

KIVÁLASZTÓSEJTEKKEL AZ ENDO-LIZOSZÓMÁLIS PÁNYVÁZÓFAKTOROK ÉS MÁS FEHÉRJÉK NYOMÁBAN

Lőrincz Péter^{1,2}, Kenéz Lili Anna¹ és Juhász Gábor^{1,3}

¹ ELTE Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék, Budapest;

² MTA Prémium Posztdoktori Kutatói Program;

³MTA SZBK, Genetikai Intézet, Szeged

Bevezetés

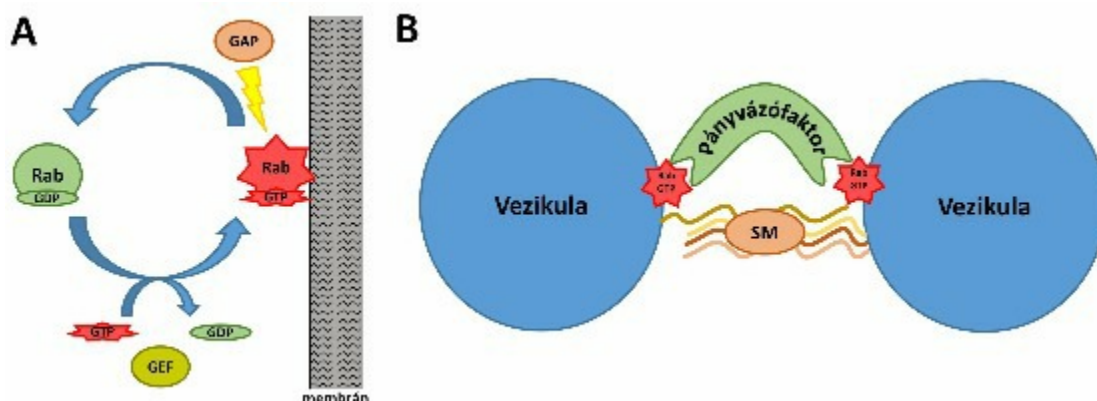
Az eukarióta sejtek összetett és dinamikusan változó szerkezettel bírnak. Belső membránjaik különféle tereket zárnak közre, amelyekben a sejt többi részétől elzárta, a sejt életéhez szükséges folyamatok (pl. fehérjeszintézis, lebontás stb.) zajlanak. A belső membránok által alkotott sejtszervecskék viszont nem egymástól elkülönülten léteznek, hanem folyamatos kapcsolatban és kölcsönhatásban állnak, bizonyos kompartmentek dinamikusan egymásba alakulni képesek. Ez sok esetben azt jelenti, hogy az adott kompartment egy másikkal egyesül, fuzionál. Ennek első lépése a membrán fehérje és lipid összetételének változása, amely során a membrán más identitást nyer és ezért ahhoz olyan effektor fehérjék toborzódnak, amelyek végső soron meghatározzák a sejtszervecske további sorsát [1].

Endocitózis során igen látványosan tetten érhető ez a folyamat, ugyanis amikor a sejt anyagokat vesz fel, a kialakuló sejtszervecske - az endocitotikus vezikulum - a fejlődése során sok, a sejtbiológusok számára nagyon látványos változáson megy keresztül. Ennek megértéséhez röviden nézzük át az endoszómális utat.

A Rab kis GTPázok és a klatrin mediált endocitózis

Az endocitózis egyik legáltalánosabb formája, a receptor mediált endocitózis során a ligandkötött receptorok alatt a membrán betűródik és egy klatrin burkos mélyedés alakul ki, amelyet aztán a dinamin fehérje lecsíp, a mélyedés tehát internalizálódik és innentől klatrin burkos vezikulumnak hívjuk. A klatrin burkot

a vezikulum gyorsan elveszíti, a kialakult képlet neve korai endocitotikus vezikulum, amelynek a membránját meghatározó legismertebb fehérje a Rab5 kis GTPáz [2, 3].



1. ábra. A) Rab ciklus vázlatosan (részletes magyarázat a szövegben). **B) A vezikula-fúziókban szereplő legfontosabb fehérjék** (a SNARE fehérjéket a képen különböző színű hullámvonalak jelölik).

Mielőtt azonban tovább mennénk az endocitotikus vezikulum sorsát illetően, tekintsük át röviden mik is azok a Rab kis GTPázok. A Rab fehérjék a Ras kis GTPázok közé tartozó monomer G fehérjék és az Arf kis GTPázokkal (amelyek szintén a Ras szupercsaládba tartoznak) együtt a sejten belüli membránforgalom legfőbb szabályozói. Lényegében időzített molekuláris kapcsolóknak tekinthetők, amelyek bekapcsolt állapotban GTP kötöttek és membránokhoz asszociálódnak, míg kikapcsolt állapotban GDP kötöttek és a citoszólban szolubilis helyezkednek el. A bekapcsolásukat GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) fehérjék végzik úgy, hogy az inaktív Rab fehérje által kötött GDP-t GTP-re cserélik, ami elősegíti a Rab - itt nem részletezett módon történő - célmembránhoz asszociálódását. A Rab-ok azért tekinthetők időzített kapcsolóknak, mert GTPáz aktivitással bírnak, azaz a megkötött GTP-t képesek elhidrolizálni, így csak korlátozott ideig képesek aktív állapotban maradni. A GTP hidrolízisét, azaz a Rab kikapcsolását GAP (GTPase-Activating Protein) fehérjék segítik, majd az inaktív Rab fehérjét GDI (GDP Dissociation Inhibitor) fehérjék jutattják vissza a citoszólba és a ciklus kezdődhet előlről (1.A ábra). Az aktivált Rab fehérje legfontosabb tulajdonsága, hogy számos effektor fehérje tud hozzá

kapcsolódni, amelyek a membrán további sorsát fogják meghatározni. A teljesség igénye nélkül ilyen effektorok lehetnek különféle motorfehérjék, kinázok, foszfatázok, pányvázófaktorok [1, 3, 4].

A korai endocitotikus vezikulum membránjához asszociált Rab5 fehérje tehát olyan fehérjéket toboroz a membránhoz, amelyek a vezikulumot tovább irányítják az endo-lizoszómális út következő állomása felé, amely a korai endoszóma. A korai endocitotikus vezikulumok egymással és magával a korai endoszómával is képesek egyesülni. A korai endoszóma membránjában főleg még Rab5 fehérjét találunk, de bizonyos membránrészletek Rab4 vagy Rab11 kis GTPázát is tartalmaznak. Ugyanis a korai endoszóma az a sejtszervecske, amelyben a felvett receptorok, ligandumok stb. további sorsa eldől. Azok a receptorok (és ligandjaik), amelyek a fentebb említett két Rab fehérje által meghatározott membránrészletekbe kerülnek, visszajutnak, azaz reciklizálódnak a plazmamembránba, míg a többi sorsa a lizoszómális lebontás. Ugyanis az aktív Rab5 olyan fehérjéket is köt, amelyek a membránhoz egy másik Rab fehérjét, a Rab7-et toborozzák. Amire az endoszóma membránja már kizárólag Rab7-et tartalmaz, addigra az endoszóma morfológiája markánsan megváltozik: a membránban megtalálható ligandum-receptor komplexek apró intraluminális vezikulumokba kerülnek, így a kialakult organellumot már multivezikuláris testnek, más néven késői endoszómának nevezzük. A Rab7 fehérje pedig olyan effektorokat képes toborozni, amelyek a késői endoszóma-lizoszóma fúziót hajtják végre, így a felvett anyag megemésztődhet [2, 3].

Fúziós lépések az endo-lizoszómális rendszerben

Mint a fenti bevezetőből kitűnik az endoszómális út számos fúziós lépést tartalmaz: a korai endocitotikus vezikulumok egymással és a korai endoszómákkal, a különféle endoszómák pedig egymással és lizoszómákkal képesek fuzionálni. A lizoszóma a sejt számára nagyon fontos organellum, amelybe nemcsak az endoszómális rendszer szállítmánya érkezik, hanem többek között a sejt által lebontásra ítélt saját anyagokat (autofágia) és szekréciós granu-

lumokat (krinofágia) is a lizoszómális rendszer bontja le. A lizoszómális fúziókat a Rab7, Rab2 és az Arl8 kis GTPázok szabályozzák [5-11].

A vezikulafúziók a legtöbb esetben hasonlóan zajlanak, és egyik fontos kezdeti lépésük az, hogy az aktivált Rab fehérjéhez pányvázófaktorok toborzódnak. Ezek állhatnak egy fehérjéből vagy lehetnek több alegységes fehérje komplexek egyaránt. Az viszont közös bennük, hogy Rab-GTP kötésre képesek, így a fúzionálandó membránokat/vezikulumokat egymáshoz rögzítik. Ezt követően ide SM (Sec1/Munc18) fehérjék toborzódnak és összeszerelődik a 3 vagy 4 alegységből álló, de minden esetben 4 SNARE (Soluble NSF Attachment protein REceptor) domaint tartalmazó transz-SNARE komplex. A SNARE fehérjék közül az egyik az egyik membránban, a többi pedig a másikban helyezkedik el, és egymásra tekeredve képesek a két membránt összenyomva egyesíteni. Ezt a folyamatot az SM fehérjék, vagy bizonyos esetekben maga a pányvázó komplex is katalizálja (1.B ábra) [1, 12].

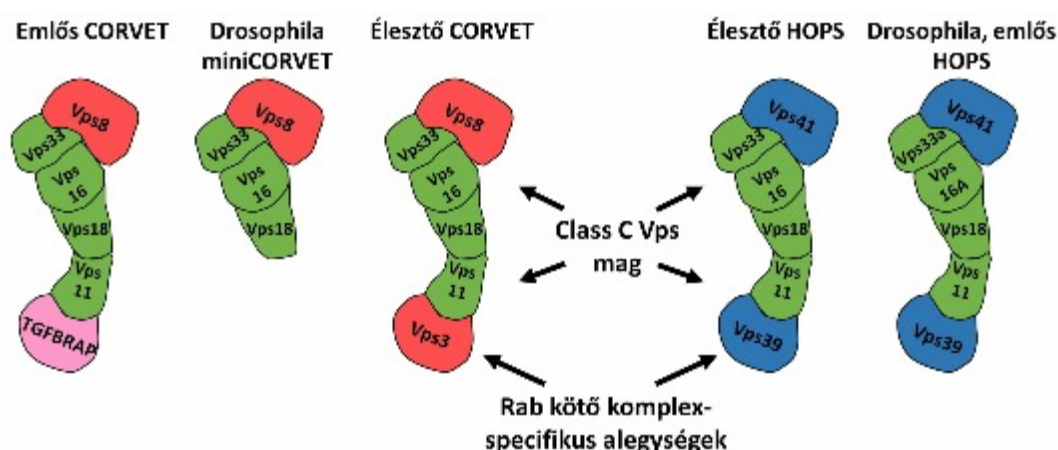
Ezáltal belátható, hogy a fúziós eseményeket irányító fehérjék nélkül vezikulafúzió, tehát a dinamikus sejtműködés elképzelhetetlen. Ma már több mint 60 SNARE fehérjét és számos pányvázó faktort ismerünk, amelyek a sejten belüli membrántranszport folyamat valamelyikére többé kevésbé specifikusak. Így ismerünk pl. a Golgi készülék (pl. COG (Conserved Oligomeric Golgi Complex) vagy exocitózis/szekréció (pl. exocyst complex) specifikus komplexet is [13, 14].

Tanszékünkön nagy hagyománya van az egyik fő lizoszómális út, az autofágia tanulmányozásának. Ahogyan azt fentebb is láthattuk, lizoszómába nemcsak autofág, tehát saját eredetű anyag érkezik, hanem pl. endoszómális eredetű is, így az utóbbi években egyre inkább az autofág és endocitotikus folyamatokat, mint egymástól nem teljesen elválasztható lebontó útvonalakat vizsgáljuk. A munkánk kezdetén viszont azzal a problémával szembesültünk, hogy míg az elmúlt évtizedekben az autofágia vizsgálatára a lárvális muslica zsírszövet szinte tökéletes modell szervnek bizonyult és számos riporter, reagens és metódus áll

rendelkezésünkre [15, 16], addig az endocitózis, különös tekintettel az endoszómális fúziók vizsgálatára ilyen jól használható eszközkészletünk nem volt. Viszont egy szerencsés véletlen következtében, amely egy különleges pányvázó faktornak köszönhető, a helyzet mára sokat javult.

A több alegységes endoszómális-lizoszómális pányvázófaktorok - CORVET és HOPS

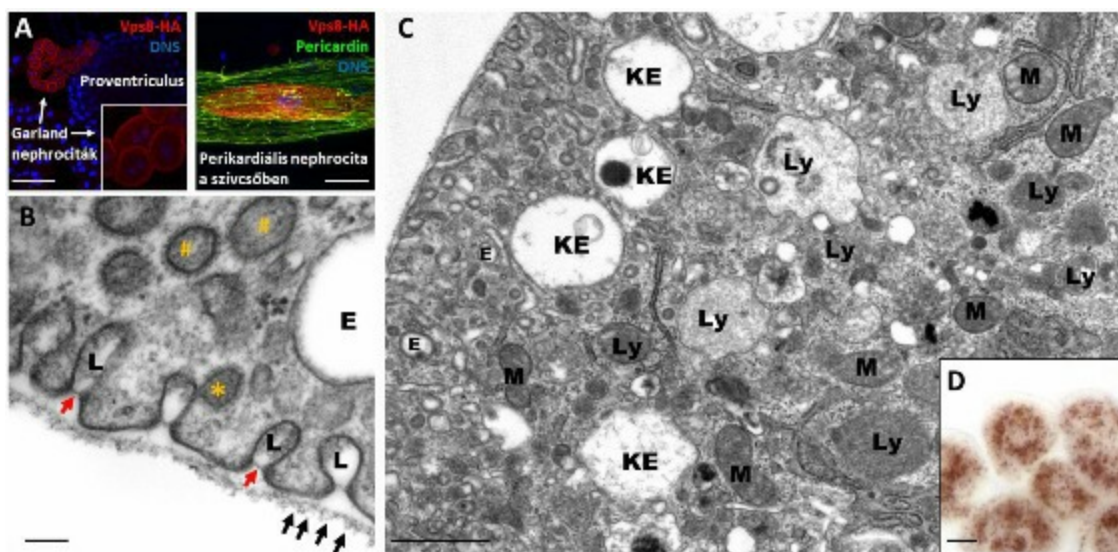
Az endoszómális-lizoszómális pányvázófaktorok és számos egyéb fehérje többségét élesztőben azonosították először, amelyek a legtöbb esetben konzerváltak többsejtűekben is. Így pl. az említett Rab5 és Rab7 fehérjék, a Rabenosyn-5 (Rbsn-5) fehérje (amely Rab5 tartalmú membránok, azaz korai endoszómák és endocitotikus vezikulumok pányvázója) vagy a hat alegységes HOPS (HOmotypic fusion and vacuole Protein Sorting, a Rab7, Rab2 és Arl8 tartalmú membránok, azaz a Golgi vezikulumok, késői endoszómák, autofagoszómák és lizoszómák pányvázója) homológjai mind megtalálhatóak magasabb rendű élőlényekben [6, 17, 18]. Azonban volt egy viszonylag későn azonosított komplex, amelynél a konzerváltság egyáltalán nem egyértelmű. Ez a komplex a CORVET (class C cORE Vacuole/Endosome Tethering) nevet viseli és hasonló a HOPS komplexhez.



2. ábra. Különböző CORVET és HOPS komplexek felépítése. Zöld színnel a Class C Vps-ek vannak jelölve, amelyek a komplexek központi részét alkotják. A HOPS specifikus Rab7 kötő alegységeket kék szín jelöli. A CORVET specifikus Rab5 kötő fehérjéket pedig piros vagy lila szín. Mivel a TGFBRAP a HOPS-ban megtalálható Vps39 paralógja, a lila szín a két fehérje rokonságát, illetve az élesztőben megtalálható Vps3-tól való eltérést mutatja.

Élesztőben mindkét komplex tartalmaz 4 közös alegységet, a Vps (Vacuolar protein sorting) 11, 16, 18 és 33 fehérjét, és közülük a Vps33 SM fehérje aktivitással is bír, tehát a komplexek a pályvázáson kívül a SNARE működéshez is fontosak [12, 19].

A 4 alegységes „class C” mag két ellentétes végén pedig Rab kötő alegységek találhatóak: a CORVET-ben a Rab5 kötésért felelős Vps8 és Vps3, a HOPS-ban pedig a Rab2, illetve Rab7 kötő Vps41 és Vps39 (2. ábra) [5, 8]. A két komplexet alkotó fehérjék egy kivételével mind konzerváltak, azonban a CORVET specifikus Vps3 kizárólag gombákban van jelen. Így a CORVET létezése magasabb rendűekben erősen kétséges volt. Nemrég mutatták be, hogy talán a Vps39 paralógja, a TGFBRAP1 töltheti be emlősökben a hiányzó Vps3 funkcióját, de hogy pontosan mit is csinál az emlős CORVET és pontosan milyen endoszómákat pályváz, az kérdéses [20, 21].



3. ábra. A) A Vps8-HA riporter (az ábrán piros) a lárvális kiválasztósejtekben fejeződik ki (bal oldali mérce: 100 μ m, jobb oldali mérce: 20 μ m, a Pericardin fehérje (a képen zöld színben) a szívcső falát jelöli ki). A sejtmagokat a DNS-t kék színnel festő fluoreszcens festékkel tettük láthatóvá. **B) A garland nefrocita lakúnaíinak (L) és ultraszűrő membránjának (piros nyilak) elektronmikroszkópos képe.** Csillag: klatrin burkos mélyedés, kettőskereszt: klatrin burkos vezikulum, E: korai endoszóma, fekete nyilak: alaphártya. Mérce: 200 nm. **C) A garland nefrocita citopazmája számos endoszómát és lizoszómát tartalmaz.** E: korai endoszóma, KE: késői endoszóma, Ly: lizoszóma, M: mitokondrium. Mérce: 1 μ m. **D) AgNO₃ tartalmú táptalajon nevelt muslialárva garland sejtjeiben jól láthatóak az ezüstöt tartalmazó raktározó lizoszómák (barna pöttyök).** Mérce: 20 μ m. Az ábra A) panelje a következő publikációból származik [22], ami a CC BY 4.0 licenz alapján szabadon felhasználható.

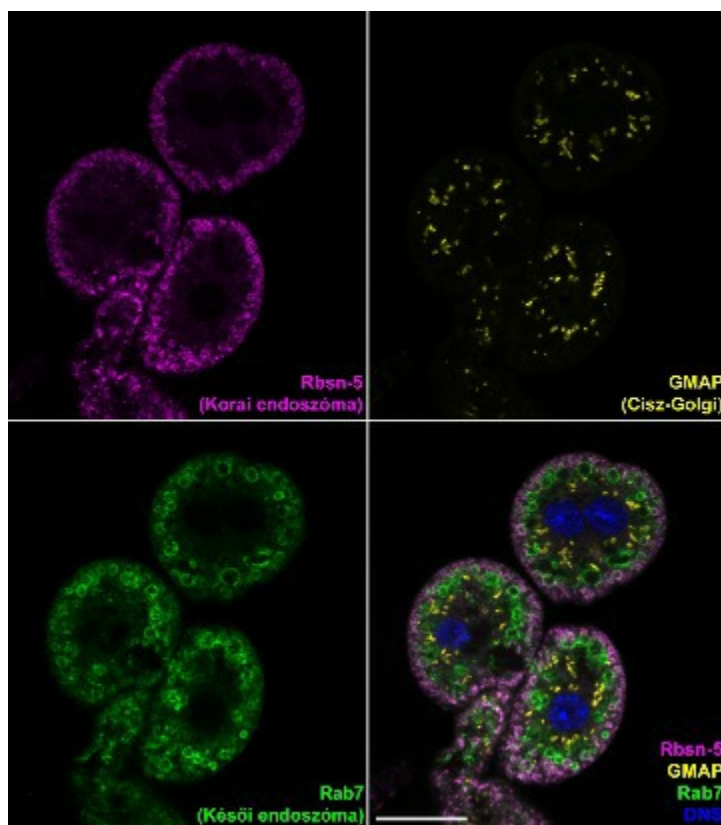
Muslicában viszont az a különleges, hogy genomjában sem *vps3* sem *tgfbra1/vps39-2* nincs jelen, de a *vps8* gén igen. Ezért azt szerettük volna kideríteni, hogy mi a funkciója a Vps8-nak muslicákban, illetve létezhet-e valamilyen más komplexforma az élesztő és emlős CORVET komplexen kívül. Első lépésben riportert készítettünk, amely a *vps8* gén promótere által szabályozottan fejeztet ki Vps8-HA (HA: hemagglutinin) fúziós fehérjét. Viszont, amikor a hemagglutinin-tagre specifikus ellenanyaggal megfestettük a lárvális muslica-szerveket kiderült, hogy szinte az összes szervben a festhetőség alatti szinten fejeződött ki a riporter. Ez alól a vérsejtek (és lárvális nyirokszervek), valamint a lárvális kiválasztó sejtek kivételnek bizonyultak (3.A ábra) [22]. Ez nagyon fontos nyom volt a számunkra, ugyanis ezek a sejtek végeznek legintenzívebben endocitózist a muslica lárvákban. A vérsejtek elsősorban fagocitálnak, és a fagocitózis vizsgálatának fontos modelljei. A kiválasztó sejtek pedig, ahogy a nevük is mutatja a kiválasztó rendszer részei, de több szempontból is különböznek a gerincesek hasonló funkciójú sejtjeitől.

A rovarok különleges kiválasztó sejtjei

Az emlősöktől eltérően a rovarok kiválasztó rendszere két részből áll. A szélesebb körben ismert Malpighi edények a nitrogén-, víz- és ionháztartásáért felelősek, míg a kiválasztó sejtek elsősorban a testfolyadékban található fölösleges/káros anyagokat próbálják meg eltávolítani vagy legalább izolálni [23]. A kiválasztó sejtek a szívcső falában és a nyelőcső körül koszorúszerűen helyezkednek el. Előbbiek neve perikardiális nefrocita, utóbbiak a garland nefrociták (a garland angolul koszorút, girlandot jelent). A két sejtfeleség lényegében ugyanazt a feladatot végzi, a felépítésük szinte teljesen azonos, különbség az elhelyezkedésük mellett a sejtmagok számában (a perikardiális sejt egy, a garland sejt két magvú) és a sejthalakban (az előbbi elnyújtottabb) van (3.A ábra) [23].

Elhelyezkedésükből következik, hogy nem csatlakoznak csőrendszerhez, így a „kiválasztandó” anyagokat a szó szoros értelmében nem képesek kiválasztani.

Mivel a rovar keringési rendszer nyílt, így a hemolimfa nyomása nem elégséges ahhoz, hogy a szűrőmembránon keresztül egy kiválasztó csőbe préselje a szűrletet. A megoldást a sejt felszínén kell keresnünk: a sejtfelszínük rendkívüli mértékben lakúnákkal (a plazmamembrán árkaival, betűródéseivel) borított, amelyek nyílását ultraszűrő membrán zárja le (3.B ábra). Ez a membrán ultrastruktúráját és fehérjekészletét tekintve szinte azonos az emberivel, nagyon szép példát mutatva arra, hogy olyan élőlényekben és szervekben találhatunk homológiát, amelyben első ránézésre nem is várnánk [24]. A lakúnák, betűródések mélyén pedig rengeteg klatrin burkos mélyedés található, amely mutatja, hogy itt igen intenzív endocitózis zajlik, tehát lényegében a sejt folyamatosan veszi fel innen a hemolimfát, az ultraszűrő membránon mintegy „átszívva” (3.B ábra). A felvett anyagot azután vagy reciklizálja, vagy lizoszómális rendszere segítségével bontja le. Azokat az anyagokat, pl. nehézfémeket, amikkel nem tud mit kezdeni, a lizoszómaiban elraktározza (3.D ábra).



4. ábra. Vad típusú *ecetmuslica* lárvális kiválasztósejtjeinek képe korai endoszómát (Rbsn-5, az ábrán magenta), késői endoszómát (Rab7, az ábrán zöld) és cisz-Golgi készüléket (GMAP, az ábrán sárga) felismerő ellenanyagokkal történt immunfestést követően. A sejtmagot jelölő DNS festék kék színnel látható. Mércé: 20 μ m.

Emiatt a rovar kiválasztó sejtek összességét a klasszikus irodalom „raktározó típusú” vesének nevezi [25, 26]. Bár sok különbség van a rovar és a gerinces vese között, az ultraszűrő membrán homológiája miatt a rovar nefrociták a kiválasztó funkciók vizsgálatának kedvelt modelljei, de ahogy azt alább látni fogjuk, másra is kitűnően alkalmasak.

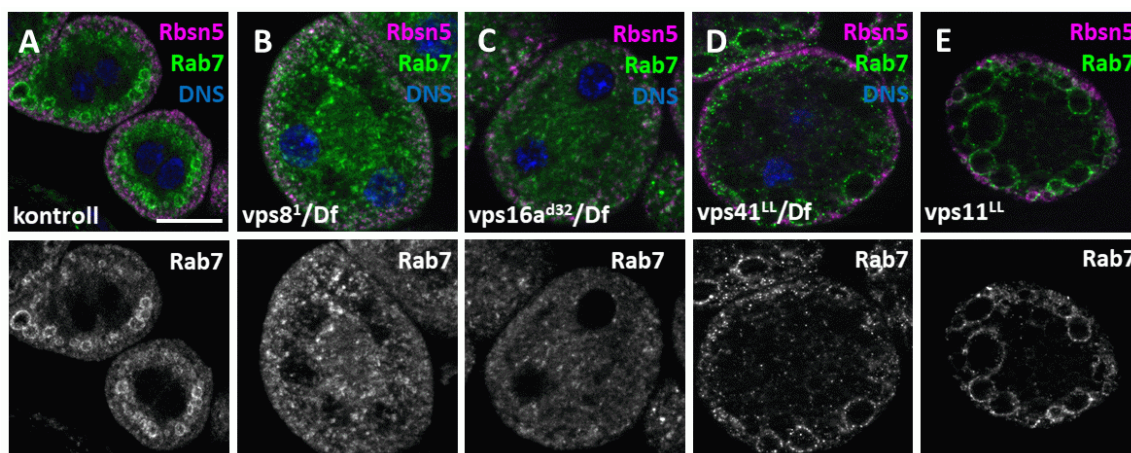
Egy különleges pányvázókomplex, a miniCORVET azonosítása

A Vps8-HA riporter mutatta meg nekünk, hogy nefrocitákkal kell dolgoznunk, ha a CORVET funkcióit szeretnénk muslicában tanulmányozni. Ez a sejtfeleség folyamatos, tehát nem indukált endocitózist végez, ráadásul viszonylag állandó sebességgel. Ennek köszönhetően a garland nefrocita mind fény, mind elektron-mikroszkópos szinten nagyon jellegzetes és szép felépítést mutat: a sejtmembrán alatt közvetlenül a korai endoszómák és endocitotikus vezikulumok rétege található, alatta a nagyobb átmérőjű Rab7 pozitív késői endoszómák rétege található, és ezzel részben átfedve, de a sejtmagokhoz közelebb pedig a lizoszómák és Golgi készülékek rétege van (3.C ábra, 4. ábra). A sejtben legbelül nagy kiterjedésű ER és két sejtmag található. Mivel ezek a rétegek normálisan mindig jelen vannak az állatban, így bármi, ami az endocitózis/lizoszóma képződés folyamatát megzavarja igen látványos és jól detektálható fenotípust okoz.

Felismertük, hogy a Vps8 hiányában a késői endoszómák mérete igen apró lesz, míg a korai endoszómák mérete lényegében nem változik (5.A, B ábra). Mivel a Vps8 korai endoszómákon Rab5-öt köt, így feltételezhető, hogy ilyenkor a korai endoszómák kialakulnak, a korai endocitotikus vezikulumok tudnak egyesülni, de a korai endoszómák fúziója hiányában azok csak apró késői endoszómákká képesek alakulni [22].

Mivel a fenotípus alapján a Vps8 szükséges az endoszómális fúziókhoz, ezért a HA-tag-et csaliként felhasználva ko-immunoprecipitációs és tömegspetrometriás vizsgálatokat végeztünk, hogy megállapítsuk, hogy vajon létezik-e CORVET a

muslicában. Meglepetésünkre sikerült kifognunk a Vps8-HA-val a CORVET és HOPS közös alegységeit, azaz a class C Vps fehérjéket, de csak hármat!



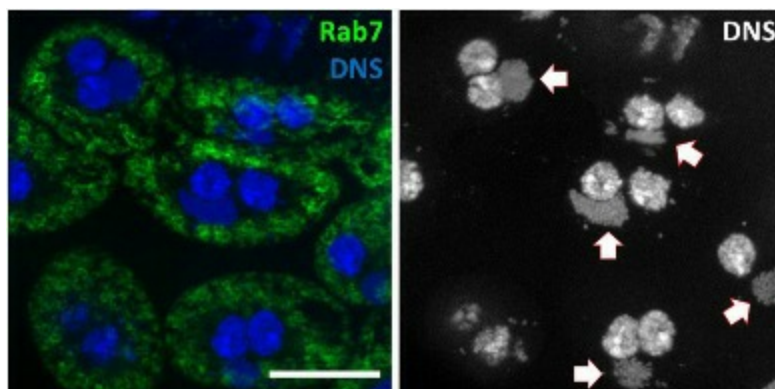
5. ábra. MiniCORVET és HOPS mutáns kiválasztósejtekben az endoszómák mérete, eloszlása látványosan megváltozik. A kontrollhoz (A) képest a miniCORVET specifikus Vps8 (B) vagy a Vps16A (C) class C Vps fehérje (amely mindkét komplexben benne van) hiányában, a korai endoszómális fúziók hiánya miatt, a Rab7 pozitív (a kompozit képeken zöld) késői endoszómák sokkal kisebbek és szinte kitöltik a citoplazmát. A HOPS specifikus Vps41 (D) hiányában a Rab7 pozitív (a kompozit képeken zöld) késői endoszómák nem tudnak lizoszómákkal fúzióálni, ezért méretük látványosan megnő. Mivel a Vps11 class C Vps fehérje hiányában a fenotípus a Vps41 mutáns fenotípussal és nem a Vps8 mutánssal egyezik meg, ezért a Vps11 nem része a miniCORVETnek. A magenta színnel jelölt Rbsn-5 pozitív korai endoszómák mérete, eloszlása egyik mutánsban sem változik számottevően. A sejtmagokat a DNS-t kék színnel festő fluoreszcens festékkel tettük láthatóvá. A színes kompozitképek alatt a Rab7 pozitív késői endoszómákat mutató csatorna fekete-fehéren is be van mutatva. Az ábra a következő publikációból származik: [22] amely a CC BY 4.0 licenz alapján szabadon felhasználható. Mércse: 20 μ m.

A Vps18, Vps33A és Vps16A komplexben volt a Vps8-al, de a Vps11 nem. Ráadásul, míg a Vps8-al kölcsönható három class C fehérje hiányában a Rab7 mintázat a Vps8 mutáns fenotípussal megegyezőnek bizonyult, addig a Vps11 mutáns állatok késői endoszómái nemhogy nem kisebbek, hanem pont ellenkezőleg, hatalmasak. Ez a fenotípus pedig teljesen megegyezett a Vps39 és Vps41 HOPS specifikus alegységek funkcióvesztéses fenotípusával (5.A,D,E ábra). Ez arra utal, hogy muslicákban létezik ugyan CORVET, viszont az kisebb - hat helyett négy alegységes - ezért miniCORVET-nek neveztük el (2. ábra). Az, hogy hogyan is működhet ez a kisebb komplex, az még nyitott kérdés. Eredményeink alapján azt feltételezzük, hogy más pányvázófaktorokkal (pl. Rabenosyn-5) működhet együtt, de ennek a lehetőségnek az igazolása/vizsgálata még hátra van [22].

A miniCORVET azonosítása egy további fontos jelentőséggel bírt: kezünkbe került az a sejttípus, amely kitűnően alkalmas az endoszómális transzport és lebontás vizsgálatára. Viszonylag könnyen preparálható, folyamatos endocitózist végez és benne az organellek olyan méretűek és elhelyezkedésűek, hogy azok fény- és elektronmikroszkópiával egyaránt könnyen azonosíthatóak. Korai endoszómális fúziók hiányában kisebb endoszómák keletkeznek (ez megjelenhet a korai, illetve késői endoszómák szintjén is). Lizoszóma biogenezis és fúziós hiba esetén, a lebontás hiánya miatt a késői endoszómák és hibás lizoszómák óriásira nőnek [22].

Nefrociták használata a jövőben

A fentebbiek ismeretében egyértelműnek tűnik, hogy ezek a sejtek endocitózis vizsgálatára kitűnőek, ennek ellenére meglepő, hogy nagyon kevés endocitózisról/lizoszómákról szóló cikk született ennek a sejttípusnak a tanulmányozásával. Ezek azonban egyáltalán nem elhanyagolható jelentőségűek: ebben a sejttípusban ismerték fel pl. az elsők között, hogy a dinamin csípi le az endocitotikus vezikulákat a membránról [27, 28], vagy hogy az ESCRT-0 alegysége, a Hrs szükséges az endoszómák által felvett receptor-ligandkomplexek intraluminális vezikulákba történő felvételéhez, azaz a multivezikuláris test képzéshez [29]. Egy későbbi munkánk során többek között a muslica nefrocitákkal sikerült igazolnunk, hogy a Rab2 Golgi Rab kis GTPáz szükséges a lizoszóma biogenezishez, így az endoszómális és autofág lebontáshoz [6].



6. ábra. *Wolbachia*-val fertőzött *ecetmuslica* lárvális kiválasztósejtekben baktériumcsoportok DNS-festékekkel láthatóvá tehetőek (nyilak). Mércse: 20 μ m.

A fentieken kívül számos génről és fehérjéről feltételezzük, hogy a fentebb leírt folyamatokban szükségesek, így az ezzel a sejtféleséggel végzett munkáink nem fejeződtek be, sőt ugyancsak a véletlennek köszönhetően új távlatok is megnyíltak előttünk: néhány törzsben a két sejtmag mellett apró DNS festékekkel festhető rögzöket találtunk, amelyekről kiderült, hogy azok *Wolbachia pipientis* [30] baktériumok (6. ábra).

A *Wolbachia* egy Gram negatív intracelluláris baktérium, amely a Föld egyik legelterjedtebb parazitája. A szárazföldi ízeltlábú fajok 40%-ából kimutatható, de más gerincteleneket, pl. emberi kórokozó féregfajokat is fertőz. [31]. Obligát parazita, azaz gazdaszervezet nélkül életképtelen, ezért endoszimbiontának vagy reprodukív parazitának tekintik [32]. A túlélésért cserébe a gazdaszervezet más patogénekkel szembeni ellenállóképessége látványosan megnövekszik [33, 34]. A feltételezések szerint a baktériumot a sejtek valószínűleg receptor-mediált endocitózissal veszik fel. [35] Az, hogy hogyan is alakulnak ki a *Wolbachia* tartalmú vakuólumok, még egyáltalán nem ismert, véleményünk szerint ennek a kérdésnek a megválaszolására is alkalmas lehet a garland nefrocita.

Irodalomjegyzék

- [1] Wickner, W., Schekman, R. (2008) Membrane fusion. *Nature structural & molecular biology*, **15 (7)**: 658-64.
- [2] Doherty, G.J., McMahon, H.T. (2009) Mechanisms of endocytosis. *Annual review of biochemistry*, **78**: 857-902.
- [3] Stenmark, H. (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **10 (8)**: 513-25.
- [4] Zhen, Y., Stenmark, H. (2015) Cellular functions of Rab GTPases at a glance. *Journal of cell science*, **128 (17)**: 3171-3176.
- [5] Balderhaar, H.J., Ungermann, C. (2013) CORVET and HOPS tethering complexes—coordinators of endosome and lysosome fusion. *Journal of cell science*, **126 (6)**: 1307-1316.

- [6] Lorincz, P., Toth, S., Benko, P., Lakatos, Z., Boda, A., Glatz, G., Zobel, M., Bisi, S., Hegedus, K., Takats, S., Scita, G., Juhasz, G. (2017) Rab2 promotes autophagic and endocytic lysosomal degradation. *The Journal of cell biology*, **216 (7)**: 1937-1947.
- [7] Hegedus, K., Takats, S., Boda, A., Jipa, A., Nagy, P., Varga, K., Kovacs, A.L., Juhasz, G. (2016) The Ccz1-Mon1-Rab7 module and Rab5 control distinct steps of autophagy. *Molecular biology of the cell*, **27 (20)**: 3132-3142.
- [8] Solinger, J.A., Spang, A. (2013) Tethering complexes in the endocytic pathway: CORVET and HOPS. *The FEBS journal*, **280 (12)**: 2743-2757.
- [9] Pankiv, S., Alemu, E.A., Brech, A., Bruun, J.A., Lamark, T., Overvatn, A., Bjorkoy, G., Johansen, T. (2010) FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport. *The Journal of cell biology*, **188 (2)**: 253-69.
- [10] Csizmadia, T., Lorincz, P., Hegedus, K., Szeplaki, S., Low, P., Juhasz, G. (2018) Molecular mechanisms of developmentally programmed crinophagy in *Drosophila*. *The Journal of cell biology*, **217 (1)**: 361-374.
- [11] McEwan, D.G., Popovic, D., Gubas, A., Terawaki, S., Suzuki, H., Stadel, D., Coxon, F.P., Miranda de Stegmann, D., Bhogaraju, S., Maddi, K., Kirchof, A., Gatti, E., Helfrich, M.H., Wakatsuki, S., Behrends, C., Pierre, P., Dikic, I. (2015) PLEKHM1 regulates autophagosome-lysosome fusion through HOPS complex and LC3/GABARAP proteins. *Molecular cell*, **57 (1)**: 39-54.
- [12] Sudhof, T.C., Rothman, J.E. (2009) Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science (New York, N.Y.)*, **323 (5913)**: 474-7.
- [13] Brocker, C., Engelbrecht-Vandre, S., Ungermann, C. (2010) Multisubunit tethering complexes and their role in membrane fusion. *Current biology : CB*, **20 (21)**: R943-52.
- [14] Lürick, A., Kümmel, D., Ungermann, C. (2018) Multisubunit tethers in membrane fusion. *Current Biology*, **28 (8)**: R417-R420.
- [15] Lorincz, P., Mauvezin, C., Juhasz, G. (2017) Exploring Autophagy in *Drosophila*. *Cells*, **6 (3)**:

- [16] Nagy, P., Varga, A., Kovacs, A.L., Takats, S., Juhasz, G. (2015) How and why to study autophagy in *Drosophila*: it's more than just a garbage chute. *Methods*, **75**: 151-61.
- [17] Kummel, D., Ungermann, C. (2014) Principles of membrane tethering and fusion in endosome and lysosome biogenesis. *Current opinion in cell biology*, **29**: 61-6.
- [18] Khatter, D., Raina, V.B., Dwivedi, D., Sindhwani, A., Bahl, S., Sharma, M. (2015) The small GTPase Arl8b regulates assembly of the mammalian HOPS complex on lysosomes. *Journal of cell science*, **128 (9)**: 1746-61.
- [19] Fratti, R.A., Wickner, W. (2007) Distinct targeting and fusion functions of the PX and SNARE domains of yeast vacuolar Vam7p. *Journal of Biological Chemistry*, **282 (17)**: 13133-13138.
- [20] Perini, E.D., Schaefer, R., Stoter, M., Kalaidzidis, Y., Zerial, M. (2014) Mammalian CORVET is required for fusion and conversion of distinct early endosome subpopulations. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, **15 (12)**: 1366-89.
- [21] Lachmann, J., Glaubke, E., Moore, P.S., Ungermann, C. (2014) The Vps39-like TRAP1 is an effector of Rab5 and likely the missing Vps3 subunit of human CORVET. *Cellular logistics*, **4 (4)**: e970840.
- [22] Lorincz, P., Lakatos, Z., Varga, A., Maruzs, T., Simon-Vecsei, Z., Darula, Z., Benko, P., Csordas, G., Lippai, M., Ando, I., Hegedus, K., Medzihradszky, K.F., Takats, S., Juhasz, G. (2016) MiniCORVET is a Vps8-containing early endosomal tether in *Drosophila*. *eLife*, **5**.
- [23] Denholm, B., Skaer, H. (2009) Bringing together components of the fly renal system. *Current opinion in genetics & development*, **19 (5)**: 526-32.
- [24] Weavers, H., Prieto-Sanchez, S., Grawe, F., Garcia-Lopez, A., Artero, R., Wilsch-Brauninger, M., Ruiz-Gomez, M., Skaer, H., Denholm, B. (2009) The insect nephrocyte is a podocyte-like cell with a filtration slit diaphragm. *Nature*, **457 (7227)**: 322-6.
- [25] Kowalevsky, A. (1889) Ein Beitrag zur Kenntnis der Excretions-organe. *Biol Centralbl*, **9**: 74-79.

- [26] Wigglesworth, V.B. (1943) The fate of haemoglobin in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and other blood-sucking arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **131 (865)**: 313-339.
- [27] Narita, K., Tsuruhara, T., Koenig, J.H., Ikeda, K. (1989) Membrane pinch-off and reinsertion observed in living cells of *Drosophila*. *Journal of cellular physiology*, **141 (2)**: 383-91.
- [28] Kosaka, T., 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*, **97 (2)**: 499-507.
- [29] Lloyd, T.E., Atkinson, R., Wu, M.N., Zhou, Y., Pennetta, G., Bellen, H.J. (2002) Hrs regulates endosome membrane invagination and tyrosine kinase receptor signaling in *Drosophila*. *Cell*, **108 (2)**: 261-269.
- [30] Hertig, M., Wolbach, S.B. (1924) Studies on rickettsia-like micro-organisms in insects. *The Journal of medical research*, **44 (3)**: 329.
- [31] Zug, R., Hammerstein, P. (2012) Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. *PloS one*, **7 (6)**: e38544.
- [32] Charlat, S., Hurst, G.D.D., Merçot, H. (2003) Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. *Trends in Genetics*, **19 (4)**: 217-223.
- [33] Teixeira, L., Ferreira, Á., Ashburner, M. (2008) The Bacterial Symbiont *Wolbachia* Induces Resistance to RNA Viral Infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biology*, **6 (12)**: e1000002.
- [34] Martinez, J., Longdon, B., Bauer, S., Chan, Y.S., Miller, W.J., Bourtzis, K., Teixeira, L., Jiggins, F.M. (2014) Symbionts commonly provide broad spectrum resistance to viruses in insects: a comparative analysis of *Wolbachia* strains. *PLoS Pathog*, **10 (9)**: e1004369.
- [35] White, P.M., Pietri, J.E., Debec, A., Russell, S., Patel, B., Sullivan, W. (2017) Mechanisms of Horizontal Cell-to-Cell Transfer of *Wolbachia* spp. in *Drosophila melanogaster*. *Applied and environmental microbiology*, **83 (7)**:.



Lőrincz Péter 2009-ben szerzett biológus diplomát, majd Prof. Dr. Sass Miklós témavezetésével kezdte meg doktori tanulmányait az ELTE Anatómiai Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszékén, ahol 2012 januárjától egyetemi tanársegédként dolgozik, 2017-ben PhD fokozatot szerzett. 2014 nyarától Prof. Dr. Juhász Gábor kutatócsoportjában az endoszómák és autofagoszómák érési folyamatait vizsgálja. 2016-ban munkatársaival azonosította a korai endoszómák pányvázásához szükséges, addig ismeretlen miniCORVET komplexet. Eredményeiért 2016-ban elnyerte az Új Nemzeti Kiválósági Program doktorjelölti ösztöndíját. 2017-ben munkatársaival azonosított egy új, a lizoszómális lebontáshoz nélkülözhetetlen fehérjét, a Rab2-t. Jelenleg az ELTE Anatómiai Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszéken az MTA Prémium Posztdoktori Kutatói Program keretein belül a Wolbachia tartalmú vakuólum kialakulását és az autofagoszómák és endoszómák érési folyamatát vizsgálja.



Kenéz Lili Anna 2018-ban szerzett BSc diplomát az ELTE biológia szakán, dolgozatát a lizoszómák mozgásának molekuláris mechanizmusairól írta. Jelenleg MSc hallgatóként Prof. Dr. Juhász Gábor - az ELTE Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai tanszéken folyó - kutatásaiba kapcsolódott be. Dr. Lőrincz Péter témavezetése mellett a lizoszómális lebontás során fontos membránfúziós fehérjéket vizsgálja. 2015-óta az ELTE Bolyai Szakkollégiumának tagja, 2018-ban elnyerte az Új Nemzeti Kiválóság Program ösztöndíját a Wolbachia pipientis tartalmú vakuólum kialakulásának a tanulmányozására. Ugyanebben az évben megkapta a Nemzeti Felsőoktatási Ösztöndíjat is.



Juhász Gábor az autofágia vizsgálatából írta szakdolgozatát (1999, ELTE), PhD disszertációját (2004, ELTE), valamint habilitációs (2016, ELTE) és MTA Doktora értekezéseit (2016). 2004-2006 között a Minnesota-i Egyetemen dolgozott Tom Neufeld kutatócsoportjában, majd 2009-ben Wellcome Trust támogatással alapított saját labort az ELTE-n. 2015-től az MTA SZBK Lendület Drosophila Autofágia Kutatócsoportját vezeti tudományos tanácsadóként, emellett félállású egyetemi tanárként továbbra is oktat és kutat az ELTE Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszékén. Számos díj (pl. Bolyai ösztöndíj 2 alkalommal, Bolyai plakett) nyertese, a Molekuláris Sejt- és Neurobiológia Doktori program vezetője az ELTE-n, és az Autophagy szaklap (ötéves átlagos impakt faktor: 11,019) társszerkesztője (Associate Editor).