

36. OTDK Biológia Szekció

A Snazarus fehérje funkciójának leírása

Drosophila nefrocita modellben

Juhász Gábor

SZTE Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar Általános orvos

IV. évfolyam

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Témavezetők:

Dr. Maruzs Tamás

Dr. Juhász Gábor

Tartalomjegyzék

Bevezető.....	3
Célkitűzés.....	7
Anyagok és módszerek.....	7
Eredmények és értékelésük	9
Előzetes eredmények.....	9
Az Snz szerepe a résmembrán és a lakúnarendszer kialakításában.....	13
Az Snz szekréciós dinamikára való lehetséges hatásainak vizsgálata FRAP-pel	16
AgNO ₃ felvétel vizsgálat és toxicitási mérések	17
Összefoglalás.....	18
Köszönetnyilvánítás	20
Irodalom	20

Bevezető

Az eukarióta sejtek rendkívül összetett endomembrán rendszerrel rendelkeznek. Ez számos, egyedi funkcióval rendelkező organellumból áll. Az anyag folyamatos, irányított áramlása és átalakítása ezen a rendszeren keresztül a normális sejtműködés alapvető része. Az anyagcserében szerepet játszó molekulák sejten belüli szállítása elsősorban a vezikulák által közvetített transzport révén valósul meg. Az endocitózis esetében az extracelluláris anyagot először a plazmamembrán veszi körül. Az így lefűződött endocitotikus vezikulák a korai endoszómák. Ezek aztán miközben a lizoszómák felé haladnak késői endoszómákká érnek. Az endoszómális érés során a vezikula membránjának részei betüremkedve lefűződhetnek, így úgynevezett multivezikuláris testek alakulhatnak ki. A késői endoszómák, illetve a multivezikuláris testek az érés végén lizoszómákkal fuzionálnak, amiben a szállított anyag lebontása zajlik (Huotari és Helenius, 2011). Az endocitotikus útvonalba került transzmembrán fehérjék jelentős része az endoszómákból visszakerül a plazmamembránba vagy közvetlenül, az úgynevezett gyors reciklizációs útvonalon, vagy közvetve az reciklizáló endoszómákon keresztül (lassú reciklizációs útvonal) (Naslavsky és Caplan, 2018). Az endocitotikus és a reciklizációs útvonal megfelelő, kiegyensúlyozott működése elengedhetetlen a plazmamembrán membránfehérje összetételének fenntartásához és átépüléséhez, ami a változó környezethez való alkalmazkodáshoz szükséges. Az endoszómális rendszer működésében fontos, hogy a vezikulák a megfelelő organellumból, meghatározott beltartalommal és kellő mennyiségben fűződjenek le, eljussanak a sejten belül a célhelyükre, és legyenek képesek a megfelelő célmembránnal fuzionálni, illetve a saját funkciójukon kívül mást ne tegyenek. Ezeket a folyamatokat fehérjék és több fehérjéből álló komplexek irányítják. Ezen molekulák bármelyikének hibája (például mutációk miatt) a sejtek működésének károsodásához vezet, és olyan súlyos betegségek kialakulását okozza, mint a neurodegeneratív kórképek vagy a tumoros elváltozások.

A sorting nexin (Snx) fehérjék a PX (phox homology)-domént tartalmazó fehérjék családjába tartoznak, amelynek közel 50 tagja van az ember esetében (Teasdale and Collins, 2012). A PX-domén a foszfatidilinozitolok kötésére alkalmas és lehetővé teszi, hogy az ilyen domént tartalmazó fehérjék különböző foszfolipid membránokhoz kötődjenek. Ezen kívül az ide tartozó sorting nexin fehérje alcsoportok egyéb, változatos összetételű doméneket hordoznak, amik az egyedi funkcióikat meghatározzák. Számos Snx fehérjének jól leírt szerepe van az endoszómális rendszerben a retromer komplex részeként, míg a család más tagjai retromer-

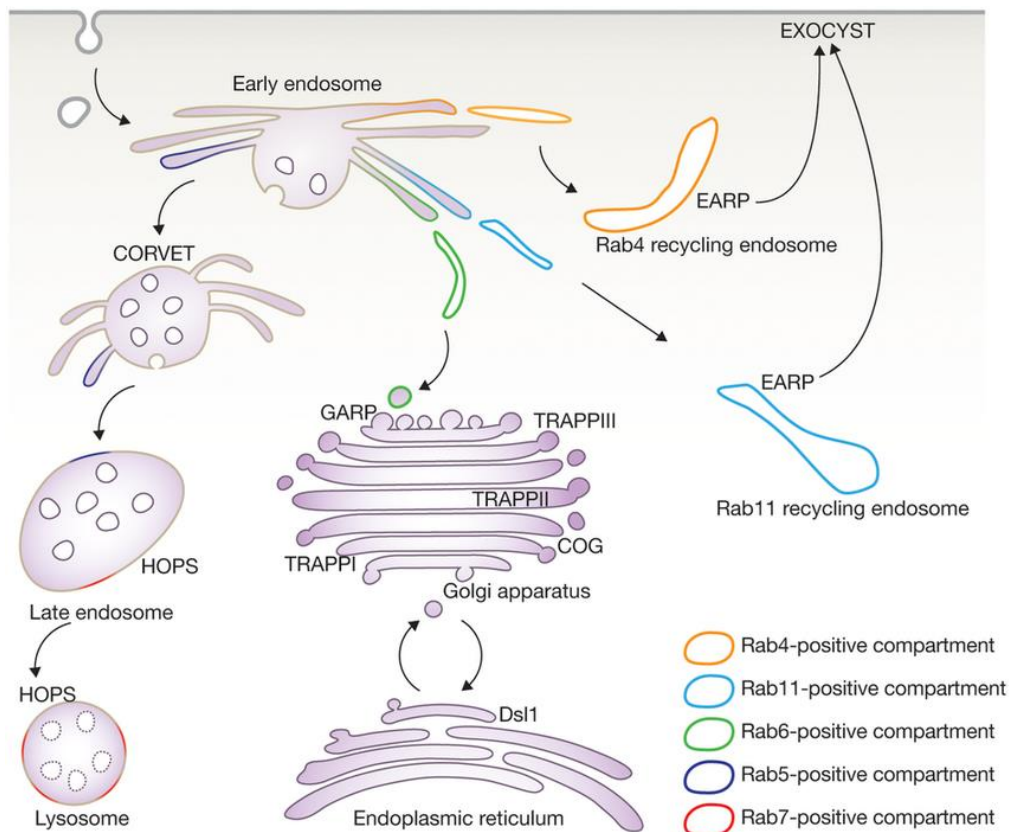
független funkciókkal rendelkeznek (Gallon és Cullen, 2015). Az utóbbi csoporton belül az emlős Snx fehérjék SNX13/SNX14/SNX19/SNX25 (Snx-TM) alcsoportját sajátos doménszerkezet jellemzi, amely két feltételezett N-terminális transzmembrán régióból áll, amelyeket a PXA-RGS-PX-PX-PXC domének követnek. Ezek közül az SNX14 mutációinak hatásait széles körben vizsgálják, mivel ezek a kisagyi ataxia szindróma egy sajátos típusához vezetnek, amelynek jellemzői a kisagyi atrófia (a Purkinje-sejtek elvesztése miatt), értelmi fogyatékoság és durva arcvonások (Thomas és mtsai., 2014; Akizu és mtsai., 2015). Egy nemrégiben végzett tanulmány kimutatta, hogy az SNX14 az endoplazmatikus retikulum (ER) és a lipidcseppek (LD-k) közötti úgynevezett contact site-okban található meg, ami által elősegíti a zsírsavak beépülését a trigliceridekbe emlőssejtekben (Datta és mtsai., 2019, 2020). Emellett egyre több eredmény utal arra, hogy más Snx-TM fehérjék is részt vesznek emberi betegségek kialakulásában (Jacques és mtsai., 2005; Bare és mtsai., 2007; Li és mtsai., 2014; Olsson és mtsai., 2014; Henne és mtsai., 2015; Hariri és mtsai., 2019).

Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) egy széles körben alkalmazott modellállat. Alkalmas *in vivo* kísérletek gyors és olcsó elvégzésére, kiépített módszertana van élettani, etológiai és genetikai kutatásokhoz is, emellett széleskörű genetikai és sejtbiológiai eszköztár érhető el a kutatók számára az ecetmuslicával végzett kísérletekhez. Az emberi génekkel viszonylag nagy egyezést mutató genomja mindössze 4 kromoszómapárból áll, emiatt könnyű kezelni.

A *Drosophila* egyetlen Snx-TM fehérjével rendelkezik, amelyet a CG1514 gén kódol. Ennek a legközelebbi humán megfelelője az SNX25. A CG1514-ről szóló első tanulmány a gén intenzív expressziójáról számolt be a lárvális zsírtestekben, és leírta a funkcióvesztéses mutációk élettartamot meghosszabbító hatását (Suh és mtsai., 2008), így a gén neve *sorting nexin lazarus*, röviden *snazarus* (*snz*) lett. A közelmúltban leírták az *Snz* első molekuláris funkcióját a lárvális zsírtestekben. Ez contact site-ok kialakítása a plazmamembrán, az ER, és a perifériás LD-k között, ezáltal a lipidtranszport és az LD-k eloszlásának szabályozása (Ugrankar és mtsai., 2019). Bár a humán SNX25 élettani funkciója nem ismert, leírták a vezikuláris transzportban való szerepét. Az SNX25 kölcsönhat a TGF- β receptorokkal és növeli receptor degradációt a klatrin-függő endocitotikus útvonalon (Hao és mtsai., 2011). Az SNX25 az autofágiában is szerepet játszik a VAMP8 trafficking által (Lauzier és mtsai., 2022). Újabban temporális lebeny epilepsziával (Du és mtsai., 2013), colorectalis carcinomával (Feng és mtsai., 2022), pikkelysömörrel (Vecellio és mtsai., 2021) és krónikus vesebetegséggel (CKD) (Kim, Jin és Eom, 2021) is összefüggésbe hozták. Az utóbbi esetben

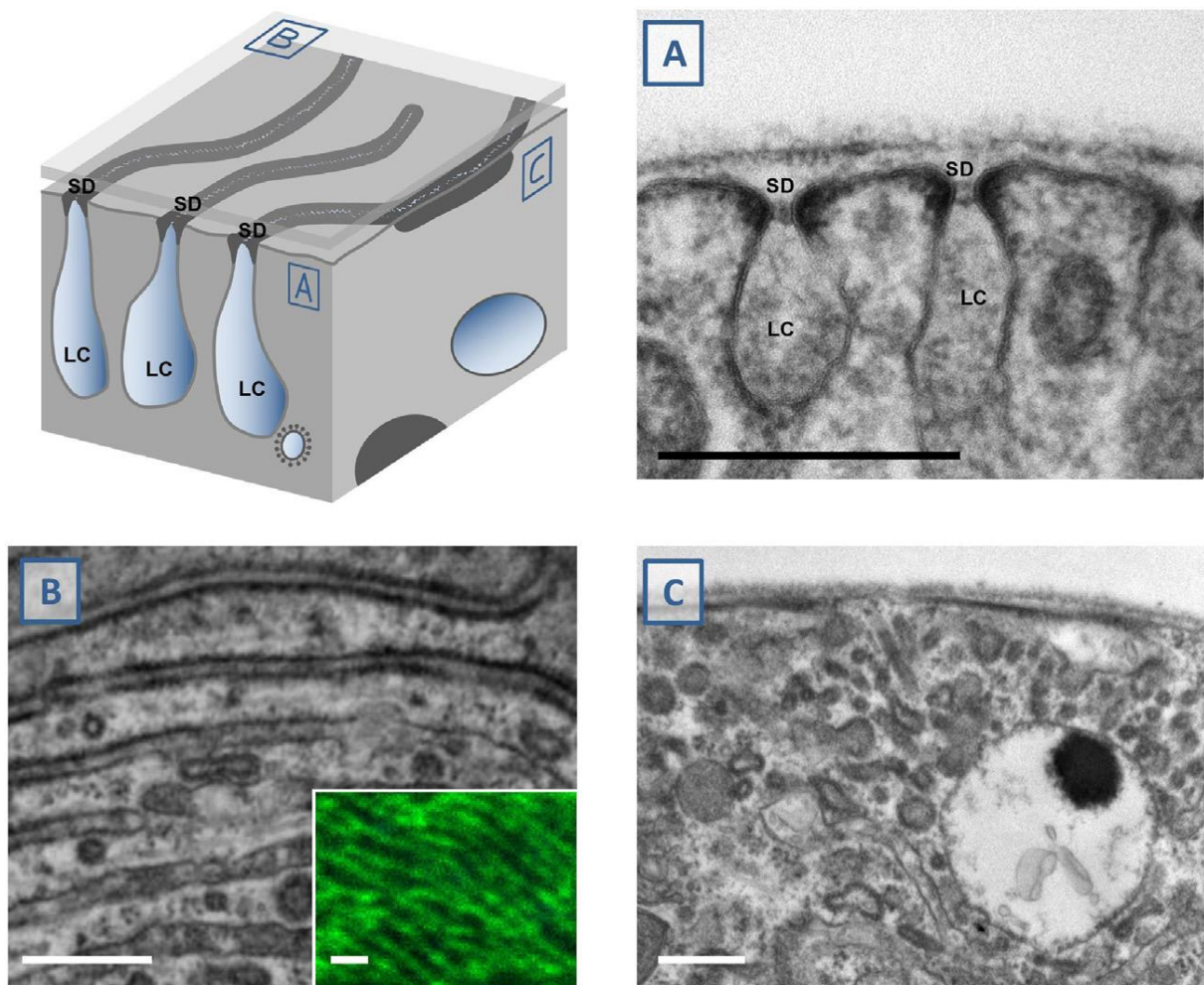
magasabb indolamin-2,3-dioxigenáz aktivitást és csökkent eGFR-t (estimated glomerular filtration rate) találtak.

Az ecetmuslica lárvális kiválasztórendszerének részei a nefrociták, melyek az emlős podocitákkal analógnak tekinthetők, ám azokkal ellentétben nem mutatnak klasszikus értelemben vett apiko-bazális polaritást, és nem egy kivezető csatornába választják ki a felesleges vagy káros anyagokat, hanem lizoszómálisan lebontják vagy önmagukban elraktározzák azokat. A közelítőleg gömb-alakú nefrociták folyamatos, intenzív anyagfelvételt folytatnak, emiatt rendkívül szervezett, koncentrikus körökben rendeződött endoszómális rendszerrel rendelkeznek (Denholm és Skaer, 2009), amit korai és késői endoszómák, valamint lizoszómák alkotnak. A plazmamembrán felé való reciklizációért felelős reciklizáló endoszómák a sejt periferiáján, a plazmamembrán közelében helyezkednek el. Így ezek a sejtek kiválóan alkalmasak az endoszómális rendszerben szerepet játszó gének tanulmányozására. Az imént felsorolt vezikulumok működését irányító, illetve sejten belüli helyüket kijelölő molekulák a kis GTPázokhoz tartozó Rab fehérjék. A korai endoszómák felszínén a Rab5, a későiekén a Rab7, a reciklizáló endoszómákon pedig a Rab11 található meg. Ezen fehérjék kulcsfontosságúak az endoszómális transzportfolyamatokhoz.



1. **Ábra** A nefrociták vezikuláris rendszere. (Desfougères és mtsai., 2015)

A nefrociták felszínét egy alaphártya borítja, mely alatt a podocita lábnyúlványokhoz hasonló membránbetűrődésekből álló lakúnarendszer, illetve a lakúnák bejáratát szegélyező részmembrán (RM), másnéven diafragma található. **(2. ábra)** Ez kiszűri a 12 nm-nél (vagy nagyjából 70 kDa-nál) kisebb molekulákat (Helmstädter, Huber és Hermle, 2017). A részmembránon átjutott anyagok a lakúnák plazmamembránján át, endocitózissal kerülnek felvételre. Maga a részmembrán egy módosult zonula adherens. Nagyjából egy tucat különböző típusú fehérjéből áll, melyek a szűrő eltömítődésének megakadályozása miatt folyamatos endocitózison és reciklizáción esnek át, melyben kulcsfontosságúak a Rab5 és a Rab11 fehérjék (Wen és mtsai., 2020). A vezikuláris rendszer működésének zavarai emiatt a részmembrán szerkezetének megváltozását vonják maguk után. A szűrőrendszer ilyen károsodása hosszútávon funkcionális problémákat is okozhat.



2. Ábra A nefrociták lakúnarendszerének felépítése. (Helmstädter, Huber és Hermle, 2017)

Célkitűzés

Célunk a sorting nexinek közül az Snz fehérje funkciójának meghatározása *Drosophila* nefrocitákban. Ez a funkció csoportunk előzetes kísérletei alapján eltér a lárvális zsírtestben leírttól. Ebben a kutatásban meghatározzuk az újonnan talált funkció végrehajtásához szükséges kölcsönható molekulákat, melyek közül a Rab11 játszik központi szerepet, és feltárjuk, melyik kompartment részeként működik az Snz a nefrocitákban. A kutatásban végzett munkám célja az Snz funkcióvesztésének a nefrocitákban zajló membrán-reciklizációra gyakorolt hatásának vizsgálata volt. Ennek során vizsgáltam az Snz mutáció hatásait a sejtek anyagcseréjére a nefrocita résmembránt vizsgáló immunhisztokémiai módszerek, membrándinamikai FRAP, és életképességet mérő AgNO₃ toxicitási vizsgálatok által. Ezen új funkció megértésével feltehetőleg az Snz humán ortológjának mutációi miatt kialakult emberi betegségek patomechanizmusára is lehetséges magyarázattal tudunk szolgálni.

Anyagok és módszerek

A modellállatokat szobahőmérsékleten tartjuk standard élesztő/kukoricaliszt/agar tápon. A kutatás során használt törzseket a Bloomington *Drosophila* Stock Center-ből (BDSC) vagy a Vienna *Drosophila* Resource Center-ből (VDRC) szereztük be. Ezek a következők voltak: mCherry RNAi (kontroll) [BDSC 35785], snz RNAi 1. [BDSC 39036], snz RNAi 2. [VDRC 105671], vps39 RNAi [VDRC 40425], sec5 RNAi [BDSC 27526], rab11 RNAi [BDSC 27730], UAS-EYFP-Rab11^{Q70L} (Rab11^{CA}) [BDSC 9791]. A prospero-Gal4 driver a (Bechtel et al., 2013), a Glue-dsRed; fkh-Gal4 törzs a (Costantino et al., 2008) tanulmányokat publikáló csoportoktól származik. Az snz^{KO} törzs, az UAS-dMAPPER-Cherry és az UAS-Snz-GFP riportereket a (Ugrankar et al., 2019) tanulmány szerzői bocsájtották rendelkezésünkre. Standard genetikai keresztezések által rekombináltuk az UAS-Snz-GFP, illetve az UAS-EYFP-Rab11^{Q70L} riportereket a prospero-Gal4 tartalmú kromoszómához.

A fő megfigyelési eszközünk a fluoreszcens mikroszkópia volt.

Immunfestés esetén a kipreparált nefrociták fixálásához két módszert használtam az ellenanyagok igényeitől függően. A **formaldehidben fixált** nefrocitákat a (Lőrincz et al., 2016) cikkben megtalálható protokoll szerint festettem meg. Ennek menete röviden: az L3

stádiumú lárvákat PBS-ben boncoltam, majd a bélszegmenseket 30 percig 4%-os, PBS alapú formaldehid oldatban fixáltam. Ezután a mintákat alaposan átmostam PBS-sel, majd 30 percig PBTx-ben (0,1% Triton X-100 PBS-ben) inkubáltam. Az 5% FCS-t (fetal calf serum) tartalmazó PBTx-szel történő blokkolás után a mintákat egy éjszakán át 4°C-on inkubáltam a blokkoló alapú primer ellenanyag oldatban. Ezt követően a mintákat leöblítettem, alaposan átmostam, majd a megfelelő másodlagos ellenanyagokat tartalmazó blokkoló oldatban inkubáltam 2 órán át szobahőmérsékleten. Az öblítést és mosást követően a sejtmagokat DAPI-val festettem meg, a felesleget lemostam, és egy csepp Vectashield-del tárgylemezen lefedtem a mintákat. A **hőfixálást** a (Hochapfel et al., 2017) cikk alapján hajtottam végre. Ez röviden a következő: az L3 stádiumú lárvákat PBS-ben boncoltam, majd a bélszegmenseket forró 0,03%-os PBTx-be helyeztem, és azonnal 20 másodpercig mikrohullámú sütőben melegítettem vízfürdőben. Ezt követően TWEEN 20-PBS-ben mostam őket, majd egy órán át BSA-oldatban blokkoltam őket. A mintákat a-Sns és a-Pyd primer antitestekkel inkubáltam egy éjszakán át 4 °C-on. Alapos mosás után a mintákhoz 2 órán keresztül szobahőmérsékleten a megfelelő másodlagos antitesteket adtam, majd ismét mostam és lefedtem őket. A következő **elsődleges ellenanyagokat** használtuk: poliklonális nyúl a-Rab11 (1:400, (Tanaka és Nakamura, 2008)), poliklonális csirke a-Sns (1:1000, (Hochapfel et al., 2017)), monoklonális egér a-Pyd (1:400, DSHB), poliklonális csirke a-GFP (1:400, 2BScientific #AGFP-NM), poliklonális Alexa Fluor 647 kecske a-Hrp (1:800, Jackson Immunoresearch #2338967). A **másodlagos ellenanyagok** FITC számár anti-csirke, Alexa Fluor 488 kecske anti-nyúl, Alexa Fluor 488 kecske anti-csirke, Alexa Fluor 568 kecske anti-nyúl, Alexa Fluor 568 számár anti-kecske, voltak. Az **immunfestett minták fotózását** Zeiss Zen szoftverrel végeztem 63-szoros nagyításon. A képeket 9, egymástól 0,25 µm távolságra lévő optikai szelet összegzésével hoztam létre.

A **FRAP** elvégzéséhez az M3 oldatban kipreparált lárvális nefrocitákat üvegaljú műanyag petricsészére helyeztem. Erre 37°C-os dermedési hőmérsékletű M3 alapú agart pipettáztam, majd jégre tettem a petricsészét, hogy az így megszilárduló agar helyben tartsa a sejteket. Az élősejtes mintákat 30 percen keresztül percenként fotóztam 63x-os nagyításon fluoreszcens mikroszkóppal. A photobleaching a második percnél történt 40 rövid, egymás utáni megvilágítási ciklussal maximális fényintenzitás mellett, a látótérből kiválasztott 2-3 ROI-n belül. A sejtek esetleges mozgását a képek elkészülése közötti időben manuálisan korrigáltam mindhárom tértengely mentén. A videók kiértékeléséhez ImageJ szoftvert használtam. A különböző ROI-k fényintenzitásából kivontam a háttér fényintenzitását, majd ezen értékek

százalékos arányát vettem a teljes kép eredeti fényintenzitásához képest. A minta fakulása miatt az adott időpontokhoz tartozó teljes kép fényintenzitásához is korrigáltam a ROI-k és a hátterek különbségét.

Az **AgNO₃** toxicitás vizsgálatához 50-50 L1 stádiumú lárvát helyeztem normál, 0,2%, illetve 1% ezüst-nitrátot tartalmazó tápra. Az ezeken sikeresen bebábozódó és kikelő egyedeket számoltam meg. A nefrociták AgNO₃-felvételének vizsgálatához 0,2% ezüst-nitrát tartalmú tápon kikelt L3 stádiumú lárvák nefrocitáit PBS-ben kiboncoltam, majd 10 mp UV-fénnyel történő megvilágítás után 40-szeres nagyításon lefényképeztem azokat. Az UV-fény mélyebb barnás színt ad az AgNO₃-nak.

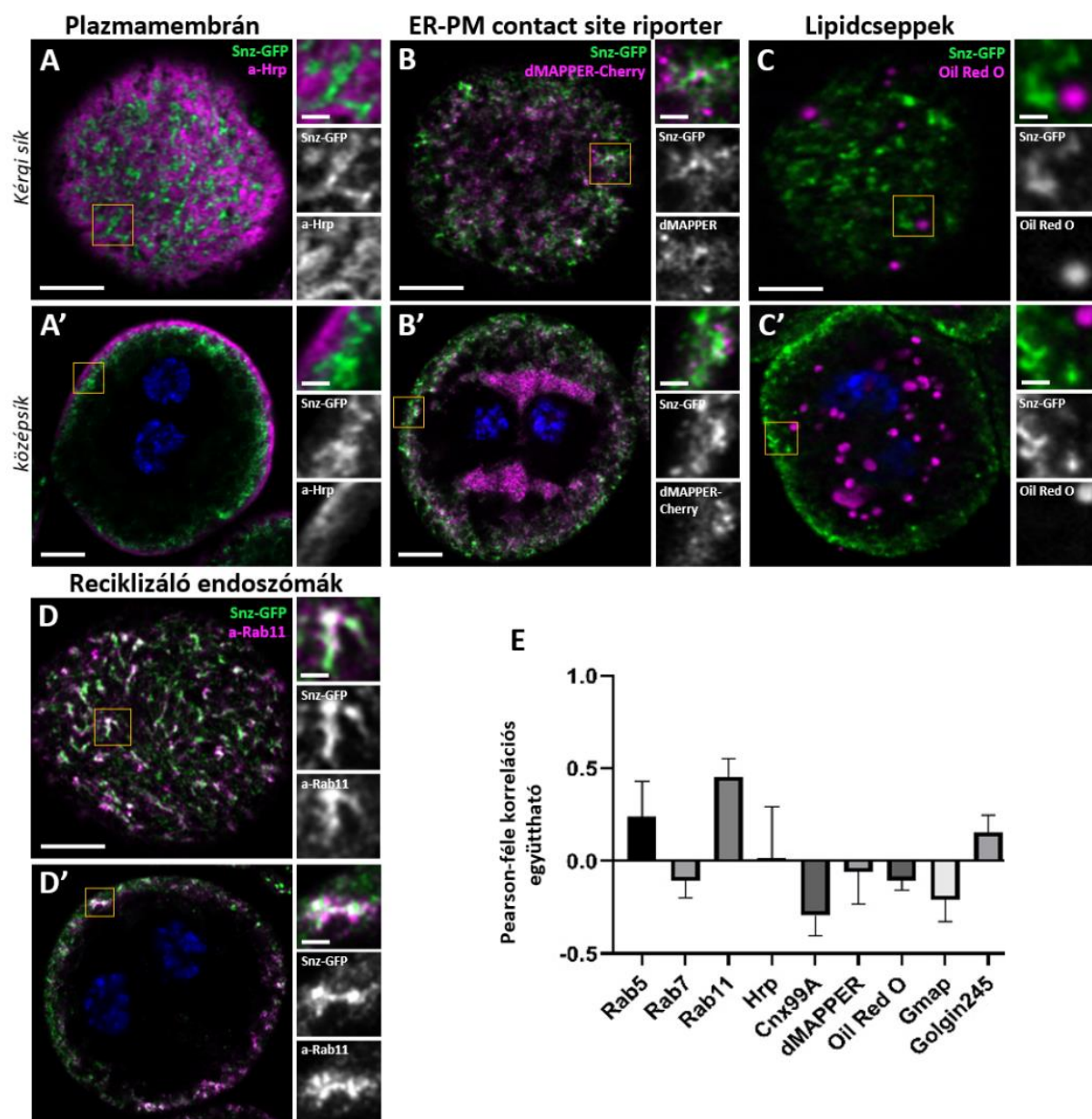
Eredmények és értékelésük

Előzetes eredmények

A kutatásba való csatlakozásom előtt a csoportom egy projektjében munkatársaim a különböző sorting nexinek csendesítésének endoszómális rendszerre gyakorolt hatásait kezdték el vizsgálni *Drosophila* lárvális szerveiben. Ennek egyik eredményeként azt találták, hogy az *Snz* csendesítése erősen megváltoztatta a nefrociták vezikulamintázatát. Ezekben a sejtekben a korai és késői endoszómák – amik Rab5 és Rab7 immunfestés által figyelhetők meg – mérete jelentősen megnőtt. Az *snz* géntől megfosztott, nullmutáns állatok hasonló mintázatot mutattak. Ezt az *Snz* prospero driverrel vezérelt menekítő génkópiája vissza tudta állítani a normálishoz közel álló állapotra. Az *snz* csendesítés hatását elektronmikroszkópos képeken is meg lehetett figyelni.

Mivel az *Snz*-ről tudott, hogy a lárvális zsírtestsejtekben contact site-okat alakít ki a plazmamembrán, az ER és a perifériás LD-k között, így ellenőrizték, hogy a nefrocitákban van-e kolokalizáció a négy egység között. Ezen kísérletek ismétlésében már én is dolgoztam. Ám kiderült, hogy a nefrocitákban nincs a zsírtestre jellemző contact site elemei között semmilyen kolokalizáció (**3. ábra, A-C**), hiszen a mikroszkópos képeken a zöld *Snz*-GFP és a magentával jelölt sejtalkotók átfedése fehér területként jelenne meg. Az anti-Hrp ellenanyag a nefrociták esetében kijelöli a plazmamembránt, a dMAPPER az ER és a plazmamembrán kapcsolódási pontjain helyezkedik el (Chang és mtsai., 2013), az Oil Red O pedig elsősorban a magas triglicerid-tartalmú struktúrákat festi meg. Ez alapján úgy tűnik, hogy a fehérje

korábban leírt funkciója nincs jelen ebben a sejttypusban. Ezután azt találták, hogy az Snz, illetve a reciklizáló endoszómák felszínén elhelyezkedő Rab11 között áll fent kolokalizáció (3. ábra, D). Ehhez az endogén Rab11-et immunfestéssel tették láthatóvá. A zsírtestben nem írtak le a reciklizációs útvonal és Snz közötti összefüggést, így a nefrociták esetén egy korábban nem ismert, Rab11-hez köthető funkciót kellett feltérképeznünk.

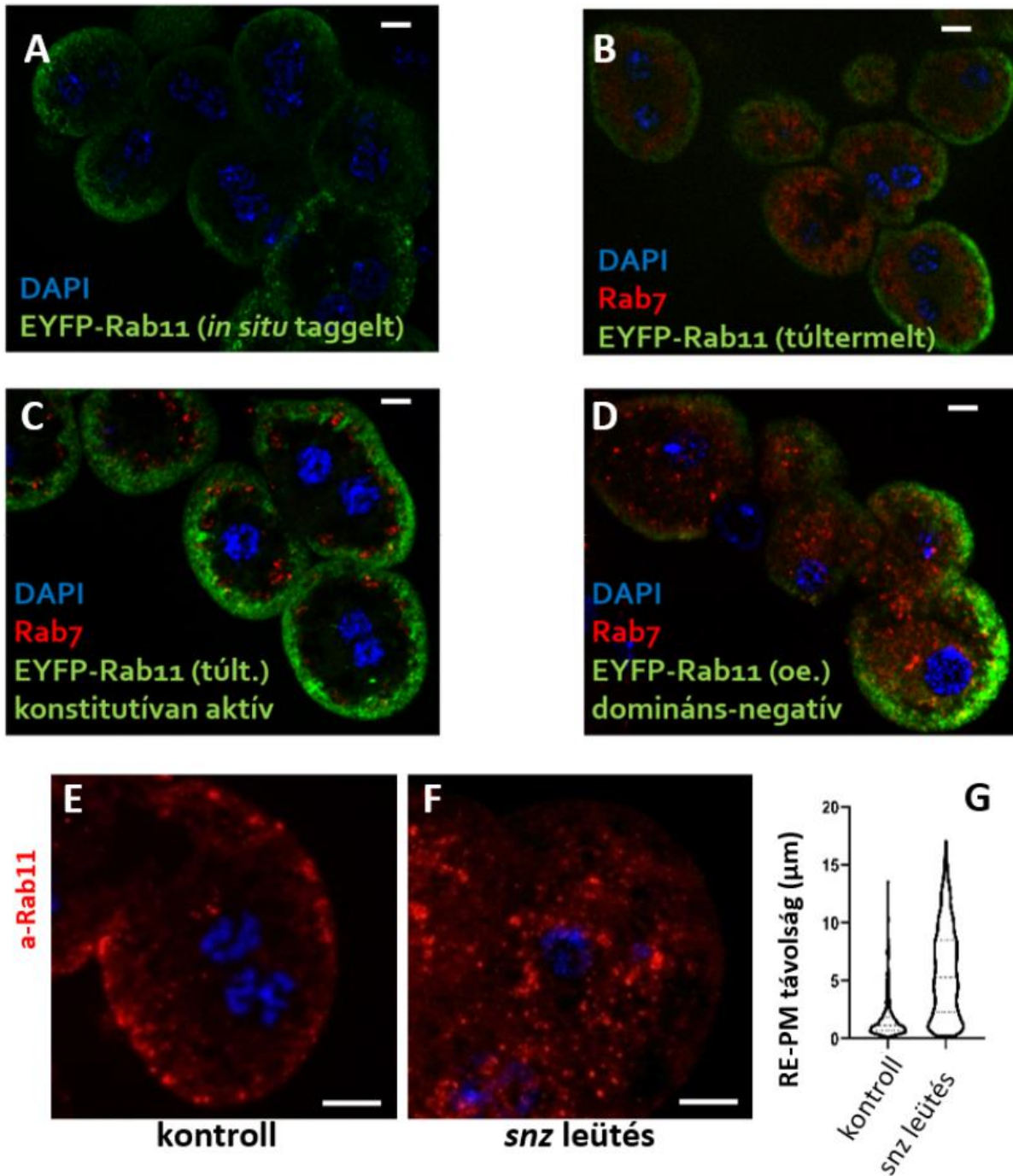


3. Ábra Az Snz a reciklizáló endoszómákon lokalizál a nefrocitákban. (A-D) Snz-GFP-t expresszáló nefrociták különböző organeláris markerekkel festve. Minden képen kortikális (A-D) és mediális (A'-D') nézetek láthatók. Nem látható átfedés a plazmamembránt jelölő anti-Hrp (A), az ER-PM contact site riporter dMAPPER-Cherry (B), és az Oil Red O-val jelölt lipidcseppek (C) esetében. Az Snz-GFP nagymértékű kolokalizációt mutat a Rab11-pozitív reciklizáló endoszómákkal (D). Az inszertek a sárga téglalapokkal jelölt területeket mutatják nagyobb nagyításban. (E) Az A-D panelek adatainak,

illetve a Rab5 (korai endoszómák), Rab7 (lésői endoszómák), Cnx99A (ER), Golgin245 (transz-golgi), és Gmap (cisz-golgi) Rab11-gyel való kolokalizációjának kvantitatív meghatározása. A méretarányos sávok 5 μm -t jelentenek a paneleken és 1 μm -t az inszerteken. (Dr. Maruts Tamás, Lakatos Enikő, és Börösök Dalma képei)

A Rab11 mikroszkópos vizsgálatára alkalmas genetikai eszközök

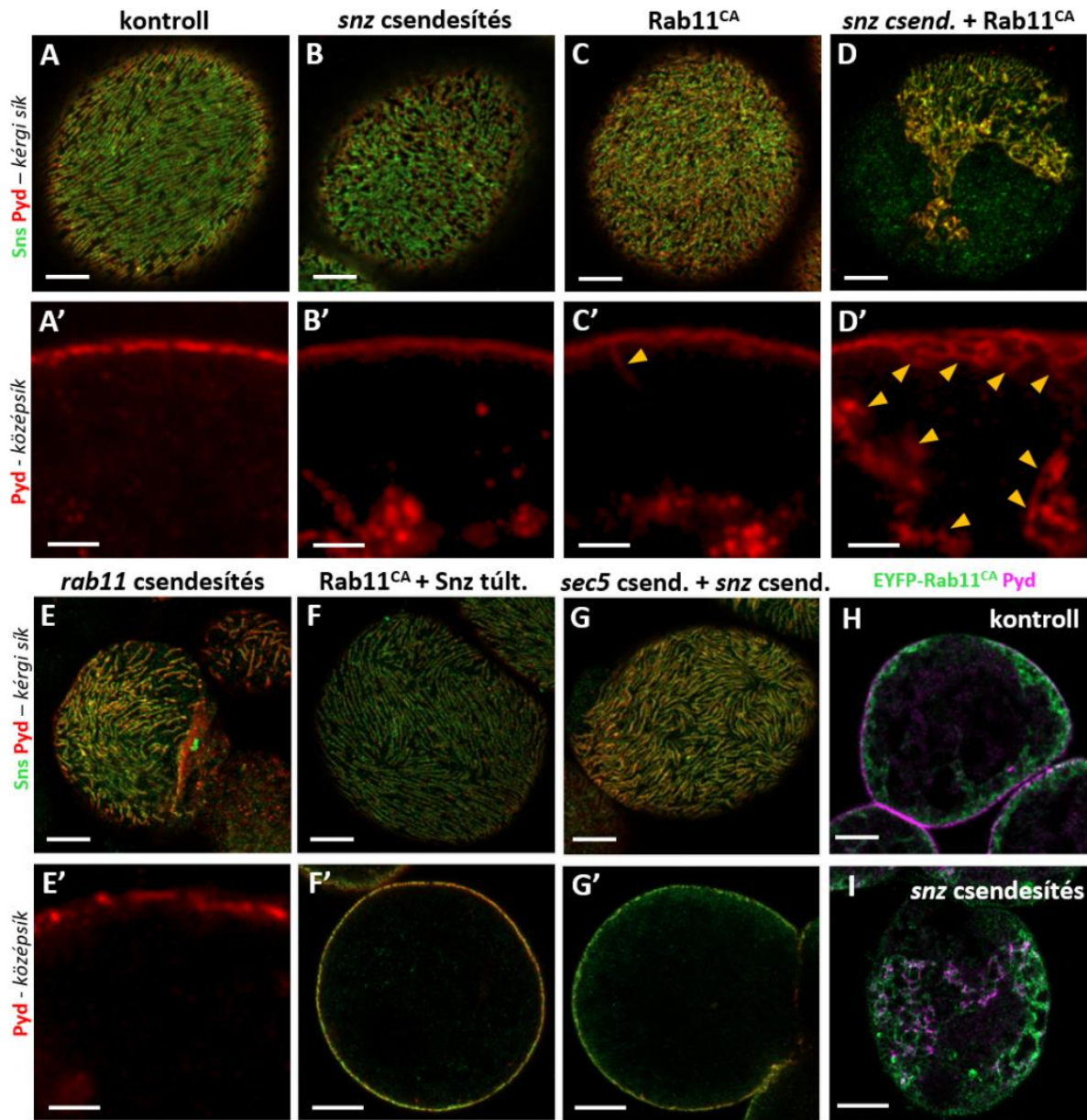
Miután a kutatáshoz csatlakoztam, a Rab11 vizsgálatához szükséges genetikai eszközök nefrocitákban való tesztelésén kezdtünk dolgozni. Az én feladatom az EYFP-taggelt endogén, illetve a szintén EYFP-taggelt, túltermelt vadtypusú, konstitutívan-aktív és domináns-negatív Rab11 vonalak validálása volt. Ehhez a bloomingtoni törzsközpontból beszerzett, megfelelően kikeresztett törzsek F1 lárvaikat a módszerekben leírt immunfestési eljárással kipreparáltam, majd mikroszkóppal lefényképeztem. Az EYFP-taggelt endogén Rab11 mintázata az endogén, immunfestett Rab11 mintázatához hasonló volt **(4. ábra, A és E)**, a sejtek periferiáján helyezkedett el jellemző vastagságú sávban, ahol a reciklizáló endoszómák is megtalálhatóak. Úgy tűnik, a taggelés nem módosította a Rab11 sejtben belüli elhelyezkedését, és sikeresen láthatóvá tette számunkra a fehérjét. A prospero-Gal4 driverrel hajtott, túltermelt Rab11 szintén a vad típuséhoz hasonló lokalizációt mutatott **(4. ábra, B)**. Ez a riporter alkalmasabb kontrollként az egyéb, túltermelésre használt genetikai eszközeink mellett. A konstitutívan aktív - GTP-t kötő, de azt hidrolizálni nem képes - forma egy szélesebb sávot jelöl ki a helyén taggelt és vadtypusú, overexpresszált Rab11-hez képest, viszont feltehetően ez is a reciklizáló endoszómák elhelyezkedését követi, mivel jellegzetes, kerekded képleteket jelöl ki több helyen is a RE-k mérettartományában **(4. ábra, C)**. A domináns-negatív Rab11 - mely a GTP hidrolízisével keletkező GDP-t irreverzibilisen köti - az előbbi mintához hasonlóan vezikulásterű periferiás képleteket jelöl **(4. ábra, D)**. Az általam tesztelt eszközök a fentiek alapján a nefrocitákban való vizsgálatokra alkalmasnak tekinthetők, és később több, a jelen dolgozatban nem ismertetett vizsgálatunkban használtuk őket. A további vizsgálataink azt mutatták, hogy az Snz és a Rab11 nem csupán kolokalizál egymással, hanem az Snz csendesítése felborítja a Rab11 sejtben belüli mintázatát **(4. ábra, F)**. Tehát az Snz szükséges a Rab11 normális eloszlásának kialakításához. A funkcionális kapcsolat mellett az egyik munkatársunk, Blastyák András által kivitelezett ko-immunoprecipitációs kísérletek biokémiai kapcsolatot is kimutattak az Snz és a Rab11 között.



4. Ábra (A) Az EYFP-taggelt, endogén promóterű Rab11 a normál Rab11 eloszlását mutatja. (B) A túltermelt, EYFP-taggelt Rab11 esetében is megmaradt ez a mintázat. (C) A szintén túltermelt, konstitutívan-aktív Rab11 továbbra is kirajzolja a reciklizáló endoszómák rendszerét, de a normálisnál vastagabb sávban látható. (D) A túltermelt, domináns-negatív Rab11 kevésbé megvastagodott sávban van jelen, de egyébként az előbbiekkal egységes. (E) Az endogén, ellenanyaggal kijelölt Rab11 eloszlása a sejt középsíkjában. (F) A Rab11 által kijelölt reciklizáló endoszómák lokalizációjának felborulása *snz* csendesítés hatására. A Rab11-tartalmú képletek a teljes citoplazmában diffúzan megtalálhatóak. (G) A feltételezhető RE-k plazmamembrántól való távolsága. A méretarányos sávok 5 μm -t jelentenek a főpaneelen és 1 μm -t az inszerteken.

Az Snz szerepe a résmembrán és a lakúnarendszer kialakításában

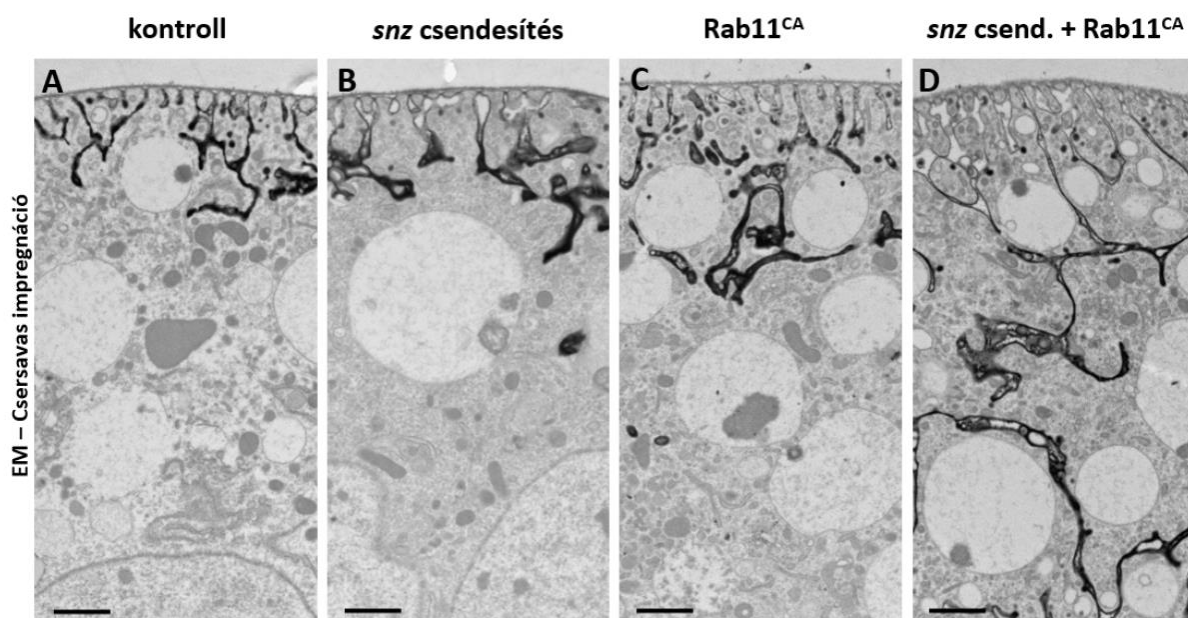
Ahhoz, hogy megértsük a Rab11 és az Snz közötti kapcsolat funkcióját, olyan, reciklizációt igénylő folyamatokat kerestünk, amelyek segítségével meg tudjuk figyelni az Snz funkciókiesés hatását. Az egyik ilyen folyamat a résmembrán fehérjék turnover, azaz folyamatos cseréje, amely a szűrőrendszer eldugulásának és előregedésének megakadályozásához szükséges. A kísérletek során az Sns (Sticks and stones, a humán Nephrin ortológja) és a Pyd (Polychaetoid, a humán ZO-1 ortológja) fehérjéket vizsgáltuk. Ezek fluoreszcens immunjelölése kirajzolja a sejtek felszínén az ujjlenyomatra emlékeztető résmembrán mintázatot (**5. ábra, A**, illetve Weavers és mtsai., 2009; Zhuang és mtsai., 2009). A *rab11* csendesítés hatására a résmembránrendszer nem tud megfelelő mértékben kialakulni a sejteken (**5. ábra, E**, illetve Fu és mtsai., 2017; Wen és mtsai., 2020). A túltermelt, konstitutívan-aktív Rab11, illetve az *snz* csendesítés hatására is eltérő megjelenést mutattak a megfestett résmembrán fehérjék (**5. ábra, B és C**). Ha a sejtek középsíkját nézzük, a sejtmag közelében a Pyd felhalmozódása figyelhető meg az előbb említett két genotípus esetén (**5. ábra, B' és C'**) a kontroll és a *rab11* csendesített mintákkal ellentétben (**5. ábra, A' és E'**). A konstitutívan aktív Rab11 *snz*-csendesített háttéren való túltermelése is abnormális szűrőrendszert okozott (**5. ábra, D**), és a Pyd akkumuláció mértéke jelentősen megnőtt a csak Rab11-túltermelő vagy csak *snz*-csendesített sejtekhez képest (**5. ábra, D'**). Az Snz túltermelése viszont menekíteni tudta a túltermelt Rab11 hatását, mivel az ilyen genotípusú sejtek többé-kevésbé normális résmembrán mintázatot mutattak és Pyd sem gyűlt fel a sejt mélyebb rétegeiben (**5. ábra, F és F'**). A Rab11 az úgynevezett exocyst fehérjekomplex révén hajtja végre a szekréció utolsó lépését képező membránfúziót. Ennek egyik alkotója a Sec5 fehérje. A *sec5* csendesítésekor a sejtek szekrécióra való lehetősége erősen lecsökken. Az *snz* csendesítése azonban még a *sec5* csendesített sejtekben is többé-kevésbé normális szekréciós rátát tudott lehetővé tenni a résmembránfehérjék festése alapján (**5. ábra, G**). A teljesség kedvéért a sejtek középsíkjában is készítettem képet, amely szintén a kontroll mintához hasonló megjelenésű (**5. ábra, G'**). Az *snz* csendesített sejtekben a konstitutívan-aktív Rab11 leköveti a Pyd mintázatát, ami alapján a lakúnáris rendszer sejtbe való terjedésére következtethetünk. (**5. ábra, H és I**)



5. Ábra A nefrocita részmembrán és a lakúnáris rendszer mintázata. (A-G) A RM-t az Sns és a Pyd immunfestésével tettük látatóvá hőfixált sejtekben. (A'-G') A sejtek középsíkjában készült keresztmetszeti képeken a lakúnák betüremkedései és a sejtek mélyebb rétegei láthatók. Az *snz* csendesítése (B) és a konstitutívan-aktív Rab11 (Rab11^{CA}) túltermelés (C) hatása bizonyos fokú, a kettő kombinációja pedig jelentős eltérést mutat a kontroll (A) és a *rab11* csendesítés (E) megjelenéséhez képest. A kontrollhoz hasonló mintázatot mutat a Rab11^{CA} Snz túltermeltetéssel kombinálva (F), illetve a *sec5* csendesítés *snz* csendesítéssel kombinálva (G). Hasonlóképpen, az *snz* csendesítése (B'), a Rab11^{CA} túltermelése (C'), illetve ezek kombinációja (D') Pyd felhalmozódást okozott a sejtek mélyebb rétegeiben a kontroll (A') és a *rab11* csendesített (E') esetekkel ellentétben. A sárga nyilak az ektopikus RM-okat mutatják. A Rab11^{CA} túltermelés Snz túltermeltetéssel kombinálva (F'), illetve a *sec5* csendesítés *snz* csendesítéssel kombinálva (G') nem okozott ilyen felhalmozódást. (H és I) EYFP-Rab11^{CA}-t kifejező, formaldehid-fixált nefrociták Pyd-immunfestés mellett. Látható, hogy az *snz* csendesített sejtekben a konstitutívan-aktív Rab11 leköveti a Pyd által

kijelölt sejten belüli hálózat lefutását, feltehetően egy kiterjedt lakúnáris rendszert jelölve. A méretarányos sávok 5 μm -t jelentenek az A-I paneleken és 2 μm -t az A'-G' paneleken.

A lakúnákat nagyon jól ki lehet jelölni csersavas impregnációs eljárással, majd az azt követő elektronmikroszkópos képalkotással. Ezeket a vizsgálatokat kollégáink, Lőrincz Péter és Hargitai Dávid végezték el. Az eljárás során a csersav nem hatol át a plazmamembránon, így a képeken a fekete, elektrondenz területek a sejthártyán kívül eső extracelluláris, de a résmembránon már átjutott csersavat jelölik (Kosaka és Ikeda, 1983). Az *snz* leütés és a Rab11 overexpresszió hatására is a kontrollhoz (6. ábra, A) képest valamivel mélyebb lakúnák alakulnak ki (6. ábra, B és C). Az *snz* csendesített háttéren Rab11^{CA}-t túltermelő sejtekben pedig erősen meghosszabbodott membránbetűrődések rajzolódnak ki a képeken. A lakúnák jellege minden esetben hasonlóan tűnik, a szembetűnő különbséget csak a betüremkedésük mértéke adja.

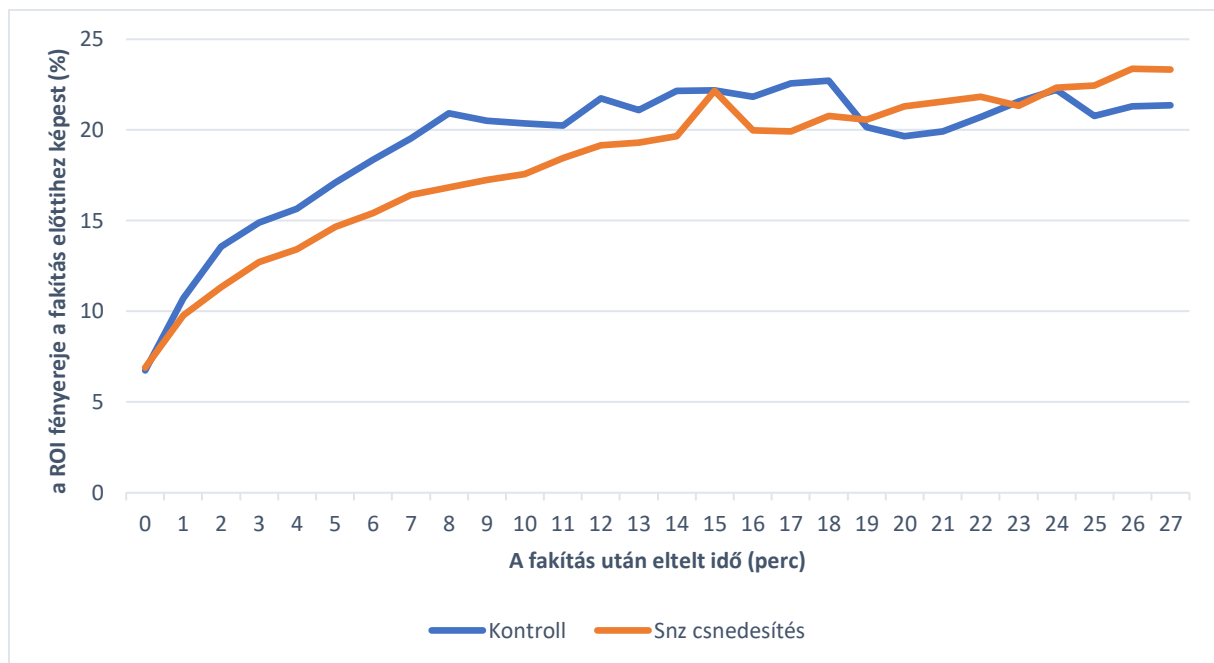


6. Ábra Csersavval impregnált sejtek TEM felvételei. A plazmamembrán betűrődéseinek a résmembrán alatti részeit – a lakúnákat – sötétben megjelenő csersav tölti ki. (A) A kontroll mintához képest (B) az *snz* csendesített és (C) a Rab11^{CA} túltermelő sejtek mélyebbre nyúló lakúnákkal rendelkeznek. (D) A Rab11^{CA} *snz*-csendesített háttéren való túltermelésének hatására a lakúnák nagyon mélyen benyomulnak a sejtek belsejébe. A méretarányos sávok 1 μm -t jelentenek. (Lőrincz Péter és Hargitai Dávid képei)

Az Snz szekréciós dinamikára való lehetséges hatásainak vizsgálata FRAP-pel

Az Snz csendesítésének a szekréció intenzitására való hatását szintén vizsgáltuk. A FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) kísérletek a dinamikus sejtfolyamatok vizsgálatára alkalmasak. Lényegük, hogy valamilyen, sejten belüli mozgást végző makromolekulát, legtöbbször fehérjét, fluoreszcens taggal látunk el, mely intenzív megvilágítás hatására irreverzibilisen elveszti fluoreszcenciáját, „kifakul”, tehát nem látható tovább a felvételen. Ezt az erőteljes megvilágítási sorozatot nevezzük bleaching-nek. A bleaching-et csak a látható terület egy részén (region of interest - ROI) végezzük el. Az ezután újonnan a ROI-ba kerülő fehérjemolekulák, amelyek fluoreszcenciáját nem oltotta ki a megvilágítás, a kifakított területen ismét növelni kezdik a fényintenzitást. Szekrécióra kerülő transzmembrán fehérjék esetén például a plazmamembrán egy részének fakítása után nyomon követhetjük a fluoreszcencia visszatérésének sebességét. Ez arányos a fehérjeszekréció sebességével.

Ha a Rab11 útvonalon szekretálódó, GFP-vel taggelt Sns-t követjük a FRAP során, a photobleaching után folyamatosan visszatérő fényerősséget fogunk tapasztalni a fakításon átesett ROI-ban. A fényerősség visszatérése egy maximális értéket fokozatosan közelítő, „plató”-jellegű görbével jellemezhető. Az *snz* csendesítés hatására a platót hamarabb elérő görbét várunk, hiszen feltevésünk alapján az Snz alapesetben gátolja a szekréciót. Több egyedi FRAP kísérlet után viszont egyelőre nem találtunk egyértelmű összefüggést a szekréció sebessége és az *snz* csendesítése között. Mind a kontroll, mind az *snz* csendesítés esetén a fakítás utáni 27 perc alatt az eredeti fényerősség 20-25%-át visszanyerte a ROI-n belüli plazmamembrán, ám az eredmények nagy szórása miatt ez a kérdés további vizsgálatokat igényel. **(7. ábra)**

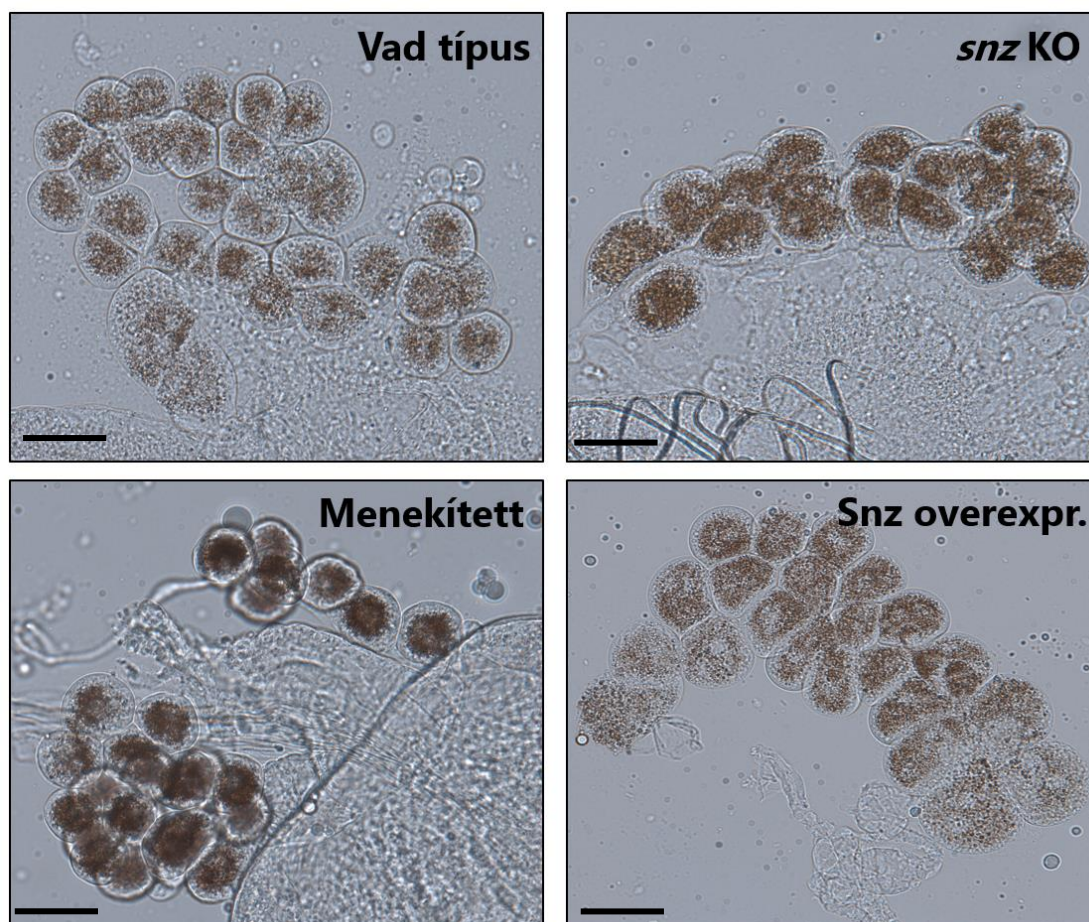


7. Ábra Az eddigi FRAP kísérletek eredménye alapján a (kék) kontroll sejtek és a (narancssárga) *snz* csnedesített sejtek esetén vizsgált fényerősség visszatérések sebességének átlaga nem tér el számottevően egymástól. Mivel az átlagszámítás előtti adatok szórása viszonylag nagy volt, így az átlag görbék is változhatnak a későbbi kísérletek által.

AgNO₃ felvétel vizsgálat és toxicitási mérések

Az ezüst-nitrát kettős célra használható a nefrocitákkal végzett kísérletek esetén. Egyrészt toxicitási tesztekhez, hiszen nehézfém tartalma miatt mérgező hatású, másrészt ún. endocitózis tracer-ként is alkalmazható, hiszen a hemolimfát szűrő nefrociták endocitózissal felveszik és elraktározzák magukban, hogy így csökkentsék a mérgező vegyület koncentrációját a testfolyadékban. A felvett AgNO₃ egy rövid, pár másodperces UV-megvilágítás után barna csapadékként jól megfigyelhető a nefrocitákban, tehát az így végzett vizsgálatok megmutatják az endocitózis hatékonyságát. A kísérletekhez vad típusú, *snz* nullmutáns (*snz* KO), prospero driverrel hajtott *Snz*-GFP által menekített *snz* KO (menekített), illetve *Snz*-t overexpresszáló törzseket használtam. Nem volt látható számottevő eltérés az AgNO₃ felvételében a különböző genotípusok között, azaz az *Snz* funkciókiesése, illetve túltermelése nem befolyásolja közvetlenül az endocitózist. **(8. ábra)** A toxicitási teszt eredménye hasonlóan azt mutatta, hogy az *Snz* működésének nincs szignifikáns hatása a méreg mellett (vagy anélkül) történő túlélésre a lárvális fejlődés időtartama alatt. Érdekes módon, némileg jobb életképességűek voltak az *snz* nullmutáns egyedek, ami mögött valószínűleg az *Snz*-nek a

zsírtestben leírt, lipid metabolizmusra való hatása állhat. Fontos megemlíteni viszont, hogy a lárvális vizsgálatok az ecetmuslicában nem alkalmasak idült hatások vizsgálatára, kizárólag a rövid időn belül jelentkező következményeket láthatjuk, tehát hosszú távon káros hatásai is lehetnek az Snz funkció kiesésének.



8. Ábra A nefrociták által felvett és vezikulárisan elraktározott ezüst-nitrát (barna) mintázata. Sem az *snz* KO, sem az Snz overexpresszió nem okoz számottevő eltérést a felvételen. Az Snz-GFP által menekített sejtek is a vad típusú sejtekkel azonos mértékű endocitózist mutatnak. A méretarányos sávok 30 μ m-t jelentenek.

Összefoglalás

Az Snz a nefrocitákban erős kolokalizációt mutat a Rab11-gyel és kapcsolatuk ko-immunoprecipitációval is kimutatható. Ebben a sejttypusban vizsgálataink alapján nem alakul ki a zsírtestsejtekben leírt contact site mivel egyik eleme sem kolokalizál az Snz-vel, így itt feltehetően nem a lipid metabolizmusban játszik szerepet a fehérje, hanem a Rab11 által szabályozott membrán-reciklizációs útvonalban szerepel. Ezt erősíti az az eredményünk is, amely szerint az *snz* csendesítése a Rab11 sejtben belüli elhelyezkedését is megváltoztatja,

ugyanis a fehérje nem tud a sejt perifériájára lokalizálni, ahol a RE-k normálisan megtalálhatók. A Rab11 funkcióját igénylő egyik folyamat a lakúnáris rendszer és a benne található résmembrán fenntartása az ide tartozó fehérjék turnoverének, azon belül is exkréciójának szabályozásán keresztül. Kísérleteinkben ezért a résmembrán és a lakúnáris rendszer megjelenését vizsgáltuk az Snz funkció függvényében. Azt találtuk, hogy az *snz* csendesítése megváltoztatja a RM elrendeződését a sejtek felszínén, és a Pyd fehérje megjelenését okozza a sejt mélyebb területein. Ismert, hogy kóros RM fehérje akkumulációk láthatók az abnormálisan megnyúlt lakúnáris csatornában akkor, ha az endocitózis gátolt vagy az exocitózis haladja meg a szükséges mértéket (Atienza-Manuel és mtsai., 2021; Kampf és mtsai., 2019). Ilyen esetben a felesleges membránmennyiség miatt kimélyülnek a membránbetűródések és a rajtuk lévő PM fehérjék is látszólag intracellulárisan helyezkednek el a sejtmag közelében. A csetsavas kezelés után készített elektronmikroszkópos képeken jól láthatóvá lehet tenni a lakúnák lefutását. A kontroll nefrocitákhoz képest mélyebb lakúnák láthatók az *snz* csendesített és a Rab11^{CA}-t túltermelő sejteknél. Az *snz* csendesített háttéren túltermelt Rab11^{CA} esetén a lakúnák szembetűnően kiterjedt hálózatot alkotnak a nefrocitákban, amely megfelel az ebben a genotípusban a Pyd festés esetén látott kóros RM-hálózatnak. Ez arra utal, hogy nagy mennyiségű felesleges plazmamembrán keletkezik ezekben a sejtekben. Felesleges PM felgyülemelést a csökkent mértékű endocitózis is okozhatna, ám az *snz* csendesítése esetén sem a korai endoszómákban, sem az ezüst-nitrát felvételben nem láttunk eltéréseket, tehát az endocitózis funkciója megtartott volt. Az eredmények együttesen azt mutatják, hogy az Snz szükséges a RM és a lacunáris csatorna integritás fenntartásához, mégpedig valószínűsíthetően a Rab11 által közvetített reciklizáció és exocitózis PM felé történő visszatartása révén. Ez az inhibítoros funkció akár szerepet játszhat a nefrocita analóg humán podocitákban is. Ezt megerősíti a krónikus vesebetegséget SNX25 mutációkkal kapcsolatba hozó Kim, Jin és Eom, 2021 cikk. A Rab11-en keresztül számos más folyamatot is befolyásolni lehet képes az Snz/SNX25, ezzel hozzájárulva egyéb, a génnel eddig összefüggésbe nem hozott betegségeket is. Az Snz funkciójának további kutatása tovább bővítheti a sorting nexin fehérjéről alkotott tudásunkat, illetve a jövőben lehetővé teheti az SNX25-höz kapcsolódó betegségek patomechanizmusának jobb megértését.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm a szakmai segítséget Dr. Maruts Tamásnak, Lakatos Enikőnek, Börcsök Dalmának és Dr. Juhász Gábornak. A kutatásunk kiegészítő kírérleteinek elvégzését köszönöm Dr. Blastyák Andrásnak, Dr. Lőrincz Péternek és Dr. Hargitai Dávidnak.

A jelen közlemény alapjául szolgáló kutatást a Nemzeti Orvosbiológiai Alapítvány Nemzeti Tudósképző Akadémia Programja támogatta a Kulturális és Innovációs Minisztérium pénzügyi hozzájárulásával.

Irodalom

Akizu, N. et al. (2015) ‘Biallelic mutations in SNX14 cause a syndromic form of cerebellar atrophy and lysosome-autophagosome dysfunction’, *Nature Genetics*, 47(5), pp. 528–534. Available at: <https://doi.org/10.1038/ng.3256>.

Atienza-Manuel, A. et al. (2021) ‘Endocytosis mediated by an atypical CUBAM complex modulates slit diaphragm dynamics in nephrocytes’, *Development*, 148. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.199894>.

Bare, L.A. et al. (2007) ‘Five common gene variants identify elevated genetic risk for coronary heart disease.’, *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 9(10), pp. 682–689. Available at: <https://doi.org/10.1097/gim.0b013e318156fb62>.

Bechtel, W. et al. (2013) ‘Vps34 deficiency reveals the importance of endocytosis for podocyte homeostasis’, *Journal of the American Society of Nephrology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1681/ASN.2012070700>.

Chang, C.L. et al. (2013) ‘Feedback regulation of receptor-induced ca^{2+} signaling mediated by e-syt1 and nir2 at endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions’, *Cell Reports* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.09.038>.

Costantino, B.F.B. et al. (2008) ‘A novel ecdysone receptor mediates steroid-regulated developmental events during the mid-third instar of *Drosophila*’, *PLoS Genetics*. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000102>.

Datta, S. et al. (2019) 'Cerebellar ataxia disease-associated Snx14 promotes lipid droplet growth at ER-droplet contacts', *Journal of Cell Biology*, 218(4), pp. 1335–1351. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201808133>.

Datta, S. et al. (2020) 'Snx14 proximity labeling reveals a role in saturated fatty acid metabolism and ER homeostasis defective in SCAR20 disease.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(52), pp. 33282–33294. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.2011124117>.

Denholm, B. and Skaer, H. (2009) 'Bringing together components of the fly renal system', *Current Opinion in Genetics and Development*, 19(5), pp. 526–532. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.08.006>.

Desfougères, Y., D'Agostino, M., & Mayer, A. (2015). A modular tethering complex for endosomal recycling. *Nature cell biology*, 17(5), 540–541. <https://doi.org/10.1038/ncb3154>

Du, Y. et al. (2013) 'Expression pattern of sorting nexin 25 in temporal lobe epilepsy: A study on patients and pilocarpine-induced rats', *Brain Research [Preprint]*. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.03.005>.

Feng, F. et al. (2022) 'Identification of APC Mutation as a Potential Predictor for Immunotherapy in Colorectal Cancer', *Journal of oncology*, 2022.

Fu, Y. et al. (2017) 'Comprehensive functional analysis of Rab GTPases in *Drosophila* nephrocytes.', *Cell and tissue research*, 368(3), pp. 615–627. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2575-2>.

Gallon, M. and Cullen, P.J. (2015) 'Retromer and sorting nexins in endosomal sorting', *Biochemical Society Transactions [Preprint]*. Available at: <https://doi.org/10.1042/BST20140290>.

Hao, X. et al. (2011) 'SNX25 regulates TGF- β signaling by enhancing the receptor degradation', *Cellular Signalling [Preprint]*. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.01.022>.

Hariri, H. et al. (2019) 'Mdm1 maintains endoplasmic reticulum homeostasis by spatially regulating lipid droplet biogenesis', *Journal of Cell Biology*, 218(4), pp. 1319–1334. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201808119>.

Helmstädter, M., Huber, T.B. and Hermle, T. (2017) 'Using the Drosophila Nephrocyte to Model Podocyte Function and Disease.', *Frontiers in pediatrics*, 5, p. 262. Available at: <https://doi.org/10.3389/fped.2017.00262>.

Henne, W.M. et al. (2015) 'Mdm1/Snx13 is a novel ER-endolysosomal interorganelle tethering protein', *Journal of Cell Biology*, 210(4), pp. 541–551. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201503088>.

Hochapfel, F. et al. (2017) 'Distinct functions of Crumbs regulating slit diaphragms and endocytosis in Drosophila nephrocytes', *Cellular and Molecular Life Sciences* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2593-y>.

Huotari, J. and Helenius, A. (2011) 'Endosome maturation', *EMBO Journal*, 30(17), pp. 3481–3500. Available at: <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>.

Jacques, C. et al. (2005) 'Two-step differential expression analysis reveals a new set of genes involved in thyroid oncocytic tumors.', *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 90(4), pp. 2314–2320. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1337>.

Kampf, L.L. et al. (2019) 'TBC1D8B mutations implicate rab11-dependent vesicular trafficking in the pathogenesis of nephrotic syndrome', *Journal of the American Society of Nephrology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1681/ASN.2019040414>.

Kim, H.R., Jin, H.S. and Eom, Y. Bin (2021) 'Metabolite genome-wide association study for indoleamine 2,3-dioxygenase activity associated with chronic kidney disease', *Genes* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.3390/genes12121905>.

Kosaka, T. and Ikeda, K. (1983) 'Reversible blockage of membrane retrieval and endocytosis in the garland cell of the temperature-sensitive mutant of *Drosophila melanogaster*, *shibirets1*.', *The Journal of cell biology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.499>.

Lauzier, A. et al. (2022) 'Snazarus and its human ortholog SNX25 modulate autophagic flux', *Journal of cell science* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.258733>.

Li, J. et al. (2014) 'SNX13 reduction mediates heart failure through degradative sorting of apoptosis repressor with caspase recruitment domain', *Nature Communications*, 5(May), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms6177>.

- Lőrincz, P. et al. (2016) 'MiniCORVET is a Vps8-containing early endosomal tether in drosophila', eLife [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.14226>.
- Murthy, M. et al. (2003) 'Mutations in the exocyst component Sec5 disrupt neuronal membrane traffic, but neurotransmitter release persists', Neuron [Preprint]. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00031-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00031-X).
- Naslavsky, N. and Caplan, S. (2018) 'The enigmatic endosome - Sorting the ins and outs of endocytic trafficking', Journal of Cell Science [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.216499>.
- Olsson, A.H. et al. (2014) 'Genome-wide associations between genetic and epigenetic variation influence mRNA expression and insulin secretion in human pancreatic islets.', PLoS genetics, 10(11), p. e1004735. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004735>.
- Suh, J.M. et al. (2008) 'An RGS-containing sorting nexin controls Drosophila lifespan', PLoS ONE [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002152>.
- Tanaka, T. and Nakamura, A. (2008) 'The endocytic pathway acts downstream of Oskar in Drosophila germ plasm assembly', Development [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.017293>.
- Teasdale, R.D. and Collins, B.M. (2012) 'Insights into the PX (phox-homology) domain and SNX (sorting nexin) protein families: Structures, functions and roles in disease', Biochemical Journal, 441(1), pp. 39–59. Available at: <https://doi.org/10.1042/BJ20111226>.
- Thomas, A.C. et al. (2014) 'Mutations in SNX14 cause a distinctive autosomal-recessive cerebellar ataxia and intellectual disability syndrome', American Journal of Human Genetics, 95(5), pp. 611–621. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.10.007>.
- Ugrankar, R. et al. (2019) 'Drosophila Snazarus Regulates a Lipid Droplet Population at Plasma Membrane-Droplet Contacts in Adipocytes', Developmental Cell, 50(5), pp. 557--572.e5. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.07.021>.
- Vecellio, M. et al. (2021) 'DNA Methylation Signature in Monozygotic Twins Discordant for Psoriatic Disease', Frontiers in Cell and Developmental Biology [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.778677>.

Weavers, H. et al. (2009) 'The insect nephrocyte is a podocyte-like cell with a filtration slit diaphragm', *Nature*, 457(7227), pp. 322–326. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature07526>.

Wen, P. et al. (2020) 'Exocyst genes are essential for recycling membrane proteins and maintaining slit diaphragm in *Drosophila* nephrocytes', *Journal of the American Society of Nephrology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1681/ASN.2019060591>.

Zhuang, S. et al. (2009) 'Sns and Kirre, the *Drosophila* orthologs of Nephrin and Neph1, direct adhesion, fusion and formation of a slit diaphragm-like structure in insect nephrocytes', *Development*, 136(14), pp. 2335–2344. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.031609>.