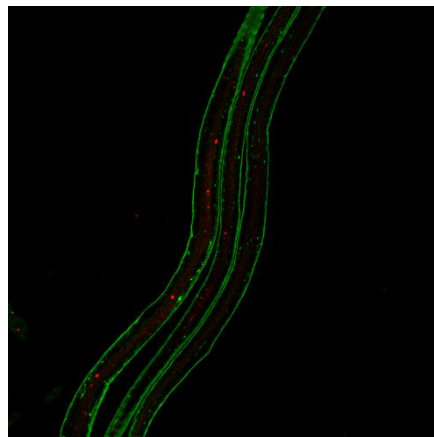




A sejtszintű extracelluláris mátrix felvétel vizsgálata in vivo *Drosophila* modellszervezetben

Kemény Eszter, TTIK biológia BSc, III. évfolyam



Témavezető: Dr. Csordás Gábor

Szegedi Tudományegyetem

HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetika Intézet, Lizoszómális Degradáció
Kutatócsoport

Szeged, 2024

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
Bevezetés	4
ECM fogalma és jelentősége a többsejtű eukarióta szervezetekben	4
ECM főbb komponensei és receptorai.....	6
ECM remodeling	12
ECM fehérjék sejtszintű felvétele.....	13
Az ECM dinamika vizsgálata ecetmuslicában	14
Célkitűzések	18
Anyagok és módszerek.....	19
<i>Drosophila</i> genotípusok és keresztezések	19
Agy és idegek preparálása	19
Immunfestés.....	20
Idegi sérülés modellezése	21
Mikroszkópos vizsgálat	22
Adatelemzés.....	22
Eredmények	23
ECM fehérjék kifejeződése <i>Drosophila</i> szegmentális idegekben	23
Glia sejtek általi Laminin felvétel és lebontás követése vezikula markerekkel	24
Szöveti sérülés ECM felvételre gyakorolt hatásának vizsgálta	25
Glia-specifikus vizsgálati rendszerek létrehozása	26
Hemociták általi Laminin felvétel és lebontás követése	28
Az eredmények megvitatása és jövőbeli tervek	30
Összegzés	34
Köszönetnyilvánítás	35
Irodalomjegyzék.....	36

Rövidítések jegyzéke

BSA: bovine serum albumin, marha szérum albumin

BM: bazális lamina (bazális membrán)

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenil-indol (fluoreszcens festék)

DDR: Diszkoidin doménnel rendelkező receptorok

EBP: elasztin-kötő fehérje

ECM: Extracelluláris mátrix

GAG: glükózaminoglikán

GFP: green fluorescent protein, zöld fluoreszkáló fehérje

GP: glikoprotein

HA: hialuronsav

LanB1: Laminin B1 a fehérje béta alegysége

MMP: mátrix-metalloproteináz

MR: mannóz receptor

PG: proteoglikán

PTU: fenil-tiol-urea

PBS: phosphate-buffered saline, foszfáttal pufferolt sóoldat (pufferoldat)

PBST: phosphate-buffered saline with triton-x, foszfáttal pufferolt sóoldat triton-x-el

PFA: paraform-aldehid

TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinase, szöveti mátrix-metalloproteináz gátló

VNC: ventral nerve cord, ventrális idegköteg

Bevezetés

ECM fogalma és jelentősége a többsejtű eukarióta szervezetekben

A többsejtű eukarióta szervezetek működéséhez elengedhetetlen egy szöveteket körülvevő, azokat összekötő réteg, mely receptorok által kölcsönhatásban áll a sejtekkel, illetve a sejtek közötti térben található anyagokkal, például ionokkal, hormonokkal, légzési gázokkal, anyagcsere intermedierekkel és végtermékekkel. Ezt a réteget általánosan extracelluláris mátrixnak (röviden ECM) nevezzük (Karamanos és mtsai., 2021; Szabó, G., 2009). Az ECM egymással kapcsolatban álló alkotóelemeivel létrehoz egy stabil, de dinamikus egységet, ami hozzájárul a szöveti homeosztázis fenntartásához és a szervezet megfelelő működéséhez. Az ECM beborítja a szervezet különböző szöveteit, szerveit, ezáltal elválasztja és egyúttal összeköti azokat (Karamanos és mtsai., 2021; Mouw és mtsai., 2014; Szabó, G., 2009). A mátrix főként fehérje és szénhidrát makromolekulákból felépülő összetett hálózat. A mátrix komponensek kiválasztását, valamint lebontását végezhetik lokálisan a sejtek (Alberts, 2022; Szabó, G., 2009), de fiziológias és patológias esetekben is előfordulhat, hogy egyes sejtípusok építik fel vagy bontják le több más szövet bazális membránját (Jürgensen és mtsai., 2020; Zhao és mtsai., 2022).

Az ECM komponenseinek molekuláris szerkezete evolúciós konzerváltságot mutat, valamint az alkotó makromolekulák osztályai is megőrződtek, mégis számos különböző megjelenésű és tulajdonságú ECM-et ismerünk (Alberts, 2022). Ez a változatosság egyrészt magyarázható az összetevők szerveződésével, azzal, hogy hogyan és melyik komponensek kapcsolódnak össze. Másrészt az ECM fehérjék, szénhidrátpolimerek és makromolekulák szövetspecifikus kifejeződésével, mely meghatározza az adott szövet működéséhez szükséges ECM összetételt és szerkezetet (Alberts, 2022; Karamanos és mtsai., 2021).

A mátrix azon kívül, hogy kitölti a sejtek közötti teret és fizikai támasztékot biztosít a sejtek számára, számos további feladatot lát el, amit a bonyolult kémiai összetétele, változatos komponensei és összetett felépítése tesz lehetővé (Mouw és mtsai., 2014). Az ECM közvetíti az extracelluláris térből érkező jeleket a sejtek számára, ezért a sejt és ECM fehérjék közötti interakciók kritikusak abból a szempontból, hogy a sejtek adhéziója, migrációja megtörténjen (Hynes, 2009; Itoh, 2021; Karamanos és mtsai., 2021).

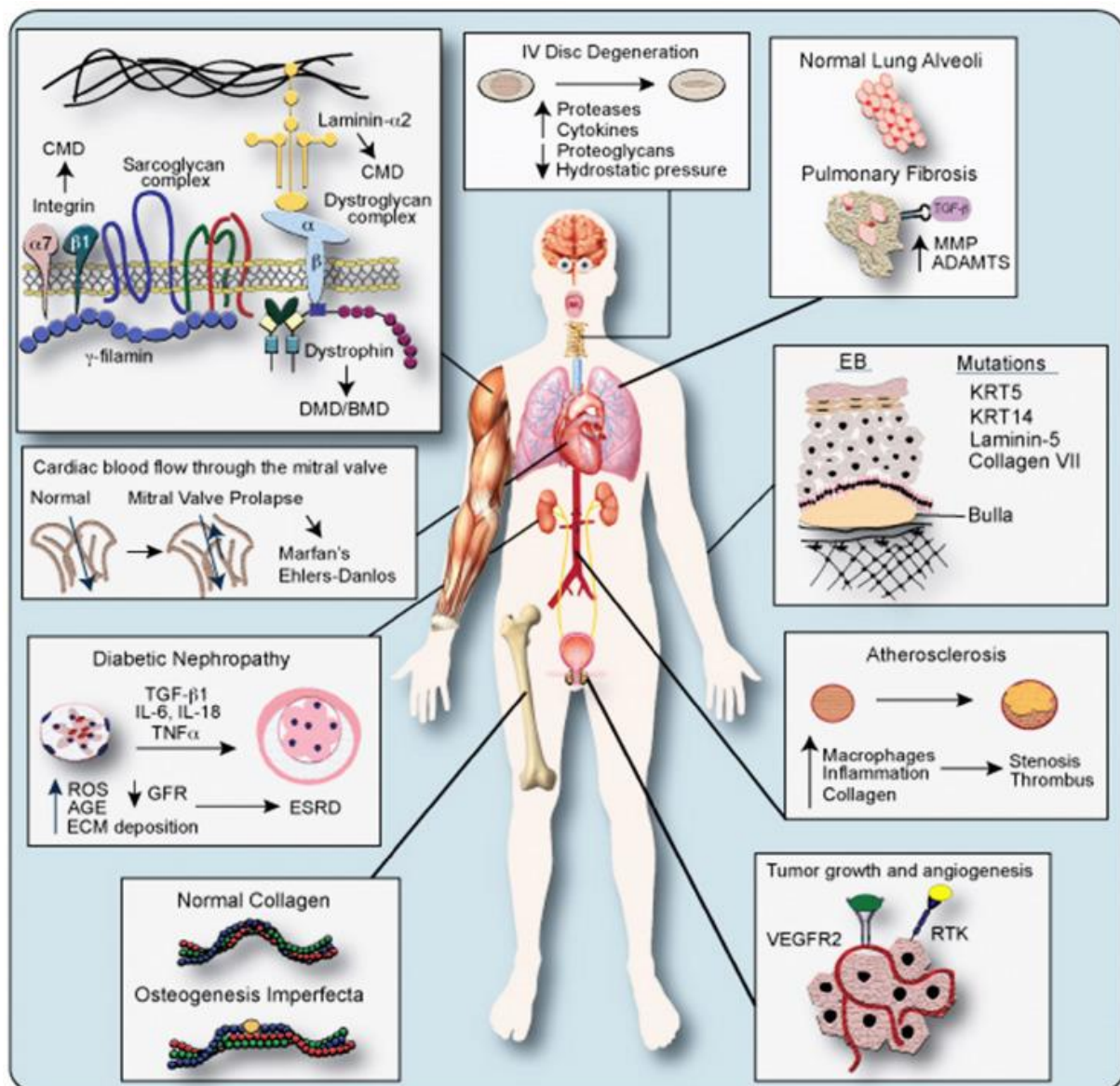
Bizonyos szövetek esetében az ECM „barrier” funkciókat lát el, tehát megakadályozza a sejtek és molekulák vándorlását, átjutását egyik szöveti rétegből a másikba. Citokinekhez, növekedési faktorokhoz és egyéb jelátvivő molekulákhoz kötődve kontrollálja azok aktivitását,

elérhetőségét a sejtek számára. Az ECM-nek ez a „tároló” funkciója lehetővé teszi a jelátviteli utak finomhangolását a fiziológiai szükségletekre adott válaszoknál (Alberts, 2022; Hynes, 2009; Theocharis és mtsai., 2016). Ez a funkció szerepet játszik az immunsejtek migrációja és aktivációja során, elősegíti a túlélésüket, valamint modulálja a gyulladásos válaszokat (Jürgensen és mtsai., 2020). Az ECM - immunsejt kölcsönhatások diszregulációja vagy az ECM defektusai felelősek lehetnek autoimmun betegségek, krónikus gyulladások, egyéb patológiák kialakulásában (Iozzo & Gubbiotti, 2018; Lu és mtsai., 2011).

Az ECM komponensek túlzott felhalmozódása egy szövetben szöveti hegesedést és a szerv működési zavarait eredményezi, ezt fibrózisnak hívjuk. Számos szerv esetében bekövetkezhet, beleértve a tüdőt, májat és a vesét. A fibrózis kialakulásának hátterében az ECM makromolekulák szintézisének és lebomlásának diszregulációja áll, amely gyakran a fibrotikus fehérjék (például a Kollagén) további fokozott termeléséhez vezet (Zhao és mtsai., 2022). A makrofágok kiemelt szerepet töltenek be a fibrózis okozta gyulladásos folyamatok során, fenotípusainak, szerepköreinek vizsgálata több kutatás fókuszában áll (Wynn & Vannella, 2016), mégis számos folyamat tisztázatlan.

Az ECM befolyásolhatja a tumorok progresszióját is a sejtadhézió, migráció és a sejtprolifерáció szabályozásával. Az ECM összetételében és szerkezetében bekövetkező változások olyan mikrokörnyezetet hozhatnak létre, amely elősegíti a rákos sejtek invázióját és metasztázis képzését (Karamanos, 2019; Lu és mtsai., 2011).

Ezen kívül az ECM jelentős szerepet játszik az erek szerkezetének és működésének fenntartásában, éppen ezért az összetételében bekövetkező változások hatással vannak a szív- és érrendszeri betegségekre, például az ateroszklerózis és a magas vérnyomás patogenezisére (Iozzo & Gubbiotti, 2018; Mithieux & Weiss, 2005). Egy-egy komponens hiánya vagy funkcionálisan sérült formája is okozhat súlyos rendelleneségeket (Karamanos és mtsai., 2021). A III. típusú Kollagén génjének mutációja okozza az Ehlers-Danlos-szindrómát, melynek tünetei a nyúlékony bőr, rendkívül rugalmas ízületek és a vérerek sérülékenysége (Leganger és mtsai., 2016). A Marfan-szindrómában a Fibrillin fehérje génjében bekövetkezett mutáció miatt töredezett rugalmas rostok képződnek, mely az aorta tágulását (aneurizma) vagy megrepedését okozhatja (**1. ábra**) (Coelho & Almeida, 2020).

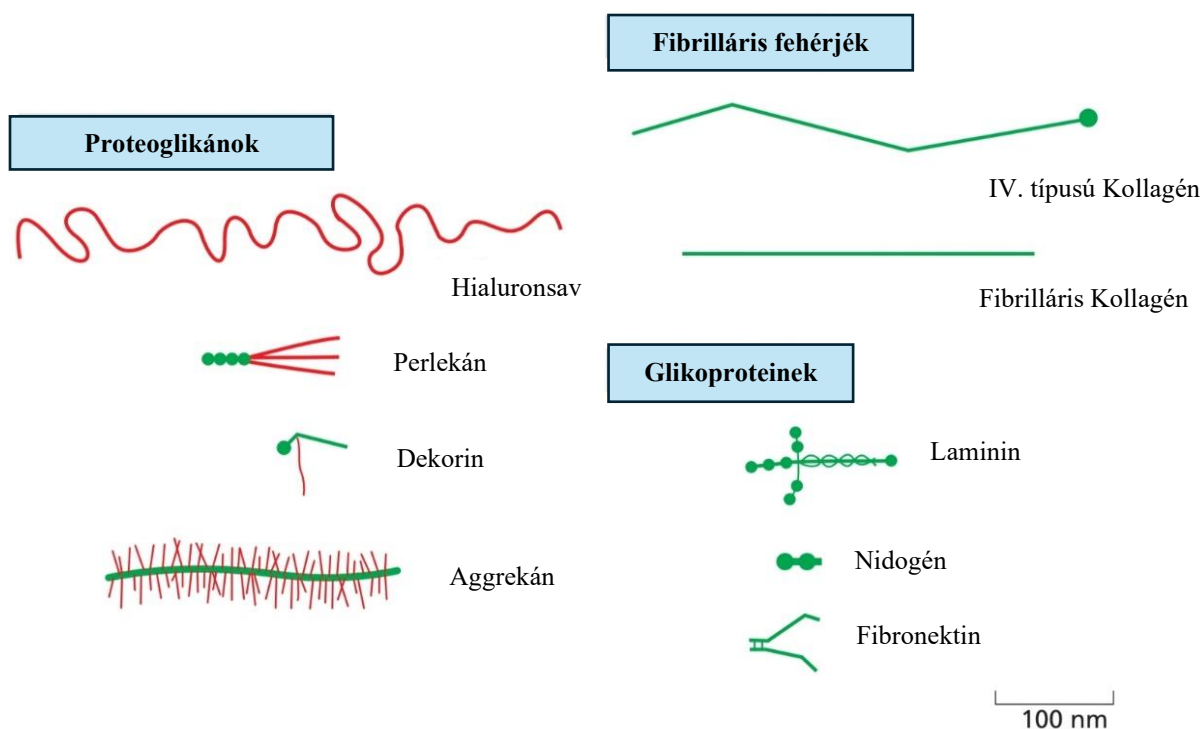


1. ábra A mátrix komponensek hibája az emberi test számos szervrendszerét érintő betegségben szerepet játszik. Ezek az ECM-függő betegségek a hiányzó vagy funkcióképtelen fehérjék miatt alakulnak ki, és aberráns jelátviteli aktivitás vagy a létfontosságú szervek szerkezeti összetevőinek dezorganizációja révén manifesztálódnak (Iozzo & Gubbiotti, 2018).

ECM főbb komponensei és receptorai

Az ECM-et felépítő makromolekulák lokálisan a sejtek által termelődnek. A legjellemzőbb ECM termelő sejtípusok a fibroblasztok, kondrociták és oszteoblasztok (Alberts, 2022). Az ECM fehérjék, makromolekulák szintézise többlépcsős folyamat, ami a különböző molekula típusoknál eltérhet. Az endoplazmatikus retikulumban végbemenő poszttranszlációs módosítások kiemelt fontosságúak, mivel majdnem minden ECM fehérje glikozilált. A felépülő mátrix komponensek szekréciós útvonalak révén kerülnek a sejten kívülre, ahol megtörténik az organizációjuk, stabilizációjuk (Karamanos és mtsai., 2021; Onursal és mtsai., 2021). A sejtvez

polarizált elrendeződése kulcsfontosságú a mátrix makromolekulák irányított szekréciójához. Az is fontos a megfelelő ECM struktúra kiépüléséhez, hogy a sejt belső vázrendszere adapter fehérjék és receptorok révén kapcsolatban álljon a többi sejttel, illetve ECM komponensekkel (Alberts, 2022; Hynes, 2009).



2. ábra Az extracelluláris mátrix makromolekulák csoportosítása. Zölden vannak jelölve a fehérjék, pirossal a GAG-ok, (Alberts, 2022 – alapján).

A mátrix kialakulásában és felépítésében alapvetően három makromolekula osztályba tartozó fehérjék és szénhidrát-polimerek vesznek részt: a glükózaminoglikánok (röviden GAG-ok), a fibrilláris fehérjék (például a kollagének), valamint a glikoproteinek (GP), melyeknek általában több mátrix makromolekulát valamint sejtfelszíni receptort kötő doménje van (**2. ábra**) (Alberts, 2022; Hynes, 2009; Karamanos és mtsai., 2021; Theocharis és mtsai., 2016).

Emlősökben közel 300 mátrix fehérje található, ebből 36 féle proteoglikán, vagy 40 kollagén és több mint 200 glikoprotein, valamint a becslés nem tartalmazza a mátrix-asszociált fehérjéket, illetve azokat az enzimeket sem, melyek módosítják a kötéseket a mátrix komponensek között (Alberts, 2022). Az ECM komponenseket és az ECM-asszociált fehérjéket kódoló gének összességét matrisome-nak nevezzük (Hynes & Naba, 2012). A humán matrisome 1027 gént tartalmaz, ez a teljes genom 4%-a, valamint a rágcsáló matrisome 1110 gént tartalmaz

(Golusda és mtsai., 2021), míg további modellszervezetek matrisome méretéről in silico predikciók állnak rendelkezésünkre (Karamanos és mtsai., 2021).

Glükózaminoglikánok (GAGok) és proteoglikánok (PGk)

A glükózaminoglikánok hosszú, el nem ágazó poliszacharidok, amelyek ismétlődő diszacharid egységekből állnak. Ezek az egységek jellemzően hexóزامint (N-acetil-glükóزامint vagy N-acetil-galaktóزامint) és uronsavat (glükuronsavat vagy iduronsavat) tartalmaznak. A legtöbb GAG negatív töltésű a szulfát- vagy karboxilcsoportjaik miatt, amelyek lehetővé teszik számukra, hogy vonzzák a vízmolekulákat és ellenálljanak a nyomóerőnek, fenntartva a szövetek hidratáltságát, valamint biztosítva a kompresszióval szembeni ellenállást az ízületekben és a kötőszövetekben (Alberts, 2022). Számos GAG molekula ismert, az egyik ilyen a Hialuronsav (HA), mely az egyedüli nem szulfatált GAG. Nagy, hidratált polimereket képez, amiknek jelenléte számos szövet számára nélkülözhetetlen (Karamanos és mtsai., 2021). A Hialuronsav a CD44 nevű I. típusú transzmembrán sejtdhéziós molekula ligandja, tehát a CD44 képes kötni a HA-t (**3. ábra**) (Yoshifumi Itoh, 2021).

A proteoglikánok egy központi magfehérjéből állnak, mellyel kovalensen kapcsolódhatnak egy vagy több GAG oldalláncához. Méretüket, szerkezetüket és funkciójukat tekintve igen változatosak. Egészen a kisméretű sejtfelszíni proteoglikánoktól a nagy, összetett mátrixmolekuláig terjed sokszínűségük. Az Aggrecán egy nagy méretű PG, ami elsősorban a porcokban található, ahol HA-val és más mátrixmolekulákkal kölcsönhatásba lépve nagy aggregátumokat képez (Hynes, 2009; Iozzo & Schaefer, 2015; Karamanos és mtsai., 2021). A Perlecan egy fontos heparán-szulfát proteoglikán. Hozzá hasonlóan a Decorin egy kisméretű PG, amely a kollagénrostokhoz kötődik és szabályozza azok képződését (Iozzo & Schaefer, 2015).

Fibrilláris fehérjék és a kollagén család

A kollagén-típusú fehérjék az extracelluláris mátrix legnagyobb mennyiségben előforduló alkotói, amelyek különféle szövetek, például bőr, csont, inak és porcok szerkezeti vázát hozzák létre (Szabó, G., 2009). A mechanikai szilárdság biztosítása mellett kulcsfontosságú szerepet játszanak a szöveti homeosztázis és a jelátvitel biztosításában (Karamanos és mtsai., 2021).

A Kollagén egy tripla hélix fehérje, amely három polipeptidláncból áll. Az alfa-hélix láncokban minden harmadik aminosav glicin, ez teszi lehetővé a molekula számára a rugalmasságot. Nagyszámban tartalmaz prolin, illetve hidroxiprolin aminosavakat, melyek

hidroxil csoportjai H-hídkötéseket formálnak, ezzel stabilizálva a triplahélixet. A lizinek és hidroxilizinek kovalens keresztkötéseket alakítanak ki a triplahélixek között, így létrehozva a kollagénrostokat (Szabó, G., 2009).

A Kollagén szintézise egy összetett folyamat, amely intracelluláris és extracelluláris lépésekből áll. Prokollagén prekursoraként szintetizálódik a durva felszínű endoplazmatikus retikulum lumenében. Ezután számos poszttranszlációs módosításon megy keresztül, majd szekréciós vezikulákba csomagolódik és kiválasztódik az extracelluláris térbe, ahol specifikus enzimek, úgynevezett prokollagén peptidázok eltávolítják a propeptideket, ezzel lehetővé téve a kollagén fibrillumok összeépülését. Végül lizin-oxidáz enzimek a tropokollagén szálak között kovalens keresztkötéseket hoznak létre, mely folyamat végén vízben oldhatatlan, fibrilláris kollagénrostokat kapunk (Kadler és mtsai., 2007; Karamanos és mtsai., 2021; Onursal és mtsai., 2021).

A Kollagén számos sejtfelszíni receptorral kölcsönhatásba lép, hogy szabályozza a sejt viselkedését. Ilyen transzmembrán receptorok a heterodimerikus integrinek, melyek a sejt adhézióban elengedhetetlenek. A Kollagénhez az $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$ és $\alpha11\beta1$ integrinek kötődnek (Heino, 2014). A receptorok aktiválása intracelluláris utakat indít el (mint a FAK útvonal), melyek a sejtproliferációban és a differenciálódás során elengedhetetlenek. Diszkoidin doménnel rendelkező receptorok (DDR-ek) is képesek megkötni a Kollagént, ilyen a DDR1 és a DDR2 Kollagén által aktivált tirozin kináz receptorok. Rajtuk keresztül szabályozódnak olyan folyamatok, mint a sejtmigráció és az ECM-remodeling **(3. ábra)** (Itoh, 2021).

Az Elastin szintén egy fibrilláris fehérje, mely főként a gerincesekben található meg (Alberts, 2022). A kötőszöveti rugalmas rostok alapanyaga, elsősorban a bőrben, tüdőben, illetve az erek falában fordul elő, lehetővé téve ezen szövetek számára, hogy egy erőteljesebb megnyúlás vagy összehúzódás után visszanyerjék eredeti formájukat. A Kollagénhez hasonlóan az Elastin is rostokba rendeződik, illetve kapcsolódik sejtfelszíneken lévő adhéziós fehérjékhez (Alberts, 2022; Mithieux & Weiss, 2005). Az Elastin rostok elsődleges receptora az elastin-kötő fehérje (EBP) (Karamanos és mtsai., 2021).

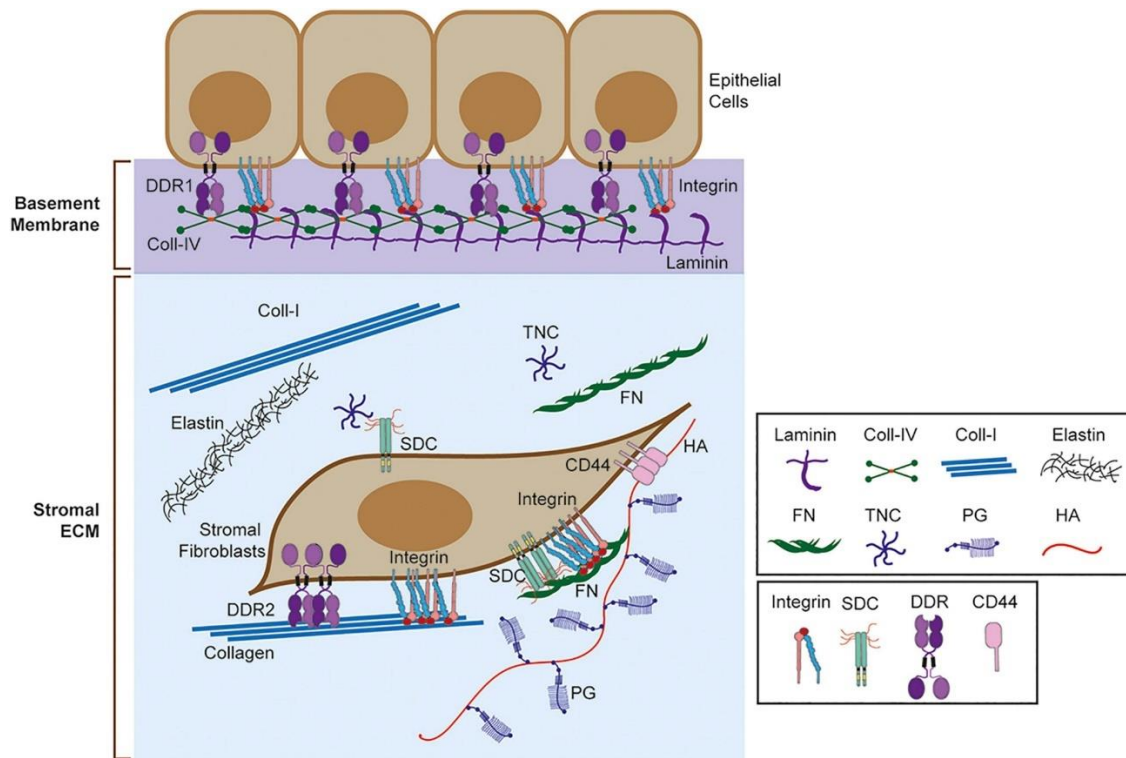
Glikoproteinek (GPk) - multiadhéziós fehérjék

Az ebbe a csoportba tartozó molekulák többsége különböző mátrixmolekulákat kötnek össze egymással vagy a sejtmembránban található receptorokkal. Rendszerint rövid és elágazó oligoszacharidláncot tartalmaznak, valamint gyakran képeznek egymással aggregátumokat. Ide soroljuk a Fibronektint, Laminint és a hozzájuk kapcsolódó Nidogént (Szabó, G., 2009).

A Fibronektin egy dimer glikoprotein, amely két közel azonos alegységből áll, amelyeket diszulfidkötések kapcsolnak össze. Két fő formában létezik, az ECM-ben található oldható Plazmafibronektinként, illetve oldhatatlan celluláris Fibronektinként (Alberts, 2022).

A Laminin egy heterotrimerikus glikoprotein, amely α , β és γ láncokból áll. A bazális lamina nélkülözhetetlen alkotóeleme. A Lamininek férgekben, ecetmuslicában és emlősökben is egyaránt megtalálhatók. α , β és γ láncait egy-egy külön gén kódolja. Ideáig 5 α , 3 β , és 3 γ láncot azonosítottak gerincesekben, melyek több mint 16 különböző izoformában szerelődhetnek össze. A Lamininek szövetspecifikus módon fejeződnek ki. Az α , β , és γ láncok kereszt vagy T-, Y- esetleg I- alakú szerkezetekben fordulnak elő. A láncok összeszerelődésük során alakítanak ki rövid és hosszú karokat. A rövid karok diszulfidban gazdag doméneket és a saját polimerizációjához szükséges N-terminális globuláris domént tartalmaznak. A hosszú kart a három lánc helikális felcsavarodásából kapjuk meg, ami C-terminális globuláris doménnel záródik. A Laminin a karjain keresztül több ECM molekulával kapcsolatba lép (Durbeej, 2010; Hallmann és mtsai., 2020; Hohenester, 2019; Hohenester & Yurchenco, 2013; Karamanos és mtsai., 2021). A Lamininek az LG doménjükön keresztül kapcsolódnak a sejtfelszíneken lévő receptorokhoz, például integrinekhez ($\alpha 6 \beta 1$) vagy Disztroglikánhoz, illetve számos más BM fehérjéhez (Perlekánhoz, Nidogénhez) **(3. ábra)** (Itoh, 2021).

Modellszervezetekben, főként egérben, muslicában végzett funkcióvesztéses kísérletek során számos funkciója feltérképezésre került (Karamanos és mtsai., 2021), illetve mára az összes Laminin alegységet kapcsolatba hozták emberi betegségekkel is. Például, a LAMA2, LAMA3, LAMB3, LAMC2 és LAMB2 mutációi ritka, de súlyos veleszületett rendellenességeket okoznak; veleszületett izomdisztrófiát (Durbeej, 2015), junkcionális epidermolysis bullosát (Has & Nyström, 2015) és Pierson-szindrómát (Funk és mtsai., 2018).



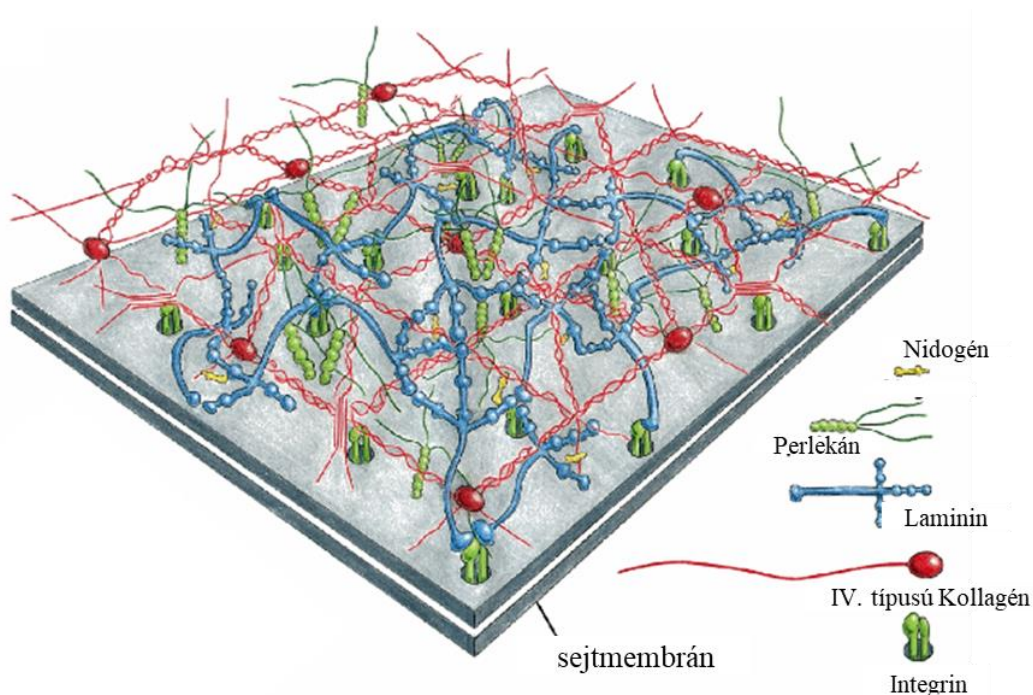
3. ábra Az ECM és sejtfelszíni receptorok hálózata. A bazális membrán, a stromális ECM és az ECM receptorok sematikus ábrázolása. Látható a Laminin, a Kollagén IV (Coll-IV), a Kollagén I (Coll-I), az Elastin, a Fibronektin (FN), a Tenascin C (TNC), proteoglikán (PG) és a Hialuronsav molekula (HA). Az ECM receptorok közül az integrinnek, a Szindekán (SDC), a diszkoidin domén tirozin kináz receptorok (DDR-ek) és a CD44 van ábrázolva. Az integrinek különböző mátrix komponenseket kötnek, beleértve a Kollagént, Laminint és FN-t. Az SDC heparán-szulfát (HS) láncokon keresztül köti meg a TNC-t és az FN-t. A DDR1 a fibrilláris kollagénekhez (Coll-I, Coll-II, Coll-III) és Coll-IV kötődik, míg a DDR2 csak a fibrilláris kollagénekhez kötődik. A CD44 kötődik a HA-hoz (Itoh, 2021).

Bazális membrán és molekulái

A bazális lamina vagy bazális membrán (BM) az extracelluláris mátrix (ECM) speciális típusa, amely a hám- vagy endoteliális sejtek és az alatta lévő kötőszövetek határfelületén, illetve izom, zsír, Schwann és glia sejtek körül található (Mouw és mtsai., 2014). Szerkezeti támogatást biztosít és biokémiai jeleket közvetít, amelyek szabályozzák a szövetek szerveződését, a sejtek migrációját, differenciálódását és túlélését (Alberts, 2022; Karamanos és mtsai., 2021; Theocharis és mtsai., 2016).

A bazális lamina összeállításában két fő Kollagén vesz részt: a IV. Kollagén és a VII. Kollagén. A Kollagén IV-et egy amino-terminális 7S domén és egy karboxi-terminális NC1 domén jellemzi, ezek globuláris domének, amelyek elősegítik a hexamerek, illetve dimerek képződését. Ezek egymással erősen rendezett rácsszerkezeteket alkotnak. A VII. Kollagén hosszú dimereket képez, amelyek azután meghajlanak és összekapcsolódnak a IV. Kollagén rácok globuláris régióival. A bazális laminán belül a lamininek a sejtfelszínen képeznek

réteget, amit láncai közötti kölcsönhatások, valamint a Laminin globuláris régiói és a sejtfelszíni receptorok (például integrinek és disztroglikán) közötti kötődés erősít meg. A IV. Kollagén nidogéneken keresztül kötődik a lamininekhez, és vázat képez a lamininek tetején (4. ábra). Ezt a struktúrát a VII. Kollagén is rögzíti, továbbá összekötheti a bazális laminát a retikuláris laminával és így létrehozza az alapmembránt (Mouw és mtsai., 2014).



4. ábra A bazális membrán hálószerű struktúrája és komponenseinek kölcsönhatását bemutató ábra, (Tu, 2017) – alapján.

ECM remodeling

Az érett ECM környezeti ingerekre, például erőhatásra vagy fizikai sérülésre reagálva dinamikus átalakuláson is áteshet, ami lehetővé teszi a szövet számára a homeosztázis fenntartását és a fiziológiai kihívásokra és stresszhatásokra, köztük a betegségekre való reagálást (Humphrey és mtsai., 2014; Mouw és mtsai., 2014). Az ECM-nek ez a képessége nélkülözhetetlen a szervek növekedéséhez, illetve a szöveti regeneráció folyamataihoz is. Az ECM remodeling magába foglalja a mátrix makromolekulák lebontását, degradációját, szintézisét és újjászervezését (Lu és mtsai., 2011). A mátrix átalakulását pontosan szabályozzák olyan enzimek, mint a mátrix metalloproteinázok (röviden: MMP-k) és katepszinek, illetve az MMP-k szöveti inhibitorai. A proteáz enzimeket (MMP, Hialuronidáz, Kollagenáz, Katepszin-K) a sejtek választják ki a sejtközüti térbe (Karamanos és mtsai., 2021).

Az MMP-k a cink-függő endopeptidázok családjába tartoznak. Bontják a különböző ECM-komponensek közötti kovalens kötések, ezáltal a sejtek számára is felvehető méretű fragmentekre darabolva azokat. Inaktív proenzimként szekretálódnak és az extracelluláris térben aktiválódnak (Bonnans és mtsai., 2014; Karamanos és mtsai., 2021). Szövetek szintjén az MMP-k működése specifikus inhibitor molekulák által szabályozott, melyeket szöveti mátrix-metalloproteináz gátlóknak, röviden TIMP-nek hívjuk. A TIMP-ek az MMP-aktivitás gátlásával szabályozzák az ECM remodelinget (Karamanos és mtsai., 2021). Az MMP-k és a TIMP-k közötti egyensúly kritikus fontosságú az ECM megfelelő szerkezetének fenntartásához. Ebből következő az egyensúly hiánya vagy az MMP aktivitás diszregulációja olyan kóros állapotokhoz vezethet, mint a rák, az ízületi gyulladás és a fibrózis, ahol az ECM túlzott lebomlása vagy felhalmozódása következik be (Alberts, 2022; Bonnans és mtsai., 2014; Karamanos és mtsai., 2021; Lu és mtsai., 2011).

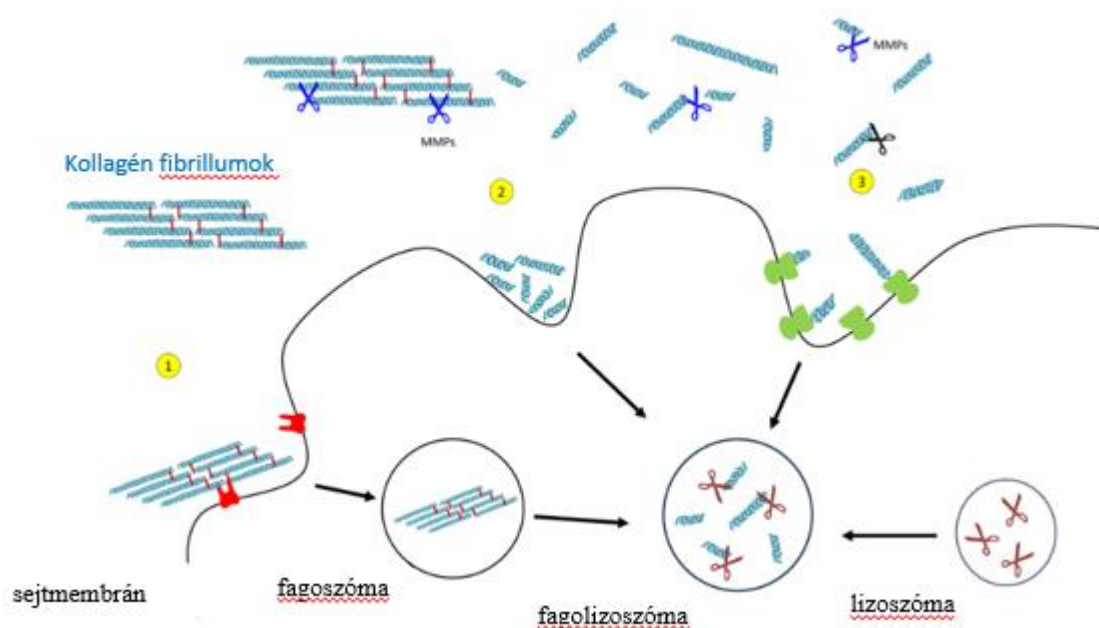
ECM fehérjék sejtszintű felvétele

Az ECM fehérjék speciális szekréciónalakkal és sajátos szortírozó rendszerrel rendelkeznek, annak érdekében, hogy az ECM megfelelő vastagságban, mennyiségben és összetételben épüljön fel (Karamanos és mtsai., 2021; Mouw és mtsai., 2014). Amennyiben ezek a rendszerek zavart szenvednek az a BM alkotóelemek felhalmozódásához, a sejtek számára stressz állapothoz és sejthalálhoz vezetnek (Bonnans és mtsai., 2014). Nem csak a rendellenes szintézis és szekréció, hanem a nem megfelelő ECM lebontása, degradációja is okozhat fibrotikus elváltozást (Karamanos és mtsai., 2021; Zhao és mtsai., 2022). Fontos kiemelni, hogy az előbbieken ismertetett enzimatis ECM bontás mellett bizonyos fiziológiás és patológiás esetekben a mátrix eltakarítás (azaz a felvétel és lebontás) fagocitózisra képes sejtek által is végbe mehet, például makrofágok vagy mikrogliák által (Crapser és mtsai., 2021; Jürgensen és mtsai., 2020).

A mátrix molekulák közül a Kollagén dinamikájáról és forgalmának mechanizmusairól tudunk a legtöbbet. Lebontása és szintézise szigorúan szabályozott, ezzel biztosítva az ECM megfelelő vastagságát. A Kollagén degradáció folyamatát intracelluláris és extracelluláris útvonalakra lehet osztani (Onursal és mtsai., 2021). A lebontást a mátrix metalloproteináz (MMP) enzimek végzik, azon belül is az MMP-1 (Kollagenáz-1) és az MMP-13 (Kollagenáz-3) hasítja a hármas hélixeket az extracelluláris térben (Lu és mtsai., 2011b; Onursal és mtsai., 2021). A hasítások után kisebb Kollagén fragmentek keletkeznek, melyek már a sejt által is felvehetőek fagocitózis vagy endocitózis révén (Onursal és mtsai., 2021). A Kollagén-turnover intenzívebben játszódik a mechanikai igénybevételnek kitett szövetekben vagy olyan élettani

folyamatok során, mint például a sebgyógyulás. A Kollagén forgalmával kapcsolatos kutatások arra engednek következtetni, hogy a sejtek általi ECM felvétel feltehetően integrin-mediált fagocitózis, esetleg scavenger receptor általi vagy receptor-mediált endocitózis révén megy végbe (**5. ábra**) (Onursal és mtsai, 2021).

Fibroblasztokon és makrofágokon azonosítottak olyan receptorokat, melyek az ECM komponensek receptor-mediált endocitózisához szükségesek. Ilyen receptor az urokináz plazminogén aktivátor receptor asszociált protein (röviden: uPARAP/Endo180), mely előfordul mezenchimális sejt típusokon és bizonyos makrofágok membránjában. A másik, nemrégiben azonosított receptor egy mannóz receptor (MR) a CD206, amely makrofágokon és dendritikus sejtek felszínén egyaránt fellelhető (Henrik J. Jürgensen és mtsai., 2020). **Dacára a meglévő információknak a sejtek általi ECM felvétel pontos mechanizmusáról, kulcselemeiről igen keveset tudunk.**



5. ábra A Kollagén felvételi és lebontási útjai. Az MMP-k, katepszinek általi, illetve az intracelluláris degradáció lehetséges útvonalai láthatóak, amelyek végbemehetnek (1) fagocitózis (2) makropinocitózis vagy (3) receptor-mediált endocitózis révén (Onursal és mtsai., 2021).

Az ECM dinamika vizsgálata ecetmuslicában

A *Drosophila melanogaster* széles körben elterjedt modellszervezet, számos tudományterület kutatásaiban alkalmazzák, nem csak a jól ismert genetikai eszköztára miatt, hanem mert összetett élettani és molekuláris mechanizmusok *in vivo* tanulmányozását is lehetővé teszi (Duffy, 2002). A *Drosophila* ECM felosztható egy külső vagy apikális frakcióra,

ami a test felszínén található, illetve egy belső vagy bazális frakcióra, ami pedig a test belsejében a szöveteket burkolja (Broadie és mtsai., 2011). Komponenseit lokálisan a sejtek szekretálják. Emellett a legtöbb ECM fehérje szintézisét elsődlegesen az állat zsírtestjei és kisebb mértékben az immunsejtjei (hemocitái) végzik. Az így kiválasztott fehérjék a hemolimfán keresztül jutnak el a megfelelő szöveti felszínhez (Fogerty et al., 1994; Martin-Bermudo and Brown, 2000).

Az ecetmuslica bazális membránjait a korábban már ismertetett ECM-komponensek alkotják, hasonlóan a gerincesekéhez (Yurchenco & Patton, 2009). *Drosophilában* ezek a mátrix alkotók evolúciósan jól konzerváltak, ideértve két Laminin trimert (Laminin A, Laminin W), egy Perlekánt (Terribly reduced optic lobes, Trol), két gént, amelyek a IV-es típusú Kollagén polipeptideket (Cg25C és Viking, Vkg) kódolják, egy Nidogént (Ndg) (Hynes & Zhao, 2000). A két *Drosophila* Laminin egységnek megegyeznek a β és γ láncai (LanB1 és LanB2), de az α láncai eltérnek egymástól (LanA a Laminin A-ban és a Wing blisters (Wb) fehérje a Laminin W-ben). A két Laminin trimer szöveti eloszlása eltérő (Broadie és mtsai., 2011; Martin és mtsai., 1999). Perlekán jól konzervált a *Drosophilában*, és az I. domén kivételével megegyezik az emlős Perlekán doménszerkezetével (Friedrich és mtsai., 2000; Voigt és mtsai., 2002). Embriókban a Perlekán számos BM-ben megtalálható, és nagymértékben ko-lokalizálódik a Laminin A-val (Friedrich és mtsai., 2000). A Nidogén a *Drosophila* BM-ben is linker funkciókat lát el (Wolfstetter & Holz, 2012). A IV-es típusú Kollagének hármass hélix szerkezetűek, amelyek egymásba fonódó hálózatokat alkotnak, és a *Drosophilában* is a BM-ek szerkezeti alapját képezik. *Drosophilában* két IV-es típusú Kollagén fejeződik ki, a Viking és a Cg25C (Natzle és mtsai., 1982; Yasothornsrikul és mtsai., 1997).

Az utóbbi évtizedekben egyre több, a *Drosophila* ECM szerveződéssel és a mátrix komponensek funkcióinak azonosításával kapcsolatos tanulmány jelent meg, főleg az egyedfejlődés, idegi fejlődés és funkció, tumor kialakulás és szöveti növekedés kapcsán (Broadie és mtsai., 2011; Bunt és mtsai., 2010; Srivastava és mtsai., 2007). A *Drosophilában* megtalálható MMP-k és TIMP-ek funkcióiról, szövet specifikus kifejeződéseiről, valamint a szöveti átalakulásokban betöltött szerepeiről szintén sok ismeret áll rendelkezésünkre (Page-McCaw, 2008; Llano és mtsai., 2002). Azonban a mátrix fehérjéinek sejtszintű felvételét és lebontását csak *in vitro* vizsgálták embrionális S2 sejtvonal használatával (Lee és mtsai., 2014). Az *in vivo* sejtszintű ECM felvétel folyamatai, szabályozóelemei nem ismertek, noha a fagocitózisra képes sejtek (makrofágok, gliák) szerepkörei különösen kutatók számára számos biológiai folyamatban.

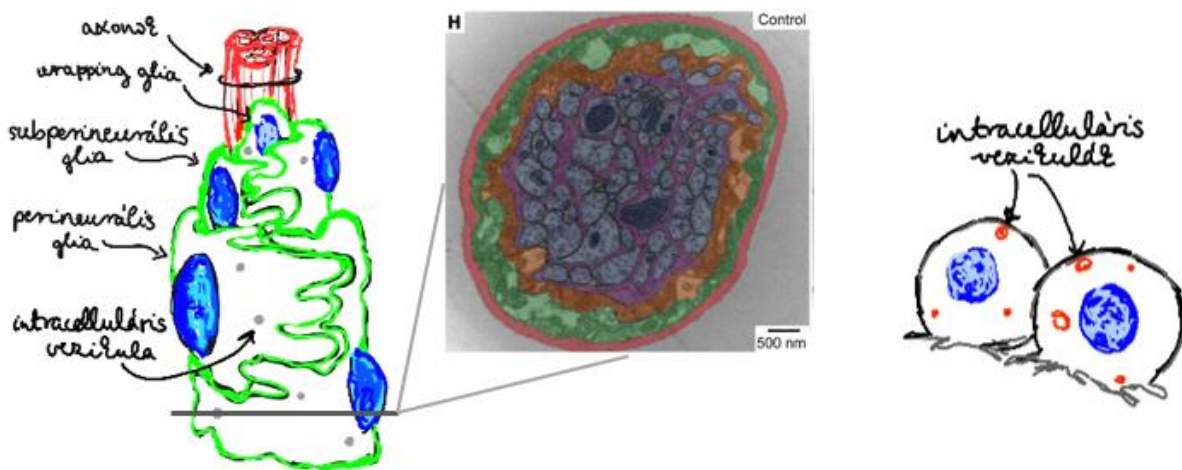
Az ecetmuslica makrofág-szerű sejtjeinek (plazmatocitáinak) számos funkcióját azonosították, melyek közül a legfontosabb a mikrobák és apoptotikus törmelékek bekebelezése (Ulvila és mtsai., 2011). Több, a fagocitózis első lépéséhez, azaz a célpontok felismeréséhez szükséges molekulákat azonosítottak. Ilyen receptor az Eater (Chung & Kocks, 2011; Kocks és mtsai., 2005), a NimrodC1 (Kurucz és mtsai., 2007; Zsámboki és mtsai., 2013), valamint a Draper (Fujita és mtsai., 2012; Manaka és mtsai., 2004). A plazmatociták a bekebelezésen kívül más feladatokat is ellátnak: extracelluláris mátrix fehérjéket és antimikrobiális peptideket termelnek és választanak ki (Martinek és mtsai., 2008). Továbbá azt is tudjuk, hogy a *Drosophila* immunsejtjei milyen molekulák révén tudnak kapcsolatba lépni a bazális membránnal. A Multiplexin fehérje, amely egy *Drosophila* Kollagén XV/XVIII ortológ, szükséges a makrofágok szöveti felszínhez való tapadásához, a makrofág membránjában lévő Eater recepttorral kialakított fizikai kölcsönhatás révén (Csordás és mtsai., 2020).

Az ecetmuslicában azonban egyéb sejtípusok is képesek fagocitózisra és ezáltal sejtes törmék felvételére. Egy nemrégiben publikált tanulmányban leírták, hogy *Drosophila* szárnyban lévő glia sejtek LC3 asszociált fagocitózissal veszik fel és távolítják el az axon fragmentumokat axotómia után (Szabó és mtsai., 2023). *Drosophila* lárva szegmentális idegéről készült elektronmikroszkópos felvételek alapján tudjuk, hogy annak felépítésében három glia populáció vesz részt. Legbelül a wrapping gliák védik és fogják közre az axonokat, őket veszik körbe a szubperineurális gliák majd kívülről a perineurális gliák. Legkívül az ideg felszínét pedig feltehetően a perineurális gliák által szintetizált bazális membrán vékony rétege burkolja **(6. ábra)** (Petley-Ragan és mtsai., 2016).

Fagocitózis során a sejt képes bekebelezni apoptotikus sejtörmelékeket, baktériumokat, makromolekulákat és mikroszkópikus részecskéket. A folyamat első lépése a bekebelezendő anyag felismerése és megkötése sejtfelszíni receptorokkal. A felismerés során a sejt úgynevezett „egyél meg/általános” szignálokat ismer fel. Ezután a sejt az aktinfilamentumaival állabakat növeszt a bekebelezendő anyag felé és körülzárja azt. A bekebelezett anyag az őt kötő receptorokkal és lipidmembránnal együtt kerek vezikulum formájában lefűződik a sejtmembránról és bekerül a citoplazmába. Ezt fagoszómának nevezzük, ami a sejten belüli érési folyamatot követően összeolvad a proteolitikus enzimeket tartalmazó lizoszómával. Az így létrejött fago-lizoszómában megtörténik a bekebelezett anyag enzimatis lebonthatása. A receptor-mediált endocitózissal több típusa van, de általánosan elmondható, hogy szelektívebb felvételi folyamat a fagocitózissal, mivel itt specifikus receptor-ligand kötésnek kell kialakulnia. További jelentős különbség, hogy receptor-mediált endocitózis során nem

alakulnak ki állábak, hanem a ligandot megkötő receptorok körül a sejtmembrán belső oldalán a klatrin fehérjék segítségével fűződik le és kerül be a sejt belsejébe a felvételre kerülő anyag. A lefűződött vezikulum, a korai endoszóma érési folyamaton megy keresztül, melynek során az endoszóma membránjához asszociált fehérjék egy része lecserélődik, megváltozik a membránösszetétel. Ezáltal alakulnak ki a késői endoszómák, amelyek ezt követően lizoszómákkal fuzionálnak, amelyekben megtörténik az enzimatikus lebontás (Kinchin & Ravichandran, 2008).

Mivel a fagocitózis és a receptor-mediált endocitózis molekuláris folyamatai is jól jellemzettek ecetmuslicában, valamint széles genetikai eszköztárat hoztak létre a vizsgálatukhoz (Dunst és mtsai., 2015; Melcarne és mtsai., 2019), ezért a *Drosophila* kiváló modellként szolgál a mátrix felvétel *in vivo* vizsgálatához. Mindezek miatt szerettük volna jobban megérteni, hogy a makrofágok és a gliák milyen sejt szintű folyamatokon, mikor és hogyan veszik fel és bontják le, azaz alakíthatják át a saját ECM-környezetüket.



6. ábra A szegmentális ideget ábrázolja a bal oldali sematikus ábra, illetve az ideg keresztmetszetéről készült elektronmikroszkópos felvételt láthatjuk középen (H), ahol axonok (kék), wrapping glia (lila), szubperineurális glia (narancssárga), perineurális glia (zöld), BM (piros). Jobboldalon a hemociták sematikus ábrázolása látszik. Az elektronmikroszkópos felvétel - (Petley-Ragan és mtsai., 2016).

Célkitűzések

Elsődleges célunk volt olyan modellrendszerek felállítása *Drosophila melanogaster* szervezetben, ahol *in vivo* követni tudjuk a sejtszintű ECM felvétel folyamatát homeosztázisban, illetve szöveti regeneráció során.

Mivel egyik modellként a *Drosophila* lárva szegmentális idegeit választottuk, jellemezni szeretnénk volna az itt található ECM fehérjék lokalizációját.

Intracelluláris vezikula markerekkel azonosítani akartuk a mátrixfehérjék lebontásban szereplő sejten belüli vezikula kompartmenteket, lebontási útvonalakat, ezzel követve a sejtszintű ECM felvételt gliákban és immunsejtekben.

Vizsgálni és jellemezni szeretnénk volna a szöveti sérülés gliális ECM felvételre gyakorolt hatását, a sérülést követő 2., illetve 24. órában.

Szerettünk volna létrehozni olyan genetikai rendszereket, amelyek segítségével sejtípus-specifikusan végezhetünk jövőbeli szűrővizsgálatokat az ECM felvételi útvonalak kulcsszereplőinek felderítésére.

Anyagok és módszerek

Drosophila genotípusok és keresztezések

Az ecetmuslicák keresztezését, valamint fenntartását 25°C-on végeztük, standard *Drosophila* táptalajon.

A dolgozatban az alábbi genotípusokat használtuk:

vkg::GFP: w; P[PTT-un1]vkgG454 (DGRC #11069)

LanB1::GFP: w; PBac{fTRG00681.sfGFP-TVPTBF}VK00033 (VDRC #318180)

Trol::GFP: y¹ w; Mi{PT-GFSTF.0}trolM^{04580-GFSTF}* (BDSC #60214)

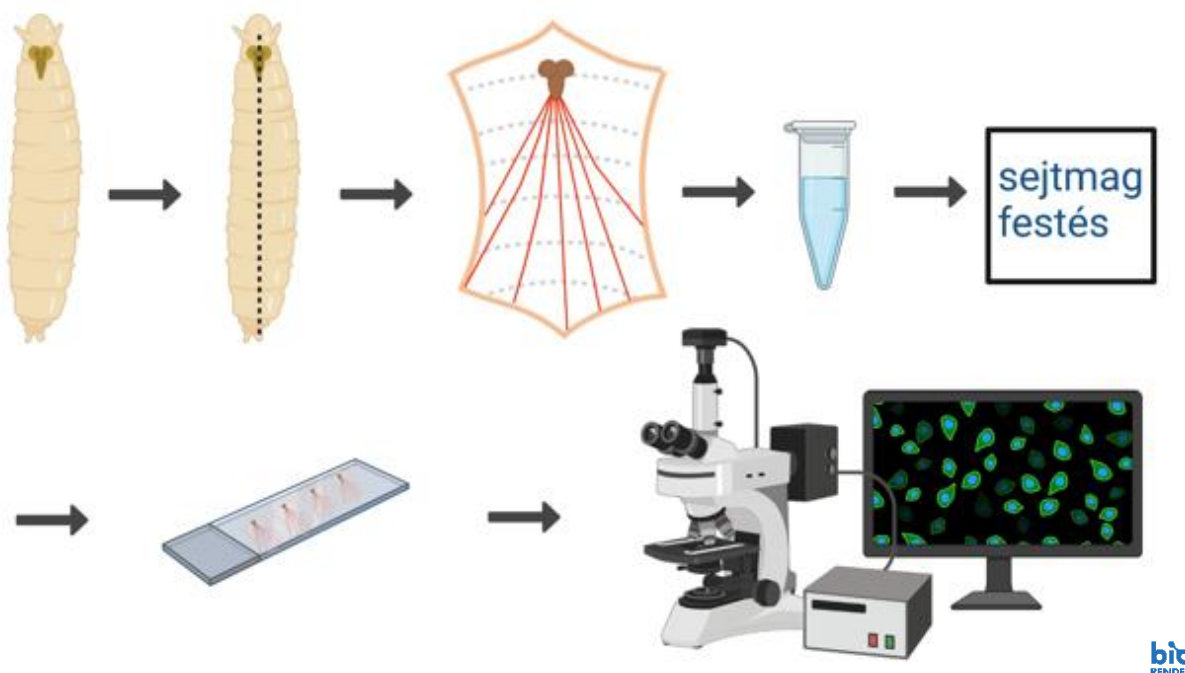
repo>TMEM192::3xmCherry, LanB1::GFP: w; UAS-TMEM192::3xmCherry; repo-GAL4, PBac{fTRG00681.sfGFP-TVPTBF}VK00033

wg-split>TMEM192::3xmCherry, LanB1::GFP: w; UAS-TMEM192::3xmCherry; IT0117-VP16A, Nrv2-GAL4^{DBD}, PBac{fTRG00681.sfGFP-TVPTBF}VK00033

Agy és idegek preparálása

Az idegrendszer preparálását sztereomikroszkóp alatt végeztük. Átlagosan egy kísérlet során 6 lárva boncoltunk kísérleti körülményenként. Az állatokat egy fekete szilikon boncolólapon 50 µL PBS-ben helyeztük el, úgy, hogy dorzális oldaluk legyen felül. A lárva anterior és posztterior végét minúciatűvel kitűztük. Két csipesz segítségével a szagittális sík mentén szétnyitottuk az állatot, majd négy további tűvel kitűztük a lárva kutikuláját. Ezután a VNC-n és a szegmentális idegein kívül minden más szövetet, szervet eltávolítottunk. A boncolás után 50 µL 4% PFA segítségével 20 percig fixáltuk a mintákat, majd 500 µL-es eppendorf csőbe helyeztük őket, melybe 300 µL PSBT-t pipettáztunk. Ezt 3x5 perc PBST mosás követte. Abban az esetben, amikor nem végeztünk indirekt immunofluoreszcens festést, a mintákat PBST-ben felvett, 0.5 mM végkoncentrációjú DAPI festékkel inkubáltuk 30 percig. Ezután 3x5 perc PBST mosást követően a mintákat VectaShield fedőmédiumban a tárgylemezre helyeztük és lefedtük **(7. ábra)**. LysoTracker festés esetében a boncolás lépései megegyeznek a fent bemutatottakkal, azonban itt a mintákat nem fixáltuk 4% PFA-val, hanem közvetlenül a mintára pipettáztuk a LysoTracker-RED festéket, amelyet 5 perc inkubáció követett. Ezután 2x5 perc PBS mosás után az agyat az idegekkel együtt óvatosan eltávolítottuk a kitűzött kutikula preparátumról és a tárgylemezen lévő VectaShield fedőmédiumba helyeztük azokat. A mintákat minden esetben 70

μ L VectaShield fedőmédiumban rendeztük el, úgy, hogy a vizsgálni kívánt szövet jól látszódjon, majd fedőlemezzel fedtük a mintákat.



7. ábra A minták előkészítését: a boncolás és az indirekt immunfluoreszcens festés folyamatának lépéseit ábrázolja.

Immunfestés

Annak érdekében, hogy jelöljük az egyes vezikula populációkat indirekt immunfluoreszcens jelölést végeztünk **(8. ábra)**. Miután a paraformaldehidet lemostuk a mintákról, a szöveteken PBST-ben feloldott, 0.1% végkoncentrációjú BSA-val blokkolást végeztünk. A telítő oldatban 20 percig inkubáltuk a mintákat, majd a BSA eltávolítása után a telítőoldatban hígított elsődleges ellenanyagot adtunk hozzá a mintához. Az elsődleges ellenanyaggal vagy másfél óráig inkubáltunk szobahőmérsékleten vagy éjszakán át 4°C-on. Ezt 3x5 perc mosás követte PBST-vel, majd a fluoreszcensen jelölt másodlagos ellenanyag, illetve a sejtmagot jelölő DAPI festék keverékét adtuk a mintákhoz. A mintákat egy óráig inkubáltuk szobahőn. A további mosások és a minták fedése a fenti protokoll szerint történt.

A dolgozatban használt ellenanyagok:

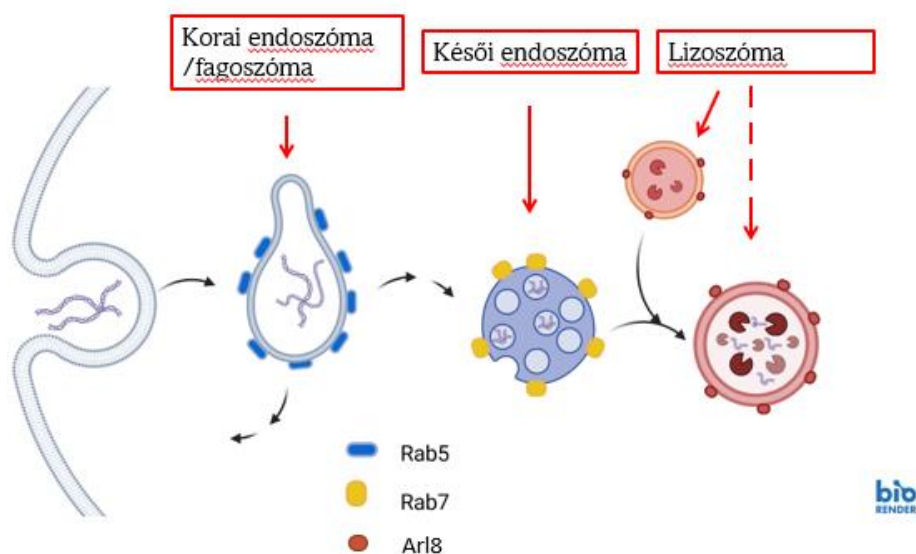
anti-Rab5 (nyúl, 1:1000 hígítás), Abcam, ab31261

anti-Rab7 (egér, 1:100 hígítás), DSHB, AB_2722471

anti-Arl8 (nyúl, 1:1000 hígítás), DSHB, AB_2618258

anti-egér – Alexa-568 (kecske, 1:1000 hígítás) Molecular Probes, A11031

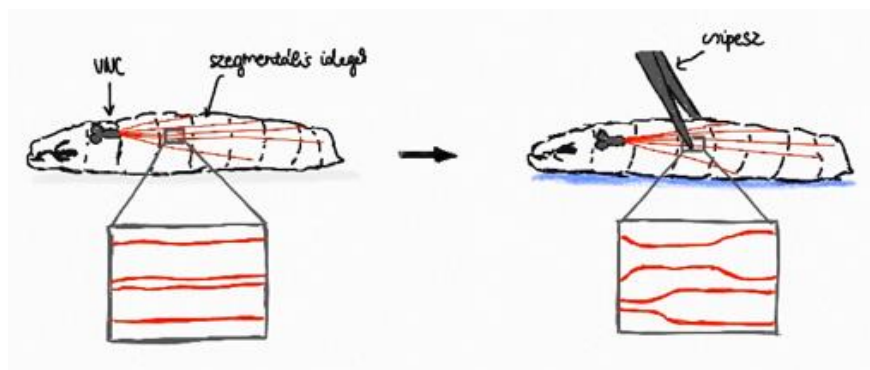
anti-nyúl – Alexa-568 (kecske, 1:1000 hígítás) Molecular Probes, A11036



8. ábra A fluoreszcensen jelölt intracelluláris vezikulákat ábrázolja.

Idegi sérülés modellezése

Idegi sérülést egy korábban leírt protokoll követése alapján váltottunk ki (Mishra és mtsai., 2014). A lárvákat dorzális oldalukkal jéghideg felületre helyeztük, majd csipesszel a ventrális oldalon megszorítottuk a kutikulájukat a 3. abdominális szegmensnél, ezzel roncsolva nem csak a kutikulát, hanem a szegmentális idegeket is (**9. ábra**). Sikeres roncsolás hatására az állat poszterior fele lebénult és csak a sérüléstől anterior irányba tapasztaltunk mozgást (Mishra és mtsai., 2014). A roncsolást követően az állatokat visszahelyeztük friss táptalajra, majd 2, illetve 24 órával később kipreparáltuk a korábban leírt protokollnak megfelelően (**7. ábra**).



9. ábra Az idegi sérülés modellezésének ábrázolása sematikusan. Bal oldalon a kontroll (ép) szegmentális idegek, jobb oldalon a csipés utáni roncsolódott idegek látszódnak. A kinagyított rész mutatja, melyik területen készítettük a mikroszkópos felvételeket.

Mikroszkópos vizsgálat

A lefedett mintákat Zeiss ApoTome2 fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk meg. A mikroszkópos felvételeket mindkét esetben a Zeiss ZEN szoftverrel készítettük el, Z-sorozatok formájában, ApoTome módban. A dolgozatban szereplő képek minden esetben a Z-sorozat egy optikai szeletét mutatják be. A **9. ábrán** a kinagyított területek jelölik azt a régiót, ahol a képalkotást végeztük.

Adatelemzés

Az ECM fehérjék idegi lokalizációjának megállapításához a FIJI képelemző szoftver „Surface plot” modulját használtuk. Egy 20 pixel széles szakaszt jelöltünk ki az ideg lefutására merőlegesen, majd a kapott értékeket átlagos pixel intenzitásként („Gray value”) tüntettük fel.

Az idegekben a sérülést követő ECM felhalmozódást a FIJI szoftverrel mértük. A LanB1::GFP jel átlagos fluoreszcencia intenzitását (Mean fluorescence intensity, MFI) egy egységnyi terület kijelölését követően határoztuk meg. A kapott értékeket egyutas ANOVA többszörös összehasonlítással elemeztük, az ábrákon a standard deviációt tüntettük fel. Mindhárom kondíció esetében 12 mérést végeztünk.

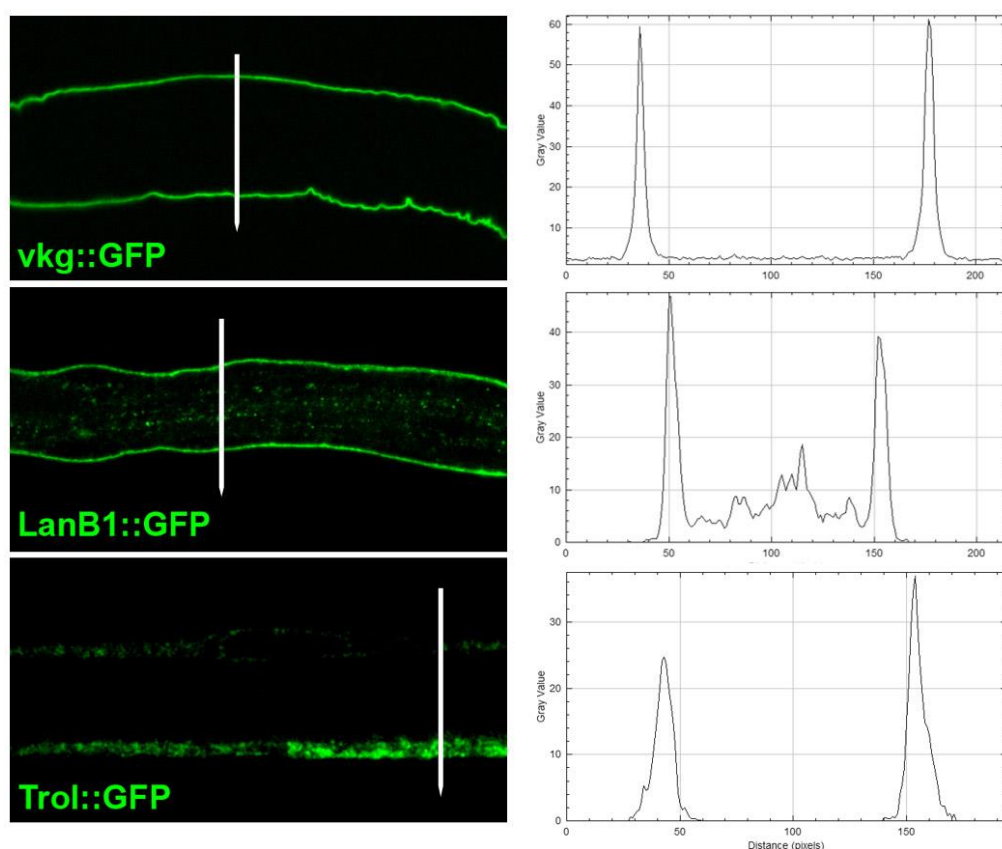
Az idegekben és immunsejtekben végzett kolokalizációs elemzéshez a FIJI szoftvert használtuk. A Z-sorozat középső szeletének kiválasztását követően a zöld (LanB1::GFP) és piros (vezikula marker) csatornákon thresholding-ot végeztünk (a szoftver által ajánlott értéken), majd a képek egységnyi részletén megállapítottuk az adott vezikulák számát, valamint azon vezikulákét, amelyek tartalmazták az ECM fehérjét is (zöld és piros átfedés). A két szám hányadosából megállapított százalékos értékeket hasonlítottuk össze kétmintás Student's t-próbával. Kategóriánként 12 mérési adatot hasonlítottunk össze, melyek mintánként két-két idegről vagy immunsejt-csoportról készült felvételekből készültek. A box plot ábrákon a standard deviációt tüntettük fel. Az egyszerűbb bemutatás érdekében a három független vezikuláris kompartmentumban végzett méréseket egy ábrán, szaggatott vonallal elválasztva tüntettük fel. A grafikonokat a GraphPad PRISM szoftverrel készítettük.

Eredmények

ECM fehérjék kifejeződése *Drosophila* szegmentális idegekben

Elsődleges modellünk tehát a lárva szegmentális idegei, ahol az axonokat három glia populáció veszi körül. Az elektronmikroszkópos felvételekből tudjuk, hogy az idegeket kívülről burkoló BM-en kívül az axonok és a wrapping gliák között is megfigyelhetők ECM fehérjék (Petley-Ragan és mtsai., 2016).

Elsőként meghatároztuk, hogy az idegek belsejében megfigyelt mátrix milyen ECM fehérjékből áll. Kísérleteinkben három, a muslica lárva legabundánsabb ECM fehérjéjének GFP-vel jelölt változatát vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy a Kollagén IV. (Vkg) és a Perlekán (Trol) az ideg körül helyezkednek el, az ideg belsejében nem voltak detektálhatók. Ezzel szemben a Laminin (esetünkben a LamininB1) nem csak kívülről határolta az ideget, hanem az ideg belsejében is jelen volt több, változó méretű pontként (**10. ábra**). Tehát, megállapítottuk, hogy a lárva szegmentális idegében a glia populációk között előfordul a Laminin fehérje, illetve, hogy az ideg felszínét burkoló BM tartalmaz Kollagén IV., Laminin és Perlekán ECM fehérjéket.

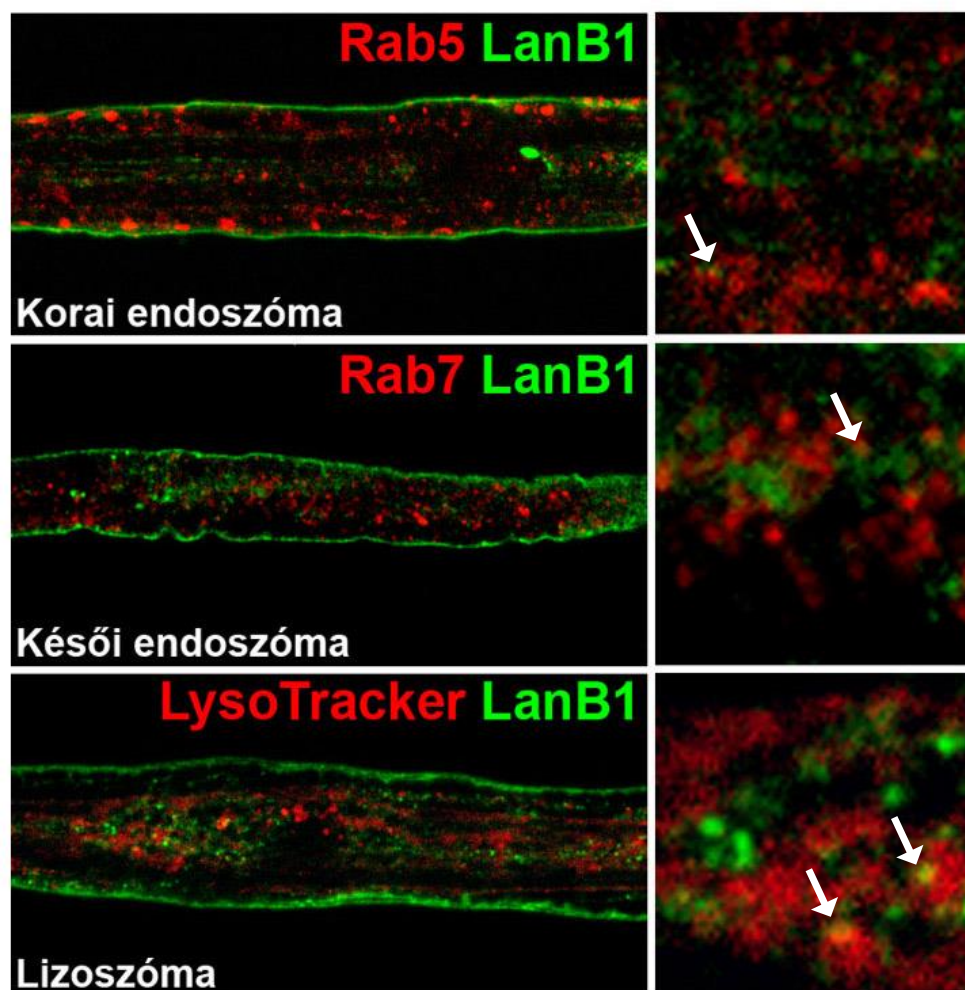


10. ábra Bal oldalon az idegekről készült hosszmetzeti képek mutatják a Kollagén IV. (Vkg), Laminin (LanB1) és Perlekán (Trol) kifejeződését. 20 pixel széles szakaszt jelöltünk ki (fehér vonal), a kapott értékeket átlagos pixel intenzitásként („Gray value”) tüntettük fel – jobb oldal.

Glia sejtek általi Laminin felvétel és lebontás követése vezikula markerekkel

A lokalizációs elemzést követően további kísérleteinkben a LamininB1::GFP riporter mintázatát vizsgáltuk. Ezután szeretnénk volna megállapítani, hogy a gliák képesek-e felvenni Laminint az extracelluláris térből és az bekerül-e az intracelluláris lebontási útvonalban szereplő vezikulákba.

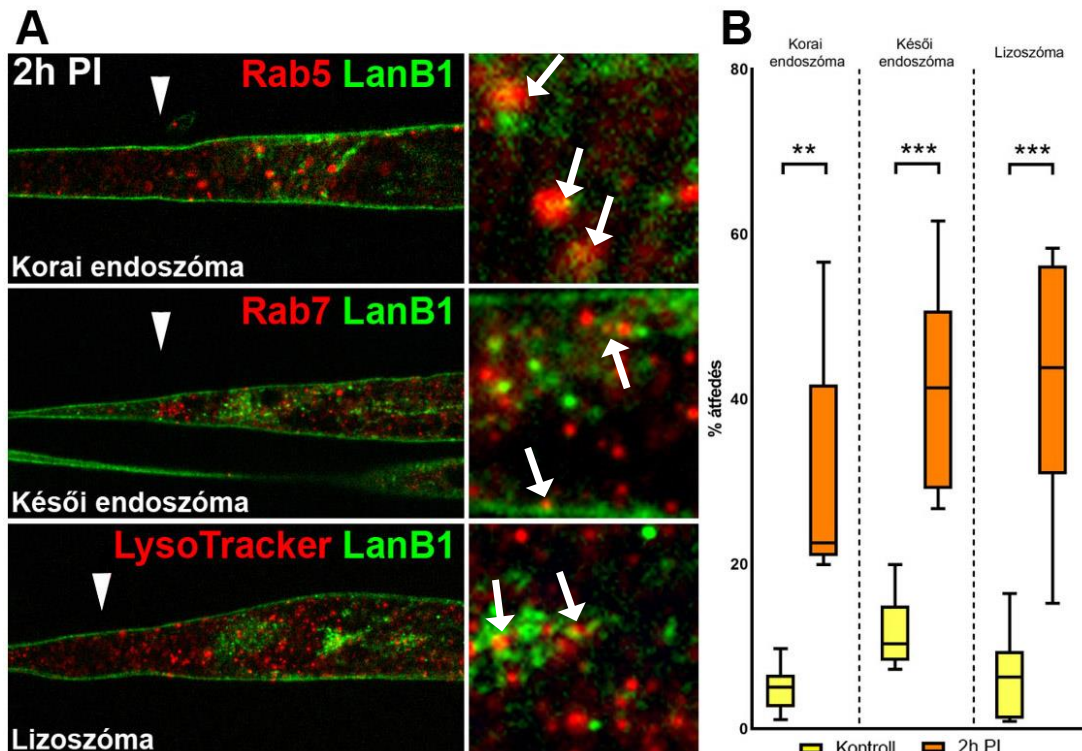
Ennek megértéséhez az intracelluláris vezikulákat jelöltük alpopulációkra specifikus markerekkel és vizsgáltuk a LamininB1::GFP jellel való átfedésüket. A kolokalizációs kísérleteket elvégeztük korai (Rab5) és késői endoszómákkal (Rab7), illetve a savas lizoszómákat jelölő LysoTracker-RED festékkel (**11. ábra**). Megállapítottuk, hogy az idegekben a Laminin ritkán mutatott átfedést az endo és lizoszómális markerekkel, ami utalhat arra, hogy a gliák általi ECM felvétel homeosztatisz körülmények között alacsony szinten működik.



11. ábra Bal oldalon a különböző vezikula markerekkel jelölt naiv idegek láthatóak, jobb oldalon azokból kinagyított részek, ahol fehér nyilak jelölik a kolokalizációt. A zöld szín jelöli a LamininB1::GFP-t, a korai (Rab5) és késői endoszómák (Rab7), illetve a savas lizoszómák (LysoTracker-RED) piros színnel láthatóak.

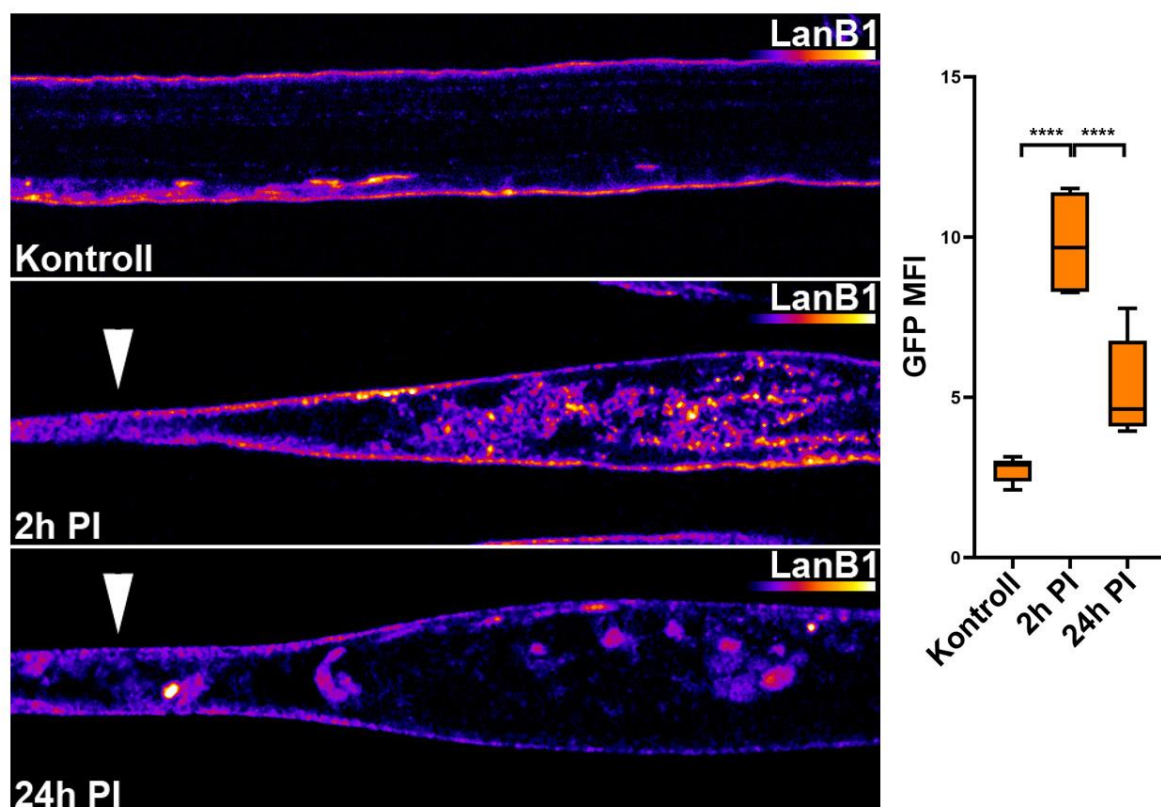
Szöveti sérülés ECM felvételre gyakorolt hatásának vizsgálta

Ezt követően kíváncsiak voltunk arra, hogy a gliasejtek általi ECM felvétel indukálható-e fizikai sérüléssel. Emlős modellekből tudjuk, hogy az idegek sérülését, például zúzódását, gyakran mátrixkomponensek felhalmozódása követi, amely az ideg gyógyulásával párhuzamosan enyhül/megszűnik (Liu és mtsai., 2021). Esetünkben egy, az irodalomban korábban leírt fizikai sérülés modellt alkalmaztunk (Mishra és mtsai., 2014) (lásd anyag és módszertan). Megfigyeltük, hogy az általunk okozott zúzódás az ideg helyi elvékonyodásához vezetett, azonban nem okozott szakadást az ideget kívülről burkoló bazális membránban. A roncsolódott idegekben a sérülés közvetlen környékén jelentős Laminin felhalmozódást figyeltünk meg, amely két órával a sérülést követően diffúz mintázatot, illetve pontszerű fókuszokat mutatott. Kolokalizációs kísérleteink során azt figyeltük meg, hogy a LamininB1::GFP a vezikulákkal (endo/lizoszómális markerekkel) való átfedésének aránya jelentősen megemelkedett a sértetlen idegekben tapasztaltakhoz képest (**12. ábra B**). A sérülés környékén jelentősen több GFP pozitív vezikula kompartmentumot figyeltünk meg (**12. ábra A**). Mindez jelentheti azt, hogy sérülés hatására megemelkedik a sejtek általi ECM felvétel folyamatának aktivitása, kompenzálva a sérülés környékén bekövetkező ECM felhalmozódást.



12. ábra Az A paneleken a sérült idegek láthatóak, illetve azokból kinagyított részek, ahol fehér nyilak jelölik a GFP pozitív korai (Rab5) és késői endoszómákat (Rab7), illetve a savas lizoszómákat (LysoTracker-RED). A B panelen a GFP-vezikula marker átfedés látható, a világos sárga szín jelzi a naiv idegeket, narancssárga a sérült idegeket. A szórás, mint standard deviáció van feltüntetve, a vízszintes vonal mutatja az átlagot. Student's T-próba (**): $p < 0,01$; (***): $p < 0,001$; $n = 12$.

Mivel szeretnénk volna megtudni, hogy a zúzódást követően a Laminin mennyisége hogyan változik, az idegeket a sérülés után 24 órával is megvizsgáltuk. A kétórás időpontnál tapasztalt diffúz eloszláshoz képest 24 órával a sérülés után a Laminin gömb alakú, aggregátum-szerű morfológiát mutatott a sérülés környékén, valamint a mennyisége csökkent a 2 órás időpontoknál tapasztaltakhoz képest (**13. ábra**). Tehát mind a Laminin felhalmozódás morfológiájában, mind a sérülés környéki mennyiségében változást tapasztaltunk a kontroll, a kétórás és a 24 órás idegek között, ami arra utal, hogy a felhalmozódó Laminin sejtes úton és/vagy extracelluláris enzimek által lebontásra kerül.

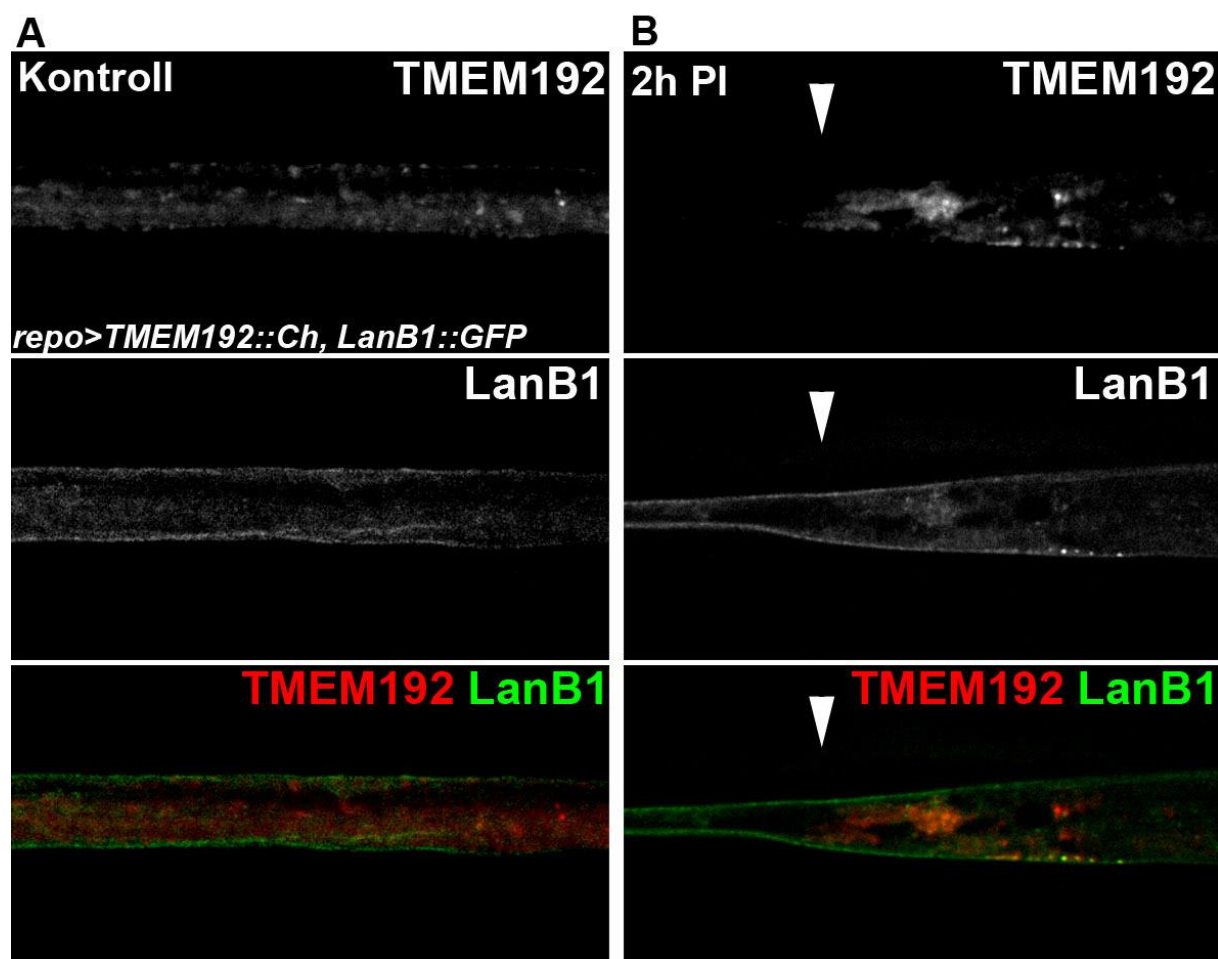


13. ábra A kontrollhoz képest a sérülést követően két órával megnő a Laminin mennyisége az ideg belsejében, míg a sérülés után 24 órával ez csökken. Minél világosabb egy terület (sárga, fehér) annál erősebb a GFP jel. Jobb oldalon a box plot grafikonon az idegen belül kijelölt egységnyi terület általános fluoreszcencia intenzitásának (MFI) változása látható a különböző időpontokban. Szórásként a standard deviációt tüntettük fel, a vízszintes vonal jelzi az átlagot. ANOVA többszörös összehasonlítás (****): $p < 0,0001$; $n = 12$.

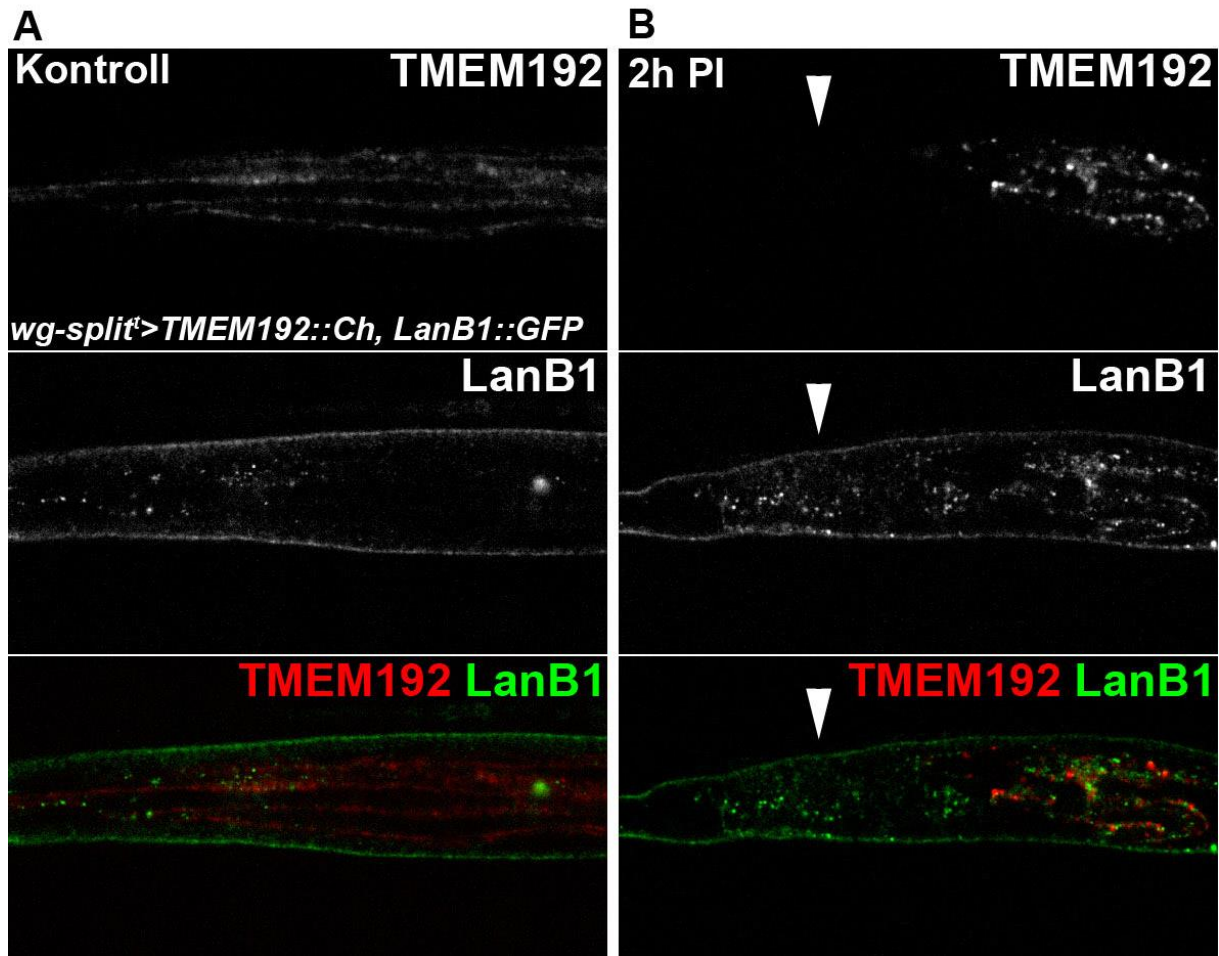
Glia-specifikus vizsgálati rendszerek létrehozása

Az általunk vizsgált lárvális szegmentális idegekben három, funkcionálisan is különbségeket mutató gliatípus található. Mivel a jövőben szeretnénk megismerni ezek részvételét a homeosztatis, valamint a sérülést követő ECM remodelingben, olyan transzgenikus rendszereket építünk, melynek segítségével ezek együttesen vagy külön-külön követhetők. A LamininB1::GFP genetikai háttéren a GAL4/UAS rendszert használva pán-glia (repo-GAL4)

valamint wrapping glia-specifikus (wg-split-GAL4) meghajtóelemekkel kifejeztettük a TMEM192::3xmCherry markert, amely a lizoszómák membránjába lokalizálódik. Ezt követően megvizsgáltuk a Laminin kolokalizációját a lizoszómális markerrel homeosztatis állapotban, valamint két órával a sérülést követően. Hasonlóan a korábban tapasztaltakhoz, mindkét genotípusban megfigyeltük a GFP halmozódását a sérülés környékén. Ezen felül megállapítottuk azt is, hogy a kontrollhoz képest a sérült idegben nagyobb mértékű Laminin/lizoszóma kolokalizáció figyelhető meg (14. és 15. ábra). Ezen eredmények egyrészt megerősítik korábbi megfigyelésünket, miszerint a sérülést követően megnő a gliák által felvett Laminin mennyisége, másrészt arra is utalnak, hogy a wrapping gliák részt vesznek a sérült ideg belsejében felhalmozódott Laminin felvételében.



14. ábra Repo-GAL4 meghajtóelemmel kifejeztettük a lizoszómákat jelölő TMEM192::3xmCherry markert. Az A oszlopban a kontroll, a B oszlopban a sérült idegek láthatóak. A fehér háromszög jelzi a sérülés helyét. A kontrollhoz képest a sérült idegekben nagyobb mértékű Laminin-lizoszóma kolokalizációt figyeltünk meg két órával a sérülést követően.



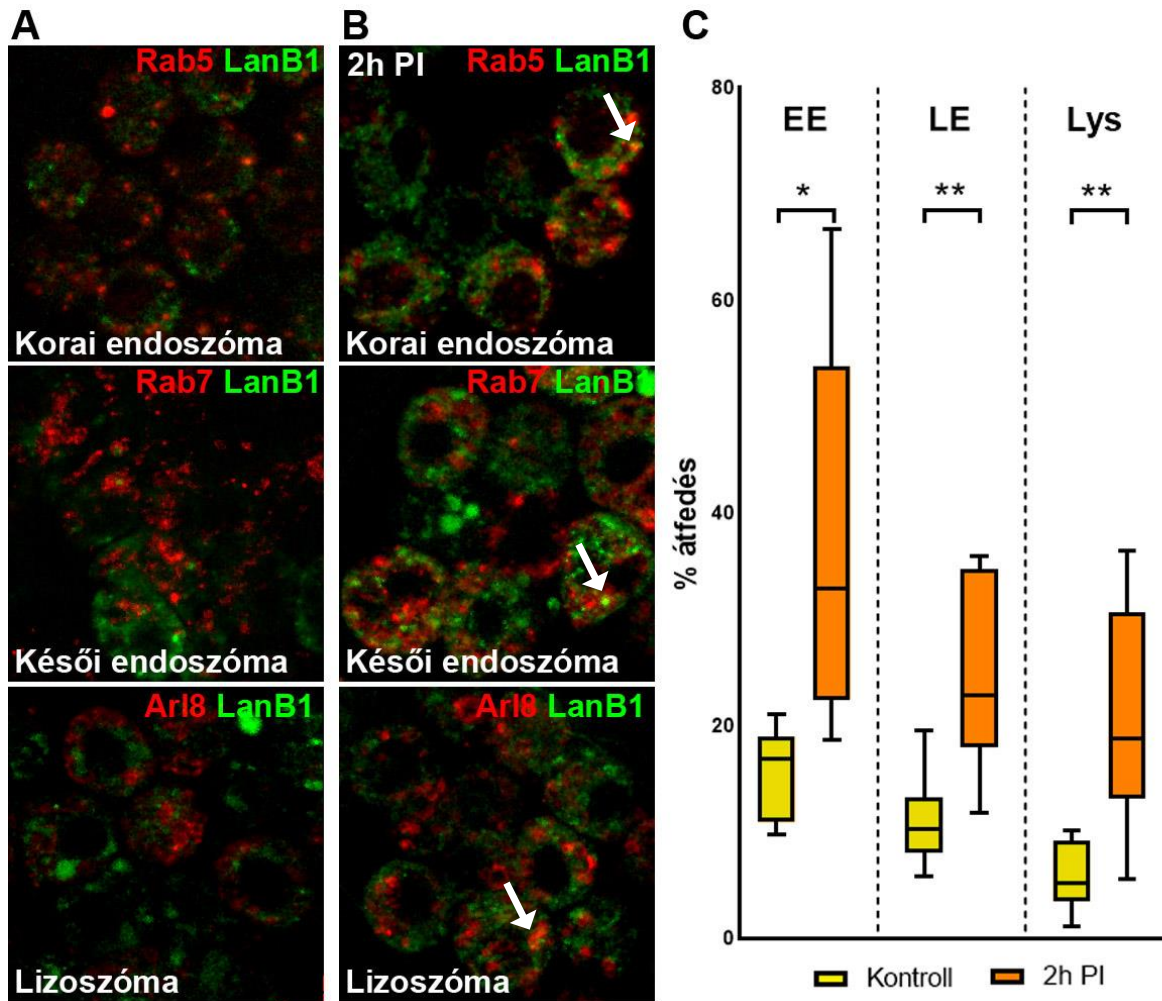
15. ábra A *wg-split-GAL4* meghajtóelemmel kifejeztettük a lizoszóákat jelölő *TMEM192::3xmCherry* markert a wrapping gliákban. Az A oszlopban a kontroll, a B oszlopban a sérült idegek láthatóak. A fehér háromszög jelzi a sérülés helyét. A kontrollhoz képest a sérült idegekben nagyobb mértékű Laminin-lizoszóma kolokalizációt figyeltünk meg két órával a sérülést követően a glia alpopulációban.

Hemociták általi Laminin felvétel és lebontás követése

Mivel kíváncsiak voltunk arra, hogy a gliákban tapasztalt Laminin felvétel a lárva immunsejtjeiben is megfigyelhető-e, megvizsgáltuk a testfalhoz asszociált vérsejtekben (szesszilis hemocitákban) található Laminin kolokalizációját az előző kísérletekben használt endoszómális markerekkel, valamint az Arl8 lizoszóma-specifikus fehérje követésével (lásd anyag és módszertan). Hasonlóan a gliákban tapasztaltakhoz, homeosztatisztikus körülmények között a Laminin ritkán volt megtalálható korai és késői endoszómákban, valamint lizoszómákban.

Az idegi sérülés vizsgálatokor megfigyeltük, hogy az általunk okozott zúzódás jelentős szöveti károsodást vált ki a testfal epidermiszben és izmokban, valamint már két órával a sérülést követően jelentős mennyiségű immunsejt asszociálódott a sérült testfalhoz. Mivel itt

jelentős ECM roncsolódást is tapasztaltunk, ezért ebben az esetben is megvizsgáltuk, hogy a sérülés megnöveli-e az immunsejtek által felvett Laminin mennyiségét. Sérülés után két órával a LamininB1::GFP vezikulákkal való kolokalizációja szignifikánsan megnőtt a korai és késői endoszómákkal, valamint a lizoszómákkal a naiv kontrollokhöz képest (**16. ábra**). Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy vagy a sérülést kísérő aktivációs jelek miatt, vagy a roncsolt mátrixfehérjék emelkedett mennyiségének következtében a vérsejtekben megnő a Laminin felvétel és lebontás.



16. ábra A oszlopban naiv szeszilis hemociták, B oszlopban a sérülés körül felhalmozódó hemociták láthatóak. A Rab5 marker a korai endoszómákat, a Rab7 marker a késői endoszómákat, az Arl8 marker pedig a lizoszómákat jelöli (piros). A box plot diagramnál az átlagtól (vízszintes vonal) való szórás (standard deviáció) van ábrázolva. Látható, hogy két órával a sérülés után a hemocitákban megnőtt a GFP pozitív vezikulák aránya a kontrollhoz képest. Student's T-próba (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; $n = 12$.

Az eredmények megvitatása és jövőbeli tervek

Kísérletes munkánk során a sejtszintű ECM felvétel folyamatait vizsgáltuk glia és makrofág sejtekben *in vivo Drosophila melanogaster* modellszervezetben. Az eredmények alapján elmondható, hogy a lárva szegmentális idegében a gliákban és az állat hemocitáiban egyaránt megfigyelhető a sejtközvetített ECM felvétel (**17. ábra**).

Megállapítottuk, hogy a szegmentális idegek felszínén a Kollagén IV., a Perlekán és a Laminin mátrixmolekulák fordulnak elő, illetve megfigyeltük, hogy a Laminin az idegek belsejében is megtalálható. A Laminin szintéziséről korábban belátták, hogy az idegeket kívülről borító perineurális gliák végzik (Petley-Ragan és mtsai., 2016). Az idegeket kívülről borító Kollagén IV. is származhat a gliákból, azonban Pastor-Pareja és munkatársai eredményei szerint valószínűleg ez a mátrixkomponens nagyrészt zsírtest eredetű, ugyanis a Kollagén IV. csendesítése zsírtestben idegi fenotípusokhoz és a VNC megnyúlásához vezet (Pastor-Pareja & Xu, 2011). A Perlekán esetében is hasonló megfigyeléseket tettek, azonban az általunk vizsgált riporter lokalizációja arra utal, hogy a perineurális gliák is részt vesznek a szintézisében. Azt, hogy a Laminin milyen mechanizmussal szekretálódik az ideg belső oldala felé is, jelenleg még nem tisztázott. Feltételezzük, hogy az axonok és gliák közé kiválasztott Laminin támasztó vagy rögzítő funkcióval bírhat, vagy fokozhatja az idegek szerkezeti stabilitását, ami fontos a funkcióinak ellátásához. Ezen felül érdemes megemlíteni, hogy emlősökben a Laminint a szinaptikus ECM környezet egyik fontos szereplőjeként azonosították (Hunter és mtsai., 2019; Nishimune és mtsai., 2004).

Az intracelluláris vezikulákkal végzett koloalizációs kísérleteink segítségével arra kerestük a választ, hogy a gliák valóban felveszik-e a GFP-vel jelölt Laminin fehérjét. Ezt azért is tartottuk fontos kérdésnek, mert a Laminin felvételtől ecetmuslicában gyakorlatilag nem áll rendelkezésre információ, és emlős modellekben is rendkívül kevés tudott erről a folyamatról. Tapasztalataink szerint az idegekben a jelölt LamininB1 ritkán mutatott átfedést az endo- és lizoszómális markerekkel, ami utalhat arra, hogy a gliák általi ECM felvétel homeosztatikus körülmények között alacsony szinten működik. Ez utalhat például arra, hogy az idegek belsejébe irányuló Laminin szekréció az általunk vizsgált harmadik lárva stádiumban már elhanyagolható, tehát a megfigyelt, homeosztatikus Laminin eltávolítása nem szükséges. Ezzel szemben az ideget ért sérülést követően intenzívebb ECM felvételt figyeltünk meg. A sérülés után két órával szignifikáns LamininB1 felhalmozódást tapasztaltunk („homokóra” alakban) a zúzódás közvetlen közelében. A felhalmozódó Laminin eredetét jelenleg még nem ismerjük. Lehetséges, hogy a sérülés következtében a szomszédos perineurális gliákban jelentősen

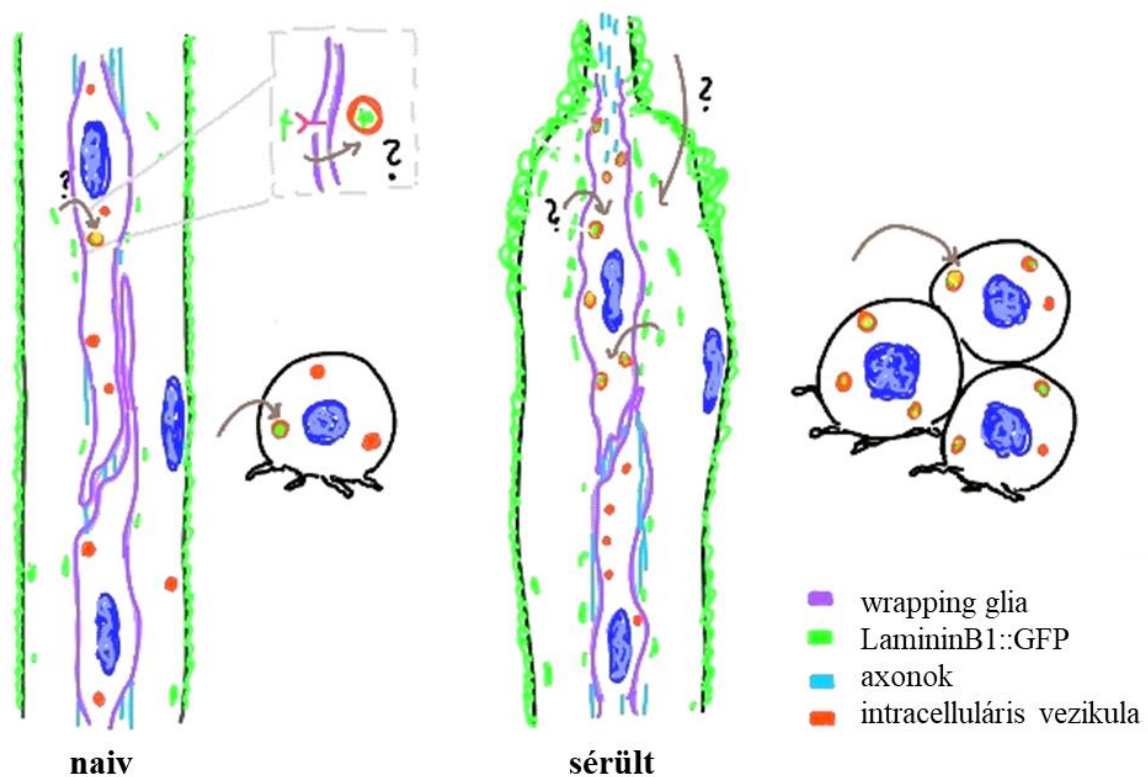
megnövekszik a Laminin szintézise. Ugyanakkor azt sem zárhatjuk ki, hogy a sérülés két oldalán látható Laminin felhalmozódás valójában az ideg összepréselt szakaszából szorult ki és halmozódott fel. A jelentős Laminin halmozódást ugyanakkor annak emelkedett, gliák általi felvétele is követte. Azt jelenleg is vizsgáljuk, hogy ez a megemelkedett aktivitás kizárólag a többlet ECM fehérjének köszönhető-e, vagy esetleg a sérülést követően a roncsolt axonok/gliasejtek olyan stressz-útvonalakat indítanak-e be, amely fokozza a gliák sejttörmelék, valamint ECM felvevő mechanizmusait, és segíti azok intracelluláris lebontását.

24 órával a sérülés után Laminin gömb alakú, aggregátum-szerű morfológiát mutatott a sérülés környékén, valamint a mennyisége is csökkent a 2 órás időpontoknál tapasztaltakhoz képest. Ebből szintén következtethetünk arra, hogy a gliák általi Laminin felvétel és lebontás aktívabban működik és viszonylag rövid idő alatt kompenzálja a megnövekedett ECM mennyiségét. A folyamatban valószínűleg részt vehetnek az ECM bontására képes extracelluláris enzimek is, amelyeket a jövőbeli kísérleteinkben szintén meg fogunk vizsgálni. Az, hogy a Laminin mennyiségének változása az ideg gyulladásához hogyan járul hozzá, bár rendkívül fontos kérdés, a lárvális rendszerben a bábozódás miatt nem vizsgálható. Ennek megválaszolására a kifejlett muslicában kellene sérülési paradigmákat vizsgálni, azonban ilyen jellegű kísérleti rendszert egyelőre még nem írtak le *Drosophilában*.

Előzetes eredmények arra utalnak, hogy a glia alpopulációk közül a wrapping gliák képesek a LamininB1 fehérje felvételére. Ez összhangban van azzal a megfigyelésünkkel, hogy a felhalmozódó ECM fehérje elsősorban az ideg belsejében található meg, vagyis abban a térrészben, ahol a wrapping gliák találhatók. Ez a gliatípus rendkívül fontos az axonok megfelelő működéséhez (Kottmeier és mtsai., 2020), ugyanakkor a kifejlett *Drosophila* perifériás idegrendszerében az axon törmelékek fagocitózisában is szerepet játszik (Neukomm és mtsai., 2014).

Kíváncsiak voltunk arra is, hogy az állat immunsejtjeiben (hemocitákban) megfigyelhető-e a Laminin felvétel, ezért kísérleteinket elvégeztük a testfalhoz asszociált vérsejtekben is. Megvizsgáltuk a hemocitában található Laminin kolokalizációját intracelluláris vezikula markerekkel. Hasonlóan a gliákban tapasztaltakhoz, homeosztatisztikus körülmények között a Laminin ritkán volt megtalálható korai/késői endoszómákban és lizoszómákban. Fizikai sérülést követően egyrészt megfigyeltük, hogy már két órával a sérülést követően jelentős mennyiségű immunsejt asszociálódott a sérült testfalhoz, másrészt, hogy az itt megtalálható hemocitákban több GFP pozitív korai, késői endoszóma és lizoszóma található. Az eredmények arra engednek következtetni, hogy vagy a sérülést kísérő aktivációs jelek miatt, vagy a roncsolt

mátrixfehérjék emelkedett mennyiségének következtében a vérsejtekben megnő a Laminin felvétel és lebontás. Tudjuk, hogy a hemocitáknak fontos szerepük van a patogének elleni védekezésben, homeosztázis fenntartásában, elsősorban azért, hogy a mikrobákat, apoptotikus sejttermelékeket bekebelezik (Ulvila és mtsai., 2011). Számos kutatás foglalkozik a makrofágok fibrózis során betöltött fenotípusaival, illetve ismeretek mechanizmusok, amelyek kiváltják a makrofágok gyulladáscsökkentő, sebgyógyulást elősegítő, profibrotikus, antifibrotikus vagy szövetregeneráló tulajdonságait, fenotípusait sérülés után (Wynn & Vannella, 2016). Elképzelhető, hogy esetünkben a roncsolódott Laminin, illetve annak megnövekedett mennyisége hasonló mechanizmusokat indít el a hemocitákban is.



17. ábra Összegző ábra a jelenlegi tapasztalataink alapján a sejt szintű ECM felvételtől *in vivo* *Drosophila* modellben. A képen a szegmentális ideget alkotó gliák és a hemociták általi ECM felvétel van ábrázolva.

Annak érdekében, hogy részletesen megismerjük a gliapopulációk szerepét az ECM felvételében és lebontásában, valamint, hogy azonosítsuk, hogy az ECM felvétel *ecetmuslica* vérsejtekben és gliákban milyen mechanizmusok által megy végbe (fagocitózis, receptor-mediált endocitózis, LC3-asszociált fagocitózis), GAL4/UAS alapú genetikai szűrőrendszereket hozunk létre (18. ábra). Ezek segítségével immunsejt, valamint gliapopuláció specifikusan fogunk RNS csendesítést végezni. A LamininB1::GFP lokalizációját

össze fogjuk hasonlítani az adott sejtípusban kifejeztetett vezikula riporterrel (például a dolgozatban bemutatott UAS-TMEM192::3xmCherry-vel), miközben olyan faktorokat csendesítünk, amelyek irodalmi adatok, az ECM felvételben szerepet játszó emlős fehérjékkel mutatott ortológia, valamint egyéb szempontok alapján rávilágíthatnak az általunk vizsgált folyamat molekuláris hátterére. Emellett kiterjesztjük a vizsgálatainkat további mátrixfehérjékre is (Kollagén, Perlekán), mivel szeretnénk megállapítani, hogy vannak-e hasonlóságok a különböző mátrix komponensek felvételi mechanizmusaiban.

Genetikai szűrőrendszer idegekben:



Genetikai szűrőrendszer immunsejtekben:



18. ábra Genetikai szűrőrendszer elemeinek ábrázolása. LamininB1::GFP lokalizáció vizsgálata kifejeztetett vezikula riporterrel egy adott sejtípusban, specifikus RNS csendesítéssel.

Az eredmények lehetséges orvosi jelentősége

A Laminin megkötését és annak sejt általi felvételét biztosító receptorok azonosítása számos orvosi jelentőséggel bírhat. Például a krónikus sebek gyógyulási folyamata során a Laminin receptorok potenciális célpontok lehetnek az ECM átalakulásának és a szövetek helyreállításának fokozásánál (Goldfinger és mtsai., 1999; Iorio és mtsai., 2015; Zhu és mtsai., 2018). Mivel a Laminin fontos szereppel bír a szinaptikus működésben, illetve a neuronok fejlődésében és az axon növekedésben, ezért a neuronokon és gliasejteken lévő receptorainak azonosítása bizonyos neurodegeneratív betegségek terápiáiban egy új megközelítést nyithat (Nguyen és mtsai., 2021). De releváns információkkal bírhat a rákkutatásban, az immunmodulációban vagy a receptor-célzott nanomedicina területénél is, hiszen a Laminin receptorok célpontok lehetnek az antitest-gyógyszer konjugátumok leadásában, az olyan szövetekbe való pontos bejuttatáshoz, mint az agy vagy a daganatok (Hsu és mtsai., 2022; Pardridge, 2012; Rea és mtsai., 2012; Simon & Bromberg, 2017).

Összegzés

Az extracelluláris mátrix (ECM) egy összetett, biokémiai sokszínű réteg, mely a különféle makromolekulák hálózataiból épül fel és szerveződik a szövetek köré, ezzel biztosítva azok mechanikai védelmét, megfelelő növekedését, funkcióját. Rengeteg sejt viselkedést befolyásol, a fejlődésükön át a migrációjukig, éppen ezért az ECM megfelelő összetétele és szerkezete kulcsfontosságú szövetek működéséhez.

Kiemelkedően fontos tulajdonsága, hogy különféle környezeti ingerek hatására képes átalakulni, mely során a komponensei feldarabolódnak, lebontódnak és a helyükre újak szintetizálódnak. Az ECM átalakulása szigorúan szabályozott, mivel csak a megfelelő vastagságban és összetételben tudja ellátni funkcióit. A legtöbbet vizsgált ECM lebontási mechanizmus a sejtközi térbe kiválasztott proteázok, úgynevezett mátrix metalloproteinázok (MMP-k) és katepszinek általi mátrix emésztés. Ezen kívül ismertek olyan fiziológias és patológias esetek, amikor fagocitózisra képes sejtek felveszik és sejten belül lebontják az ECM makromolekulákat. Az utóbbi folyamatok pontos működéséről és kulcselemeiről igen keveset tudunk.

Annak érdekében, hogy a sejtszintű ECM felvételt *in vivo* vizsgálni tudjuk a *Drosophila melanogaster* modellszervezetben hoztunk létre vizsgálati rendszereket és az állat glia sejtjeiben és immunsejtjeiben (hemocitáiban) tanulmányoztuk a sejt általi ECM felvételt. Kísérleteink során fluoreszcensen jelöltük az ECM fehérjét, illetve különböző sejten belüli vezikula kompartmenteket, amelyek a fagocitózissal és endocitózissal kapcsolt lebontási útvonalakban vesznek részt. Vizsgáltuk a jelölt fehérjék lokalizációját, valamint az intracelluláris vezikula markerekkel való átfedésüket. Emellett alkalmaztunk egy fizikai sérülés modellt, amelyben a sérülés ECM felvételre gyakorolt hatását vizsgáltuk.

Eredmények alapján elmondható, hogy a lárva szegmentális idegében a gliákban és az állat hemocitáiban egyaránt megfigyelhető a sejtközi ECM felvétel. Megfigyeltük, hogy a mátrixfehérjék sejtszintű felvételi mechanizmusa homeosztázis esetén alacsony szinten működik, míg szöveti sérülést követően a folyamat aktivitása megemelkedik mind a gliákban, mind a hemocitákban. Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy vagy a sérülést kísérő aktivációs jelek miatt, vagy a roncsolt mátrixfehérjék emelkedett mennyiségének következtében a vérsejtekben és gliákban megnő a Laminin felvétel és lebontás.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Csordás Gábornak, aki folyamatos segítségnyújtással kísérte és vezette munkámat, illetve a pályamunka megírását. Köszönöm az érdekes tudományos beszélgetéseket és a hasznos szakmai tanácsokat.

Továbbá szeretném megköszöni Dr. Juhász Gábornak és Dr. Szabó Áronnak, hogy bekapcsolódhattam a kutatócsoport munkájába és ezáltal jobban megismerhettem a tudományos pálya rejtelseit.

Köszönöm Dr. Harmatos-Ürmösi Adélnak, Lakatos Enikőnek és témavezetőmnek, hogy a szakdolgozatbörzén bemutatták a kutatócsoportot, illetve köszönet a csoport összes tagjának, hogy mindig segítőkészen fordultak felém.

Köszönöm Bozsó Szilviának, Fehérné Juhász Erzsébetnek és Erdődi Ildikónak a folyamatos technikai munkáját, ami lehetővé tette, hogy mindig gördülékenyen végezhessem a kísérleteket.

Továbbá köszönet Dr. Sinka Ritának, hogy elvállalta a belső konzulensi felkérést.

Irodalomjegyzék

- Alberts, B. (2022). *Molecular biology of the cell* (Seventh edition). W. W. Norton & Company.
- Bonnans, C., Chou, J., & Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(12), 786–801. <https://doi.org/10.1038/nrm3904>
- Broadie, K., Baumgartner, S., & Prokop, A. (2011). Extracellular matrix and its receptors in *drosophila* neural development. *Developmental Neurobiology*, 71(11), 1102–1130. <https://doi.org/10.1002/dneu.20935>
- Bunt, S., Hooley, C., Hu, N., Scahill, C., Weavers, H., & Skaer, H. (2010). Hemocyte-Secreted Type IV Collagen Enhances BMP Signaling to Guide Renal Tubule Morphogenesis in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 19(2), 296–306. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.07.019>
- Chung, Y.-S. A., & Kocks, C. (2011). Recognition of Pathogenic Microbes by the *Drosophila* Phagocytic Pattern Recognition Receptor Eater. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(30), 26524. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.214007>
- Coelho, S. G., & Almeida, A. G. (2020). Marfan syndrome revisited: From genetics to the clinic. *Revista Portuguesa De Cardiologia*, 39(4), 215–226. <https://doi.org/10.1016/j.repc.2019.09.008>
- Crapser, J. D., Arreola, M. A., Tsourmas, K. I., & Green, K. N. (2021). Microglia as hackers of the matrix: Sculpting synapses and the extracellular space. *Cellular & Molecular Immunology*, 18(11), 2472–2488. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00751-3>
- Csordás, G., Grawe, F., & Uhlirova, M. (2020). Eater cooperates with Multiplexin to drive the formation of hematopoietic compartments. *eLife*, 9, e57297. <https://doi.org/10.7554/eLife.57297>
- Duffy, J. B. (2002). GAL4 system in *drosophila*: A fly geneticist's swiss army knife. *Genesis*, 34(1–2), 1–15. <https://doi.org/10.1002/gene.10150>
- Dunst, S., Kazimiers, T., von Zadow, F., Jambor, H., Sagner, A., Brankatschk, B., Mahmoud, A., Spann, S., Tomancak, P., Eaton, S., & Brankatschk, M. (2015). Endogenously Tagged Rab Proteins: A Resource to Study Membrane Trafficking in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 33(3), 351. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.03.022>
- Durbeej, M. (2010). Laminins. *Cell and Tissue Research*, 339(1), 259–268. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0838-2>
- Durbeej, M. (2015). Laminin- $\alpha 2$ Chain-Deficient Congenital Muscular Dystrophy: Pathophysiology and Development of Treatment. *Current Topics in Membranes*, 76, 31–60. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2015.05.002>
- Friedrich, M. V., Schneider, M., Timpl, R., & Baumgartner, S. (2000). Perlecan domain V of *Drosophila melanogaster*. Sequence, recombinant analysis and tissue expression. *European Journal of Biochemistry*, 267(11), 3149–3159. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01337.x>
- Fujita, Y., Nagaosa, K., Shiratsuchi, A., & Nakanishi, Y. (2012). Role of NPxY motif in Draper-mediated apoptotic cell clearance in *Drosophila*. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 6(6), 291–297.
- Funk, S. D., Lin, M.-H., & Miner, J. H. (2018). Alport syndrome and Pierson syndrome: Diseases of the glomerular basement membrane. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 71–72, 250–261. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.04.008>
- Goldfinger, L. E., Hopkinson, S. B., deHart, G. W., Collawn, S., Couchman, J. R., & Jones, J. C. R. (1999). The $\alpha 3$ laminin subunit, $\alpha 6\beta 4$ and $\alpha 3\beta 1$ integrin coordinately regulate wound healing in cultured epithelial cells and in the skin. *Journal of Cell Science*, 112(16), 2615–2629. <https://doi.org/10.1242/jcs.112.16.2615>
- Golusda, L., Kühl, A. A., Siegmund, B., & Paclik, D. (2021). Extracellular Matrix Components as Diagnostic Tools in Inflammatory Bowel Disease. *Biology*, 10(10), 1024. <https://doi.org/10.3390/biology10101024>
- Hallmann, R., Hannocks, M.-J., Song, J., Zhang, X., Di Russo, J., Luik, A.-L., Burmeister, M., Gerwien, H., & Sorokin, L. (2020). The role of basement membrane laminins in vascular function. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 127, 105823. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105823>

- Has, C., & Nyström, A. (2015). Epidermal Basement Membrane in Health and Disease. *Current Topics in Membranes*, 76, 117–170. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2015.05.003>
- Heino, J. (2014). Cellular signaling by collagen-binding integrins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 819, 143–155. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9153-3_10
- Hohenester, E. (2019). Structural biology of laminins. *Essays in Biochemistry*, 63(3), 285–295. <https://doi.org/10.1042/EBC20180075>
- Hohenester, E., & Yurchenco, P. D. (2013). Laminins in basement membrane assembly. *Cell Adhesion & Migration*, 7(1), 56–63. <https://doi.org/10.4161/cam.21831>
- Hsu, S.-C., Wu, N.-P., Lu, Y.-C., & Ma, Y.-H. (2022). Laminin Receptor-Mediated Nanoparticle Uptake by Tumor Cells: Interplay of Epigallocatechin Gallate and Magnetic Force at Nano–Bio Interface. *Pharmaceutics*, 14(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081523>
- Humphrey, J. D., Dufresne, E. R., & Schwartz, M. A. (2014). Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(12), 802–812. <https://doi.org/10.1038/nrm3896>
- Hunter, D. D., Manglapus, M. K., Bachay, G., Claudepierre, T., Dolan, M. W., Gesuelli, K.-A., & Brunken, W. J. (2019). CNS synapses are stabilized trans-synaptically by laminins and laminin-interacting proteins. *Journal of Comparative Neurology*, 527(1), 67–86. <https://doi.org/10.1002/cne.24338>
- Hynes, R. O. (2009). The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils. *Science*, 326(5957), 1216–1219. <https://doi.org/10.1126/science.1176009>
- Hynes, R. O., & Naba, A. (2012). Overview of the Matrisome—An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(1), a004903. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004903>
- Hynes, R. O., & Zhao, Q. (2000). The evolution of cell adhesion. *The Journal of Cell Biology*, 150(2), F89–96. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.2.f89>
- Iorio, V., Troughton, L. D., & Hamill, K. J. (2015). Laminins: Roles and Utility in Wound Repair. *Advances in Wound Care*, 4(4), 250–263. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0533>
- Iozzo, R. V., & Gubbiotti, M. A. (2018). Extracellular matrix: The driving force of mammalian diseases. *Matrix Biology*, 71–72, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.03.023>
- Iozzo, R. V., & Schaefer, L. (2015). Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biology*, 42, 11–55. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.02.003>
- Itoh, Y. (2021). Modulation of Microenvironment Signals by Proteolytic Shedding of Cell Surface Extracellular Matrix Receptors. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 736735. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.736735>
- Jürgensen, H. J., Van Putten, S., Nørregaard, K. S., Bugge, T. H., Engelholm, L. H., Behrendt, N., & Madsen, D. H. (2020). Cellular uptake of collagens and implications for immune cell regulation in disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(16), 3161–3176. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03481-3>
- Kadler, K. E., Baldock, C., Bella, J., & Boot-Handford, R. P. (2007). Collagens at a glance. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 12), 1955–1958. <https://doi.org/10.1242/jcs.03453>
- Karamanos, N. K. (2019). Extracellular matrix: Key structural and functional meshwork in health and disease. *The FEBS Journal*, 286(15), 2826–2829. <https://doi.org/10.1111/febs.14992>
- Karamanos, N. K., Theocharis, A. D., Piperigkou, Z., Manou, D., Passi, A., Skandalis, S. S., Vynios, D. H., Orian-Rousseau, V., Ricard-Blum, S., Schmelzer, C. E. H., Duca, L., Durbeej, M., Afratis, N. A., Troeberg, L., Franchi, M., Masola, V., & Onisto, M. (2021). A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. *The FEBS Journal*, 288(24), 6850–6912. <https://doi.org/10.1111/febs.15776>
- Kinchen, J. M., & Ravichandran, K. S. (2008). Phagosome maturation: Going through the acid test. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(10), 781–795. <https://doi.org/10.1038/nrm2515>
- Kocks, C., Cho, J. H., Nehme, N., Ulvila, J., Pearson, A. M., Meister, M., Strom, C., Conto, S. L., Hetru, C., Stuart, L. M., Stehle, T., Hoffmann, J. A., Reichhart, J.-M., Ferrandon, D., Rämet, M., & Ezekowitz, R. A. B.

- (2005). Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell*, 123(2), 335–346. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.034>
- Kottmeier, R., Bittern, J., Schoofs, A., Scheiwe, F., Matzat, T., Pankratz, M., & Klämbt, C. (2020). Wrapping glia regulates neuronal signaling speed and precision in the peripheral nervous system of *Drosophila*. *Nature Communications*, 11(1), 4491. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18291-1>
- Kurucz, E., Márkus, R., Zsámboki, J., Folkl-Medzihradsky, K., Darula, Z., Vilmos, P., Udvardy, A., Krausz, I., Lukacsovich, T., Gateff, E., Zettervall, C.-J., Hultmark, D., & Andó, I. (2007). Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in *Drosophila* plasmatocytes. *Current Biology: CB*, 17(7), 649–654. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.02.041>
- Lee, T.-H., McKleroy, W., Khalifeh-Soltani, A., Sakuma, S., Lazarev, S., Riento, K., Nishimura, S. L., Nichols, B. J., & Atabai, K. (2014). Functional genomic screen identifies novel mediators of collagen uptake. *Molecular Biology of the Cell*, 25(5), 583–593. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-07-0382>
- Leganger, J., Søborg, M.-L. K., Farholt, S., Lund, A. M., Rosenberg, J., & Burcharth, J. (2016). [Ehlers-Danlos syndrome]. *Ugeskrift for Læger*, 178(17), V01160014.
- Liu, X., Liu, Y., Jin, H., Khodeiry, M. M., Kong, W., Wang, N., Lee, J. K., & Lee, R. K. (2021). Reactive Fibroblasts in Response to Optic Nerve Crush Injury. *Molecular Neurobiology*, 58(4), 1392–1403. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02199-4>
- Llano, E., Adam, G., Pendás, A. M., Quesada, V., Sánchez, L. M., Santamaría, I., Noselli, S., & López-Otín, C. (2002). Structural and Enzymatic Characterization of *Drosophila* Dm2-MMP, a Membrane-bound Matrix Metalloproteinase with Tissue-specific Expression. *Journal of Biological Chemistry*, 277(26), 23321–23329. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200121200>
- Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M., & Werb, Z. (2011a). Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(12), a005058–a005058. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005058>
- Manaka, J., Kuraishi, T., Shiratsuchi, A., Nakai, Y., Higashida, H., Henson, P., & Nakanishi, Y. (2004). Draper-mediated and phosphatidylserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by *Drosophila* hemocytes/macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(46), 48466–48476. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408597200>
- Martin, D., Zusman, S., Li, X., Williams, E. L., Khare, N., DaRocha, S., Chiquet-Ehrismann, R., & Baumgartner, S. (1999). Wing blister, a new *Drosophila* laminin alpha chain required for cell adhesion and migration during embryonic and imaginal development. *The Journal of Cell Biology*, 145(1), 191–201. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.1.191>
- Martinek, N., Shahab, J., Saathoff, M., & Ringuette, M. (2008). Haemocyte-derived SPARC is required for collagen-IV-dependent stability of basal laminae in *Drosophila* embryos. *Journal of Cell Science*, 121(Pt 10), 1671–1680. <https://doi.org/10.1242/jcs.021931>
- Melcarne, C., Lemaitre, B., & Kurant, E. (2019). Phagocytosis in *Drosophila*: From molecules and cellular machinery to physiology. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 109, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.04.002>
- Mishra, B., Ghannad-Rezaie, M., Li, J., Wang, X., Hao, Y., Ye, B., Chronis, N., & Collins, C. A. (2014). Using Microfluidics Chips for Live Imaging and Study of Injury Responses in *Drosophila* Larvae. *Journal of Visualized Experiments*, 84, 50998. <https://doi.org/10.3791/50998>
- Mithieux, S. M., & Weiss, A. S. (2005). Elastin. *Advances in Protein Chemistry*, 70, 437–461. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70013-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70013-9)
- Mouw, J. K., Ou, G., & Weaver, V. M. (2014). Extracellular matrix assembly: A multiscale deconstruction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(12), 771–785. <https://doi.org/10.1038/nrm3902>
- Natzle, J. E., Monson, J. M., & McCarthy, B. J. (1982). Cytogenetic location and expression of collagen-like genes in *Drosophila*. *Nature*, 296(5855), 368–371. <https://doi.org/10.1038/296368a0>

- Neukomm, L. J., Burdett, T. C., Gonzalez, M. A., Züchner, S., & Freeman, M. R. (2014). Rapid in vivo forward genetic approach for identifying axon death genes in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(27), 9965–9970. <https://doi.org/10.1073/pnas.1406230111>
- Nguyen, B., Bix, G., & Yao, Y. (2021). Basal lamina changes in neurodegenerative disorders. *Molecular Neurodegeneration*, 16, 81. <https://doi.org/10.1186/s13024-021-00502-y>
- Nishimune, H., Sanes, J. R., & Carlson, S. S. (2004). A synaptic laminin–calcium channel interaction organizes active zones in motor nerve terminals. *Nature*, 432(7017), 580–587. <https://doi.org/10.1038/nature03112>
- Onursal, C., Dick, E., Angelidis, I., Schiller, H. B., & Staab-Weijnitz, C. A. (2021). Collagen Biosynthesis, Processing, and Maturation in Lung Ageing. *Frontiers in Medicine*, 8, 593874. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.593874>
- Page-McCaw, A. (2008). Remodeling the model organism: Matrix metalloproteinase functions in invertebrates. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19(1), 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.06.004>
- Pardridge, W. M. (2012). Drug Transport across the Blood–Brain Barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32(11), 1959–1972. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.126>
- Pastor-Pareja, J. C., & Xu, T. (2011). Shaping Cells and Organs in *Drosophila* by Opposing Roles of Fat Body-Secreted Collagen IV and Perlecan. *Developmental Cell*, 21(2), 245–256. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.026>
- Petley-Ragan, L. M., Ardiel, E. L., Rankin, C. H., & Auld, V. J. (2016). Accumulation of Laminin Monomers in *Drosophila* Glia Leads to Glial Endoplasmic Reticulum Stress and Disrupted Larval Locomotion. *The Journal of Neuroscience*, 36(4), 1151–1164. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1797-15.2016>
- Rea, V. E. A., Rossi, F. W., De Paulis, A., Ragno, P., Selleri, C., & Montuori, N. (2012). 67 kDa laminin receptor: Structure, function and role in cancer and infection. *Le Infezioni in Medicina*, 20 Suppl 2, 8–12.
- Simon, T., & Bromberg, J. S. (2017). Regulation of the Immune System by Laminins. *Trends in immunology*, 38(11), 858–871. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.06.002>
- Srivastava, A., Pastor-Pareja, J. C., Igaki, T., Pagliarini, R., & Xu, T. (2007). Basement membrane remodeling is essential for *Drosophila* disc eversion and tumor invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(8), 2721–2726. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611666104>
- Szabó, Á., Vincze, V., Chhatre, A. S., Jipa, A., Bognár, S., Varga, K. E., Banik, P., Harmatos-Ürmösi, A., Neukomm, L. J., & Juhász, G. (2023). LC3-associated phagocytosis promotes glial degradation of axon debris after injury in *Drosophila* models. *Nature Communications*, 14(1), 3077. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38755-4>
- Szabó, G., (2009). *Sejtbiológia* (2., átdolg., bőv. kiad). Medicina.
- Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., & Karamanos, N. K. (2016). Extracellular matrix structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97, 4–27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>
- Ulvila, J., Vanha-Aho, L.-M., & Rämetsä, M. (2011). *Drosophila* phagocytosis—Still many unknowns under the surface. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 119(10), 651–662. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2011.02792.x>
- Voigt, A., Pflanz, R., Schäfer, U., & Jäckle, H. (2002). Perlecan participates in proliferation activation of quiescent *Drosophila* neuroblasts. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 224(4), 403–412. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10120>
- Wolfstetter, G., & Holz, A. (2012). The role of LamininB2 (LanB2) during mesoderm differentiation in *Drosophila*. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 69(2), 267–282. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0652-3>
- Wynn, T. A., & Vannella, K. M. (2016). Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*, 44(3), 450–462. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.015>
- Yasothornsrikul, S., Davis, W. J., Cramer, G., Kimbrell, D. A., & Dearolf, C. R. (1997). viking: Identification and characterization of a second type IV collagen in *Drosophila*. *Gene*, 198(1–2), 17–25. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(97\)00274-6](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(97)00274-6)

- Yurchenco, P. D., & Patton, B. L. (2009). Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly. *Current Pharmaceutical Design*, 15(12), 1277–1294. <https://doi.org/10.2174/138161209787846766>
- Zhao, M., Wang, L., Wang, M., Zhou, S., Lu, Y., Cui, H., Racanelli, A. C., Zhang, L., Ye, T., Ding, B., Zhang, B., Yang, J., & Yao, Y. (2022). Targeting fibrosis: Mechanisms and clinical trials. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01070-3>
- Zhu, Y., Cankova, Z., Iwanaszko, M., Lichtor, S., Mrksich, M., & Ameer, G. A. (2018). Potent laminin-inspired antioxidant regenerative dressing accelerates wound healing in diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(26), 6816–6821. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804262115>
- Zsámboki, J., Csordás, G., Honti, V., Pintér, L., Bajusz, I., Galgóczy, L., Andó, I., & Kurucz, É. (2013). Drosophila Nimrod proteins bind bacteria. *Central European Journal of Biology*, 8(7), 633–645. <https://doi.org/10.2478/s11535-013-0183-4>