaz, A., Lescat, L., Bai, H., MacIntosh, G. C., & Jenny, A. (2022). Lamp1 mediates lipid transport, but is dispensable for autophagy in *Drosophila*. *Autophagy*, 18(10), 2443–2458. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2038999>
- Delevoeye, C., Marks, M. S., & Raposo, G. (2019). Lysosome-related organelles as functional adaptations of the endolysosomal system. *Current opinion in cell biology*, 59, 147–158. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.05.003>
- Hariri, M., Millane, G., Guimond, M. P., Guay, G., Dennis, J. W., & Nabi, I. R. (2000). Biogenesis of multilamellar bodies via autophagy. *Molecular biology of the cell*, 11(1), 255–268. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.1.255>
- Helmstädter, M., Huber, T. B., & Hermle, T. (2017). Using the *Drosophila* Nephrocyte to Model Podocyte Function and Disease. *Frontiers in pediatrics*, 5, 262. <https://doi.org/10.3389/fped.2017.00262>
- Klumperman, J., & Raposo, G. (2014). The complex ultrastructure of the endolysosomal system. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(10), a016857. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016857>
- Kobayashi, T., Vischer, U. M., Rosnoblet, C., Lebrand, C., Lindsay, M., Parton, R. G., Kruithof, E. K., & Gruenberg, J. (2000). The tetraspanin CD63/lamp3 cycles between endocytic and secretory compartments in human endothelial cells. *Molecular biology of the cell*, 11(5), 1829–1843. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.5.1829>

- Lőrincz, P., Kenéz, L. A., Tóth, S., Kiss, V., Varga, Á., Csizmadia, T., Simon-Vecsei, Z., & Juhász, G. (2019). Vps8 overexpression inhibits HOPS-dependent trafficking routes by outcompeting Vps41/Lt. *eLife*, 8, e45631. <https://doi.org/10.7554/eLife.45631>
- Lőrincz, P., Lakatos, Z., Maruzs, T., Szatmári, Z., Kis, V., & Sass, M. (2014). Atg6/UVRAG/Vps34-containing lipid kinase complex is required for receptor downregulation through endolysosomal degradation and epithelial polarity during *Drosophila* wing development. *BioMed research international*, 2014, 851349. <https://doi.org/10.1155/2014/851349>
- Lőrincz, P., Mauvezin, C., & Juhász, G. (2017a). Exploring Autophagy in *Drosophila*. *Cells*, 6(3), 22. <https://doi.org/10.3390/cells6030022>
- Lőrincz, P., Tóth, S., Benkő, P., Lakatos, Z., Boda, A., Glatz, G., Zobel, M., Bisi, S., Hegedűs, K., Takáts, S., Scita, G., & Juhász, G. (2017b). Rab2 promotes autophagic and endocytic lysosomal degradation. *The Journal of cell biology*, 216(7), 1937–1947. <https://doi.org/10.1083/jcb.201611027>
- Perera, R. M., & Zoncu, R. (2016). The Lysosome as a Regulatory Hub. *Annual review of cell and developmental biology*, 32, 223–253. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125125>
- van der Wel, N. N., Sugita, M., Fluitsma, D. M., Cao, X., Schreibelt, G., Brenner, M. B., & Peters, P. J. (2003). CD1 and major histocompatibility complex II molecules follow a different course during dendritic cell maturation. *Molecular biology of the cell*, 14(8), 3378–3388. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-11-0744>
- Weaver, T. E., Na, C. L., & Stahlman, M. (2002). Biogenesis of lamellar bodies, lysosome-related organelles involved in storage and secretion of pulmonary surfactant. *Seminars in cell & developmental biology*, 13(4), 263–270. <https://doi.org/10.1016/s1084952102000551>
- Winchester B. G. (2001). Lysosomal membrane proteins. *European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society*, 5 Suppl A, 11–19. <https://doi.org/10.1053/ejpn.2000.0428>
- Xu, C., Xu, J., Tang, H. W., Ericsson, M., Weng, J. H., DiRusso, J., Hu, Y., Ma, W., Asara, J. M., & Perrimon, N. (2023). A phosphate-sensing organelle regulates phosphate and tissue homeostasis. *Nature*, 617(7962), 798–806. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06039-y>