

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Reprodukční a vývojová biologie

Studijní obor: Reprodukční a vývojová biologie



Bc. Aneta Holšteinová

Vazebné proteiny myotubularinu 9

Binding proteins of MTMR9

Typ závěrečné práce:

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Lenka Doubravská, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 8. 2021

.....

Aneta Holšteinová

Poděkování

Touto cestou bych ráda upřímně poděkovala školitelce Mgr. Lence Doubravské Ph.D. za cenné rady, čas, trpělivost a vstřícnost při vedení diplomové práce. Mgr. Ondřeji Šebestovi a Mgr. Martinu Schätzovi Ph.D. děkuji za poskytnutí odborné podpory a zkušeností při práci s fluorescenčním mikroskopem a analýzou snímků. Mgr. Marii Macůrkové Ph.D., RNDr. Lence Libusové Ph.D. a všem kolegům z Laboratoře molekulární genetiky vývoje děkuji za vlídné přijetí a vytváření příjemného pracovního prostředí.

Abstrakt

Myotubulariny (MTMR) jsou lipidické fosfatázy, které defosforylují fosfatidylinositol (3)-fosfát (PI(3)P) a fosfatidylinositol (3,5)-bisfosfát (PI(3,5)P₂) na pozici 3 inositolového kruhu, čímž regulují složení lipidické vrstvy membránových kompartmentů. První člen rodiny byl popsán v souvislosti se závažnou dědičnou myopatií. Od té doby do rodiny přibylo dalších třináct členů. Katalyticky neaktivní MTMR9 nesoucí konzervovanou mutaci ve fosfatázové doméně reguluje lokalizaci markeru časné sekretorické dráhy, RAB1A, strukturu *cis*-Golgi a sekreci. MTMR9 interaguje s katalyticky aktivními fosfatázami MTMR6 a MTMR8, které specificky lokalizuje a zvyšuje jejich fosfatázovou aktivitu. Cílem diplomové práce bylo zjistit, zdali je fenotyp pozorovaný u buněk se změněnou hladinou MTMR9 závislý na aktivitě katalyticky aktivních fosfatáz MTMR6 a MTMR8. Prokázali jsme vliv MTMR6 a MTMR8 na distribuci transfekované RAB1A mezi intermediálním kompartmentem (IC) a Golgiho aparátem. MTMR6 a MTMR8 se podílejí také na regulaci struktury *cis*-Golgi. Pomocí dvou odlišných přístupů se nám nepodařilo objasnit vliv MTMR6 a MTMR8 na sekreci. Změna hladiny katalyticky aktivních fosfatáz MTMR6 a MTMR8 vede k podobnému fenotypu, který byl popsán u buněk se sníženou nebo zvýšenou hladinou MTMR9, což nasvědčuje regulaci lokalizace RAB1A, struktury Golgiho aparátu, a navíc lokalizace lysozomů prostřednictvím hladiny PI(3)P a PI(3,5)P₂.

Klíčová slova: MTMR6, MTMR8, MTMR9, RAB1A, PI(3)P, PI(3,5)P₂, endoplasmatické retikulum, intermediální kompartment, Golgiho aparát

Abstract

Myotubularins are lipid phosphatases that dephosphorylate phosphatidylinositol 3-phosphate and phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate the position three of the inositol ring. This allows them to regulate the structure of the lipid layer of the membrane compartment. The first member of the family was described in association with a severe hereditary myopathy. From that point on, another thirteen members have been added to the family. The catalytically inactive MTMR9 carrying the conserved mutation in the phosphatase domain regulates the localization of the marker of the early secretory pathway, RAB1A, the cis-Golgi structure and the secretion. MTMR9 interacts with the catalytically active MTMR6 and MTMR8 that specifically localizes and increases their phosphatase activity. The aim of this diploma thesis was to find out whether the phenotype observed in cells with altered MTMR9 levels is dependent on the catalytically active phosphatases MTMR6 and MTMR8. We proved the influence of MTMR6 and MTMR8 on the distribution of transfected RAB1A between the intermediate compartment and the Golgi apparatus. MTMR6 and MTMR8 also take part in regulating the cis-Golgi structure. By the use of two different approaches we did not manage to clarify the influence of MTMR6 and MTMR8 on secretion. Changes in the catalytic active phosphatase MTMR6 and MTMR8 levels lead to a similar phenotype that was previously described in cells with decreased or increased MTMR9 levels. This gives evidence of the regulation of localization of RAB1A, the Golgi apparatus and even the localization of lysosomes through phosphatidylinositol 3-phosphate and phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate levels.

Key words: MTMR6, MTMR8, MTMR9, RAB1A, PI(3)P, PI(3,5)P₂, endoplasmic reticulum, intermediate compartment, Golgi apparatus

Obsah

Seznam použitých zkratk	9
1. Úvod	12
2. Literární přehled	13
2.1. Proteiny příbuzné myotubularinu („myotubularin related proteins” - MTMR)	13
2.1.1. Substrát MTMR	14
2.1.1.1. PI(3)P	14
2.1.1.2. PI(3,5)P ₂	15
2.1.2. Funkce MTMR	15
2.1.3. Nemoci způsobené mutací v genech <i>MTMR</i>	16
2.1.4. Struktura <i>MTMR6</i> , <i>MTMR8</i> , <i>MTMR9</i>	17
2.1.4.1. Doména PH-GRAM	18
2.1.4.2. Doména PTP	18
2.1.4.3. Doména CC	19
2.1.5. <i>MTMR9</i>	19
2.1.5.1. Lokalizace <i>MTMR9</i>	19
2.1.5.2. Funkce <i>MTMR9</i>	19
2.1.6. <i>MTMR6</i>	20
2.1.6.1. Lokalizace <i>MTMR6</i>	21
2.1.6.2. Vazební partneři <i>MTMR6</i>	21
2.1.6.3. Funkce <i>MTMR6</i>	21
2.1.7. <i>MTMR8</i>	22
2.1.7.1. Lokalizace <i>MTMR8</i>	22
2.1.7.2. Funkce <i>MTMR8</i>	22
2.2. Transport váčků	24
2.2.1. RAB	24
2.2.1.1. Cyklus RAB	24
2.2.1.2. Struktura RAB	25
2.2.1.3. MTMR jako efekторы RAB	25
2.2.2. <i>RAB1A</i> a <i>RAB1B</i>	27
2.2.2.1. <i>RAB1</i> v signalizaci	27
2.2.2.2. <i>RAB1</i> v autofagii	28
2.2.3. <i>RAB1</i> v časně fázi sekretorické dráhy	28
2.2.2.3. ER	28
2.2.2.3.1. ERES	29
2.2.2.3.2. COPII	29
2.2.2.4. IC	30
2.2.2.4.1. Modely IC	30
2.2.2.4.2. Struktura IC	31
2.2.2.4.3. Funkce IC	32
2.2.2.5. COPI	33
2.2.2.6. Golgi	34
2.2.2.6.1. Struktura Golgi	34
2.2.2.6.2. Regulace struktury Golgi	34

2.2.2.6.3.	Struktura Golgi a neurodegenerativní onemocnění	35
3.	Cíle práce.....	38
4.	Materiál a metody	39
4.1.	Materiál	39
4.1.1.	Biologický materiál.....	39
4.1.2.	Média	39
4.1.3.	Roztoky a chemikálie	39
4.1.4.	Protilátky.....	42
4.1.5.	Enzymy	43
4.1.6.	Primery.....	43
4.1.7.	Vektory	44
4.1.8.	Komerční soupravy	45
4.2.	Metody	45
4.2.1.	Práce s buněčnými kulturami.....	45
3.2.2.	Gelová elektroforéza	46
3.2.3.	SDS PAGE elektroforéza	46
3.2.4.	<i>Western blot</i>	47
3.2.5.	Fixace a imunologické barvení	47
3.2.6.	Příprava buněčných linií „knock-out”	47
3.2.7.	Testování buněčných linií KO	49
3.2.8.	Transformace bakterií	52
3.2.9.	System RUSH.....	52
3.2.10.	Luciferázový test.....	53
3.2.11.	Konfokální mikroskopie a analýza dat.....	54
4.	Výsledky	56
4.1.	Lokalizace MTMR6 a MTMR8	56
4.2.	Vliv zvýšené hladiny MTMR6/MTMR8 na lokalizaci exogenně exprimované RAB1A	57
4.3.	Vytvoření buněčných linií „knock-out”	58
4.4.	Vliv delece <i>MTMR6</i> a <i>MTMR8</i> na lokalizaci RAB1A	61
4.5.	Vliv MTMR6 a MTMR8 na strukturu cis-Golgi	62
4.6.	Vliv exprese MTMR6 a MTMR8 na sekreci	66
4.7.	Vliv MTMR6 a MTMR8 na lysozomální systém	68
5.	Diskuze	70
6.	Závěr.....	78
7.	Seznam použité literatury	79

Seznam použitých zkratk

AD	Alzheimer's Disease	Alzheimerova choroba
AK	amino acid	aminová kyselina
alfa-syn	alfa-synuclein	alfa-synuklein
ALS	amyotrophic lateral sclerosis	amyotrofická laterální skleróza
ARF1	ADP-ribosylation factor 1	ADP-ribosylační faktor 1
Arp2/3	Actin related protein 2/3 complex	proteinový komplex 2/3 příbuzný aktinu
ATB	antibiotic	antibiotikum
BFA	Brefeldin A	Brefeldin A
bp	base pair	pár bází
CC	coiled-coil	doména svinuté cívky
CDK	Cyclin-dependent kinase	cyklin-dependentní kináza
CMT	Charcot-Marie-Tooth	Charcot-Marie-Tooth
COPI	coat protein complex I	obalový proteinový komplex I
COPII	coat protein complex II	obalový proteinový komplex II
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromatických repetit
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole	4',6-Diamidino-2-fenylindol
DENN	differentially expressed in normal cells and neoplasia	rozdílně exprimovaná v neoplastických a normálních buňkách
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Dulbekovo modifikované Eaglovo médium
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	kyselina ethylendiamintetraoctová
ER	endoplasmic reticulum	endoplasmatické retikulum
ERES	ER exit sites	výstupní místa ER
ERGIC53	ER-Golgi intermediate compartment 53 kDa protein	protein intermediálního kompartmentu o velikosti 53 kDa
FBS	fetal bovine serum	fetální bovinní sérum
GAP	GTPase activating protein	protein aktivující GTPázu
GBF1	Golgi-specific BFA resistance factor 1	faktor 1 rezistentní k BFA a specifický pro Golgi
GDF	GDI-displacement factor	faktor nahrazující GDI
GDI	Guanosine dissociation inhibitors	inhibitor disociace guanosinu
GDP	guanosine diphosphate	guanosindifosfát
GEF	guanine-nucleotide exchange factor	faktor pro výměnu guaninových nukleotidů
GM130	130 kDa cis-Golgi matrix protein	protein matrix <i>cis</i> -Golgi o velikosti 130 kDa
GRAM	glucosyltransferases, RAB-like GTPase activators and myotubularin	glukosyltransferáza, proteiny aktivující GTPázy podobné RAB a myotubulariny
GRASP65	Golgi reassembly-stacking protein of 65 kDa	strukturní protein Golgi o velikosti 65 kDa
gRNA	guide RNA	navádějící RNA
GTP	guanosine triphosphate	guanosintrifosfát
HeLa	Henrietta Lacks	Henrietta Lacksová
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzym A
HR	homologous recombination	homologní rekombinace
HRP	Horse-Radish Peroxidase	křenová peroxidáza
IC	intermediate compartment	intermediální kompartment

INPP5E	inositol polyphosphate-5-phosphatase E	inositolová polyfosfát-5 fosfatáza E
KCa3.1	calcium-activated potassium channel	kanál K ⁺ aktivovaný Ca ²⁺
KD	knock-down	snížení exprese
KO	knock-out	delece exprese
LAMP1	lysosomal-associated membrane protein 1	membránový protein 1 asociovaný s lysozomem
LB	lysogeny broth	lysogenní vývar
LC3	light chain 3	lehký řetězec 3
LRRK2	leucin-rich repeat kinase 2	kináza 2 bohatá na leucinové repetice
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney cells	psí ledvinové buňky Madin-Darby
MES	2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid	kyselina 2-(N-morfolino)-ethansulfonová (MES)
miRNA	microRNA	mikroRNA
MYO1C	myosin IC	myosin IC
MSB	microtubule stabilising buffer	pufr stabilizující mikrotubuly
MTM	myotubularin	myotubularin
MTMR	myotubularin related proteins	proteiny příbuzné myotubularinu
mTOR	mammalian target of rapamycin	savčí cíl rapamycinu
NHEJ	non-homologous end joining	nehomologní spojování konců
NSID	nonsyndromic intellectual disability	nesyndromová mentální retardace
NT	nucleotide	nukleotid
OC	ovarian cancer	nádorová ovariální tkáň
PBS	phosphate buffer saline	fosfátový pufr
pcIC	pericentrosomal domain of the IC	pericentrozomální doména IC
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
PD	Parkinson's Disease	Parkinsonova choroba
PFA	paraformaldehyde	paraformaldehyd
PH	Pleckstrin homology	Pleckstrin homologická
PH-GRAM	Pleckstrin homology-glucosyltransferases, RAB-like GTPase activators and myotubularin	Pleckstrin homologická-glukosyltransferáza, proteiny aktivující GTPázy podobné RAB a myotubulariny
PI	phosphatidylinositol	fosfatidylinositol
PI(3)P	phosphatidylinositol-3-phosphate	fosfatidylinositol (3)-fosfát
PI(3,5)P ₂	phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate	fosfatidylinositol (3,5)-bisfosfát
PI(4)P	Phosphatidylinositol (4)-phosphate	fosfatidylinositol (4)-fosfát
PI3K	PI3-kinase	PI3-kináza
PI5K	PI5-kinase	PI5-kináza
PI3K-C2α	clathrin-binding PI3K alpha	PI3K alfa vázající klathrin
PIP	phosphatidylinositol phosphate	fosfatidylinositid
PTP	protein tyrosine phosphatase	proteinové tyrosin fosfatázy
RAB	rat brain	potkaní mozek
RABGGT	RAB geranylgeranyl transferase	geranylgeranyltransferáza pro RAB
RAS	rat sarcoma	potkaní sarkom
REP	RAB escort protein	eskortní protein pro RAB
RNAi	RNA interference	interference RNA
RPE-1	retinal pigment epithelial-1	retinální pigmentový epitel 1
RT-PCR	real time-PCR	PCR v reálném čase
RUSH	retention using selective hooks	zadržení využívající selektivní kotvu

SBF	SET-binding factor	SET-vazebný faktor
SBP	streptavidin binding peptide	peptid vázající streptavidin
SDS	sodium dodecyl sulfate	dodecylsulfát sodný
SER	smooth ER	hladké ER
SET	Suvar3-9, Enhancer-of-zeste, Trithorax	Suvar3-9, zesilovač proteinu zeste, Trithorax
SID	SET-interaction domain	SET-interakční doména
siRNA	small interfering RNA	malé interferující RNA
SNP	single-nucleotide polymorphism	jednonukleotidový polymorfismus
SNX3	sorting nexin 3	třídící nexin 3
SOD1	superoxide dismutase 1	superoxiddismutáza 1
STF	SuperTOPFlash	SuperTOPflash
TAE	tris-acetate-EDTA	tris-acetát-EDTA
TBC1D20	Tre2/Bub2/Cdc16	Tre2/Bub2/Cdc16
TBE	tris-borate-EDTA	tris-borát-EDTA
TBST	tris-buffered saline with 0,1% tween	solný roztok pufovaný Tris s 0,1% Tween
TDP43	Trans-activation response element DNA binding protein 43 kDa	DNA vazebný protein o velikosti 43 kDa
TEMED	tetramethylethylenediamine	tetramethylethylendiamin
TNF	tumor necrosis factor	faktor nádorové nekrózy
TRAPP	transport protein particle	transportní proteinová částice
VSVG	vesicular stomatitis virus-G protein	G-protein viru vezikulární stomatitidy
WIPI2	WD repeat domain phosphoinositide - interacting protein 2	Protein 2 s opakující se WD doménou interagující s PIP
WNT	Wingless/int-1	Wingless/int-1
WT	wild type	divoký typ
YPT1	yeast protein transporter 1	kvasinkový proteinový transportér 1

1. Úvod

Vnitřní prostor buněk je rozdělen prostřednictvím membrán na jednotlivé kompartmenty, které zajišťují specifické prostředí pro správný průběh buněčných procesů. Mezi jednotlivými kompartmenty putují váčky. Regulace formování váčky, uvolnění z donorové membrány, transport a rozpoznání cílové membrány je intenzivně studováno již mnoho desítek let (Ilia Mechnikov, 1882), přesto stále zůstávají mnohé molekulární mechanismy jednotlivých kroků neznámé.

Dříve převládala představa, že je membrána určitého kompartmentu obohacena převážně jedním typem derivátu fosfatidylinositolu (PI), který jí dává identitu. Konkrétní PI jsou na membráně rozpoznávány různými proteiny s doménou vázající PI. Tyto proteiny následně zprostředkovávají děje nezbytné pro transport váček. Během následujících let se ukázalo, že fosfatidylinositidy (PIP) jsou mnohem promiskuitnější, než se původně myslelo. Na membránách bývají zastoupeny všechny deriváty PIP a ve vazbě efektorů hrají roli i další aspekty než jen kombinace fosforylací inositolového kruhu (Choy *et al.*, 2017).

Pečlivá kontrola každého kroku transportu je dána souhrou mnoha molekul, především pak kinázami, fosfatázami a GTPázami RAB. Jedním z regulátorů složení lipidických membrán a transportu váček jsou i proteiny příbuzné myotubularinu (MTMR), lipidické fosfatázy, které defosforylují deriváty PI na třetí pozici inositolového kruhu (Raess *et al.*, 2017). MTMR byly objeveny ve spojitosti se závažnými onemocněními u lidí (Laporte *et al.*, 1996). Ačkoliv jsou MTMR posledních dvacet pět let studovány, role jednotlivých členů rodiny v mnohých procesech zůstávají nejasné. Diplomová práce se věnuje podskupině MTMR zahrnující MTMR6, MTMR7 a MTMR8 (Raess *et al.*, 2017). Tyto MTMR nejsou spojovány s žádným monogeně podmíněným onemocněním, což může být jedním z důvodů nedostatku informací o této podskupině.

2. Literární přehled

2.1. Proteiny příbuzné myotubularinu („myotubularin related proteins” - MTMR)

MTMR tvoří rozsáhlou rodinu lipidických fosfatáz, které jsou evolučně konzervovány od kvasinek po člověka. V důsledku přítomnosti charakteristického C(X)₅R motivu jsou řazeny do nadrodiny proteinových tyrosinových fosfatáz (PTP) (Denu *et al.*, 1996; Laporte *et al.*, 1996), ačkoliv jejich substrátem jsou lipidy, nikoliv proteiny (Alonso *et al.*, 2004). Můžeme je rozdělit do dvou skupin na základě fosfatázové aktivity, která je dána přítomností klíčových aminokyselin (AK) v katalytické kapse domény PTP (Raess *et al.*, 2017).

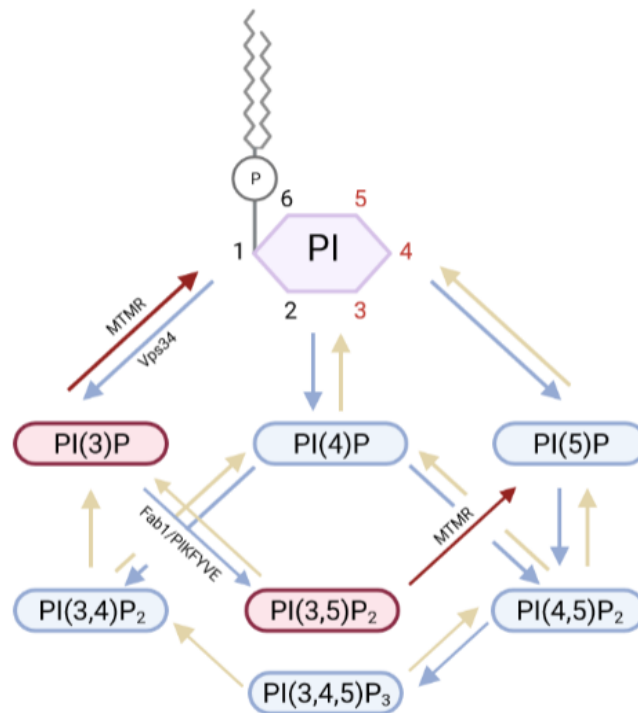
Lidský genom nese čtrnáct genů (*MTM1*, *MTMR1-13*) kódujících členy rodiny MTMR, osm z nich je katalyticky aktivních, zbylých šest není schopno defosforylace (Kerk a Moorhead, 2010; Raess *et al.*, 2017). Do rodiny MTMR je někdy zařazován i MTMR14, označovaný také jako hJUMPY. Sekvence katalytické smyčky MTMR14 je velice podobná konzervované struktuře aktivních MTMR. MTMR14 defosforyluje substráty jako ostatní členové rodiny (Tosch *et al.*, 2006), nicméně další domény charakteristické pro rodinu MTMR neobsahuje a fylogenetické studie naznačují pouze blízkou příbuznost (Vergne *et al.*, 2009; Raess *et al.*, 2017).

Geny pro myotubulariny se nacházejí až na výjimky (intracelulární paraziti *Encephalitozoon cuniculi*, *Plasmodium falciparum* a eukaryotické řasy *Cyanidioschyzon merolae*, *Ostreococcus sp.*, *Chlamydomonas reinhardtii*) u všech eukaryot (Kerk a Moorhead, 2010). Přítomnost mnoha proteinů se stejným substrátem a podobnou funkcí by mohla spočívat ve funkční redundanci. Během mnoholetého výzkumu MTMR se postupně odkrývají jedinečné role jednotlivých MTMR v lidském organismu. *MTM1* a *MTMR2* mají identický substrát a tkáňovou specifitu, přesto mutace v nich vedou k diametrálně odlišným onemocněním. Rozdílný fenotyp mutací může být dán různými interakčními partnery a tím rozdílnou lokalizací v buňce (Raess *et al.*, 2017).

Celá rodina dostala název podle prvního identifikovaného myotubularinu 1 (*MTM1*). Další zástupci byli pojmenováni jako proteiny příbuzné myotubularinu (MTMR). Mutace *MTM1* vede k myotubulární myopatii, která se projevuje hypotonií a svalovou ochablostí. Většina dětí umírá do 5. měsíce života (Spiro *et al.*, 1966; Laporte *et al.*, 1996). Dalším závažným onemocněním spojeným s mutací genů *MTMR* je Charcot-Marie-Tooth (CMT) demyelinizující periferní neuropatie typu 4B1 (*MTMR2*) (Bolino *et al.*, 2000). Vznik CMT typu 4B2 je podmíněn mutací katalyticky neaktivního *MTMR13*, což ukazuje na důležitou úlohu katalyticky neaktivních fosfatáz (Tersar *et al.*, 2007; Robinson *et al.*, 2008).

2.1.1. Substrát MTMR

Substrátem MTMR jsou PIP. Ačkoliv je zastoupení PI a jeho derivátů v membráně eukaryotické buňky menší než 10 %, zajišťují tyto lipidy stěžejní buněčné procesy zahrnující signalizaci, regulaci otvírání iontových kanálů, dynamiku cytoskeletu, motilitu a membránový transport prostřednictvím náboru efektorů s doménou vázající PI. Efektory také řídí dynamiku samotných membrán, jejich tvarování, fúzi nebo vznik nových membránových kompartmentů. Činností kináz a fosfatáz je zajištěn dynamický obrat lipidů, který se podílí na udržování homeostázy organismu. Variabilní kombinací fosforylace PI na pozici 3D, 4D a 5D vzniká sedm odlišných PIP (Balla 2005; Robinson a Dixon 2006) (obr. 1).



Obrázek 1: **Fosfatidylinositol a jeho deriváty.** Fosfatidylinositol může být fosforylován na třetí, čtvrté a páté pozici inositolového kruhu (červeně), čímž vzniká sedm různých derivátů. Aktivitu kináz značí modré šipky, fosfatáz běžové šipky. Činnost MTMR je zvýrazněna červeně. Substráty MTMR jsou zakroužkovány červenou barvou. (Obrázek inspirován (Hasegawa et al., 2017), vypracován v programu Biorender)

Nové studie ukazují, že odlišné role PI nejsou zapříčiněny pouze rozdílnou fosforylací, ale také variabilitou v acylových řetězcích, které mohou mít vliv na chování efektorů. Acylové řetězce se liší v délce a mají různý stupeň nasycenosti. Když je řetězec dlouhý, efektor nedosedá na fosfolipidovou membránu. Naopak v případě krátkého řetězce je efektor v těsném kontaktu s membránou, ale na PIP navázaný není. To může vysvětlovat, proč mají PIP řadu odlišných funkcí a efektorů (Choy et al., 2017). MTMR regulují hladinu fosfatidylinositol (3)-fosfátu (PI(3)P) a fosfatidylinositol (3,5)-bisfosfátu (PI(3,5)P₂) (Zou et al., 2012).

2.1.1.1. PI(3)P

PI(3)P představuje jeden ze dvou substrátů MTMR. V eukaryotické buňce vzniká primárně činností PI3-kinázy (PI3K) VPS34, což je kináza třetí třídy, menší procento je výsledkem činnosti PI3K druhé třídy

(Campa *et al.*, 2018). PI(3)P je klíčový PIP membrány časného endozomu (Cao *et al.*, 2008). Jeho obrat je důležitý pro transport napříč endocytickou dráhou, pro fúzi časných endozomů (Jones a Clague 1995) a přeměnu časného endozomu do pozdního endozomu. Zrání endozomů doprovází výměna RAB5 („rat brain“) za RAB7 (Poteryaev *et al.*, 2010).

Do buňky se neustále dostávají komponenty z plasmatické membrány, které mohou být degradovány nebo vráceny zpět k povrchu buňky. Pro recyklaci nákladu je nezbytné snížení hladiny PI(3)P na časných endozomech. Po hydrolyze PI(3)P vytvořeného kinázou druhé třídy PI3K-C2 α („clathrin-binding PI3K alpha“) dochází k odstrižení váčků s nákladem, které dále putují do recyklačních endozomů (Campa *et al.*, 2018). PI(3)P je také důležitý regulátor autofagické dráhy (Wu *et al.*, 2014).

2.1.1.2. PI(3,5)P₂

PI(3)P je prekurzorem PI(3,5)P₂, který se vyskytuje převážně na membráně pozdních endozomů a lysozomů (Takatori *et al.*, 2016). Přechod mezi membránovými kompartmenty je doprovázen fosforylací PI(3)P na PI(3,5)P₂ prostřednictvím aktivity kinázy PI5-kinázy (PIKfyve). PI(3,5)P₂ je stejně jako PI(3)P zapojen do regulace autofagie, zřejmě do pozdějších fází procesu. Snížení hladiny PI(3,5)P₂ prostřednictvím inhibice PI5K vedlo k akumulaci proteinu charakteristického pro autofagii („light chain 3“ - LC3), což může být důsledkem zvýšené produkce autofagozomálních struktur nebo narušením fúze autofagozomu s lysozomem (de Lartigue *et al.*, 2009). Fosfatáza INPP5E („inositol polyphosphate-5-phosphatase E“) vyskytující se na membráně lysozomů snižuje hladinu PI(3,5)P₂, čímž dochází ke stabilizaci aktinové sítě nezbytné pro fúzi autofagozomu s lysozomem (Hasegawa *et al.*, 2016). PI(3,5)P₂ odráží prostředí a podmínky, ve kterých se buňka nachází. V případě působení stresu dochází ke zvýšení hladiny (Dove *et al.*, 1997). Dále je zapojen do regulace třídění nákladu v multivezikulárních tělískách (Odorizzi *et al.*, 1998).

2.1.2. Funkce MTMR

Potvrzené lokalizace PIP a jejich popsané funkce rozvíjely představy o úloze MTMR vzhledem k jejich substrátům. Detekované mutace v MTMR spojené s patologickým projevem naznačují tkáňově specifickou expresi jednotlivých členů MTMR rodiny a také jejich odlišné interakční partnery (Raess *et al.*, 2017).

MTMR jsou jedny z mnoha proteinů, které kontrolují tvorbu membránových kompartmentů, transport a dynamiku váčků napříč buňkou prostřednictvím regulace složení membrány. MTM1 a MTMR2 jsou regulátory endozomální dráhy. Jejich úloha byla popsána na transportu EGFR (receptor pro epidermální růstový faktor). MTM1 je nezbytný pro uvolnění nákladu z časného endozomu, MTMR2 reguluje přenos nákladu z pozdního endozomu (Cao *et al.*, 2008). Některé MTMR, jako například MTMR3, MTMR8 nebo MTMR14, jsou zapojeny i do specifického transportu cytoplasmatických komponent určených k degradaci v lysozomech. V buňce fungují jako negativní regulátory autofagie, nicméně jejich

přítomnost je pro správný průběh procesu nezbytná (Vergne *et al.*, 2009; Taguchi-Atarashi *et al.*, 2010; Allen *et al.*, 2020). MTMR6 je společně s MTMR9 negativním regulátorem apoptózy (Zou *et al.*, 2009).

MTMR hrají také důležitou roli v signalizaci. MTMR14, který je hojně exprimován v srdeční svalovině, negativně reguluje aktivitu Akt signální dráhy. Odstranění MTMR14 z buněk srdeční svaloviny způsobuje zvýšenou aktivitu Akt signální dráhy a srdeční hypertrofii u myši (Zhang *et al.*, 2020). Delece MTMR2 vede ke zvýšené aktivitě mTORC1, která je stejně jako defekty v MTMR2 spojována s neobvyklou myelinizací periferních nervů (Sawade *et al.*, 2020).

Katalycky neaktivní MTMR tvoří heterodimery s aktivními interakčními partnery a jsou schopné regulovat jejich lokalizaci na membrány (Doubravská *et al.*, 2020). Vazbou mezi nimi se zvyšuje fosfatázová aktivita MTMR a také jejich stabilita (Zou *et al.*, 2012). Katalycky neaktivní fosfatázy však neslouží pouze jako podpůrné proteiny pro své katalycky aktivní partnery. Narušení jejich optimální exprese v buňce může vést k vážným onemocněním stejně jako u aktivních fosfatáz (Tersar *et al.*, 2007).

Detailnější informace o funkcích MTMR, kterým se věnuje tato práce, jsou uvedeny dále v textu.

2.1.3. Nemoci způsobené mutací v genech *MTMR*

Mutace v *MTM1* způsobuje myotubulární myopatii vázanou na chromozom X, což je závažné monogenně dědičné onemocnění, které postihuje kosterní svalovinu. Je charakterizováno patologicky sníženým svalovým napětím a slabostí. Výrazným histopatologickým znakem tohoto onemocnění je centrálně umístěné jádro, malé zakulacené fibrily kosterních svalů, neobvyklá akumulace mitochondrií a lokalizace proteinů, jako je dysferlin nebo dihydropyridinový receptor 1 alfa. Pacienti mužského pohlaví umírají průměrně ve 4. - 5. měsíci života na respirační selhání. Ženy přenašečky nevykazují žádné klinické projevy, nicméně biopsie a následná analýza svalové tkáně u části testovaných osob ukázala, že některé fibrily obsahovaly centrálně umístěné jádro (Spiro *et al.*, 1966; Laporte *et al.*, 1996; Childers *et al.*, 2014).

Mutace v genu *MTMR2* způsobuje demyelinizující neuropatii postihující periferní nervstvo (Bolino *et al.*, 2000). CMT syndrom je vážné klinicky i geneticky heterogenní onemocnění. Toto onemocnění postihuje 1 z 2 500 jedinců a řadí se tak mezi nejčastější neurologická dědičná onemocnění. Klinicky se CMT projevuje již v dětství postupnou slabostí a atrofií svalů, která postihuje nejprve chodidla a dolní končetiny, později se šíří i do horních končetin. Vznikající myelin je chybně sbalován, v některých místech je myelin zesílen nebo jsou nervová vlákna demyelinizována (Murphy *et al.*, 2012).

Další příčinou vzniku CMT syndromu je mutace v *MTMR13*. Na myších bylo ověřeno, že delece i katalycky neaktivního *MTMR13* stačí pro vznik zvláštností ve struktuře myelinu a sníženou motorickou výkonnost jedinců (Tersar *et al.*, 2007).

Doposud nebylo prokázáno, že by mutace v MTMR6, MTMR8 nebo v MTMR9 způsobovala konkrétní syndrom. Nicméně změny v expresi těchto MTMR byly popsány u osob s mentální retardací, poruchami metabolismu nebo nádorovým bujením (Holman *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2020).

Mezi jednu z nejrozšířenějších civilizačních chorob patří obezita. Vznik obezity je podmíněn jak behaviorálně, tak genetickým pozadím, které je velice široké. Sklony k obezitě se mohou u různých etnických skupin lišit. Yanagiya *et al.* ve studii prováděné v Japonsku podkryli možnou spojitost mezi predispozicí k obezitě a jednonukleotidovými polymorfismy („single-nucleotide polymorphism” - SNP) v genu *MTMR9*. Hladina transkriptů *MTMR9* byla regulována příjmem potravy. Při hladovění se hladina zvýšila, naopak při konzumaci tučných potravin se snížila. Autoři navrhují *MTMR9* jako potencionální regulátor chuti (Yanagiya *et al.*, 2007). Prokázána byla i další spojitost mezi *MTMR9* a civilizačními chorobami, konkrétně cukrovkou (Tang *et al.*, 2014).

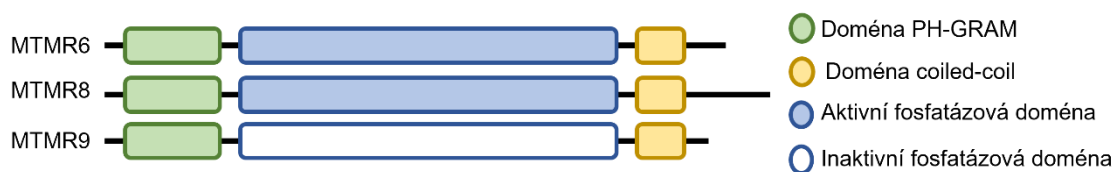
U pacientů s poruchami osobnosti byly identifikovány změny v genu *MTMR9* (Lo *et al.*, 2017). Shi *et al.* se zabývali pacienty v čínské populaci s nesyndromovou mentální retardací („nonsyndromic intellectual disability” - NSID), která může být podmíněna geneticky nebo působením vnějšího prostředí, což zahrnuje viry, teratogeny nebo záření. Pomocí testování přenosu nerovnováhy identifikovali tři SNP genu *MTMR9*, které jsou spojeny s NSID (Shi *et al.*, 2020).

Mutace v *MTMR8* byly detekovány u osob s mentálním postižením (Holman *et al.*, 2013) a s gliomy, což pravděpodobně úzce souvisí s narušeným obratem PIP a transportem váčků (Waugh 2016). *MTMR* regulují programovanou buněčnou smrt (Zou *et al.*, 2009), takže se předpokládala role *MTMR* v nádorových onemocněních. Pomocí luciferázového testu bylo zjištěno, že mRNA *MTMR6* je cílovým substrátem mikroRNA (miRNA) miR-506-3p. Výzkum se prováděl na vzorcích nádorové ovariální tkáně („ovarian cancer” - OC). Analýza OC odhalila sníženou hladinu miRNA a zvýšenou expresi *MTMR6* v porovnání s kontrolní imortalizovanou epiteliální linií vejcovodu. Zvýšená hladina *MTMR6* zabraňuje přirozenému průběhu apoptózy. Ke vzniku patologie přispívá i vliv nedostatku miRNA v nádorových tkáních. miRNA má za normálních okolností inhibiční vliv na průchod buněčným cyklem, navozuje přechod buňky do fáze G₀ a indukuje apoptózu (Wang *et al.*, 2019). Další studie, která se věnuje regulaci apoptózy prostřednictvím *MTMR6* se týká chronické B-lymfocytární leukemie. Buňky *in vitro* nevstupovaly do apoptózy vyvolané ozářením a vykazovaly minimálně dvojnásobně zvýšenou hladinu exprese *MTMR6* (Vallat *et al.*, 2003).

2.1.4. Struktura MTMR6, MTMR8, MTMR9

MTMR se dělí do podskupin na základě přítomnosti specifických domén. Základ struktury *MTMR6*, *MTMR8* a *MTMR9* tvoří stejně jako u ostatních *MTMR* doména PH-GRAM („Pleckstrin homology-glucosyltransferases, RAB-like GTPase activators and myotubularin”) na N-konci, která je spojená prostřednictvím spojky s doménou PTP (Begley *et al.*, 2003; Kerk a Moorhead, 2010). Rozhraní mezi těmito doménami je u členů *MTMR* rodiny variabilní a může ovlivňovat jejich orientaci vůči membráně

(Yoo *et al.*, 2015). Třetí doména, která se vyskytuje u MTMR9 a jeho interakčních partnerů, je doména svinuté cívky („coiled-coil” - CC) (obr. 2), která umožňuje tvorbu homodimerů a heterodimerů mezi MTMR (Kim *et al.*, 2003).



Obrázek 2: **Struktura MTMR.** MTMR jsou multidoménové proteiny. Na N-konci se nachází doména PH-GRAM (zeleně), která je spojena prostřednictvím spojky s fosfatázovou doménou (modře). U většiny MTMR byla detekována doména „coiled-coil“ (žlutě) zajišťující tvorbu homodimerů a heterodimerů. (Obrázek inspirován (Raess *et al.*, 2017))

2.1.4.1. Doména PH-GRAM

Doména PH-GRAM byla detekovaná téměř u všech organismů nesoucích geny pro MTMR. Pravděpodobně vznikla již během časně evoluce eukaryot (Kerk a Moorhead, 2010). Nejprve byla popsána pouze doména GRAM („RAB-like GTPase activators and myotubularin”), která měla sloužit jako doména zprostředkávající vazbu proteinu nebo lipidu a podílet se na přenosu signálu v buňce (Doerks *et al.*, 2000). Odhalení krystalové struktury MTMR2 ukázalo, že je doména GRAM tvořena listy beta, které jsou součástí většího motivu tvořeného doménou „Pleckstrin homology” (PH). Doména PH vykazuje vysokou afinitou vůči $PI(3,4,5)P_3$ a $PI(3,4)P_2$ a hraje významnou roli při buněčné signalizaci z plasmatické membrány. Skládá se z beta listů tvořících sendvič s helixem alfa na C-konci. Doména PH-GRAM zajišťuje vazbu MTMR na PIP a tím zajišťuje lokalizaci proteinu na specifické membránové kompartmenty. Pozitivní náboj domény PH-GRAM a domény PTP vytváří vhodné prostředí pro interakci s negativně nabitou hlavičkou PIP (Begley *et al.*, 2003). Zároveň vazba domény PH-GRAM na PIP umožňuje vhodnou orientaci domény PTP k substrátu. Nicméně bylo zjištěno, že samotná vazba domény PH-GRAM na PIP je velice slabá. Na vazbě mezi lipidem a proteinem se mohou podílet i další domény (Yoo *et al.*, 2015; Sawade *et al.*, 2020).

2.1.4.2. Doména PTP

Aktivní MTMR katalyzují hydrolýzu fosfodiesterové vazby u $PI(3)P$ a $PI(3,5)P_2$ (Blondeau *et al.*, 2000). Vyznačují se motivem $C(X)_5R$ typickým pro nadrodinu tyrosinových fosfatáz, který je umístěný na dně kapsy v oblasti smyčky vázající fosfát. Substrátová specifita MTMR pravděpodobně vyplývá z odlišné architektury aktivního místa. Doména PTP katalytický neaktivních fosfatáz nese ustálenou substituci v motivu $C(X)_5R$, která vede ke ztrátě schopnosti defosforylovat substrát (Kim *et al.*, 2003).

Doména PTP u MTMR je delší než u jiných členů nadrodiny tyrosinových fosfatáz. Je to dáno přítomností vysoce konzervované sekvence SID (SET (Suvar3-9, zesilovač proteinu zeste, Trithorax) interakční doména) (Begley *et al.*, 2003). Bylo popsáno, že doména PTP může zajišťovat vazbu na proteiny a podílet se tak na utváření komplexů. Například vazba domény PTP MTMR13 na RAB35

napomáhá lokalizovat neaktivní fosfatázu na membránu, kde utváří tetramer s aktivním MTMR2 defosforylujícím PIP (Sawade *et al.*, 2020).

2.1.4.3. Doména CC

Interakce jednotlivých členů rodiny MTMR jsou zprostředkovány doménou CC. Ačkoliv tuto doménu mají téměř všechny MTMR, zdaleka ne mezi všemi dochází k heterodimerizaci (Kim *et al.*, 2003; Zou *et al.*, 2009). Rozdíly v sekvencích domén CC členů rodiny MTMR způsobují, že pouze vybrané MTMR spolu interagují. Například MTMR1 a MTMR2 vykazují velice podobnou sekvenci kódující doménu CC, nicméně pouze MTMR2 je schopný interagovat s MTMR5. Pro doménu CC jsou charakteristické leucinové zbytky nebo příbuzné AK, které bývají v řetězci obvykle odděleny 6 libovolnými AK. Kim *et al.* porovnali sekvenci domény CC MTMR1 a MTMR2 se zaměřením na leucinové zbytky. Leucin (L607) domény CC MTMR2 byl substituován tak, aby odpovídal AK vyskytující se na této pozici v MTMR1. Vytvořený mutantní protein nebyl schopný interagovat s MTMR5 stejně jako je tomu v případě MTMR1. Rozdíly v interakčních partnerech jednotlivých MTMR mohou částečně spočívat ve variabilitě AK vyskytujících se na místech potencionálně určených leucinu (Kim *et al.*, 2003).

2.1.5. MTMR9

MTMR9 je katalyticky neaktivní enzym, který se váže na své interakční partnery pomocí domény CC. MTMR9 byl detekován ve všech tkáních. Je hojně exprimován ve varlatech a v téměř všech částech mozku (Raess *et al.*, 2017, databáze „Genotype-Tissue Expression“). Bylo zjištěno, že interaguje s blízce příbuznými proteiny MTMR6 (Zou *et al.*, 2009), MTMR7 (Mochizuki a Majerus 2003) a MTMR8, které patří do jedné podskupiny MTMR (Zou *et al.*, 2012).

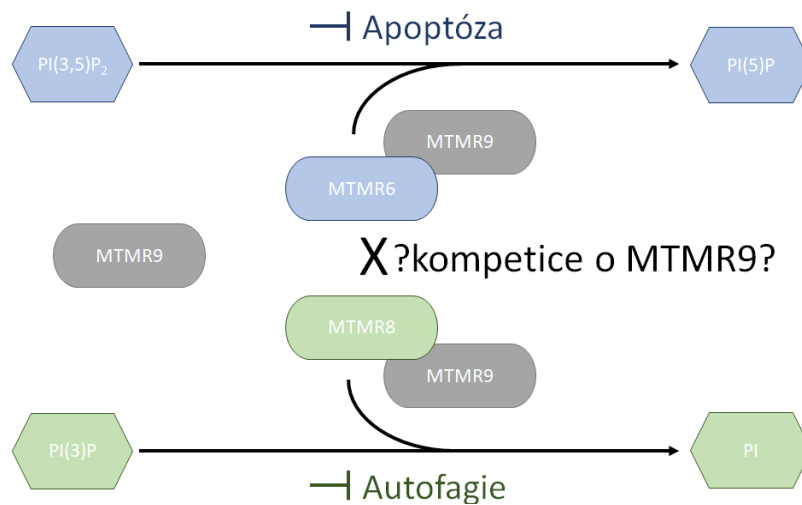
2.1.5.1. Lokalizace MTMR9

MTMR9 se v buňce nachází především v oblasti kolem jádra. Pozorování fluorescenčně značeného MTMR9 ukázalo, že se nevyskytuje pouze v cytoplasmě, ale že na rozdíl od MTMR6 a MTMR8 výrazně lokalizuje i na membrány váčkovitých struktur. Dále byl detekován v těsné blízkosti cytoplasmatické membrány (Zou *et al.*, 2009; Doubravská *et al.*, 2020). Váčky pozitivní na MTMR9 byly podrobně pozorovány v živých buňkách RPE-1. Tyto váčky vykazovaly dvojí pohyb, a to kmitání na místě, případně anterográdní pohyb ke Golgiho aparátu (Golgi). Váčky se vyskytovaly asociované s *cis*-Golgi nebo volně v cytoplasmě. Silná kolokalizace byla pozorována s váčky pozitivními na RAB1A, který je charakteristický pro intermediální kompartment (IC) nacházející se mezi endoplasmatickým retikulem (ER) a Golgi (Doubravská *et al.*, 2020).

2.1.5.2. Funkce MTMR9

MTMR9 reguluje aktivitu a lokalizaci interakčních partnerů, které vtahuje do váček (Zou *et al.*, 2012; Doubravská *et al.*, 2020). Zvýšení fosfatázové aktivity MTMR6 a MTMR8 bylo pozorováno pomocí radioaktivně značených substrátů PI(3*)P a PI(3*,5)P₂ prostřednictvím měření uvolněného [³²P]-PO₄ (Zou *et al.*, 2012). Dále MTMR9 zvyšuje stabilitu MTMR6 (Zou *et al.*, 2009), MTMR8 (Zou *et al.*,

2012) a zároveň svoji vlastní. Ve vazbě s MTMR6 reguluje apoptózu (Zou *et al.*, 2009), s MTMR8 autofagii (Zou *et al.*, 2012) (obr. 3).



Obrázek 3: **Funkce MTMR6 a MTMR8 v buňce.** MTMR6 preferenčně defosforyluje $PI(3,5)P_2$ a negativně reguluje apoptózu. Hlavním substrátem MTMR8 je $PI(3)P$ a hraje důležitou roli při autofagii. O kompetici mezi MTMR6 a MTMR8 o MTMR9 se spekuluje, žádná průkazná data nejsou momentálně k dispozici. (Obrázek inspirován (Zou *et al.*, 2012), vypracován v programu Biorender)

MTMR9 se podílí na udržování struktury Golgi a ovlivňuje lokalizaci RAB1A. Jelikož je RAB1 potřebný pro správný průběh transportu váčků mezi ER a Golgi, mohl by MTMR9 regulovat průběh sekrece. Skutečně se prokázalo, že změna exprese MTMR9 vede ke zpomalení pozorovaných sekretovaných proteinů G viru vezikulární stomatitidy (VSV-G) a WNT3A (Wingless/Int-1) mezi ER a Golgi (Doubravská *et al.*, 2020).

Vytvořené MTMR9 heterozygotní myši dosahovali v porovnání s WT (wild type) menšího vzrůstu (Zou *et al.*, 2012). Autoři článku to dávají do možné souvislosti s pozorováním Yanagiya *et al.*, kteří se zabývali SNP v genu *MTMR9* u obézních lidí. Hladina MTMR9 se odvíjela od množství přijímané potravy (Yanagiya *et al.*, 2007). Heterozygotní myši trpěly záchvaty a poruchami pohybu. Během prvních dvou týdnů života byl zaznamenán vysoký počet úmrtí, což může být vysvětleno tím, že delecí *MTMR9* je výrazně snížena stabilita a funkce interakčních partnerů MTMR6, MTMR7 a MTMR8. Myši s deletovaným *MTMR9* v obou alelách se vytvořit nepodařilo (Zou *et al.*, 2012).

2.1.6. MTMR6

MTMR6 tvoří společně s MTMR7 a MTMR8 třetí podskupinu rodiny MTMR (Laporte *et al.*, 2003). Vykazuje enzymatickou aktivitu zejména vůči $PI(3,5)P_2$ (Zou *et al.*, 2009). MTMR6 je exprimován téměř ve všech tkáních, nejvíce v nadledvinkách, varlatech a také v některých částech mozku, například ve frontálním kortexu, hypothalamu nebo v mozečku (Raess *et al.*, 2017, databáze „Genotype-Tissue Expression“). Vyskytuje se ve dvou izoformách. (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y217#Q9Y217-1>)

2.1.6.1. Lokalizace MTMR6

Komerčně dostupné funkční protilátky proti MTMR6 nejsou k dispozici. Nicméně Mochizuki *et al.* připravili myší monoklonální protilátku, která jim umožnila pozorovat lokalizaci endogenně exprimovaného MTMR6 v buňkách. Akumulace MTMR6 (Mochizuki *et al.*, 2013) stejně jako MTMR9 (Doubravská *et al.*, 2020) byla detekována v perinukleární oblasti a cytosolu. Fluorescenční signál MTMR6 nevykazuje váčkovitý charakter, nicméně oblast výraznějšího signálu se překrývá s výskytem PI(3)P a transferinu. Přítomnost MTMR6 na váčcích recyklačního endozomu nebyla prokázána. Významný překryv byl zaznamenán u MTMR6 a mikrotubulových svazků v okolí jádra. Po přidání nokodazolu, činidla narušujícího stabilitu mikrotubulů, došlo nejen k rozpadu sítě mikrotubulů, ale také zmizel výrazný signál MTMR6 v blízkosti jádra. MTMR6 se vyskytuje také v IC (Mochizuki *et al.*, 2013), kde byl detekován i transfekovaný MTMR9 (Doubravská *et al.*, 2020). Narušení hladiny malé GTPázy RAB1B vedlo ke změně lokalizace MTMR6, což by mohlo vypovídat o blízkém funkčním vztahu těchto proteinů (Mochizuki *et al.*, 2013).

2.1.6.2. Vazební partneři MTMR6

Hlavním vazebním partnerem MTMR6 je katalyticky neaktivní MTMR9 (Mochizuki *et al.*, 2013). Interakce těchto proteinů vede ke zvýšené afinitě a fosfatázové aktivitě MTMR6 vůči PI(3,5)P₂ (Zou *et al.*, 2009). Další důležitým interakčním partnerem je RAB1B. Slabou vazbu zprostředkovává doména PH-GRAM MTMR6. Vazbu ovlivňuje i forma, ve které se RAB1B nachází. MTMR6 přednostně váže RAB1B-GDP (guanosindifosfát) (Mochizuki *et al.*, 2013). Dále byla popsána interakce MTMR6 s proteiny centrozomu (<https://thebiogrid.org/114558>).

2.1.6.3. Funkce MTMR6

Komplex MTMR6/MTMR9 reguluje apoptózu. Zou *et al.* pozorovali sníženou hladinu apoptózy indukované etoposidem v buňkách, ve kterých současně exprimovali MTMR6 a MTMR9. Naopak snížení hladiny MTMR6 a MTMR9 pomocí interference RNA (RNAi) vedlo ke zvýšenému odumírání buněk (Zou *et al.*, 2009). Apoptózou se zabýval také Wang *et al.* ve studii týkající se vztahem mezi miRNA a MTMR6 v nádorové tkáni ovarií. MiR-506-3p negativně reguluje expresi této fosfatázy. U nádorové tkáně byla detekována nižší hladina miRNA a tudíž vyšší exprese MTMR6. Snížení exprese MTMR6 v nádorových buňkách prostřednictvím malých interagujících RNA (siRNA) vyvolalo nárůst apoptózy a její zvýšení vedlo k opačnému jevu. Navíc došlo ke zvýšení počtu buněk vyskytujících se ve fázi S, G2 a M buněčného cyklu (Wang *et al.*, 2019).

Vliv MTMR6 na nádorové bujení je také pravděpodobně prostřednictvím interakce s kanálem K⁺ aktivovaným Ca²⁺ (KCa3.1), který je znám jako pozitivní regulátor proliferace u některých nádorových buněčných linií (Srivastava *et al.*, 2005; Faouzi *et al.*, 2016). Kanál KCa3.1 je aktivován PI(3)P a deaktivován snížením hladiny PI(3)P prostřednictvím MTMR6 (Srivastava *et al.*, 2005). V tomto případě by vyšší exprese MTMR6 inhibovala KCa3.1 a negativně regulovala proliferaci buněk

nádorové tkáni. Protichůdnost výsledků studií naznačuje, že mnohé molekulární mechanismy ohledně úlohy MTMR6 v organismu zůstávají stále nejasné.

U háďátka a octomilky MTM6 s MTM9 regulují dráhu recyklace. Sekrece lipidicky modifikovaného proteinu Wnt je zprostředkována membránově vázaným proteinem MIG14/Wls, který je pro sekreci Wnt nezbytný. MIG14/Wls opakovaně cykluje mezi ER, Golgi a cytoplasmatickou membránou. Retrográdní transport váčků na této úrovni je řízen pomocí MTM6 a MTM9. V buňkách s defektním MTM6 nedochází k recyklaci MIG14/Wls, protože se na membráně endozomů hromadí PI(3)P-vazebný SNX3 (sorting nexin 3). Tento protein řídí transport MIG14/Wls z endozomů do Golgi prostřednictvím interakce s retromerovým komplexem, který je rovněž nepostradatelný pro návrat MIG14/Wls do Golgi (Silhankova *et al.*, 2010; Harterink *et al.*, 2011).

Mochizuki se na základě výskytu MTMR6 v IC a Golgi zaměřil na úlohu fosfatázy v časně sekreční dráze. Snížení hladiny MTMR6 vedlo ke zrychlení transportu VSVG. Zároveň pozoroval, že snížená hladina MTMR6 nebo RAB1B vede k inhibici tvorby omegazomů, což jsou útvary odvozené z membrány ER v místě vyššího výskytu PI(3)P, které dávají vzniknout některým autofagozomům. Snížení hladiny MTMR6 nebo RAB1B nezměnilo počet autofagických buněk ve srovnání s buňkami kontrolními (Mochizuki *et al.*, 2013).

2.1.7. MTMR8

MTMR8 je dalším katalyticky aktivním členem třetí podskupiny MTMR (Laporte *et al.*, 2003). MTMR8 byl detekován téměř ve všech tkáních, nejvíce v reprodukčních tkáních, jícnu, některých částech tlustého střeva a močovém měchýři (Raess *et al.*, 2017, databáze „Genotype-Tissue Expression“). Na rozdíl od MTMR6 vykazuje MTMR8 větší aktivitu vůči PI(3)P, jehož hladina v buňkách transfekovaných MTMR8 a MTMR9 výrazně klesá (Zou *et al.*, 2012). MTMR8 je evolučně mladší než MTMR6 a zcela chybí v genomu myši a potkanů (Raess *et al.*, 2017). MTMR8 se v buňkách vyskytuje ve dvou izoformách (Allen *et al.*, 2020).

2.1.7.1. Lokalizace MTMR8

Transfekovaný MTMR8 značený na C-konci se nachází především v cytoplasmě, v oblasti cytoplasmatické membrány a slabý signál je detekovatelný v oblasti Golgi. Expres společně s MTMR9 vede k částečné změně lokalizace MTMR8 do váčkovitých struktur (Doubravská *et al.*, 2020).

2.1.7.2. Funkce MTMR8

Heterodimer MTMR8/MTMR9 negativně ovlivňuje míru autofagie v buňkách a podílí se na udržování stability endolysosomálního systému (Zou *et al.*, 2012; Allen *et al.*, 2020). Autofagie je vysoce regulovaný buněčný proces, který se účastní formování těla nově se vyvíjejícího jedince, vyrovnání se buňky s hladověním a udržování homeostázy prostřednictvím degradace intracelulárních komponent. Proteiny, organely nebo makromolekulární komplexy jsou postupně obkloповány dvojitou lipidickou membránou, která dává vzniknout samostatnému váčku, autofagozomu. Ten putuje k lysosomu a fúzuje

s ním za vzniku autolyzozomu. Degradovaný náklad je následně uvolněn do cytoplasmy a nově využit pro anaboličké děje (Yu *et al.*, 2017). Správný průběh autofagie souvisí s hladinou PI(3)P. Současné zvýšení exprese MTMR8 a MTMR9 vede ke snížení hladiny PI(3)P a autofagie. Zou *et al.* detekovali v těchto buňkách zvýšenou hladinu p62 (Zou *et al.*, 2012), proteinu monitorujícího autofagii (Bjørkøy *et al.*, 2005). Snížení hladiny MTMR8 nezpůsobilo významné změny v hladině p62. Po „knock-down“ (KD) *MTMR9* byla pozorována změna v autofagii ve srovnání s kontrolními buňkami. Důvodem může být schopnost MTMR interagujících s MTMR9 se v některých buněčných procesech zastupovat. Mohlo by se jednat o MTMR7, protože RNAi MTMR6 nebo MTMR6 společně s MTMR9 nevede k výrazné změně hladiny p62 (Zou *et al.*, 2012).

Roli MTMR8 v autofagii potvrdila i skupina Allen *et al.*, která se dále zabývala úlohou domén MTMR8 v tomto procesu. Pomocí metody CRISPR/Cas9 vytvořili linii buněk HeLa, která měla v doméně PTP substituci cysteinu za serin vedoucí ke ztrátě fosfatázové aktivity MTMR8. Druhá linie obsahovala zkrácenou doménu PH-GRAM. Ukázalo se, že strukturu lyzozomálního systému ovlivňují obě domény a mají zřejmě vliv na míru degradační aktivity. Na rozdíl od buněk WT byly ve vytvořených buněčných liniích pozorovány větší autofagozomy vyskytující se ve vyšším počtu a lyzozomy, kterých bylo naopak méně. Kolokalizace markerů autofagozomu a lyzozomu se zvýšila. Výraznější změna fenotypu byla pozorována v případě buněčné linie exprimující zkrácenou doménu PH-GRAM, která lokalizuje MTMR8 na membrány obohacené PI(3)P. U buněčné linie nesoucí neaktivní fosfatázu byla detekována vyšší hladina proteinu WIPI2 („WD repeat protein Interacting with PhosphoInositides 2“), který se váže na PI(3)P na membránu v časně fázi vzniku autofagozomu, což naznačuje důležitou roli defosforylační aktivity domény PTP MTMR8 již v rané fázi autofagie (Allen *et al.*, 2020).

Katalycky aktivní MTMR jsou v antagonickém vztahu s kinázami, čímž je regulována potřebná hladina fosforylovaných substrátů. MTMR8, jehož hlavním substrátem je PI(3)P, ve spolupráci s PI3K, producentem PI(3)P v eukaryotické buňce, reguluje modelování aktinových filament a vývoj svalové soustavy během embryogeneze u zebřičky. Narušení exprese MTMR8 způsobuje defekt v somitogenezi (Mei *et al.*, 2009) a má vliv i na vývoj cévního systému a jeho specifikaci (Mei *et al.*, 2010).

MTMR6 má vyšší afinitu k PI(3,5)P₂ a MTMR8 k PI(3)P, nicméně obě fosfatázy využívají oba PIP. To by mohlo naznačovat, že se tyto proteiny funkčně zastupují. Po odkrytí role MTMR6 v apoptóze (Zou *et al.*, 2009) se Zou *et al.* zabývali tím, zdali tento proces reguluje i komplex MTMR8/MTMR9. Nicméně v tomto případě se redundance nepotvrdila (Zou *et al.*, 2012)

Ačkoliv byly výše popsány převážně odlišné děje, kterých se MTMR6 a MTMR8 účastní, je nutné zmínit, že se oba proteiny společně s MTMR9 vyskytují v oblasti sekretorické dráhy a doposud se z velké části neznámým způsobem podílejí na správném průběhu transportu váčků.

2.2. Transport váčků

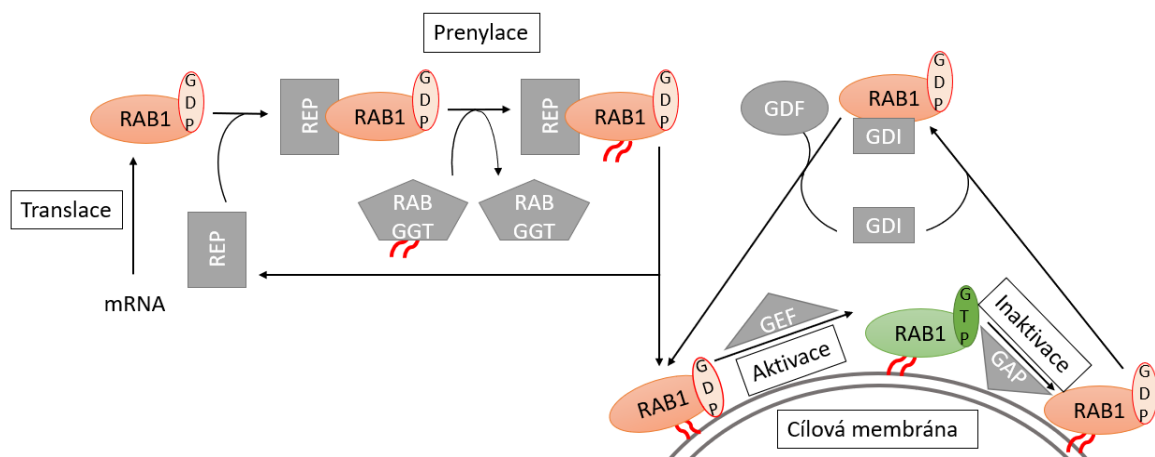
V buňce probíhá velice rozmanitý a dynamický transport. Cílem buňky je koordinovat veškeré kroky pomocí velkého počtu molekul tak, aby se zachovala homeostáza a aby buňka byla schopná v případě působení stresu vytvořit adekvátní odpověď. Narušení jemně regulovaných procesů nezřídka ústí v závažná onemocnění (Hutagalung a Novick, 2011). V diplomové práci zaměřím pozornost na sekreci. Především pak na putování váčku z ER do Golgi z pohledu rodiny RAB, které jsou nepostradatelným spojníkem jednotlivých kroků transportu.

2.2.1. RAB

RAB patří do velké nadrodiny GTPáz Ras („*rat sarcoma*“), které se vyznačují malou molekulovou hmotností. Poprvé byly identifikovány v krysím mozku a odtud pramení jejich označení („*rat brain*“) (Touchot *et al.*, 1987). Zajišťují velké množství funkcí na všech úrovních buněčného transportu. Variabilita je opatřena nábořem efektorů v jedinečný moment na specifické místo. Kromě toho jsou schopné vazbou enzymů modifikujících lipidy řídit vznik membránových domén, podílet se na výsledné identitě a struktuře organel. RAB se vyskytují v aktivní a neaktivní formě v závislosti na vazbě guanosintrifosfátu (GTP) nebo GDP. Pouze aktivní forma RAB-GTP rekrutuje efektor (Hutagalung a Novick, 2011).

2.2.1.1. Cyklus RAB

RAB v buňce cyklují mezi aktivním stavem proteinu asociovaným s membránou a neaktivním stavem proteinu, který můžeme detekovat jak na membráně, tak v cytosolu (obr. 4). Změna lokalizace proteinu a přechod do aktivní formy je vysoce regulovaný proces, na kterém se podílí mnoho proteinů (Hutagalung a Novick, 2011).



Obrázek 4: **Cyklus GTPázy RAB.** Nově syntetizovaný RAB je rozpoznán eskorním proteinem pro RAB a naveden ke geranylgeranyltransferáze pro RAB. Získaná geranylgeranyl kotva (červeně) umožňuje vložení do membrány, kde je RAB aktivován (zeleně) a váže efektor vykonávající příslušné funkce. Neaktivní RAB je z membrány vyňat prostřednictvím disociačního inhibitoru GDP (GDI). Opětovné vložení do membrány umožňuje „GDI-displacement factor“ (GDF). (Obrázek inspirován (Hutagalung a Novick, 2011), vypracován v programu Biorender)

Nově translatovaný protein není schopen vazby s membránou. RAB je v této podobě vyhledán eskortním proteinem pro RAB (REP) (Alory a Balch, 2001), který ho doručí geranylgeranyltransferáze pro RAB (RABGGT). RABGGT katalyzuje posttranslační modifikaci. K RAB připojí na C-konec obvykle dvě lipofilní geranylové podjednotky, které jsou schopné se stabilně vkládat do membrány (Hutagalung a Novick, 2011). RAB se stává substrátem faktoru pro výměnu guaninových nukleotidů (GEF), který je nezbytný pro plnou aktivaci RAB a podílí se na lokalizaci jednotlivých členů rodiny RAB do správných kompartmentů (Hutagalung a Novick, 2011; Riedel *et al.*, 2018; Joiner *et al.*, 2021). RAB1 je aktivován proteinovou transportní částicí („transport protein particle” - TRAPP). Tento proteinový komplex navíc napomáhá ukotvení membrány váčku přicházejícího z IC kompartmentu k membráně *cis*-Golgi (Alory a Balch, 2001; Riedel *et al.*, 2018). Aktivní RAB s navázaným GTP interaguje s efekty. Následně je GTP aktivní formy RAB1 hydrolyzováno proteinem Tre2/Bub2/Cdc16 (TBC1D20), proteinem aktivujícím GTPázu (GAP) (Haas *et al.*, 2007; Hutagalung a Novick, 2011). RAB-GDP zůstává vázaný na membránu, kde se stává substrátem pro disociační inhibitor GDP (GDI) (Sasaki *et al.*, 1990), což je protein, který se stejně jako protein REP řadí do nadrodiny GDI. Na rozdíl od REP, GDI rozeznává prenylovaný protein a váže pouze RAB-GDP, čímž zakrývá hydrofóbní prenylovou skupinu a zabraňuje vazbě na membránu (Alory a Balch, 2001). Po vytažení z membrány je neaktivní RAB držen v cytosolu pomocí GDI, který brání opětovnému navázání na membránu (Hutagalung a Novick, 2011). „GDI-displacement factor” (GDF) je molekulární chaperon, který uvolňuje RAB od GDI, čímž umožňuje RAB se opětovně vázat na membránu (Sivars *et al.*, 2003). Přesný mechanismus cílení RAB na specifickou membránu není zcela znám.

2.2.1.2. Struktura RAB

Všechny RAB obsahují na N-konci konzervovaný motiv zvaný globulární box, který je nezbytný pro vazbu nukleotidu (NT) a hydrolyzu GTP. Na C-konci se nacházejí konzervované zbytky cysteinu označované jako motiv CC, které jsou nepostradatelné pro vazbu proteinu na membránu, respektive jsou místem, kde dochází k posttranslační modifikaci, prenylaci (Yang *et al.*, 2016).

Konformace RAB je závislá na NT, který je na něj navázán. Výměna GDP za GTP a následná hydrolyza je jádrem funkce RAB jako molekulárního přepínače. RAB-GTP a RAB-GDP se liší strukturou, čímž je zajištěno, že se efekty vážou pouze na RAB-GTP. Místo vázající NT je obklopeno třemi konzervovanými motivy vázající fosfát/hoččík (PM1-PM3) a třemi motivy, které rozeznávají guanin (G1-G3). Po vazbě GTP spolu PM motivy interagují, což vede ke stabilizaci proteinové oblasti zvané „Switch1” a „Switch2,” a RAB se nachází ve své aktivní „zapnuté” konformaci. Po hydrolyze GTP „Switch” oblasti ztrácí rovnovážný stav a RAB je v neaktivní „vypnuté” konformaci (Pylypenko *et al.*, 2017).

2.2.1.3. MTMR jako efekty RAB

Širokou paletu efektorů RAB reprezentují i MTMR. Úzká provázanost mezi těmito proteinovými rodinami nespočívá pouze ve funkční spojitosti s PIP, ale je možné pozorovat i přímou souvislost mezi

aktivitou některých RAB a MTMR. RAB vyžadují pro svou funkci protein GEF, jak bylo zmíněno v textu výše. Některé MTMR obsahují doménu, která vykazuje aktivitu proteinů GEF a RAB aktivuje (Yoshimura *et al.*, 2010; Jean *et al.*, 2012). Bylo popsáno, že na tvorbě komplexu MTMR s RAB se podílejí domény PH-GRAM (Mochizuki *et al.*, 2013) nebo PTP (Sawade *et al.*, 2020).

MTMR5 a MTMR13 nesou doménu DENN („Differentially expressed in normal cells and neoplasia“), která slouží jako GEF pro RAB28 (Yoshimura *et al.*, 2010). Katalyticky neaktivní MTM označovaný v octomilce jako SET vazebný faktor („SET binding factor” - SBF) je zodpovědný za aktivaci RAB21 vyskytujícího se na membránách endozomálního systému. Zároveň udržuje správnou hladinu PI(3)P prostřednictvím náboru katalyticky aktivních fosfatáz a interakcí s kinázami. Souhra katalyticky aktivních a neaktivních MTMR s Rab21 kontroluje membránový transport na úrovni endozomální dráhy (Jean *et al.*, 2012).

MTMR13 je efektoem také RAB35. MTMR13 interaguje s RAB35 prostřednictvím domény PTP. Asociace by mohla být ovlivněna také doménou DENN. MTMR13 se váže na MTMR2 a společně řídí myelinizaci. Představa o úloze tohoto proteinového komplexu vychází z popsáných myelinových abnormalit způsobených vychýlením hladiny PIP. RAB35-GTP asociuje s MTMR13, který tvoří tetramer s MTMR2 na intracelulárních membránách. Katalyticky aktivní fosfatáza MTMR2 defosforyluje PI(3)P a PI(3,5)P₂, čímž reguluje jejich hladinu v buňce. Tyto PIP jsou také jedny z možných aktivátorů komplexu mTORC1. Narušení exprese MTMR2, MTMR13 nebo Rab35 vede ke zvýšení hladiny PIP, což způsobuje nadměrnou aktivaci mTORC1. Hyperaktivace mTORC1 je též spojována se vznikem myelinových abnormalit podobným těm, které se vyskytují u jedinců s Charcot-Marie-Tooth syndromem nebo byly pozorovány u modelových organismů s deletovaným MTMR2 nebo MTMR13 (Sawade *et al.*, 2020).

Spolupráce mezi RAB11 a MTM1 je nezbytná pro recyklaci pohlceného nákladu zpět na cytoplasmatickou membránu. RAB11-GDP je ukotven v membráně časného endozomu, kde pro svou aktivaci vyžaduje PI(3)P syntetizovaný PI3K-C2 α . Činností GEF vzniká RAB11-GTP, který rekrutuje MTM1 na membránu. MTM1 snižuje hladinu PI(3)P, což je nezbytné pro odstřížení váčku s nákladem od donorové membrány časného endozomu a jeho putování k recyklačnímu endozomu (Campa *et al.*, 2018).

PH-GRAM doména MTMR6 zprostředkovává slabé vazebné interakce preferenčně s RAB-GDP. MTMR6 je pravděpodobně pomocí RAB1B-GDP lokalizován na membránu, kde defosforyluje PI(3,5)P₂. Po aktivaci RAB1B je MTMR6 uvolněn zpět do cytosolu. Snížení hladiny MTMR6 s RAB1B v buňce pomocí RNAi vedlo k narušení remodelace membrány ER při vzniku omegazomů (Mochizuki *et al.*, 2013).

2.2.2. RAB1A a RAB1B

RAB1 je prvním popsaným členem rozsáhlé rodiny malých GTPáz RAB. Nejprve byl detekován v kvasinkách jako kvasinkový transportní protein 1 (Ypt1), který je nezbytný pro růst buněk. Narušení hladiny proteinu v buňce vedlo k zastavení dělení buněk, ztrátě integrity sítě mikrotubulů a jádra. Při expresi mutantního proteinu vznikaly buňky se dvěma jádry a abnormálním dělicím vřetenkem. Pro enzymatickou funkci proteinu je nutné navázání GTP (Schmitt *et al.*, 1986).

Nedlouho poté byly izolovány homology Ypt1 v savčích buňkách, konkrétně RAB1A a RAB1B, které mají identických 92 % sekvence (Touchot *et al.*, 1987; Vielh *et al.*, 1989). Detekce izoform RAB1 u více než 150 organismů ukazuje na evoluční konzervovanost tohoto proteinu (Yang *et al.*, 2016). RAB1 je nepostradatelný pro regulaci časně fáze sekretorické dráhy (Plutner *et al.*, 1991). Pokusy o vytvoření dvojitého „knock-out“ (KO) pro gen *RAB1A* a *RAB1B* byly u psích ledvinových buněk Madin-Darby (MDCK) neúspěšné. Buňky s delecí *RAB1A* nebo *RAB1B* byly životaschopné. Tyto výsledky naznačují, že je RAB1 nezbytný pro přežití MDCK buněk a že jsou izoformy redundantní (Homma *et al.*, 2019).

Inaktivní forma RAB1 se nachází v cytoplasmě. Aktivní forma lokalizuje do určitých membránových struktur, kde vykonává svou funkci (Hutagalung a Novick, 2011). Na membránách dochází pravděpodobně k jejich velice rychlému obratu (Monetta *et al.*, 2007). Kromě ER, IC a Golgi (Martinez *et al.*, 2016) byl detekován i v autofagozomech (Zoppino *et al.*, 2010) a lipidových raftech (Wang *et al.*, 2010).

2.2.2.1. RAB1 v signalizaci

Buněčné organely jako je ER nebo Golgi hrají významnou roli v signalizaci. RAB1, jakožto hlavní regulátor transportu na úrovni ER a Golgi, se buněčné signalizace účastní (Yang *et al.*, 2016). RAB1 se podílí na aktivaci signalizace mTOR („mammalian target of rapamycin“), hlavního senzoru hladiny živin v buňce (Thomas *et al.*, 2014; Sawade *et al.*, 2020). Dále bylo publikováno, že RAB1 ovlivňuje signalizaci Notch prostřednictvím geranylgeranyltransferázy RABGGT. V případě poškození funkce RABGGT nedochází k asociaci RAB na membránu buněčných kompartmentů. Jelikož protein GEF katalyzuje pouze substráty asociované s membránou, nemůže být RAB převeden do aktivní formy, není schopen vázat efektory a regulovat procesy v buňce. Regulace časně sekretorické dráhy je narušena a proteiny Delta a Scabrous, které jsou nezbytné pro správný průběh signalizace Notch, nejsou dopraveny na příslušné místo a signální dráha je poškozena (Charng *et al.*, 2014).

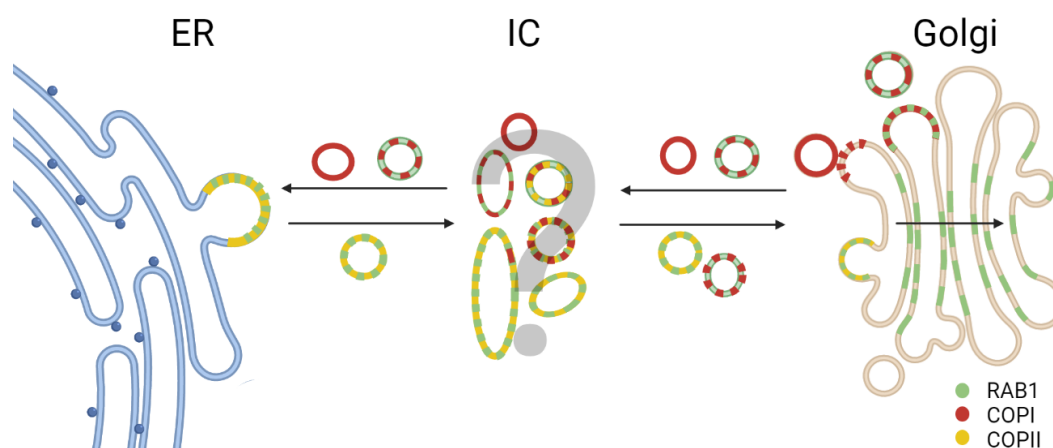
Další příklad, který prezentuje nezbytnost správného průběhu časně sekretorické dráhy a regulace prostřednictvím RAB1, se týká rodiny integrinů. Integriny zajišťují vazbu buňky na proteiny extracelulární matrix, čímž ovlivňují adhezi a migraci buněk. Inhibice RAB1 snížila adhezi buněk závislou na integrinech. V lipidových raftech bylo detekováno méně integrinu beta 1 a jeho recyklace na plasmatickou membránu byla snížena (Wang *et al.*, 2010).

2.2.2.2. RAB1 v autofagii

Jelikož se RAB1 vyskytuje mimo jiné v ER (Plutner *et al.*, 1991) a autofagozomy se mohou formovat na membráně této organely v místě bohatém na PI(3)P (Axe *et al.*, 2008), zabývali se Zoppino *et al.* tím, zdali má RAB1 roli v autofagii. V buňkách se zvýšenou hladinou RAB1B nebo jeho konstitutivně aktivní formy se vyskytoval větší počet autofagozomů, což by mohlo být způsobeno nadměrnou produkcí autofagozomů nebo inhibicí jejich zániku po fúzi s lysozomem. Jelikož se po přidání inhibitoru degradace autofagozomů ještě zvýšila hladina těchto organel, dá se předpokládat, že zvýšená hladina RAB1B způsobila vyšší tvorbu autofagozomů a RAB1 je pozitivním regulátorem (Zoppino *et al.*, 2010). Mochizuki *et al.* potvrdili vliv RAB1B na autofagii. RAB1B zřejmě reguluje autofagii v časně fázi, kdy dochází k tvorbě omegazomů (Mochizuki *et al.*, 2013).

1.2.3 RAB1 v časně fázi sekretorické dráhy

RAB1 je molekulou, která doprovází téměř každý krok časně sekretorické dráhy. Váže velké množství efektorů, které svou aktivitou regulují transport nově vzniklých proteinů z ER do Golgi (Plutner *et al.*, 1991). RAB1 zajišťuje uvolnění nákladu z ERES („ER exit site“) (Westrate *et al.*, 2020), jeho putování v intermediálním kompartmentu (IC) (Sannerud *et al.*, 2006; Marie *et al.*, 2009), fúzi váčku s membránou *cis*-Golgi (Moyer *et al.*, 2001) i transport uvnitř Golgi (Plutner *et al.*, 1991) (obr. 5).



Obrázek 5: **RAB1 je nepostradatelný pro správný průběh časně sekretorické dráhy.** RAB1 (zeleně) řídí na membráně ER uvolnění nákladu z oblasti ERES („ER exit site“) definované podjednotkami COPII („coat protein complex II“) (žlutě). Reguluje transport váčků přes intermediální kompartment (IC) k membráně *cis*-Golgi. Zajišťuje fúzi váčku s cílovou membránou a transport nákladu směrem k *trans*-Golgi. RAB1 je nezbytný pro správné skládání pláště z COPI (coat protein complex I) (červeně) podjednotek. Struktura a proteinové složení IC není detailně popsáno, proto je ve schématu znázorněno více typů váčků, které mohou do IC vstupovat nebo ho opouštět. (Obrázek vypracován v programu Biorender)

2.2.2.3. ER

ER je rozsáhlá síť kontinuálně propojených tubulů a cisteren. ER přechází z jaderné obálky, tvoří hladké a drsné ER a v oblasti kontaktu s jinými organelami nebo plasmatickou membránou vznikají specifické domény. Dochází v něm k mnoha dějům zahrnujícím regulaci hladiny Ca^{2+} uvnitř buněk, syntézu lipidů nebo syntézu a úpravu proteinů (Phillips a Voeltz 2016). Nově syntetizované proteiny určené k sekreci jsou tříděny a akumulovány ve specializované doméně ER, ERES, charakterizované přítomností

podjednotek COPII („coat protein complex II”), odkud jsou ve váčcích transportovány přes IC do Golgi a dále k cytoplasmatické membráně (Westrate *et al.*, 2020).

2.2.2.3.1. ERES

RAB1 lokalizuje do ERES oblasti s proteiny COPII již během časné fáze sekretorické dráhy (Plutner *et al.*, 1991). Podle Westrate *et al.* se pravděpodobně významně nezapojuje do třídění a akumulace proteinů určených pro sekreci z ER, k čemuž dochází i v buňkách s dominantně negativním RAB1. Nicméně je zcela nezbytný pro uvolnění nákladu z ER a jeho putování směrem ke Golgi. Váčky obsahující náklad z ER jsou pozitivní na přítomnost RAB1. V případě dominantně negativních mutantů RAB1 se náklad akumuluje v ERES, ale k jeho transportu napříč sekretorickou dráhou nedochází (Alvarez *et al.*, 2003; Westrate *et al.*, 2020).

2.2.2.3.2. COPII

Podjednotky komplexu COPII byly dlouhou dobu vnímány jako proteiny charakterizující váčky putující z ER anterográdním směrem k IC (Zeuschner *et al.*, 2006). Plášť COPII je tvořen ze dvou proteinových komplexů. Vnitřní část, která zajišťuje selekci nákladu, je tvořena komplexem Sec23/24. Ten je rekrutován GTPázou Sar1. Vnější část je charakterizována komplexem Sec13/31, který může polymerizovat a vytvořit osmistěnné klece. Dochází k zakřivení membrány a nově vznikající váček pučí z ERES (Fath *et al.*, 2007). S příchodem rychlejších a citlivějších metod se začaly objevovat protichůdné modely uvolnění nákladu z ER. Westrate *et al.* popsala transport sekretovaných proteinů manozidázy II a TNF alfa („tumor necrosis factor alfa”) z ER ve váčcích, které komponenty proteinového komplexu COPII neobsahují. Ukázala, že komponenty COPII zůstávají stabilně asociované s ER i po uvolnění nákladu z ER. Stálý výskyt těchto proteinů v ERES může být důsledkem adaptace živočišné buňky na vysoce dynamickou sekreci nově syntetizovaných proteinů (Westrate *et al.*, 2020). Nicméně převládají studie, které ukazují, že se náklad uvolňuje z ER ve váčcích pozitivních na komponenty COPII, které putují přes IC do Golgi (Kaiser a Schekman, 1990; Zeuschner *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2015).

Experimenty nejprve ukázaly, že mutant RAB1 s narušenou schopností vázat NT neovlivňuje komponenty COPII Sec13/31 v ERES. Ani u ostatních podjednotek komplexu COPII nebyla pozorována změna lokalizace (Alvarez *et al.*, 2003). Později bylo popsáno narušení lokalizace komponent COPII v oblasti ERES přiléhající ke Golgi vlivem exprese dominantně negativního RAB1 nebo GAP pro RAB1, který lokalizuje na membránu ER (Haas *et al.*, 2007). Nicméně v posledním publikovaných datech vliv RAB1 na skládání pláště z podjednotek COPII popsán nebyl. Westrate *et al.* s využitím vysoce rezolučních mikroskopických technik popsala lokalizaci RAB1B do ERES v momentě, kdy se zde již vyskytují stabilní oblasti bohaté na COPII, ve kterých dochází ke shromažďování nasyntetizovaných proteinů nezávisle na RAB1B (Westrate *et al.*, 2020).

2.2.2.4. IC

IC je systém propojených váčků a tubulů, který se nachází na rozhraní mezi ER a Golgi (Fan *et al.*, 2003). Ačkoliv byl IC detekován již před dlouhou dobou, jeho původ, struktura a mnohé funkce zůstávají stále nejasné a je na něj nahlíženo z různých směrů (Saraste a Marie, 2018).

Velmi významným posun znalostí ohledně IC znamenalo představení nové metody, která umožňovala vizualizovat synchronizovaný transport pomocí sekretovaného VSVG-GFP („Vesicular stomatitis virus G protein“) (Presley *et al.*, 1997). Teplotně senzitivní mutant VSVG (VSVG ts045) se při 40 °C hromadí v ER v důsledku špatného sbalení proteinu. Snížením teploty na 32 °C protein zaujme správnou konformaci, je z ER uvolněn a putuje ke Golgi (Beckers *et al.*, 1987). VSVG se po opuštění ER koncentruje ve váčcích, které vytváří samostatné struktury pohybující se pomocí molekulárních motorů podél mikrotubulární sítě směrem ke Golgi, a které často vytvářejí protáhlé struktury. Náklad překonává i delší vzdálenosti mezi periferně umístěnými ERES a perinukleárně lokalizovaným Golgi (Presley *et al.*, 1997).

Membrána IC je významně obohacena RAB1. RAB1 kolokalizuje s ERGIC53 („ER-Golgi intermediate compartment 53 kDa protein“) (Saraste *et al.*, 1995), markerem IC (Schweizer *et al.*, 1988). Udržování určité dynamiky mezi vezikulárními a tubulárními strukturami IC, jejich vznik a specifické funkce jsou pravděpodobně regulovány RAB1 ve spolupráci s dalšími proteiny jako je například komplex COPI („coat protein complex I“). Narušení exprese RAB1A může způsobit rozpad IC (Alvarez *et al.*, 2003; Haas *et al.*, 2007).

2.2.2.4.1. Modely IC

Na základě mikroskopického pozorování transportu váčků v živých savčích buňkách vznikly tři modely IC. Všechny modely se shodují v lokalizaci IC uvnitř buňky. Co se týče způsobu vzniku, zániku a přesné funkce IC v rámci časného transportu se od sebe liší (Saraste a Marie, 2018).

Model, který byl ustanoven jako první vychází ze studie, ve které bylo představeno pozorování transportu pomocí již zmíněného fluorescenčně značeného VSVG. IC v něm funguje jako přenašeč nákladu s omezenou časovou působností, podle toho je označován jako model přechodný. IC se kontinuálně tvoří v blízkosti ERES. Shluky váčků a tubulů zde vznikají prostřednictvím fúze typově stejných váčků COPII odvozených od ER. Nově vzniklé struktury IC se pohybují směrem ke Golgi, kde splývají s *cis* oblastí. IC se v tomto místě spotřebovává a zaniká (Presley *et al.*, 1997; Saraste a Marie, 2018).

Další model popisuje IC jako stabilní kompartment. Opírá se o studii Tekaya *et al.*, který pomocí mikroskopování živých buněk HeLa pozoroval lokalizaci fluorescenčně značeného ERGIC53. Signál detekoval především v blízkosti ERES ve stacionárních strukturách, kde dochází k třídění nákladu putujícího anterográdním i retrográdním směrem. V menší míře se také vyskytuje v krátce existujících pohyblivých útvarech na periférii. Komunikace IC s ER a Golgi je zprostředkována vysoce mobilními

nosiči odlišného původu. Pro bližší poznání dynamiky ERGIC53 byly buňky ošetřeny H89 (isochinolin sulfonamid) (Ben-Tekaya *et al.*, 2005), inhibítorem kináz, který blokuje transport na úrovni časné sekretorické dráhy (Lee a Linstedt, 2000) a způsobuje přesun GFP-ERGIC53 do ER (Ben-Tekaya *et al.*, 2005). H89 naruší transport z ER do Golgi prostřednictvím zabránění vazby Sar1 na membránu, který je nepostradatelný pro výstavbu pláště COPII (Aridor a Balch, 2000). Dále H89 narušuje retrogradní transport mezi Golgi a ER pomocí inhibice protein kinázy A, což vede k akumulaci váčků na membráně Golgi, které se od ní zřejmě nemohou odstříhnout (Tenorio *et al.*, 2015). GFP-ERGIC53 se akumuluje v ER, váčky ztrácejí fluorescenční signál a zastavují se. Po odstranění inhibitoru H89 se objevuje fluorescenční signál ERGIC53 současně na periférii buňky a v Golgi. Obnovení signálu v Golgi díky pohybu periferních elementů nebylo pozorováno. Periferní IC struktury a Golgi získaly ERGIC53 z ER nezávisle na sobě. Proto vznikla představa IC jako stacionárního kompartmentu s konstantním počtem tubulovezikulárních klastrů, které se vyskytují v oblasti kolem ER. Váčky COPII odvozené od ER nejprve podstupují heterotypickou fúzi se stabilním IC a následně se z IC oddělují jiné anterogradní nosiče, které dopraví náklad do *cis*-Golgi, se kterým fúzí (Ben-Tekaya *et al.*, 2005; Saraste a Marie, 2018).

Nejnovější model vypracovaný Saraste *et al.* vznikl spojením dvou předchozích modelů a zahrnuje dvě populace IC s odlišnou dynamikou. Je založený na pozorování RAB1 v NRK („normal rat kidney epithelial cells“) buňkách (Saraste *et al.*, 1995). RAB1 je jeden z markerů IC. Byl pozorován jak na stabilních strukturách, které se časem prodlužují a získávají pohyblivost, tak na vysoce pohyblivých strukturách, ze kterých se odštěpují váčky putující do Golgi nebo na periférii. Poslední model popisuje IC jako systém váčků zodpovědných za přenos nákladu z ER do Golgi, který je současně tvořen dynamickou a stacionární částí (Saraste a Marie, 2018). Model zahrnuje poznatky o variabilitě morfologie a chování jednotlivých IC elementů (Sannerud *et al.*, 2006; Marie *et al.*, 2009).

2.2.2.4.2. Struktura IC

IC je pravděpodobně tvořen několika populacemi, které se liší tvarem, složením, dynamikou a umístěním (Ying *et al.*, 2000; Sannerud *et al.*, 2006). Odlišná sedimentace kompartmentů v iodixanolovém gradientu odhalila dvě populace IC s různým zastoupením RAB1 a p58 (potkaní homolog ERGIC53). Pomalu sedimentující frakce tvořená tubulárními strukturami IC obsahuje dvě třetiny celkového množství membránově vázaného RAB1. V rychle sedimentující frakci je přítomná populace globulárního IC obsahující více jak dvě třetiny celkového množství p58/ERGIC53. Mikroskopie živých buněk odhalila, že z globulárního IC pučí a odděluje se tubulární IC (Sannerud *et al.*, 2006).

Další populací IC obsahující p58 a RAB1 jsou protáhlé struktury označené jako pericentrozomální domény IC (pcIC). Vyskytují se v některých aktivně se dělících buňkách kolem centrozomu (Marie *et al.*, 2009). Ukotvení pcIC v blízkosti centrozomu je zprostředkováno proteiny s doménou „coiled-coil“,

kteří zajišťují stabilní připojení *cis*-Golgi k minus konci mikrotubulů (Walenta *et al.*, 2001). pcIC obsahuje některé enzymy charakteristické pro Golgi, ale morfologie se liší. Podjednotky komplexu COPI detekované v pcIC a na membráně Golgi jsou rozdílné. Oddělením rozšiřujícího se pcIC při pohybu nebo dělení buněk nedochází k narušení integrity Golgi. Nově vzniklé pcIC se neustále přetváří (Marie *et al.*, 2009).

2.2.2.4.3. Funkce IC

IC je autonomní kompartment, který vytváří pomyslnou spojku mezi ER a Golgi. Obsahuje proteiny RAB, komponenty plášťů, molekulární motory a proteiny řídící vznik a fúzi váčků s cílovou membránou, které regulují třídění a transport proteinů jak anterogradním, tak retrogradním směrem. IC hraje roli v buněčné signalizaci, autofagii (Saraste a Marie, 2018) a transportu nezávislém na Golgi (Marie *et al.*, 2009).

Globulární IC je pravděpodobně důležitý pro obousměrný transport mezi ER a Golgi (Sannerud *et al.*, 2006), což vysvětluje přítomnost nově syntetizovaných proteinů (Presley *et al.*, 1997), ERGIC53 a v některých váčcích komponent COPI (Sannerud *et al.*, 2006).

Dynamické tubulární IC tvoří dráhu spojující centrální IC s periferií. V tubulárním IC v neuritech polarizovaných buněk PC12 (buňky odvozené z feochromocytomu dřeně nadledvin potkanů pomocí nervového růstového faktoru) nebyly detekovány efekторы RAB1, například p115 a GM130. Tato populace IC pravděpodobně funkčně přímo nesouvisí s transportem mezi ER a Golgi. Autoři článku navrhuje, že je tato doména IC zapojena do biogeneze a dynamiky hladkého endoplasmatického retikula („smooth endoplasmic reticulum” - SER) (Sannerud *et al.*, 2006). IC obsahuje Ca²⁺ATPázu a kalretikulín (Ying *et al.*, 2002) charakteristický pro SER neuronů. Při frakcionaci buněčného supernatantu v iodixanolovém gradientu pozorovali překryv mezi klíčovým enzymem pro biosyntézu cholesterolu, 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzym A (HMG-CoA) reduktázou, ke které dochází v SER, a periferní populací IC obsahující RAB1 (Sannerud *et al.*, 2006).

Pomocí transferinu, reportéru pro endocytické recyklování, byla popsána komunikace mezi pcIC a recyklačním endozomem, který se také vyskytuje v oblasti centrozomu a je stejně jako pcIC rezistentní vůči BFA. V buňkách ošetřených BFA transferin využívá dráhu IC řízenou RAB1A, aby se dostal na plasmatickou membránu. Nižší pH v lumen pcIC by mohlo usnadňovat jeho funkci v třídění a recyklaci (Marie *et al.*, 2009). Tyto kompartmenty jsou pravděpodobně propojeny transportem membránových struktur. Souvislost mezi pcIC a endozomálním systémem naznačuje i aktivace RAB1 (marker IC) a RAB11 (marker endozomálního systému), která je zprostředkována komplexem TRAPP (tj. GEF) (Yang *et al.*, 1998). Jedna z podjednotek TRAPP lokalizuje do struktur rezistentních vůči BFA, kterým pravděpodobně odpovídá pcIC a recyklační endozom (Yu *et al.*, 2006; Marie *et al.*, 2009).

Propojení IC s plasmatickou membránou bylo také pozorováno při transportu nově syntetizovaného proteinu CFTR („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“) nebo cholesterolu. Transport cholesterolu přetrvává i v buňkách ošetřených BFA, ve kterých se Golgi rozpadá. Některý náklad na cestě k cytoplasmatické membráně může využít méně popsanou alternativní dráhu, která Golgi obchází (Sannerud *et al.*, 2006; Marie *et al.*, 2009).

2.2.2.5. COPI

Proteiny komplexu COPI byly charakterizovány jako hlavní hráči retrográdního transportu z Golgi do ER a anterográdního transportu mezi cisternami Golgi (Orci *et al.*, 2000; Ishii *et al.*, 2016). Dále se prokázala spoluúčast proteinů COPI na anterográdním transportu z IC do *cis*-Golgi. Ukázalo se, že se v savčích buňkách vyskytují nejméně tři typy biochemicky rozdílných pláště COPI, které asociují s Golgi, IC a pcIC a které disponují částečně odlišnými vlastnostmi. Komponenty COPI jsou zapojeny nejen do transportu na úrovni časné sekretorické dráhy, ale také do recyklační dráhy (Marie *et al.*, 2009).

Proteiny COPI preferenčně lokalizují do oblasti Golgi a IC. Na rekrutování komplexu COPI na membránu Golgi a IC se podílí mnoho proteinů. Stěžejním a dobře popsaným regulátorem vzniku pláště COPI je ARF1 (ADP-ribosylační faktor 1), jehož aktivita je řízena GEF proteinem GBF1 („Golgi-specific BFA resistance factor 1“). ARF1 s GBF1 jsou důležité pro zakřivení membrány prostřednictvím komplexu COPI, tvorbu a odstřížení váčku od membrány donorového kompartmentu směřujícího do ER (Beck *et al.*, 2011). Tyto proteiny regulují i další buněčné procesy, mezi které patří endocytóza nezávislá na klathrinu (Gupta *et al.*, 2009), metabolismus lipidových kapének (Beller *et al.*, 2008) nebo správné umístění Golgi (Yadav *et al.*, 2012a; Kaczmarek *et al.*, 2017). Regulace odlišných funkcí v různých částech buňky jedním proteinovým komplexem je pravděpodobně zajištěna specifickým umístěním v daném čase. To je v buňce ve velké míře definováno lipidovým složením membrán a přítomností proteinů rodiny RAB (Hutagalung a Novick, 2011).

Lokalizace COPI je ovlivněna činností RAB1B a jeho efektorů. Exprese neaktivní formy RAB1B s nízkou schopností vázat GTP i GDP (RAB1B-N121I) způsobuje disociaci podjednotky beta-COP z membrán. RAB1B ovlivňuje skládání pláště COPI prostřednictvím ARF1 a GBF1 (Alvarez *et al.*, 2003). RAB1B-GTP, který přímo interaguje s GBF1, je zřejmě nezbytný pro vazbu GBF1 na membránu a stabilizuje ARF1 na Golgi (Monetta *et al.*, 2007). Do výstavby pláště COPI je zapojen i další z efektorů RAB1, kterým je protein p115 (Guo a Linstedt, 2014). P115 je jeden z ukotvujících faktorů (tzv. tethers), který reguluje přepravu váčků z ER do Golgi a mezi jednotlivými cisternami Golgi pod dohledem RAB1 a je důležitý pro udržení struktury Golgi (Nelson *et al.*, 1998; Allan *et al.*, 2000; Guo a Linstedt, 2014). Inhibice p115 způsobuje relokaci RAB1B do cytoplasmy, což v konečném důsledku zabraňuje asociaci beta-COP s membránou Golgi. Detailnějším zkoumáním vlivu p115 na cyklování RAB1B ukázalo, že p115 podporuje uvolnění RAB1B z vazby s GDI. To naznačuje, že by p115 mohl být GDF pro RAB1B v oblasti IC nebo *cis*-Golgi (Guo a Linstedt, 2014)

2.2.2.6. Golgi

Golgi se v savčích buňkách vyskytuje jako soubor obvykle 3-9 cisteren, které jsou po stranách vzájemně propojeny. Vytváří kontinuální prostředí membránové kompartmentu, které je často popisováno jako centrum sekretorické dráhy. Pozice Golgi v blízkosti centrozomu specifikuje směr transportu sekretovaných proteinů (Puthenveedu *et al.*, 2006). Náklad vstupuje do oblasti cisteren nazývané *cis*-Golgi (Plutner *et al.*, 1991). V Golgi dochází k řadě posttranslačních modifikací, které jsou nezbytnou součástí procesu syntézy proteinů. Mohou ovlivňovat funkci proteinu, jeho stabilitu, aktivitu i výslednou lokalizaci (Puthenveedu *et al.*, 2006). Transport napříč organelou řídí RAB1. Činností jeho efektorů se náklad dostává do oblasti *trans*-Golgi. Z tohoto místa putuje náklad ve větších směrem k povrchu buňky (Plutner *et al.*, 1991).

2.2.2.6.1. Struktura Golgi

Charakteristická struktura Golgi je známá již od konce 19. století, kdy ji poprvé popsal Camillo Golgi (Golgi, 1898). Vznik a udržování sítě Golgi cisteren je komplexní proces, do jehož regulace je zapojen velký počet molekul. Puthenveedu *et al.* pozorovali formování Golgi prostřednictvím specifické fúze membrán. Mezi prvními identifikovanými proteiny, které jsou nepostradatelné pro správnou funkci Golgi, byly GM130 a GRASP65 („Golgi reassembly-stacking protein of 65 kDa“) (Puthenveedu *et al.*, 2006). Dnes je známa celá řada molekul regulujících strukturu Golgi.

2.2.2.6.2. Regulace struktury Golgi

Na udržení struktury Golgi se podílejí proteiny zapojené do regulace časně sekretorické dráhy. Z velké části ji stanovuje rodina RAB a její efekторы, neboť mají naprosto zásadní úlohu při přepravě nákladu v buňce. V případě přerušení transportu mezi ER a Golgi, Golgi ztrácí svoji charakteristickou strukturu (Alvarez *et al.*, 2003; Haas *et al.*, 2007; Guo a Linstedt, 2014; Liu *et al.*, 2017).

Cytoskelet a jeho molekulární motory udržují strukturu a umístění Golgi. Nokodazol způsobuje depolymerizaci mikrotubulů a rozpad Golgi (Corthésy-Theulaz *et al.*, 1992; Cole *et al.*, 1996). Molekulární motor dynein se pohybuje po mikrotubulech k mínus konci, který je ukotven v centrozomu tvořeném gama tubulinem, čímž se podílí na umístění Golgi v těsné blízkosti centrozomu (Yadav *et al.*, 2012b). Dynein asociuje s membránou *cis*-Golgi především prostřednictvím homodimerického „coiled-coil“ proteinu golgin160 (Hicks a Machamer, 2002) za účasti GTPázy ARF1 a zajišťuje nepřetržitý pohyb organely k centru buňky (Yadav *et al.*, 2012b). Aktinová mikrofilamenta jsou také důležitá pro strukturu a lokalizaci Golgi. Narušení aktinového cytoskeletu cytochalasinem D vede k zahuštění Golgi (Valderrama *et al.*, 1998). V buňkách s deletovaným myosinem IC (MYO1C), který se vyskytuje na dynamických strukturách kolem Golgi kolokalizujících s aktinem, dochází k rozvolnění a rozpadu Golgi. Capmany *et al.* navrhují, že by MYO1C mohl stabilizovat aktin na Golgi a tím usnadnit dopravu váčků do Golgi (Capmany *et al.*, 2019).

V průběhu fáze G2 a mitózy dochází k regulované fragmentaci Golgi, která je zprostředkována fosforylací určité skupiny proteinů asociovaných s Golgi především prostřednictvím cyklin-dependentní

kinázy 1 (CDK1) a „polo-like“ kinázy 1 (PLK1) (Wang *et al.*, 2003). K rozpadu Golgi dochází dvěma cestami. První se děje prostřednictvím zabránění fúze váčků COPI s membránou Golgi a jejich akumulací v mitotickém cytosolu (Warren *et al.*, 1995). P115 se v interfázi váže na protein GM130, efektor RAB1 (Weide *et al.*, 2001), a lokalizuje do *cis*-Golgi. Jeho aktivita je nezbytná pro udržení struktury této organely (Puthenveedu *et al.*, 2006). Stejně jako p115 patří mezi kotvící proteiny a řídí fúzi membrány váčků putujících z ER s membránou *cis*-Golgi (Nakamura *et al.*, 1995). Během mitózy je GM130 fosforylován, p115 se nemůže vázat na jeho N-koncovou doménu a je zastaven transport a fúze váčků s membránou *cis*-Golgi (Nakamura *et al.*, 1997). Tímto způsobem je zajištěn rozpad více jak poloviny membrán Golgi. Zbytek membrán se přetváří v nejednotnou síť tubulů a váčků, které jsou větší než ty, které vznikají první cestou (Warren *et al.*, 1995). Golgin160 se odpojuje od membrány Golgi, která ztrácí kontakt s mikrotubuly a může se rovnoměrně rozptýlit po cytosolu (Yadav *et al.*, 2012b). GRASP55 a GRASP65 jsou ukotvující proteiny, které se podílejí na soudržnosti cisteren Golgi. Během fáze G2 a mitózy kináza JNK2 („c-Jun N-terminal kinase 2“) fosforyluje GRASP65 a kináza ERK2 („Extracellular signal-regulated kinase“ 2) fosforyluje GRASP55, což zabrání tvorbě oligomerů a cisterny Golgi ztrácí pospolitost (Cervigni *et al.*, 2015). Fragmentace Golgi je také proces doprovázející apoptózu. Stejně jako během mitózy dochází k rozkladu Golgi na jednotlivé váčky. Proteiny Golgi jsou pomocí kaspáz štěpeny (Mukherjee *et al.*, 2007).

2.2.2.6.3. Struktura Golgi a neurodegenerativní onemocnění

Narušení struktury Golgi bylo detekováno u závažných neurodegenerativních onemocnění, kdy dochází k rozpadu Golgi mimo buněčný cyklus. Mutace v některých proteinech nebo působení stresu může způsobit změnu struktury Golgi, ke které dochází ještě před nástupem klinických příznaků. Stále není jasné, zda rozpad struktury Golgi je příčinou nebo důsledkem odumírání neuronů (Liu *et al.*, 2017; Martínez-Menárguez *et al.*, 2019).

Jak vyplývá z předchozího textu, na udržení struktury Golgi se podílí mnoho molekul. Během posledních několika desítek let byla snaha o bližší poznání molekulárních mechanismů neurodegenerativních onemocnění, v důsledku čehož bylo detekováno velké množství proteinů, jejichž mutace vede ke změně morfologie Golgi. Jedním z proteinů, které jsou nezbytné pro správnou morfologii Golgi a o kterých se v poslední době hovoří v souvislosti s neurodegenerativními onemocněními jsou členové rodiny RAB (Parakh *et al.*, 2018). Neaktivní forma RAB1B s nízkou afinitou ke GTP i GDP (RAB1B-N121I) naruší časnou fázi sekretorické dráhy, navodí rozpad a přemístění proteinů Golgi do cytoplasmy (Alvarez *et al.*, 2003).

Struktura Golgi může být narušena i chybnou expresí efektorů RAB1, jeho proteiny GEF a GAP (Haas *et al.*, 2007). Delece *GM130* způsobuje změnu jeho lokalizace a rozpad struktury Golgi. Myši s podmíněně deletovaným *GM130* v neuronech vykazovaly neuronální degradaci (Liu *et al.*, 2017). U buněk s deletovaným *p115* bylo detekováno fragmentované Golgi (Guo a Linstedt, 2014).

Prvním popsaným neurodegenerativním onemocněním, u kterého dochází k rozpadu Golgi v motorických neuronech, byla amyotrofická laterální skleróza (ALS) (Mourelatos *et al.*, 1990). Charakteristickým znakem ALS jsou proteinové agregáty, které jsou detekovatelné v motorických neuronech. Většina proteinů, které jsou u pacientů s ALS mutovány, jsou zapojeny do transportu včků mezi ER a Golgi (Parakh *et al.*, 2018; Martínez-Menárguez *et al.*, 2019). Příčin vzniku ALS bylo popsáno několik. Jednou z nich je zmnožení hexanukleotidu GGGGCC v genu *C9ORF72* (DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011). Dále je to mutace v cytosolické superoxiddismutáze 1 (*SOD1*) (Rosen *et al.*, 1993), proteinu *FUS* (Blair *et al.*, 2010) a tvorba cytoplasmatických inkluzí obsahujících protein *TDP43* („Trans-activation response element DNA binding protein 43 kDa“) (Neumann *et al.*, 2006). Mutace *TDP43* a *FUS* znemožnila organizaci nákladu v ERES. Podjednotky komplexu COPII ztrácejí charakteristické uspořádání a jejich hladina je v buňkách výrazně snížena. Transport do IC je přerušen. V případě mutace *SOD1* docházelo k destabilizaci mikrotubulů a byl znemožněn transport do Golgi. Nadměrná exprese *RAB1* u buněk s mutantním *TDP43*, *FUS* nebo *SOD1* chránila ER před působením stresu, obnovila transport na úrovni časné sekretorické dráhy, zabránila tvorbě inkluzí *SOD1* a apoptóze. *RAB1* v motorických neuronech u pacientů s ALS ztrácí typické umístění a lokalizuje do intracytoplasmatických inkluzí. *RAB1* se zřejmě špatně sbaluje a stává se nefunkčním. Vzniklá nerovnováha v transportu včků do/z Golgi způsobuje jeho rozpad (Soo *et al.*, 2015).

Pacienti trpící Parkinsonovou chorobou („Parkinson’s Disease“-PD) mají fragmentované *trans*-Golgi v některých dopaminergních neuronech *substantia nigra*. Buňky v časnějším stádiu PD mají častěji fragmentované Golgi než buňky v pozdějších stádiích, která jsou charakterizována výskytem Lewyho tělísek. Zřejmě je možné napravení fragmentace Golgi během PD, která je pravděpodobně způsobena mutací proteinů regulujících transport včků (Fujita *et al.*, 2006; Martínez-Menárguez *et al.*, 2019). Přesná příčina vzniku PD není ve většině případů zřejmá. Nicméně je známo, že mutace genu *LRRK2* („leucine-rich repeat kinase 2“) může vést k rozvoji PD. *LRRK2* hraje klíčovou roli při regulaci transportu receptorů pro dopamin. Mutace v *LRRK2* způsobuje zpomalení dopravy těchto receptorů z Golgi na cytoplasmatickou membránu (Rassu *et al.*, 2017). Jedním ze substrátů *LRRK2* je rodina *RAB*. *LRRK2* fosforyluje na příklad *RAB7L1*, který se vyskytuje také na membráně Golgi. Mutace v *LRRK2* detekovaná u pacientů s PD zvyšuje fosforylaci *RAB7L1*, která vede k rozptýlenější morfologii *trans*-Golgi (Fujimoto *et al.*, 2018). V Lewyho těliscích je agregovaný alfa-synuklein (alfaSyn). U kvasinek způsobuje akumulace alfaSyn inhibici časné sekretorické dráhy na úrovni mezi ER a Golgi, která může být zvrácena zvýšenou expresí savčího *RAB1* (Cooper *et al.*, 2006).

Dalším neurodegenerativním onemocněním se změněnou morfologií Golgi v některých neuronech hipokampu je Alzheimerova choroba („Alzheimer’s Disease“- AD). U pacientů s AD jsou detekovatelné neurofibrilární uzlíky a amyloidní plaky (Salehi *et al.*, 1994; Stieber *et al.*, 1996). Hromadící se amyloid beta aktivuje *CDK5*, která fosforyluje proteiny podílející se na udržení struktury Golgi, například *GRASP65*, což může způsobovat rozvolnění cisteren Golgi připomínající rozvolnění při mitóze (Sun *et*

al., 2008; Joshi *et al.*, 2014). Struktura Golgi může být také změněna reorganizací mikrotubulů v důsledku nadměrné fosforylace proteinu Tau prostřednictvím konstitutivně aktivované CDK5. Protein Tau asociuje s mikrotubuly, podílí se na jejich uspořádání a stabilizaci. Hyperfosforylovaný Tau způsobuje tvorbu neurofibrilárních uzlíků, které narušují síť mikrotubulů (Mohamed *et al.*, 2017; Martínez-Menárguez *et al.*, 2019). Snížení hladiny endogenního RAB1A vedlo ke změně dynamiky a morfologie Golgi, což může přispívat k zvýšení sekrece Tau (Mohamed *et al.*, 2017).

3. Cíle práce

Cílem diplomové práce bylo stanovení vlivu katalyticky aktivních MTMR6 a MTMR8 na procesy spojené se sekretorickou dráhou, u kterých bylo popsáno, že jsou ovlivňovány katalyticky neaktivním MTMR9 (Doubravská *et al.*, 2020), interakčním partnerem MTMR6 a MTMR8 (Zou *et al.*, 2012). Dále jsme se zaměřili na schopnost MTMR6 a MTMR8 se v buněčných procesech zastupovat, neboť jsou schopné defosforylovat stejný substrát (Zou *et al.*, 2012) a jejich lokalizace se částečně překrývá (Doubravská *et al.*, 2020).

Jako nástroj pro splnění cílů jsme vytvořili buněčné linie HeLa s deletovaným *MTMR6* nebo *MTMR8*. Dále jsme použili vektory nesoucí fluorescenčně značený MTMR6-EGFP nebo MTMR8-EGFP, čímž jsme dočasně zvýšili přirozenou hladinu MTMR6 nebo MTMR8.

Dílčí cíle práce:

1. Charakterizovat lokalizaci markeru časné sekrece, RAB1A, a strukturu Golgi na pozadí zvýšené a snížené hladiny MTMR6 a MTMR8
2. Sledovat vliv hladiny MTMR6 a MTMR8 na sekreci proteinů
3. Porovnat změny fenotypů způsobené zvýšením nebo snížením hladiny MTMR6 nebo MTMR8 a posoudit jejich redundanci

4. Materiál a metody

4.1. Materiál

4.1.1. Biologický materiál

RPE-1: lidská imortalizovaná buněčná linie retinálního pigmentového epitelu (od MUDr. Libor Macůrek, Ph.D.)

HeLa (Henrietta Lacks): lidská nádorová buněčná linie získaná z karcinomu děložního čípku Henrietty Lacksové

SuperTOPFlash HEK 293T (STF): lidská buněčná linie s integrovaným luciferázovým reportérem pro Wnt/beta-katenin signalizaci (od RNDr. Vladimír Kořínek, CSc.)

bakterie DH5alfa

4.1.2. Média

Proliferační médium

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM ++)(Thermo Fisher Scientific) pro lidské linie

- 10% fetální bovinní sérum („fetal bovine serum” - FBS) (Gibco)
- 1% penicilin/streptomycin (Biowest)

Médium skladováno ve 4 °C

Bakteriální médium z lyzogenního vývaru („lysogeny broth” - LB) - tekuté

Příprava 200 ml

- 2 g trypton
- 1 g kvasinkový extrakt
- 2 g NaCl

Médium autoklávnováno při 121°C 20 minut, skladováno ve 4 °C

Bakteriální médium z LB - pevné

Příprava 200 ml

- 3 g agar
- 200 ml tekutého LB média

Na 200 ml bylo přidáno 200 µl kanamycinu/400 µl ampicilinu

4.1.3. Roztoky a chemikálie

Tris-acetát-EDTA (TAE)

- 40 mM Tris (pH 8,0)
- 20 mM kyselina octová
- 1mM EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová)

Tris-borát-EDTA (TBE) buffer

- 89 mM Tris (pH 8,0)

- 89 mM H₃BO₃
- 2 mM EDTA

Fosfátový pufr („phosphate buffer saline“ – PBS)

- 197 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- 10 mM Na₂HPO₄
- 1,8 mM K₂HPO₄

Zásobní roztok skladován jako 10x koncentrovaný roztok, pH 7,4

Laemliho lyzační pufr 4x

- 250 mM Tris (pH 6.8)
- 40% glycerol
- 8% dodecylsulfát sodný („sodium dodecyl sulfate“ – SDS)
- 20% 2-merkptoethanol
- 0,04% bromfenolová modř

Alikvoty skladovány v -20 °C

Elektrodový pufr

- 25 mM Tris
- 0,1% SDS
- 192 mM glycin

Zásobní roztok skladován jako 5x koncentrovaný roztok při pokojové teplotě

Polyakrylamidový gel

Tabulka 1: **Polyakrylamidový gel**

	Separační gel	Zaostřovací gel
	10%	5%
Tris (pH 8,8)	375 mM	
1M Tris (pH 6,8)		125 mM
30% Akrylamid/bis-akrylamid	33,4%	16,75%
10% SDS	1%	1%
10% peroxidisíran amonný	1%	1%
tetramethylethyldiamin (TEMED)	0,04%	0,1%

Blotovací pufr

- 25 mM Tris

- 192 mM glycin
- 0,037% SDS
- 20% methanol

Skladován ve 4 °C

Solný roztok pufovaný Tris s 0,1% Tween (TBST)

- 10 mM Tris-Cl
- 150 mM NaCl
- 0,05% Tween 20

pH 7,4, skladován při pokojové teplotě

3% paraformaldehyd (PFA) rozpuštěný v pufru stabilizujícím mikrotubuly („microtubule stabilising buffer” - MSB)

- 3% PFA
- NaOH - přidávat do úplného rozpuštění PFA
- nechat vychladnout, filtrovat, upravit pH na 6,9
- 50% 2x koncentrovaný pufr stabilizující mikrotubuly

Skladován v -20 °C

MSB

- 20 mM kyselina 2-(N-morfolino)-ethansulfonová (MES)
- 2 mM kyselina etylenglykol-bis(2-aminoethyléter)-tetra-octová (EGTA)
- 2 mM MgCl₂
- 4% polyethylenglykol 6000 (PEG)

rozpuštěno v „Hanks' Balanced Salt Solution”

Biotin

- B4501 (Sigma) - 100mM

„Mowiol mounting medium”

- 6 g glycerol
- 2,4 g Mowiol 4-88 (Hoechs)
- 6 ml ddH₂O
- 12 ml 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5)

Alikvoty skladovány v -20 °C

Používaný materiál skladován v 5 °C

10x trypsin/EDTA (Thermo Fisher Scientific)

jetOPTIMUS® DNA Transfection Reagent (Polyplus)

X-tremeGENE™ Transfection Reagent (Sigma-Aldrich)

Ethidium bromid (Top-Bio)

Tris (Roth)

TritonX100 (Sigma-Aldrich)

Dimetylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich)

Trypanová modř (Thermo Fisher Scientific)

Ampicilin (Sigma-Aldrich)

Kanamycin (Sigma-Aldrich)

GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

Agar (Sigma)

Sušené mléko (Roth)

Akrylamid/bis-akrylamid, 30% (Sigma-Aldrich)

Persíran amonný (Sigma-Aldrich)

cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche)

Blue Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare)

Immobilon® ECL Ultra Western HRP Substrate (EMD Millipore)

dNTP (Thermo Fisher Scientific)

4.1.4. Protilátky

Protilátky ředěny v kompletním DMEM médium s 1% antibiotiky (ATB) a 10% FBS

Tabulka 2: Primární protilátky

Název	Původ	Výrobce	Katalogové číslo	Ředění pro IF	Ředění pro <i>western blot</i>
Myc (9E10)	myš	Exbio	11-433-C100	1:800	
RAB1A	myš	Cell Signalling	D3X9S	1:800	1:1 000
GM130	králík	Abcam	Ab52649	1:1 000	
TU-30 gama-tub	myš	P. Dráber - dar	-	1:10	
Golgin-97	myš	Mol Probes	A21270	1:400	
Alpha tubulin	potkan	Abcam	Ab6160	1:350	
Beta tubulin	myš	Exbio	11-251-C100	1:1 000	
LAMP1	králík	Cell Signalling	9091	1:300	
Wnt3A	králík	Abcam	ab28472	1:300	1:1000
Wnt1	králík	vlastní výroba	-	-	1:300

Tabulka 3: Sekundární protilátky

Název	Specifita	Výrobce	Katalogové číslo	Ředění pro IF
DAM/Cy5	„Anti-mouse“	Jackson Immunores./Spinchem	715-175-150	1:400
GAM/A488	„Anti-mouse“	Thermo Fisher Scientific	A1101	1:1000
DAR/Cy5	„Anti-rabbit“	Jackson Immunores./Spinchem	711-175-152	1:500
GAR/HRP	„Anti-rabbit“	Jackson Immunores./Spinchem	111-035-045	1:10 000

4.1.5. Enzymy

Proteináza K (Sigma Aldrich)

Polymerázy

- polymeráza Phusion (Phu) (Thermo Fisher Scientific)
- polymeráza z *Pyrococcus furiosus* (Pfu) (vlastní výroba)
- reverzní transkriptáza Superscript III (Thermo Fisher Scientific)
- HOT FIREPol®DNA Polymerase v „5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix” (Solis Biodyne)

T4 DNA ligáza (Thermo Fisher)

4.1.6. Primery

(Sigma-Aldrich)

Tabulka 4: Primery a oligonukleotidy

Název	Sekvence	poznámka
Mttr8_int2_F	GTTTTCTAACACTGCAGTCTGC	Testování klonů
Mttr8_int3_R	CCCCTTGAAGAGCTTTTACTC	Testování klonů
Mttr6_int3_F	CAATCTCAGATTGATATGTGTGC	Testování klonů
Mttr6_ex5_R	CTCCTTATCTTGATGATAGTAGG	Testování klonů
ActB_Hs_F	GCCCTGAGGCACTCTTCCA	qPCR
ActB_Hs_R	CGGATGTCCACGTCACACTTC	qPCR
Mtm6Hs_F	CCTAACCTCAAACTTCCCTGT	qPCR
Mtm6Hs_R	AGTCATTCTTGCCACACCA	qPCR
Mttr6Hs_F2	CGGTACCCAAGGTAGAAAACG	qPCR

Mtmr6Hs_R2	AAGGGGGCATCCAGAAGTAG	qPCR
Mtm8Hs_F	AGAATGGCACCTATCCAG	qPCR
Mtm8Hs_R	AAGCCCGTAGCCTCAAAG	qPCR
Mtmr8Hs_F2	CGGTACCCAAGGTAGAAAACG	qPCR
Mtmr8Hs_R2	CAGGCTAGTGATGGGTA ACTTC	qPCR
Mtm9Hs_F	TCACCAATCCCCTCTTTGA	qPCR
Mtm9Hs_R	CGTCCTCTGTTTCCAGTTC	qPCR
Mtmr9_F3	AGGACAATACGGAGGAGCTG	qPCR
Mtmr9_R3	TCCAGAGTAGACAATGCCTCAATG	qPCR
MTMR6pSpCas9 sgDNA #1 F	<u>CACCGATCTCGCTGAGGAATATAAG</u>	CRISPR/Cas9
MTMR6pSpCas9 sgDNA #1 R	<u>AAACCTTATATTCCTCAGCGAGATC</u>	CRISPR/Cas9
MTMR6pSpCas9 sgDNA #2 F	<u>CACCGATCTCGCTGAGGAATATAAG</u>	CRISPR/Cas9
MTMR6pSpCas9 sgDNA #2 R	<u>AAACCTTATATTCCTCAGCGAGATC</u>	CRISPR/Cas9
MTMR8pSpCas9 sgDNA #1 F	<u>CACCGCCACCCGGAAATTCTTG CAG</u>	CRISPR/Cas9
MTMR8pSpCas9 sgDNA #1 R	<u>AAACCTGCAAGAATTTCCGGGTGGC</u>	CRISPR/Cas9
MTMR8pSpCas9 sgDNA #2 F	<u>CACCGGATGGGTA ACTTCTCCACAG</u>	CRISPR/Cas9
MTMR8pSpCas9 sgDNA #2 R	<u>AAACCTGTGGAGAAGTTACCCATC</u>	CRISPR/Cas9

4.1.7. Vektory

Tabulka 5: Vektory

Název	Gen	Poznámka	
pmRuby2-N1-MTMR9	<i>MTMR9</i>	Mikroskopování	
pEGFP-N3-MTMR9	<i>MTMR9</i>	Mikroskopování	
pmCherry-N1-MTMR9	<i>MTMR9</i>	Mikroskopování	
pEGFP-N3-MTMR8	<i>MTMR8</i>	Mikroskopování	
pEGFP-N3-MTMR6	<i>MTMR6</i>	Mikroskopování	
pNeonGreen-RAB1A	<i>RAB1A</i>	Mikroskopování	
PCMV-intron-myc-RAB1AWT	<i>RAB1A</i>	Mikroskopování	Addgene, Terry Hébert, Plasmid #46776
PCMV-intron-myc-RAB1AQ70L	<i>RAB1A Q70L</i>	Mikroskopování	

pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) MTMR6sg1	<i>MTMR6 sgDNA</i>	CRISPR/Cas9	
pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) MTMR6sg2	<i>MTMR6 sgDNA</i>	CRISPR/Cas9	
pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) MTMR8sg1	<i>MTMR8 sgDNA</i>	CRISPR/Cas9	
pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) MTMR8sg2	<i>MTMR8 sgDNA</i>	CRISPR/Cas9	
Str-KDEL_SBP-EGFP-WNT3A	<i>RUSH-WNT3A</i>	Synchronizované uvolnění WNT3A z ER	Addgene, David Virshup, Plasmid #108344
Str-KDEL_SBP-mCherry-WNT3A	<i>RUSH-WNT3A</i>	Synchronizované uvolnění WNT3A z ER	Addgene, David Virshup, Plasmid #108345
pEGFP-N3	EGFP	Luciferázový test	
pCMV-Wnt3A	Wnt3A	Luciferázový test	
pCMV-Wnt1	Wnt1	Luciferázový test	
pJET1.2/blunt		Klonování	

4.1.8. Komerční soupravy

Izolace produktu polymerázové řetězové reakce („polymerase chain reaction” - PCR) z gelu: Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid)

Izolace mRNA: Qiagen RNeasy kit (Qiagen)

Izolace plasmidové DNA z bakterií: Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen)

4.2. Metody

4.2.1. Práce s buněčnými kulturami

Buněčné linie byly kultivovány v DMEM mediu s 10% FBS a 1% ATB Penicilin/Streptomycin v termostatu při 37 °C a 5% CO₂ na 6 cm miskách. Práce s buněčnými kulturami probíhala v laminárním boxu. Buňky byly pasážovány dle potřeby před dosažením konfluence. Buňky byly omyty 2,5 ml PBS, byl přidán 1 ml trypsin/EDTA (0,05% trypsin; 0,02% (0,53mM) EDTA). Po 4-7 minutách bylo přidáno 5 ml čerstvého média a buňky byly resuspendovány. V kultivační misce bylo ponecháno přibližně 50 µl média s resuspendovanými buňkami a doplněno čerstvým médiem DMEM do 5 ml.

Rozmrazování buněk

Alikvoty zamražených buněk v DMEM mediu s 10% DMSO byly po vyndání z tekutého dusíku rozehráty v teplé lázni a bez odkladu přeneseny do 5 ml kompletního média. Buňky byly centrifugovány, peleta byla resuspendována v čerstvém DMEM mediu a přenesena na 6 cm misky.

Mrazení buněk

Buňky byly sklizeny z 6 cm misek pomocí trypsin/EDTA před dosažením konfluence a centrifugovány. Peleta byla resuspendována v 1 ml čerstvého DMEM média a přesunuta do kryozkumavek. Bylo přidáno

100 µl 100% DMSO. Kryozkumavka byla neprodleně přemístěna do zamrazovací nádoby plněné isopropanolem o pokojové teplotě a vložena do -80 °C. Následující den byla kryozkumavka přesunuta do tekutého dusíku.

Transientní transfekce

Buňky určené pro mikroskopické pozorování byly nasazeny na 6-jamkové nebo 12-jamkové destičky s vloženým krycím sklíčkem. Množství buněk bylo určeno tak, aby byla plocha v době fixace z 1/3 konfluentní. Další den byla k buňkám přidána směs s transfekčním činidlem X-tremeGENE™ Transfection Reagents. Do 1,5 ml zkumavky bylo napipetováno 100 µl DMEM média bez FBS a ATB, 1 µg DNA a 1,5 µl Xtreme. Směs byla zamíchána a inkubována při pokojové teplotě po dobu 20 minut. Následně byl transfekční komplex po malých objemech přidán k buňkám. Buňky byly inkubovány v termostatu do následujícího dne, kdy byly fixovány nebo pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem. V případě transfekce buněk plasmidem Str-KDEL_SBP-EGFP-WNT3A byla transfekce opakována totožným transfekčním činidlem ve stejném poměru i následující den z důvodu nižší účinnosti transfekce způsobené velikostí použitého plasmidu.

Transfekce buněk HeLa vektorem nesoucím Wnt3A nebo Wnt1 pro luciferázový test byla provedena pomocí transfekčního činidla PEI (jetOPTIMUS® DNA Transfection Reagent). Do 1,5 ml zkumavky bylo napipetováno 200 µl „jetOPTIMUS® Buffer“ média, 2 µg DNA a 2,5 µl činidla PEI. Směs byla zamíchána a inkubována při pokojové teplotě 10 minut. Transfekční komplex byl po malých objemech přidán k buňkám.

3.2.2. Gelová elektroforéza

Pro PCR produkty větší než 1 000 párů bází (bp) byl použit 1% agarózový gel. Pro PCR produkty menší než 1 000 bp byl použit 2% agarózový gel. Agarózový prášek byl rozpuštěn v TBE/TAE v závislosti na dalším využití produktu PCR. K vychlazenému roztoku o objemu 40 ml byl přidán ethidium bromid (0,75 µg/ml). K určení velikosti PCR produktu byl použit žebříček O'GeneRuler 1kb/100b DNA. Ke vzorku DNA byl přidán „Loading Dye“ (Thermo Fisher Scientific). DNA se pohybovala v elektrickém poli 10 V/1 cm.

3.2.3. SDS PAGE elektroforéza

Buňky byly během přípravy na SDS PAGE elektroforézu po celou dobu umístěny na ledu. Buňky byly sklizeny pomocí Trypsin-EDTA a centrifugovány. Peleta byla resuspendována v 1 ml PBS. K 1 000 000 buňkám bylo přidáno 100 µl 2x koncentrovaného Laemmliho pufru. Buňky byly sonikovány pomocí ultrasonického procesoru UP100H (Hielscher). Vzorek byl denaturován v termobloku při 95 °C po dobu 5 minut.

Pro SDS elektroforézu byl použit 10% (Wnt3A, Wnt1) separační polyakrylamidový gel, který byl překryt tenkou vrstvou destilované vody pro zarovnání hladiny gelu. Po ztuhnutí gelu byla destilovaná voda odstraněna a byl nanesen 5% zaostřovací gel. Po zatuhnutí byl na gel nalit elektroforézový pufr a

do jamek nanese 10 – 20 μ l vzorku a 2,5 μ l markeru „Prestained Protein Ladder PageRuler.“ Přístroj byl nastaven na 120 V.

3.2.4. Western blot

Gel z elektroforézy byl blotován na membránu. Na gel byla přiložena nitrocelulózová membrána (GE, Healthcare) a z každé strany jeden silný filtrační papír. Vše bylo zalito blotovacím pufrům vychlazeným na 4 °C. Blotování probíhalo v přístroji TE77XP (Hoefler) 45 minut při 0,8 mA/cm.² Membrána byla blokována v 5% roztoku sušeného mléka (ROTH) v TBST po dobu 45 minut na třepače a inkubována v 1% roztoku sušeného mléka v TBST s primární protilátkou přes noc při 4 °C. Následující den byla membrána promývána na třepače v TBST po dobu 30 minut a inkubována v 1% roztoku sušeného mléka v TBST se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou (HRP, Horse-Radish Peroxidase) 1 hodinu. Následně byla promývána na třepače v TBST po dobu 30 minut, analyzována pomocí substrátu pro peroxidázu a snímání světelného signálu na film (Agfa). Pro kontrolu nasazeného množství buněk byla použita protilátka proti tubulinu. K vyvolání membrány byl použit substrát připravený v laboratoři v kombinaci s komerčním substrátem „WesternBright ECL.“

3.2.5. Fixace a imunologické barvení

Fixace buněk pomocí 3% PFA

Buňky narostlé na krycích sklech v 6-jamkových nebo 12-jamkových deskách byly fixovány v 1 ml 3% PFA po dobu 10 minut. Fixované buňky byly permeabilizovány prostřednictvím 1 ml 0,1-0,5% Tritonu X100 ředěného v PBS po dobu 5 minut. Primární protilátka byla ředěna do 100 μ l kompletního média s 10% FBS a 1% ATB. Inkubace probíhala přes noc ve 4 °C. Následující den byly buňky barveny sekundární protilátkou stejným postupem jako v případě primární protilátky. Buňky byly inkubovány ve tmě 1 hodinu při pokojové teplotě. Jádra byla barvena pomocí 1 μ g/ml Diamidino-2-phenylindolového barviva (DAPI) ředěného v PBS ve tmě 5-10 minut při pokojové teplotě. Buňky byly montovány na podložní sklo pomocí 25 μ l Mowiolu.

Fixace buněk pomocí methanolu

Buňky narostlé na krycích sklech na 6-jamkových deskách byly fixovány v 1 ml 100% methanolu vychlazeného na -20 °C po dobu 10 minut při -20 °C. Následující postup byl totožný s fixací v 3% PFA. Fixované vzorky byly uchovávány ve tmě při 4 °C.

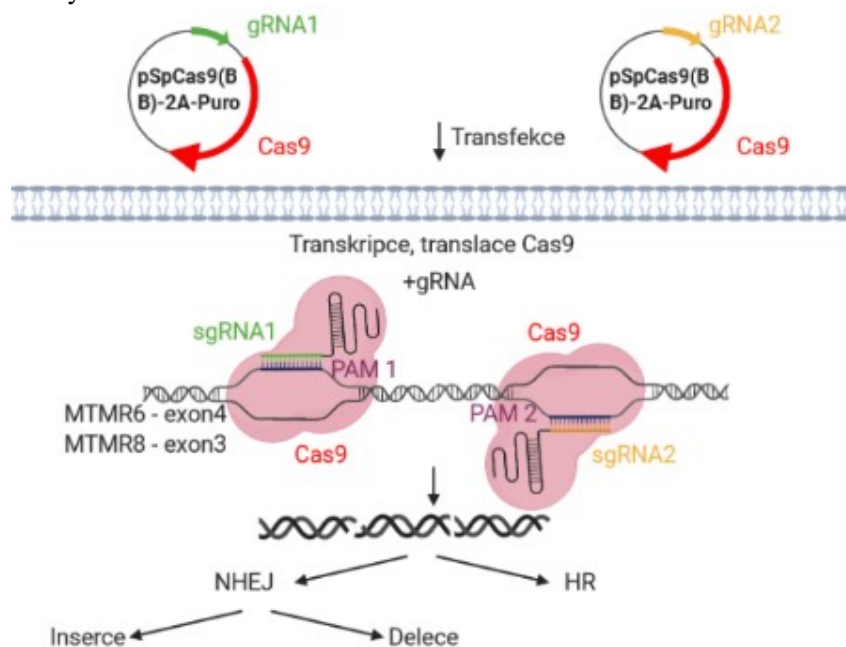
3.2.6. Příprava buněčných linií „knock-out“

Systém CRISPR/Cas9 („Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats“)

Buněčné linie s deletovaným *MTMR6* nebo *MTMR8* jsme připravovali pomocí systému CRISPR/Cas9. Naváděcí RNA („guide“ RNA - gRNA) byly navrženy tak, aby byly komplementární k úseku DNA mezi doménou PH-GRAM a PTP a aby zasahovaly i případné izoformy. Pro každý protein vznikly dvě gRNA, které se komplementárně vážaly na 3'-5' vlákno exonu 4 u *MTMR6* a exonu 3 u *MTMR8*. Tyto gRNA odpovídají komerčně dostupným gRNA pro *MTMR6* a *MTMR8*.

Postup přípravy vektoru pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) nesoucího informaci pro gRNA, Cas9 a puromycinovou rezistenci byl proveden dle protokolu „ZhangLab” (https://media.addgene.org/cms/filer_public/6d/d8/6dd83407-3b07-47db-8adb-4fada30bde8a/zhang-lab-general-cloning-protocol-target-sequencing_1.pdf). Tento vektor obsahuje fragment BbsI, který byl vyštěpen. Navržené jednovláčkové DNA oligonukleotidy odpovídající gRNA byly fosforylovány a byl proveden jejich „annealing” za vzniku dvouvláčkových oligonukleotidů. Naštěpený a přečištěný vektor byl ligován s fosforylovanými oligonukleotidy s přesahujícími konci odpovídajícími BbsI místům. Vektor pSpCas9(BB)-2A-Puro nese gen pro nukleázu Cas9. Cas9 je v transfekované buňce exprimována a produkuje dvouřetězcové zlomy v místech označených gRNA, které mohou být následně buňkou chybně opraveny a vyústit v delecii nebo inzerci NT (obr. 6).

Buňky byly selektovány v kompletním DMEM mediu s 5 µg/ml puromycinem 24 hodin. Transfekované buňky byly k puromycinu rezistentní.



Obrázek 6: **CRISPR/Cas9**. Buňky byly transfekovány dvěma vektory nesoucími různé gRNA sekvence (žlutě a zeleně) a Cas9 (červeně). gRNA rozpoznávají cílovou sekvenci na základě komplementarity bází a dvoušroubovice DNA je štěpena na dvou místech prostřednictvím nukleázy Cas9 v blízkosti PAM sekvence (fialově). Buňka opravuje vzniklé zlomy v obou vláčkách prostřednictvím homologní rekombinace (HR) nebo nehomologního spojování konců („non-homologous end joining” - NHEJ), během kterého může dojít k delecím nebo inzercím NT.

Kultivace klonů

Buňky s potenciální mutací v genu pro *MTMR6* nebo *MTMR8* byly 48 hodin po transfekci vektory pro systém CRISPR/Cas9 sklizeny. Část buněk byla zmrazena. Zbýlé buňky byly dány do nové zkuševky, médium bylo doplněno tak, aby se ve 100 µl média nacházela jedna buňka. Do každé jamky 96-jamkové destičky bylo napipetováno 150 µl média a přidáno 100 µl média s buňkou. Následující týdny byly kontrolovány jednotlivé jamky a vyřazovány ty, ve kterých se nacházelo dva a více klonů. Narostlé kolonie buněk byly přeneseny na 12-jamkovou destičku. Klony byly po dosažení konfluency sklizeny a testovány na případné změny v exonech v genomové DNA.

Izolace genomové DNA pro PCR

Buňky z konfluentní 6cm misky byly sklizeny a centrifugovány. Veškeré médium bylo odsáto, buňky byly resuspendovány v PBS a opět centrifugovány. K peletě bylo přidáno 100 μ l 30mM Tris pH8 a 1 μ l proteinázy K (20mg/ml). Směs byla po promíchání přemístěna do termobloku vyhřátého na 52 °C a inkubována přes noc. Následující den byla inaktivována proteináza K zvýšením teploty termobloku na 95 °C po dobu 15 minut. Směs byla centrifugována 10 minut, 21 400g při 25 °C. Do PCR reakce byl přidáván 1 μ l supernatantu.

3.2.7. Testování buněčných linií KO

Testování prostřednictvím DNA elektroforézy

Úsek izolované genomové DNA, ve kterém jsme předpokládali mutaci, byl namnožen pomocí PCR. Primery byly navrženy tak, že v případě *MTMR6* nasedaly na intron 3 a exon 5. Amplifikovaný úsek buněk divokého typu („wild type” - WT) měřil 661 bp. Primery pro *MTMR8* rozpoznávaly sekvenci v intronu 2 a intronu 3. Výsledný produkt u buněk WT měřil 588 bp. Pro syntézu vlákna jsme nejprve používali DNA polymerázu Pfu. Z důvodu nízké hladiny produktů jsme ji vyměnili za DNA polymerázu Phu. Produkty PCR jsme nanесли do 2% agarózového gelu, což nám umožnilo detekovat výraznější změny ve velikosti amplifikovaného úseku genomové DNA testovaných buněk. Produkty s odlišnou velikostí vůči kontrole jsme izolovali z gelu pomocí komerční soupravy „Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit.” Sekvenční změny ve sledovaných genech jsme nechali ověřit pomocí Sangerova sekvenování v laboratoři OMICS Genomika v Biocevu. Jestliže se delece nebo inserce ve vybrané kolonii potvrdila, bylo potřeba ověřit, zda došlo ke vzniku mutace v obou alelách. Bakterie DH5alfa jsme transformovali PCR produktem (stejným jako pro sekvenování) vloženým do vektoru pJET1.2/blunt. Ze selektovaných kolonií narostlých na agarózových miskách jsme izolovali plasmidy pomocí komerční soupravy „Qiagen Plasmid Midi Kit” a opět jsme namnožili úsek nesoucí případné změny pomocí primerů pJet_F/R (vždy několik kolonií odpovídajících 1 klonu případných KO buněk). PCR produkt jsme nanесли do 2% agarózového gelu, porovnali velikost s kontrolním vzorkem, fragmenty DNA jsme izolovali z gelu a dali sekvenovat. Jestliže jsme získali dvě rozdílné sekvence genu, které se zároveň lišily od sekvence buněk WT a vedly k výsledné deleci genu, používali jsme buňky nesoucí tyto alely v dalších experimentech jako modelovou KO buněčnou linii, *MTMR6KO* nebo *MTMR8KO*.

Příprava dvojitých KO pro geny *MTMR6* a *MTMR8* probíhala obdobným způsobem. Pro systém CRISPR/Cas9 byly použity buněčné linie s ověřenou mutací v obou alelách genu *MTMR6* nebo *MTMR8*.

Tabulka 6: **PCR směs pro amplifikaci úseku genomové DNA**

Reagencie	Množství
templát	1 μ l
H ₂ O	do 20 μ l
„forward primer” (10 μ M)	0,5 μ l
„reverse primer” (10 μ M)	0,5 μ l
dNTP (10 mM)	0,5 μ l
5x „high fidelity” pufr/10x Pfu pufr	4 μ l/2 μ l
Pfu/Phu (2U/ μ l)	0,5 μ l/0,25 μ l

Tabulka 7: **PCR reakce pro amplifikaci úseku genomové DNA**

Krok	Čas	Teplota/MTMR6	Teplota/MTMR8	Počet opakování
Počáteční denaturace	2 minuty	98 °C	98°C	
Denaturace	30 sekund	98 °C	98 °C	33 x
Nasednutí primerů	20 sekund	55 °C	61 °C	
Syntéza	1 minuta			
Finální syntéza	5 minut	72 °C	72 °C	

Tabulka 8: **Klonování do P-Jetu**

Reagencie	Množství
Vektor pJET1.2/blunt	0,5 μ l
Pufr	7,5 μ l
ligáza T4 (5U/ μ l)	0,5 μ l
PCR produkt	6,5 μ l

Tabulka 9: **Příprava vzorků na sekvenování**

Reagencie	Množství
fragment DNA	7,5 μ l
„Forward primer” (10 μ M)	0,5 μ l

Testování prostřednictvím kvantitativní RT-PCR

Izolace mRNA, reverzní transkripce

Buňky narostlé na 6cm misce byly sklizeny pomocí Trypsin/EDTA. mRNA byla izolována z buněk pomocí komerční soupravy „Qiagen RNeasy kit” pro izolaci mRNA. Koncentrace mRNA byla změřena na nanodropu. mRNA byla reverzní transkripcí přepsána do cDNA. Po denaturačním kroku byla směs dána na 1 minutu na led. K denaturační směsi byla přidána směs pro cDNA syntézu.

Tabulka 10: Podmínky syntézy cDNA

Krok	Reagencie	Množství	Čas	Teplota
Denaturace	mRNA	1 µg	5 minut	65 °C
	Primer oligo dT	1 µl		
	dNTP (10 mM)	1 µl		
	H ₂ O	Doplnit objem do 10 µl		
Nasednutí primerů	Reverzní transkriptáza Superscript III	1 µl		
	5x RT pufr	4 µl		
	„RNase out”	1 µl		
	0,1 M DTT (dithiothreitol)	2 µl		
	H ₂ O	2 µl		
cDNA syntéza	/	/	50 minut	50 °C
Ukončení reakce	/	/	5 minut	85 °C

Výsledná reakce měla objem 20 µl. 10 µl bylo zamrazeno v -80 °C. K 10 µl bylo přidáno 90 µl H₂O. Naředěný produkt byl připraven k použití pro RT PCR a dlouhodobě uchováván ve 4 °C.

Kvantitativní RT-PCR

V buněčných liniích MTMR6KO a MTMR8KO jsme zjišťovali hladinu mRNA MTMR6 a MTMR8. Jako kontrolní gen, který by měl být exprimován ve všech buňkách stejně, jsme zvolili aktin. Primery pro kvantitativní RT-PCR byly navrženy tak, aby amplifikovaná sekvence obsahovala rozhraní exonů. Případná příměs genomové DNA ve vzorku, která by mohla zkreslit výslednou hodnotu, by se nestihla za daný časový úsek nasyntetizovat, neboť jsou mezi exony dlouhé introny. Tím bylo zajištěno měření pouze hladiny mRNA/cDNA. Vzorky jsme měřili v tripletech. Před vložení do termálního cyklovače byly centrifugovány 1 minutu, 380 g při pokojové teplotě. Výsledné produkty měřily přibližně 200 bp.

Tabulka 11: kvantitativní RT-PCR směs

Reagencie	Množství
cDNA	1 µl
„forward primer“ (10 µM)	0,5 µl
„reverse primer“ (10 µM)	0,5 µl
H ₂ O	10 µl
5x HOT FIREPol®EvaGreen®qPCR Supermix	3 µl

Tabulka 12: RT-PCR

Krok	Čas	Teplota	Opakování
Iniciální aktivace	12 minut	95 °C	
Denaturace	95 °C	15 s	40x
Nasednutí primerů	60-65 °C	20-30 s	
Syntéza	72 °C	20-30 s	

Obdržená data byla zpracována dle protokolu „Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method“ (Schmittgen a Livak, 2008).

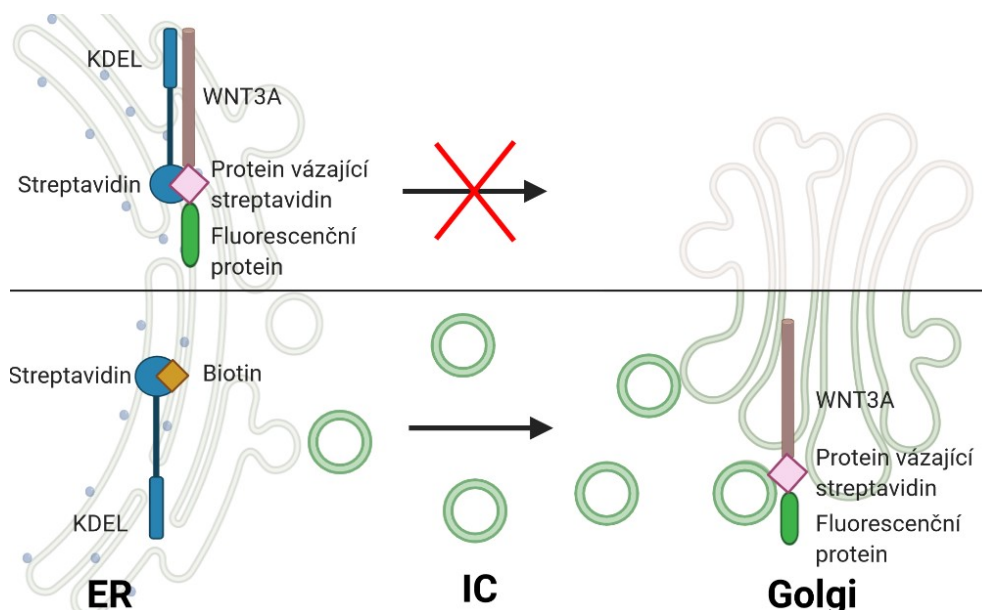
3.2.8. Transformace bakterií

Kompetentní bakterie DH5alfa byly vyndány z -80 °C na led. Ihned po rozmrazení bylo přidáno příslušné množství DNA (plasmid – 1 µg, produkt PCR – 10 µl), směs byla promíchána a ponechána 30 minut na ledu. Směs bakterií a DNA byla vystavena teplotnímu šoku přesunutím do termobloku vyhřátého na 42 °C, po 30 sekundách byla vrácena zpět na led na další 2 minuty. Bylo přidáno 700 µl LB média a inkubováno v 37 °C po dobu 30 minut. Směs byla centrifugována 1 minutu, 21 400 g při 25 °C, peleta byla resuspendována v 40-70 µl LB média a nanesena na agarózové misky s příslušným ATB. Miska byla vložena do termobloku vyhřátého na 37 °C přes noc v sáčku, který zabraňoval vyschnutí agaru.

3.2.9. Systém RUSH

Systém RUSH („Retention Using Selective Hooks“) umožňuje zadržení sekretovaného proteinu v ER a jeho následné synchronizované uvolnění. Systém se skládá ze dvou komponent, a to z proteinu zájmu fúzovaného s peptidem vázajícím streptavidin („streptavidin binding peptid“ - SBP) a vlastním „hákem“ („hook“), tedy proteinem stabilně lokalizujícím do ER, který je fúzován se streptavidinem. Transport je možné sledovat prostřednictvím fluorescenčního proteinu fúzovaného s proteinem zájmu. Pokud jsou obě komponenty exprimovány společně v buňkách, streptavidin na „háku“ váže skrze SBP protein

zájmu, který je efektivně držen v ER. Po přidání biotinu se vazba uvolní a pozorovaný protein prochází sekreční dráhou (Boncompain *et al.*, 2012) (obr. 7).



Obrázek 7: **Schéma systému RUSH.** Systém RUSH umožňuje synchronizované uvolnění nákladu z ER a skládá se ze dvou komponent. První částí (modře) je streptavidin spojený se sekvencí KDEL (lysin, kyselina asparagová, kyselina glutamová, leucin) lokalizující do ER. Druhou částí je protein vázající streptavidin (růžově), který je fúzovaný s WNT3A (hnědě) a fluorescenčním proteinem (zeleně). Proteinový komplex se akumuluje v ER. Přidaný biotin (žlutě) se naváže na streptavidin a zůstává díky kotvě v ER. Protein vázající streptavidin je uvolněn a společně s WNT3A fúzovaným s fluorescenčním proteinem putuje sekreční dráhou.

Buňky RPE-1 byly transfekovány konstruktem Str-KDEL_SBP-mCherry-WNT3A společně s pEGFP-N3-MTMR6/MTMR8/MTMR9. Buněčné linie WT, MTMR6KO a MTMR8KO byly transfekovány konstruktem Str-KDEL_SBP-EGFP-WNT3A. 20 hodin po transfekci byl k buňkám přidán 100 μ M biotin v DMSO. Buňky byly inkubovány 10 minut v 37 °C, aby se zahájilo uvolňování WNT3A z ER. Následně byly přesunuty na 3 hodiny do 15 °C, transport byl zpomalen. Buňky byly fixovány 3% PFA a barveny protilátkou proti proteinu GM130. Na fluorescenčním konfokálním mikroskopu bylo hodnoceno, zda EGFP-WNT3A doputoval do Golgi nebo zůstal v ER jako u buněk WT s přidáním DMSO bez biotinu.

3.2.10. Luciferázový test

Pro hodnocení vlivu delece *MTMR6* a *MTMR8* na sekreci jsme využili protein Wnt1. Buňky tranzientně transfekované konstruktem Wnt1 sekretují tento protein do extracelulární matrix. Reportérové buňky STF mají stabilně integrovaný luciferázový reportér SuperTOPFlash (Veeman *et al.*, 2003). Wnt1 sekretovaný do média aktivuje signální dráhu Wnt, dochází ke stabilizaci beta-kateninu a jeho translokaci do jádra, kde spolu s transkripčními faktory TCF/LEF spustí expresi luciferázy. Po přidání substrátu pro luciferázu je možné luminometrem měřit emitované viditelné světlo a dekovat míru signalizace Wnt.

Buňky určené pro luciferázový test byly nasazeny na dvě 6-jamkové destičky v množství odpovídající jedné osmině konfluence. Buňky byly transfekovány prostřednictvím transfekčního činidla PEI vektorem nesoucím Wnt1 a prázdným vektorem pro kontrolu. K buňkám určeným pro luciferázový test byly nasazeny buňky STF. Po 24 hodinách kultivace byl k buňkám přidán pufr pro měření luciferázy, „passive lysis buffer,” který ukončil aktivaci reportérových buněk a buňky zlyzoval. Takto připravené vzorky pro měření luminometrem byly uchovány v -80 °C. Buňky z druhé destičky byly lyzovány a použity na *western blot*.

K vzorkům připraveným v předchozích krocích byl přidán substrát pro luciferázu „Dual-Glo luciferase assay system.” Emise viditelného světla byla měřena luminometrem GloMax 20/20 (Promega) po dobu 10 sekund.

3.2.11. Konfokální mikroskopie a analýza dat

Mikroskopické snímky byly pořízeny na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP8 pomocí imerzního objektivu 63x (olej). Úprava a analýza snímků byla provedena v programu Fiji (Schindelin *et al.*, 2012). Pro excitaci byly použity lasery o vlnové délce 405 nm, 488 nm a 633 nm. Spektrální okna detektorů byla nastavena 430-470 nm pro modrý kanál, 500-560 nm pro zelený kanál a 650-700 nm pro červený kanál. Fixované buňky byly snímány v několika konfokálních rovinách ve vzdálenosti 200 nm (Z-stack). Takto nasnímané roviny byly sloučeny do výsledného snímku s promítnutím maximální intenzity. Živé buňky byly snímány pouze v jedné rovině. Buňkám bylo zajištěno stabilní prostředí o teplotě 37 °C a 5% CO₂. Snímky pro kvantitativní analýzu byly pořízeny při zachování stejného nastavení mikroskopu.

Při charakterizaci morfologie Golgi (červený kanál) u buněk WT a KO byl na snímek aplikován práh „Default dark,” který odstranil nespecifický signál mimo Golgi. V jednotlivých buňkách byla změřena plocha struktur pozitivních na GM130 (marker *cis*-Golgi) v μm^2 a určen jejich počet. Distribuce signálu RAB1-NG v Golgi a na váčcích byla hodnocena prostřednictvím kolokalizace mezi fluorescenčním signálem RAB1A-NG (zelený kanál) a GM130 (červený kanál). Hranice buněk byly stanoveny ručním výběrem. Následně byl na zelený kanál aplikován práh „Otsu dark,” který odstranil signál mimo Golgi a váčky. Pomocí Manderova koeficientu byl určen vzájemný překryv fluorescenčního signálu RAB1-NG s GM130 (JACoP plugin, Bolte a Cordelières, 2006). Před vlastním hodnocením vlivu MTMR6, MTMR8, MTMR9 na lysozomální systém jsme specifikovali hranice jednotlivých buněk. Nejprve byla definována jádra (modrý signál). K nim byla vymezena plocha buněk na základě mikroskopických snímků ve světlém poli (plugin MorphoLibj, Legland *et al.*, 2016). V definovaných buňkách byl naprahován zelený signál (LAMP1 – marker lysozomů) a následně určen počet a celková plocha struktur pozitivních na LAMP1 (marker lysozomů). Distribuce lysozomů byla hodnocena prostřednictvím kolokalizace mezi fluorescenčním signálem lysozomů (LAMP1 - zelený kanál) a jádra (DAPI - modrý kanál). Pomocí Manderova koeficientu byl určen vzájemný překryv fluorescenčního signálu LAMP1 s DAPI (plugin JACoP, Bolte a Cordelières, 2006).

Hodnocení statistické signifikance získaných dat bylo provedeno v programu GraphPad Prism 5 prostřednictvím nepárového t-testu.

4. Výsledky

4.1. Lokalizace MTMR6 a MTMR8

Pomocí konfokální fluorescenční mikroskopie jsme nejprve hodnotili lokalizaci vybraných proteinů MTMR. V důsledku neexistence kvalitních komerčních protilátek nebylo možné sledovat proteiny na endogenní úrovni. Proto jsme exprimovali fluorescenčně značené MTMR. MTMR7, který je také interakčním partnerem MTMR9 a řadí se do stejné podskupiny myotubularinů jako MTMR6 a MTMR8, jsme z experimentů vyloučili z důvodu nízké exprese v námi používaných buněčných liniích.

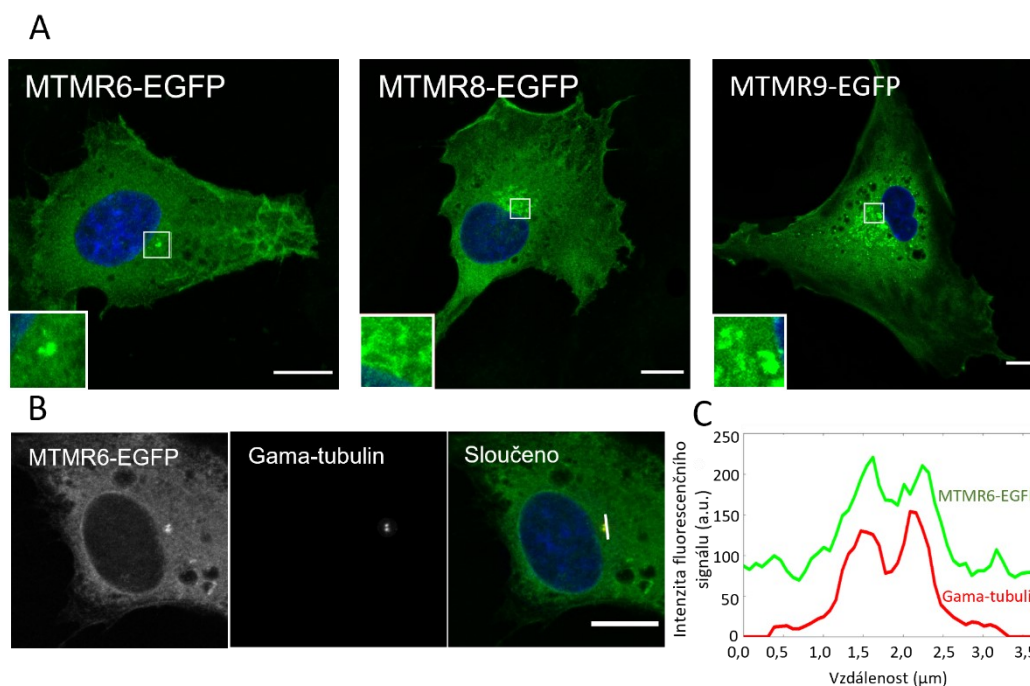


Figura 1: Lokalizace exogenně exprimovaného MTMR6-EGFP, MTMR8-EGFP a MTMR9-EGFP v buněčné linii RPE-1. A) Buňky RPE-1 byly transfekovány MTMR6-EGFP, MTMR8-EGFP a MTMR9-EGFP. MTMR6-EGFP, MTMR8-EGFP a MTMR9-EGFP byly pozorovány v cytoplasmě a na cytoplasmatické membráně. MTMR6-EGFP dále lokalizuje do oblasti centrozomu a v některých buňkách byl detekován signál v Golgi. MTMR8-EGFP byl obvykle pozorován v Golgi. MTMR9 se nachází na váčcích. Bílé rámečky vymezují zvětšenou plochu lokalizace příslušného MTMR v perinukleární oblasti. B) Buňky RPE-1 byly transfekovány MTMR6-EGFP (zelený kanál) a po fixaci barveny protilátkou proti gama-tubulinu (červený kanál). MTMR6-EGFP kolocalizuje s gama-tubulinem, který tvoří základ centrozomu. Bílá křivka označuje oblast, ve které byla měřena intenzita fluorescenčního signálu. Uvedené mikroskopické obrázky odpovídají maximální projekci několika konfokálních rovin. Měřítko: 10 μm C) Intenzita fluorescenčního signálu MTMR6-EGFP a gama-tubulinu dosahuje nejvyšších hodnot ve stejných místech buňky.

MTMR6-EGFP a MTMR8-EGFP jsou rozptýleny především v cytoplasmě a na cytoplasmatické membráně. U některých buněk byl patrný signál MTMR6-EGFP v Golgi, který však nebyl tak výrazný a častý jako v případě MTMR8-EGFP (Fig. 1A). Velmi nápadný byl fluorescenční signál MTMR6-EGFP kulovitého tvaru v blízkosti jaderné membrány, který jsme detekovali v každé buňce. Na základě lokalizace a morfologie jsme předpokládali, že by mohlo jít o centrozom. V buňkách transfekovaných vektorem nesoucím MTMR6-EGFP byl protilátkou nabarven gama-tubulin, který je základní stavební jednotkou centrozomů. Mezi MTMR6-EGFP a gama-tubulinem byla pozorována kolokalizace (Fig. 1B). Oblastí centrozomu byla proložena křivka. V každém jejím bodě byla měřena intenzita

fluorescenčního signálu („Color profiler - Fiji software“). Intenzita fluorescenčního signálu odpovídající MTMR6-EGFP a gama-tubulinu dosahovala nejvyšších hodnot ve stejných bodech křivky (Fig. 1C).

MTMR8-EGFP byl stejně jako MTMR6-EGFP primárně detekován v cytoplasmě a dále na periferii buňky v oblasti cytoplasmatické membrány. Výraznější signál strukturou odpovídající Golgi byl pozorován v perinukleární oblasti. Jak v případě MTMR6-EGFP, tak v případě MTMR8-EGFP měla cytoplasmata spíše homogenní charakter. Ani u jednoho z proteinů nebyl pozorován výraznější váčkový vzor (Fig. 1A).

Ve srovnání s MTMR6-EGFP a MTMR8-EGFP byl MTMR9-EGFP pozorován jak v cytoplasmě, tak na váčcích vyskytujících se převážně kolem jádra. MTMR9-EGFP lokalizuje v některých místech na plasmatickou membránu (Fig. 1A). Ačkoliv byla popsána afinita MTMR6 a MTMR8 vůči stejným substrátům, lokalizace naznačuje specifickou funkci těchto fosfatáz (např. centrozom a MTMR6) a zároveň nevyklučuje možnou redundanci v jiných buněčných kompartmentech.

4.2. Vliv zvýšené hladiny MTMR6/MTMR8 na lokalizaci exogenně exprimované RAB1A

Lokalizace MTMR9 do oblasti IC podnítila zkoumání vztahu mezi MTMR9 a RAB1, který je nepostradatelným proteinem pro správný transport na úrovni časné sekretorické dráhy a také jedním z markerů IC (Plutner *et al.*, 1991). Bylo zjištěno, že MTMR9-EGFP a RAB1A-MYC vzájemně ovlivňují svou lokalizaci (Doubravská *et al.*, 2020). V buňkách transfekovaných pouze RAB1A-MYC, je detekován fluorescenční signál v Golgi, váčcích IC, ER a cytoplasmě (Fig. 2A). RAB1A-MYC a MTMR9-EGFP se při společné expresi v buňkách RPE-1 přemisťují na membrány váčků o větší velikosti, než jsou váčky v buňkách transfekovaných pouze MTMR9-EGFP nebo RAB1A-MYC. Signál RAB1A-MYC v cytoplasmě je u dvojité transfekovaných buněk ve srovnání s buňkami transfekovanými pouze RAB1A-MYC slabší. MTMR9-EGFP se v přítomnosti RAB1A také přesouvá z cytoplasmy na váčky (Fig. 1A, Fig. 2B). Struktura Golgi je změněna (Fig. 2B).

Zajímalo nás, zdali umístění RAB1A v buňce ovlivňují i interakční partneři MTMR9, katalyticky aktivní fosfoinositid fosfatázy MTMR6 a MTMR8. Buňky RPE-1 byly současně transfekovány RAB1A-MYC a MTMR6-EGFP nebo MTMR8-EGFP. Lokalizace RAB1A-MYC nebyla zvýšenou hladinou MTMR6-EGFP nebo MTMR8-EGFP výrazně změněna (Fig. 2B). RAB1A-MYC byla detekována především v Golgi, cytoplasmě a na váčcích jako v buňkách transfekovaných pouze RAB1A-MYC. Ke změně lokalizace MTMR6-EGFP nebo MTMR8-EGFP při zvýšené hladině RAB1A-MYC také nedošlo. MTMR6-EGFP nebo MTMR8-EGFP a RAB1A-MYC vzájemně neovlivňují svou lokalizaci v buňkách RPE-1 na rozdíl od MTMR9-EGFP.

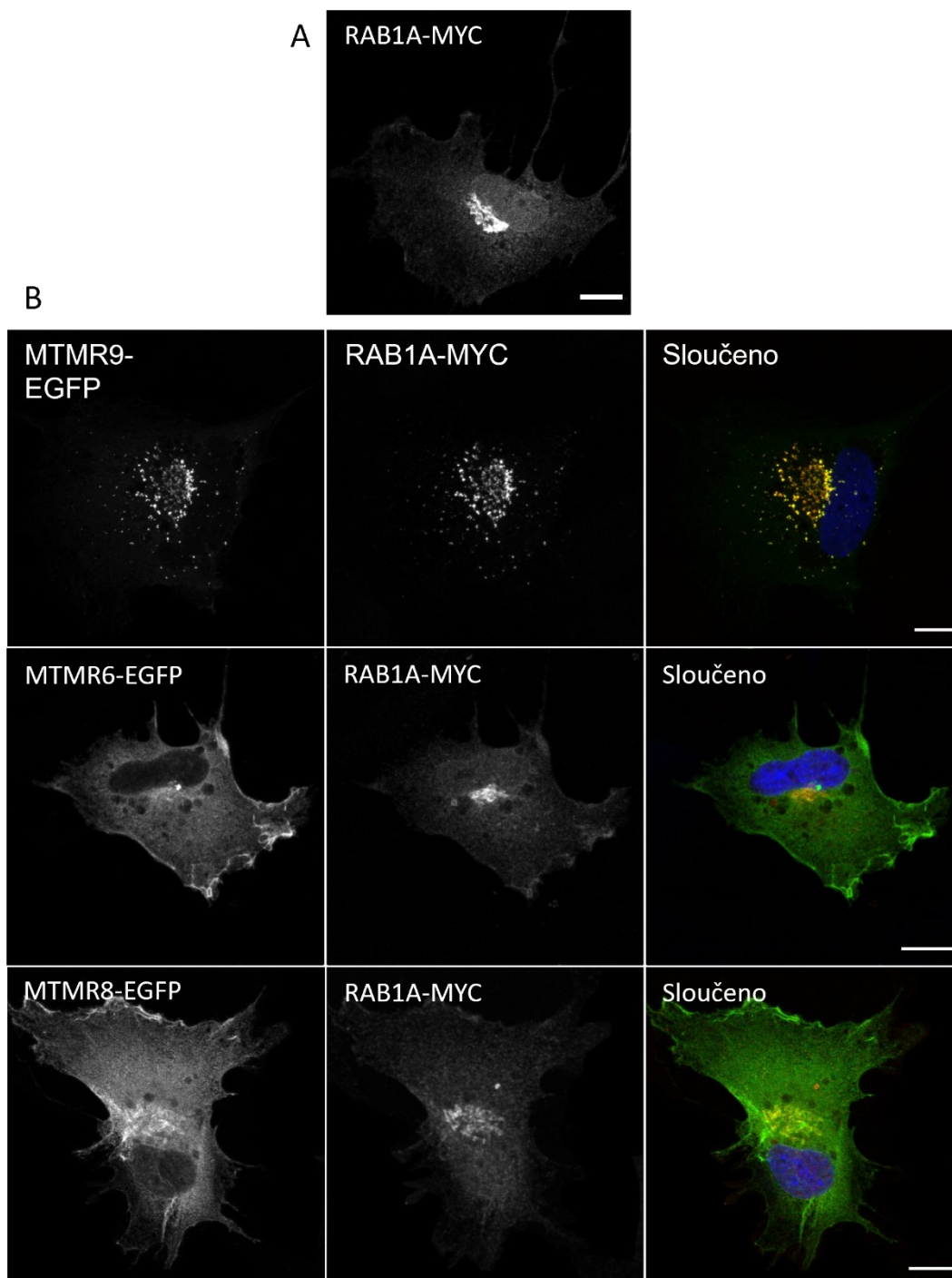


Figura 2: Zvýšená hladina MTMR6 a MTMR8 na rozdíl od MTMR9 nemá vliv na lokalizaci RAB1A v buňkách RPE-1 A) Buňky RPE-1 byly transfekovány RAB1A-MYC (červený kanál), který lokalizuje na Golgi, váčky, ER a do cytoplasmy. B) Současná transfekce RPE-1 buněk MTMR9-EGFP s RAB1A-MYC vede k přesunu RAB1A-MYC na váčky a ke změně struktury Golgi. MTMR6-EGFP a MTMR8-EGFP nemají výrazný vliv na lokalizaci RAB1A-MYC. Uvedené mikroskopické obrázky odpovídají maximální projekci několika konfokálních rovin. Měřítko: 10 μ m

4.3. Vytvoření buněčných linií „knock-out“

Jak je zmíněno výše v textu, neměli jsme k dispozici protilátku proti MTMR. Proto jsme sledovali vliv MTMR6 a MTMR8 na buněčné procesy prostřednictvím vychýlení jejich přirozené hladiny. Nejprve jsme zvýšili množství proteinů transfekcí buněk vektorem nesoucím MTMR6-EGFP nebo MTMR8-EGFP. K delecii proteinu jsme využili systém CRISPR/Cas9. Jako modelovou buněčnou linii jsme

zvolili buňky RPE-1, ve kterých jsme detekovali váčky pozitivní na RAB1A a MTMR9. Nicméně ani využití dvou odlišných protokolů nevedlo k zisku buněk RPE-1 s deletovaným *MTMR6* nebo *MTMR8*. Jako druhou modelovou linii jsme vybrali buňky HeLa, u kterých se podařilo v předchozí práci deletovat gen *MTMR9* (Doubravská *et al.*, 2020). Vytvořili jsme několik klonů, které měly mutace v genu *MTMR6* nebo *MTMR8* vedoucí k předčasnému ukončení čtecího rámce. Pro další experimenty jsme vybrali vždy jeden klon pro každý gen; MTMR6KO a MTMR8KO.

U klonu MTMR6KO došlo v jedné alele k delecí 16 NT (Fig. 3A), která vedla k posunu čtecího rámce a záměně AK ve vzniklém peptidu, který byl výrazně delší než nemutovaná forma (Fig. 3B). V druhé alele došlo k inzerci 324 NT (Fig. 3A) a opět změně AK tvořících peptid (Fig. 3B). U klonu MTMR8KO vznikla v obou alelách inzerce vedoucí k předčasnému STOP kodonu a nesmyslnému peptidu (Fig. 3D). Do jedné alely bylo vloženo 189 NT. V druhé alele došlo k inzerci 311 NT (Fig. 3C).

V buněčných liniích s deletovaným *MTMR6* nebo *MTMR8* jsme měřili relativní množství příslušných mRNA pomocí kvantitativní RT-PCR (qRT-PCR). V obou buněčných liniích došlo k významnému poklesu hladiny mRNA *MTMR6* nebo *MTMR8* ve srovnání s kontrolními WT buňkami HeLa. Relativní množství mRNA v buněčné linii MTMR6KO vztažené k hladině mRNA *MTMR6* v kontrolních buňkách, které se přiřadila hodnota 1, bylo 0,028 (SD \pm 0,0097). V případě mRNA *MTMR8* byla hodnota 0,035 (SD \pm 0,0031) (Fig. 3E).

Na vytvořené buněčné linie MTMR6KO a MTMR8KO jsme aplikovali stejný systém CRISPR/Cas9 ve snaze vytvořit buňky s dvojitou delecí genů *MTMR6* a *MTMR8*. Nejprve jsme použili buňky MTMR8KO, které jsme transfekovali stejným vektorem, jaký byl použit pro vytvoření buněčné linie MTMR6KO. Žádný z testovaných klonů neměl pozměněnou sekvenci genu *MTMR6*. Následně jsme postup opakovali s buňkami MTMR6KO, do kterých jsme transfekovali vektor, pomocí kterého jsme vytvořili buněčné linie s mutovaným *MTMR8*. Postup byl totožný jako v případě delecce jednoho genu. Ze 40 testovaných klonů žádný nenesl mutaci v genu *MTMR8*. Buněčné linie s dvojitým KO pro *MTMR6* a *MTMR8* se nám vytvořit nepodařilo, ačkoliv účinnost systému CRISPR/Cas9 při vzniku jednoduchých KO linií byla poměrně vysoká.

A

```

WT      61  TACAAGGCTGGCAGCTCATTGTCGATCCTGAGGAATATAAGAGGATGGGAGTGCCAAACT 120
      |||
Alela1  61  TACAAGGCTGGCAGCTCATTG-----TAAGAGGATGGGAGTGCCAAACT 104 } delete 16 nt

WT      61  TACAAGGCTGGCAGCTCATTGATCTCGCTGAGGAATAT 98
      |||
Alela2  61  TACAAGGCTGGCAGCTCATTGATCTCGCTGAGGAATATGCACCCCTATTTCCCGGTCCCCTCTT
      GGTAGGAACCCGATGCCTGGACACCTCTCCGAACFCCACCCCTGTGAATGAAGTCAACACGAAGG
      GGCAGTGACTGCCCCGTGCATCGTCCGGAAAAGACCCCGAGTTCCAAATACAGCTCGACAAGT
      GGCTCTCTCCCCGGGATCATGCACTGATCAGCTGACTAATCATGAAGTATCAGCTAGCTAT
      CATGCACTGATCACCTGGCTGATCATGCACTGATCACCTGGCTGATCATGCACTGATCACCTGG
      CCATCATGAATGATCACCTGGCTATCATGCACTGATCACCT
      } inzerce 324 nt

WT      98  TAAGAGGATGGGAGTGCCAAACTCACACTGGCAGTTGTCTGATGCCAACCGGGACTACAAG 158
      |||
Alela2  422 TAAGAGGATGGGAGTGCCAAACTCACACTGGCAGTTGTCTGATGCCAACCGGGACTACAAG 482
  
```

B

```

WT exon4  AKYEDLYAFSYNPKQNDSERLQGWQLIDLAEYKRMGVPNSHWQLSDANRDYK
Alela1    AKYEDLYAFSYNPKQNDSERLQGWQLI-----VRGWECQTHTGSLMPTGTT...
Alela2    AKYEDLYAFSYNPKQNDSERLQGWQLIDLAEYAPLFPGPLLVGTRCLDTSFNSTL*
  
```

C

```

WT      61  CTGACCCCTCCGCTGC 75
      |||
Alela1  61  CTGACCCCTCCGCTGCCGCTCCTCCTCAGTATCACCTCTGCCGATGCTGGTGGTTTCCTGGGT
      ACCGGAAACCAACTCTCATTCCCCAGGGCCCTAAGACCCCGTGGCCAGGCCCTCTCAAGTC
      AGGGTTCCTGCACATTACAGTTACGGGTGGCCCTGGGAGTAACACCTGGCACCCAAACAGGTC
      ACCAGAGTCCAC
      } inzerce 189nt

WT      76  CAAGAATTTCCGGGTGGCCCACTTTGTTTTAGATTCTGACCTTGTGTGCCATGAGGTTTA 134
      |||
Alela1  264 CAAGAATTTCCGGGTGGCCCACTTTGTTTTAGATTCTGACCTTGTGTGCCATGAGGTTTA 323

WT      61  CTGACCCCTCCGCTG 74
      |||
Alela2  61  CTGACCCCTCCGCTGAACAAATGCTGCAACATGGATGCACCCTGAAAACATTGTGCTAAGAGAAA
      TGAGCCAGTCACAAAAGGACAAACACTGCATGATTCTACTTACATGAAGTCCCTCGAGGAGTCA
      GATCCATAGAGACACACAGTGAAGGGTGAAGTCCCGGGCAGCAGGTACGGGTGGAGAAAGTCC
      GTTAGTTGTTTCCAGTCATATTGGCAAGTCTCTGTCAATTCCTAGGATTTCTCTACTAAAGTG
      AGGAAAGTGTGA
      } inzerce 311nt

WT      75  CAAGAATTTCCGGGTGGCCCACTTTGTTTTAGATTCTGACCTTGTGTGCCATGAGGTTTA 134
      |||
Alela2  386 CAAGAATTTCCGGGTGGCCCACTTTGTTTTAGATTCTGACCTTGTGTGCCATGAGGTTTA 445
  
```

D

```

WT exon3  IALHHIATVEKLPITSLGCPLTLRCKNFRVAHFVLDSDLVCHVEVYISLLKLSQP
Alela1    IALHHIATVEKLPITSLGCPLTLRCRSSAITSADAGGFPGYREPNSHSPGA*
Alela2    IALHHIATVEKLPITSLGCPLTLR*
  
```

E

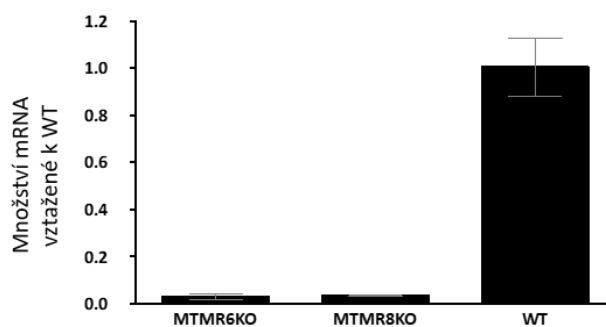
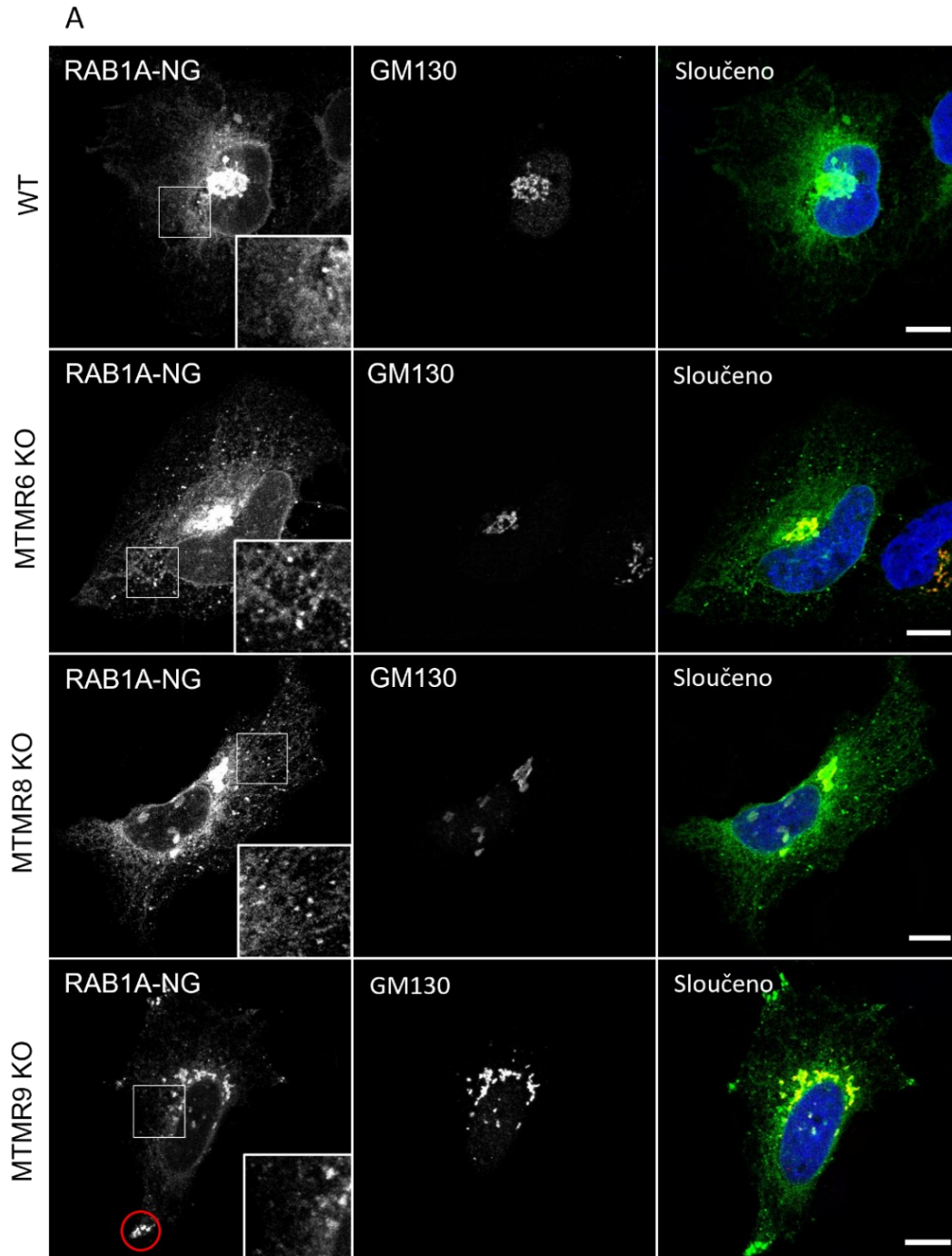


Figura 3: Vytvoření buněčných linií HeLa s deletovaným MTMR6 nebo MTMR8. A) Výsledky sekvenování genu MTMR6. Pomocí metody CRISPR/Cas9 vznikla v jedné alele delece 16 NT, v druhé alele inzerce 324 NT. B) Posloupnost AK tvořící exon 4 v buňkách WT ve srovnání s alelami buněk MTMR6KO. C) Výsledky sekvenování genu MTMR8. Pomocí metody CRISPR/Cas9 vznikla v jedné alele inzerce 189 nt, v druhé alele inzerce 311 nt. D) Posloupnost AK tvořící exon 3 v buňkách WT ve srovnání s alelami buněk MTMR8KO. E) Relativní množství mRNA MTMR6 měřené pomocí qRT-PCR v buňkách MTMR6KO bylo 0,028 (± 0,0097), mRNA MTMR8 v buňkách MTMR8KO 0,035 (± 0,0031) vztaheno k buňkám WT, ve kterých exprese obou MTMR odpovídá hodnotě 1. V grafech šedě vyznačena směrodatná odchylka.

4.4. Vliv delece *MTMR6* a *MTMR8* na lokalizaci RAB1A

Zvýšená hladina MTMR6-EGFP a MTMR8-EGFP v buňkách RPE-1 na rozdíl od MTMR9-EGFP neměla vliv na lokalizaci exogenně exprimovaného RAB1A-MYC. Zajímalo nás, zda delece *MTMR6* nebo *MTMR8* způsobuje změnu distribuce RAB1A jako v případě buněk MTMR9KO.

U buněk MTMR9KO byl detekován procentuální nárůst RAB1A-NG ve váčcích a pokles v Golgi ve srovnání s buňkami WT (Doubravská *et al.*, 2020). Dále došlo k změně lokalizace váčků obsahujících RAB1A-NG na periferii buněk a jejich kumulaci ve výběžcích (Fig. 4A).



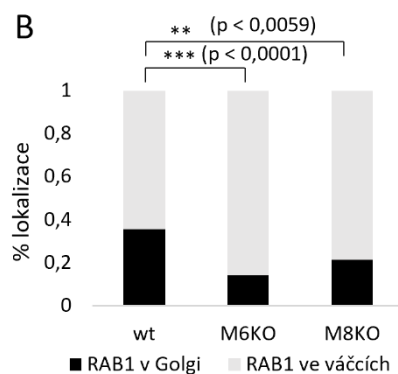


Figura 4: Delece *MTMR6*, *MTMR8* nebo *MTMR9* v buňkách HeLa vede ke změně lokalizace exogenně exprimovaného proteinu RAB1A-NG. A) WT, *MTMR6KO*, *MTMR8KO* a *MTMR9KO* buňky HeLa byly transfekovány RAB1A-NG (zelený kanál) a po fixaci v nich bylo nabarveno *cis*-Golgi (GM130 marker, červený kanál). U buněk *MTMR6KO* a *MTMR8KO* se v cytoplasmě nachází více váček pozitivních na RAB1A než u kontrolních buněk. U buněk *MTMR9KO* dochází k akumulaci RAB1A-NG na periférii buňky ve výběžcích (červená kružnice). Bílé rámečky vymezují zvětšenou plochu buňky s váčky. Uvedené mikroskopické obrázky odpovídají maximální projekci několika konfokálních rovin. Měřítko: 10 μ m. B) Graf ukazuje procentuální rozložení detekovaného signálu RAB1A v Golgi (černě) a váčcích (šedě). Data byla analyzována nepárovým t-testem, hladiny signifikance jsou uvedeny v grafu. $n(\text{WT}) = 41$, $n(\text{MTMR6KO}) = 43$, $n(\text{MTMR8KO}) = 30$.

U buněk *MTMR6KO* a *MTMR8KO* jsme zvýšené shromažďování váček obsahujících RAB1A-NG na periférii nepozorovali. Nicméně k určité změně distribuce RAB1A-NG došlo. V buňkách *MTMR6KO* a *MTMR8KO* jsme v cytoplasmě detekovali více váček obsahujících RAB1A-NG než u buněk WT (Fig. 4A). Pro ověření změny distribuce RAB1A-NG v buňkách *MTMR6KO* a *MTMR8KO* ve srovnání s buňkami WT jsme analyzovali rozložení fluorescenčního signálu RAB1A-NG mezi Golgi a váčky mimo Golgi pomocí programu Fiji. Fixované buňky byly nabarveny protilátkou proti proteinu GM130 (červený kanál), který lokalizuje do *cis*-Golgi. Na snímky byl aplikován práh citlivosti, který odstranil fluorescenční signál RAB1A-NG (zelený kanál) mimo Golgi a váčky. Procento signálu RAB1A-NG detekované v Golgi (tj. zelený signál kolokalizující s červeným signálem) u buněk WT bylo vyšší než u buněk *MTMR6KO* a *MTMR8KO* (Fig. 4B). Ke změně rozložení RAB1A-NG dochází i vlivem delece katalyticky aktivních *MTMR6* a *MTMR8*, ale rozmístění váček se od buněk *MTMR9KO* liší.

4.5. Vliv *MTMR6* a *MTMR8* na strukturu *cis*-Golgi

Jedním z regulátorů struktury Golgi je RAB1 a jeho efekторы. Narušení přirozené hladiny RAB1 vede k rozpadu Golgi (Alvarez *et al.*, 2003). Jelikož jsme pozorovali vliv *MTMR6*, *MTMR8* a *MTMR9* na lokalizaci RAB1, zajímalo nás, zdali se tyto fosfatázy podílejí i na formování struktury Golgi. Nejprve jsme transfekovali buňky RPE-1 vektory nesoucími *MTMR6*-EGFP, *MTMR8*-EGFP a *MTMR9*-EGFP a pozorovali jsme vliv zvýšené hladiny fosfatáz na strukturu Golgi barveného protilátkou proti proteinu GM130 (marker *cis*-Golgi).

Z mikroskopického pozorování bylo patrné, že Golgi v přítomnosti nadměrného množství *MTMR6*, *MTMR8* nebo *MTMR9* mění svou strukturu (Fig. 5A). Jelikož byl vzhled Golgi v buňkách variabilní provedli jsme kvantitativní analýzu signálu GM130 v programu Fiji. Prokázali jsme, že vlivem přítomnosti zvýšené hladiny námi sledovaných *MTMR* dochází ke změně počtu částí (Fig. 5B) a

velikosti (Fig. 5C) *cis*-Golgi. Největší rozdíl v pozorovaných parametrech byl detekován mezi buňkami WT a buňkami transfekovanými MTMR6-EGFP. Golgi má v buňkách s vyšší hladinou MTMR6 menší velikost a skládá se z méně částí. Obdobný fenotyp jsme pozorovali v buňkách transfekovaných MTMR8-EGFP. Nejmenší vliv na pozorované parametry mělo zvýšení hladiny MTMR9 (Fig. 5B,C).

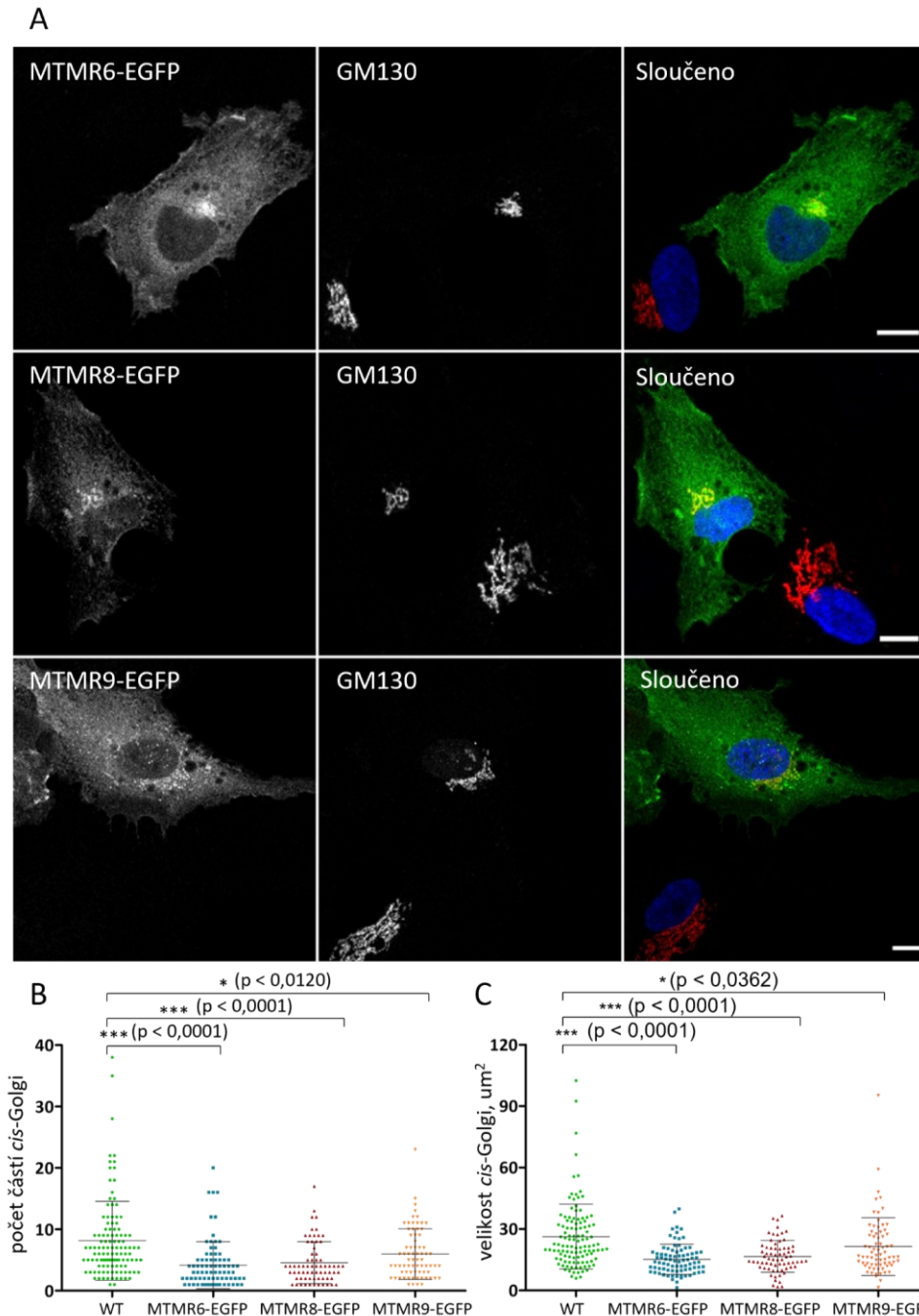
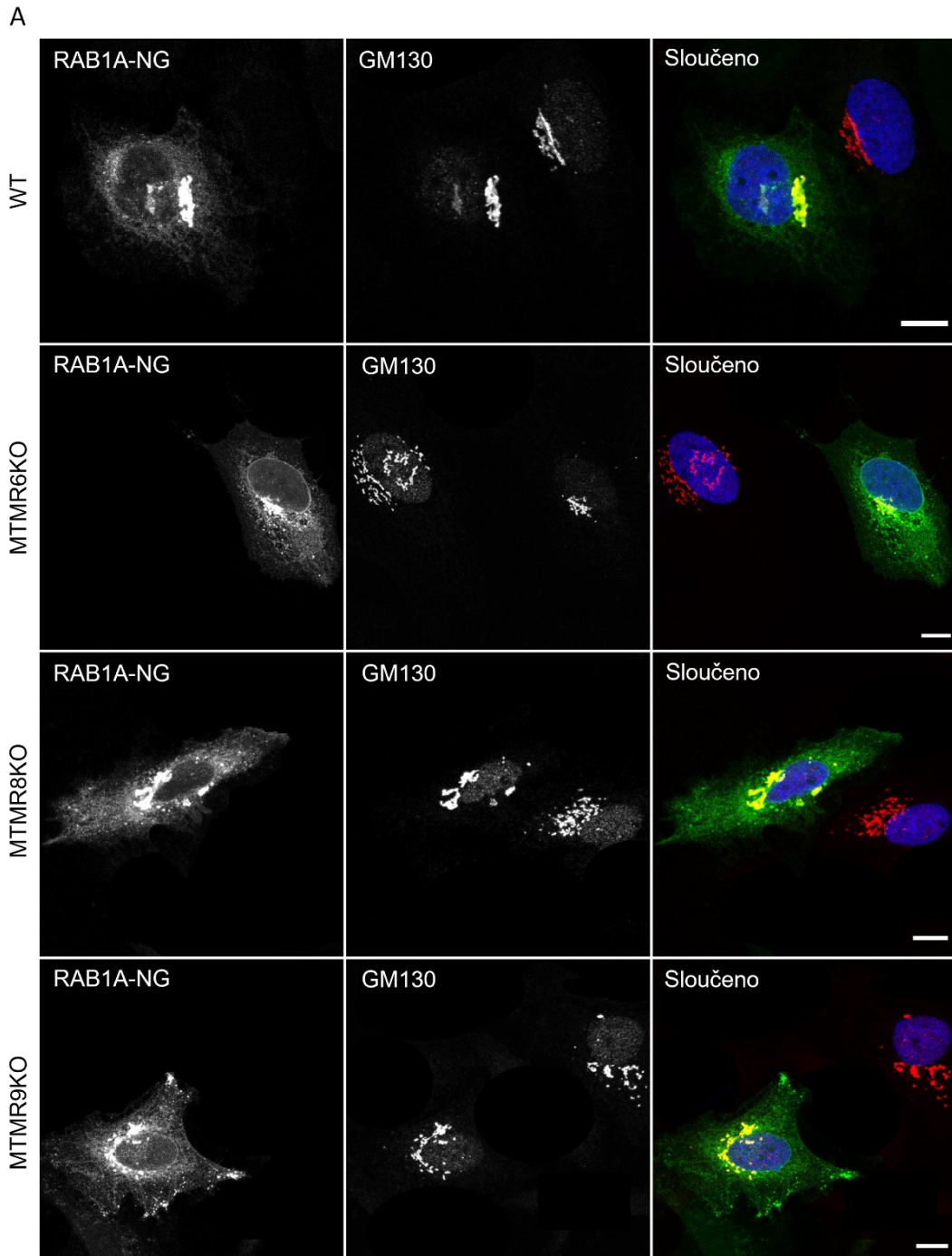


Figura 5: Zvýšená hladina MTMR6, MTMR8 a MTMR9 ovlivňuje morfologii *cis*-Golgi. A) V buňkách RPE-1 transfekovaných MTMR6-EGFP, MTMR8-EGFP a MTMR9-EGFP (zelený kanál) bylo pozorováno *cis*-Golgi barvené protilátkou proti proteinu GM130 (červený kanál). Zvýšená hladina MTMR6-EGFP, MTMR8-EGFP a MTMR9-EGFP mění strukturu Golgi. Uvedené mikroskopické obrázky odpovídají maximální projekci několika konfokálních rovin. Měřítka: 10 μm B) Zvýšená hladina MTMR6-EGFP, MTMR8-EGFP a MTMR9-EGFP ovlivňuje kompaktnost *cis*-Golgi, které se ve srovnání s netransfekovanými buňkami skládá z méně částí. C) Velikost *cis*-Golgi v buňkách WT je větší než v buňkách transfekovaných MTMR6-EGFP, MTMR8-EGFP nebo MTMR9-EGFP. V grafech černě vyznačen průměr a směrodatná odchylka. Data byla analyzována nepárovým t-testem, hladiny signifikance jsou uvedeny v grafu. $n(\text{WT}) = 115$, $n(\text{MTMR6-EGFP}) = 82$, $n(\text{MTMR8-EGFP}) = 68$, $n(\text{MTMR9-EGFP}) = 72$

Vzhled Golgi jsme hodnotili také u buněk MTMR6KO a MTMR8KO. Dříve bylo prokázáno, že u buněk MTMR9KO dochází ke změně morfologie Golgi. Fixované buňky jsme barvili protilátkou proti GM130 (Fig. 6A). U buněk MTMR6KO a MTMR8KO se *cis*-Golgi výrazně zvětšilo, ztrácelo těsný kontakt s jádrem a bylo tvořeno více cisternami. V případě buněk MTMR9KO došlo k významné změně v počtu částí tvořících *cis*-Golgi, ale velikost zůstala stejná jako u WT buněk (Fig. 6B,C).



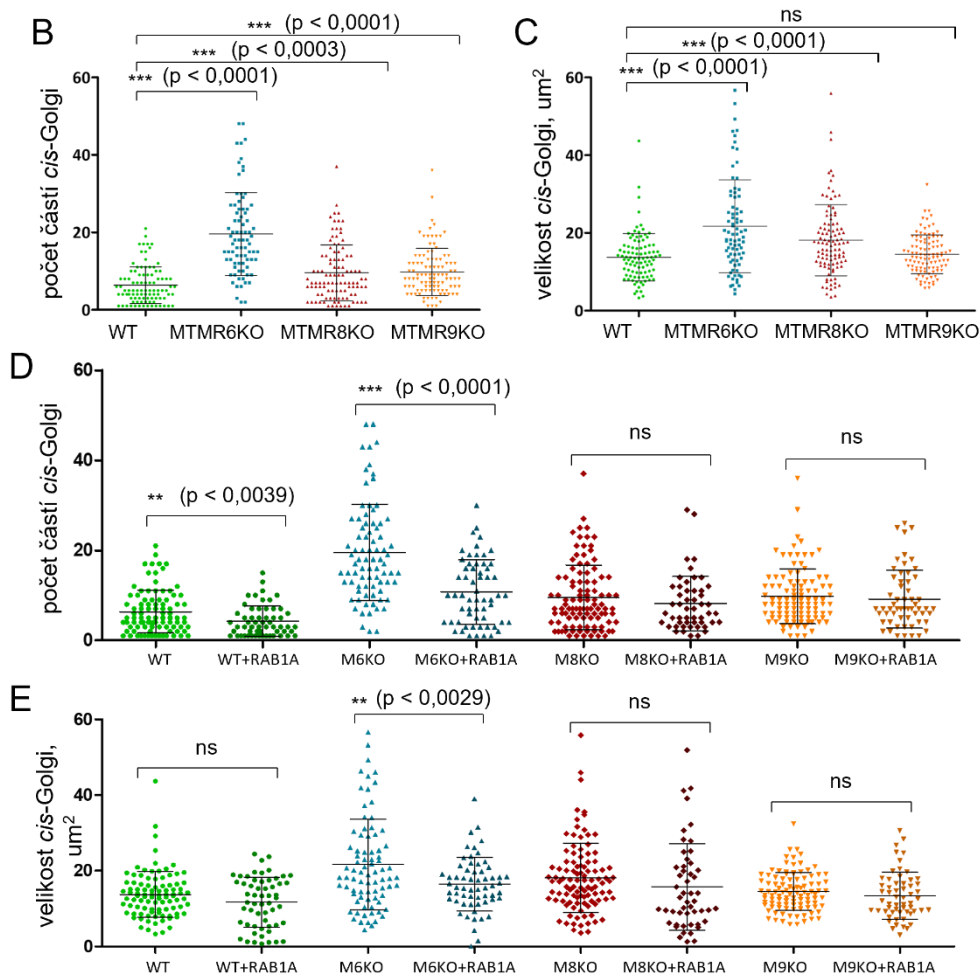


Figura 6: Delece *MTMR6*, *MTMR8* a *MTMR9* ovlivňuje morfologii *cis*-Golgi. A) V *MTMR6KO*, *MTMR8KO* a *MTMR9KO* buňkách HeLa bylo pozorováno *cis*-Golgi barvené protilátkou proti proteinu GM130 (červený kanál). *Cis*-Golgi je v buňkách s deletovaným *MTMR6*, *MTMR8* nebo *MTMR9* rozvolněné. Buněčné linie WT, *MTMR6KO*, *MTMR8KO*, *MTMR9KO* byly transfekovány RAB1-NG (zelený kanál), což vedlo u buněk *MTMR6KO* a kontrolních k zahuštění *cis*-Golgi. Uvedené mikroskopické obrázky odpovídají maximální projekci několika konfokálních rovin. Měřítka: 10 μm . B) Delece *MTMR6*, *MTMR8* nebo *MTMR9* ovlivňuje strukturu *cis*-Golgi, které je ve srovnání s WT tvořeno z více částí. C) Velikost *cis*-Golgi je v buňkách WT menší než v buňkách s deletovaným *MTMR6* nebo *MTMR8*. D) RAB1A je schopen částečně zvrátit rozpad *cis*-Golgi u buněk *MTMR6KO* a vytvořit kompaktnější Golgi u buněk WT. E) Transfekovaný RAB1A-NG má vliv na velikost *cis*-Golgi u buněk *MTMR6KO*. U buněk *MTMR8KO*, *MTMR9KO* a WT nebyl vliv zvýšené hladiny RAB1A na *cis*-Golgi statisticky významný (ns). V grafech černě vyznačen průměr a směrodatná odchylka. Data byla analyzována nepárovým t-testem, hladiny significance jsou uvedeny v grafu. $n(\text{WT}) = 95$, $n(\text{MTMR6KO}) = 81$, $n(\text{MTMR8KO}) = 103$, $n(\text{MTMR9KO}) = 102$, $n(\text{WT+RAB1A-NG}) = 58$, $n(\text{MTMR6KO+RAB1A-NG}) = 60$, $n(\text{MTMR8KO+RAB1A-NG}) = 51$, $n(\text{MTMR9KO+RAB1A-NG}) = 58$

RAB1 je důležitým regulátorem struktury Golgi (Alvarez *et al.*, 2003). V předchozí části jsme prokázali procentuální úbytek RAB1A-NG v Golgi ve prospěch IC váčků u buněk s deletovaným *MTMR6* nebo *MTMR8*. Zajímalo nás, zdali se zvýšením hladiny RAB1A zvrátí rozpad a rozvolnění Golgi, které může mít deficit RAB1A. Buňky *MTMR6KO*, *MTMR8KO*, *MTMR9KO* a kontrolní jsme transfekovali vektorem nesoucím RAB1A-NG. Po fixaci jsme nabarvili *cis*-Golgi protilátkou proti GM130 a porovnávali jsme strukturu *cis*-Golgi u buněk transfekovaných RAB1A-NG a buněk s přirozenou hladinou RAB1A (Fig. 6A). Ukázalo se, že v případě buněk *MTMR6KO* transfekovaných RAB1A-NG dochází k významnému poklesu počtu částí a také velikosti ve srovnání s Golgi u nenatransfekovaných

buněk MTMR6KO. Stejný trend ohledně počtu částí *cis*-Golgi jsme pozorovali u kontrolních buněk. Velikost *cis*-Golgi se vlivem zvýšené hladiny RAB1A u kontrolních buněk neměnila. U buněk MTMR8KO a MTMR9KO po transfekci RAB1A-NG ke statisticky významné změně nedošlo v počtu částí ani ve velikosti *cis*-Golgi (Fig. 6D,E).

4.6. Vliv exprese MTMR6 a MTMR8 na sekreci

Jelikož jsme pozorovali změny v lokalizaci RAB1A a ve struktuře Golgi, který je významným centrem časné sekretorické dráhy, rozhodli jsme se podívat na sekreci ligandu WNT v buňkách MTMR6KO a MTMR8KO. Delece *MTMR9* v lidské buněčné linii HeLa způsobuje zpomalení sekrece pozorovaných proteinů VSVG a WNT3A mezi ER a Golgi (Doubravská *et al.*, 2020).

Pro hodnocení vlivu katalyticky aktivních fosfatáz MTMR6 a MTMR8 na transport mezi ER a Golgi jsme zvolili systém RUSH, který byl použit také při hodnocení vlivu delece *MTMR9* na sekreci (Doubravská *et al.*, 2020) a je vhodný pro pozorování sekreční dráhy WNT3A i na úrovni mezi ER a Golgi (Moti *et al.*, 2019). Tento systém umožňuje synchronizované uvolnění akumulovaného nákladu z ER putujícího přes IC do Golgi. Buňky WT, MTMR6KO a MTMR8KO byly transfekovány vektorem nesoucím sekvenci AK stabilně lokalizující do ER fúzovanou se streptavidinem a protein vázající streptavidin fúzovaný s WNT3A a fluorescenčním proteinem. Tyto dvě komponenty systému RUSH jsou exprimovány a zůstávají ukotveny v ER. 20 hodin po transfekci byl k buňkám kultivovaným ve 37 °C přidán biotin, který se váže na streptavidin a fluorescenčně značený protein vázající streptavidin fúzovaný s WNT3A byl uvolněn z ER. Pro zpomalení časné sekrece byly buňky po 10 minutách přemístěny do 15 °C po dobu 3 hodin.

Nejprve jsme sledovali transport WNT3A v buňkách se zvýšenou hladinou MTMR6 a MTMR8. Žádný rozdíl pozorován nebyl (data nejsou ukázána). Následně jsme pro experiment použili buněčné linie MTMR6KO a MTMR8KO. Buňky pozorované konfokálním fluorescenčním mikroskopem byly rozděleny do dvou kategorií. První kategorie zahrnovala ty, ve kterých se WNT3A nacházel pouze v ER. Do druhé kategorie jsme zařadili buňky, ve kterých se WNT3A uvolnil z ER a byl detekován v IC nebo Golgi (Fig. 7). V každé buněčné linii jsme hodnotili lokalizaci WNT3A u více než devadesáti buněk. Jelikož u KO buněčných linií dochází k rozpadu Golgi, bylo potřeba tuto strukturu ve fixovaných buňkách vizualizovat, aby nedošlo ke zkreslení výsledků. Pomocí tohoto experimentu jsme nedetekovali významný rozdíl v časné sekretorické dráze mezi buňkami s deletovaným *MTMR6* nebo *MTMR8* a buňkami WT. Téměř u stejného procenta jednotlivých buněčných linií náklad doputoval do Golgi. Ačkoliv se signál v Golgi zdál být u KO linií slabší, nemohli jsme to s jistotou potvrdit. Hodnocení komplikovala odlišná míra transfekce u jednotlivých buněk a také to, že z mikroskopických snímků nemůžeme vyčíst kvantitu WNT3A v jednotlivých buněčných kompartmentech.

Proto jsme zvolili odlišný přístup pro hodnocení transportu v buňkách MTMR6KO a MTMR8KO. Buňky jsme transfekovali vektorem nesoucím *Wnt1*, který je sekretován a hromadí se v extracelulární

matrix, nebo Wnt3A, který je uvolňován do média. Při použití transfekčního činidla Xtreme (Roche) byla míra transfekce a následné exprese Wnt1 nízká. K buňkám sekretujícím Wnt1 byly přidány STF buňky s integrovaným luciferázovým reportérem pro signalizaci Wnt/beta-kenin (TOP flash), které po navázání ligandu spustí kanonickou dráhu Wnt a následuje přepis reportérové luciferázy. Aktivitu luciferázy je možné detekovat po přidání jejího substrátu luminometrem. Vzorky pro experiment byly připraveny duplicitně. Jedna destička s buňkami byla použita pro *western blot*, druhá pro měření aktivity luciferázy. Naměřené relativní světlo (RLU) bylo vztaženo k míře transfekce buněk dané poměrem transfekovaného Wnt1 a tubulinu v lyzátu nebo bylo RLU vztaženo k aktivitě současně s ligandem Wnt transfekované Renilly (kontrola míry transfekce). Výsledky opakovaně ukazovaly na zpomalení sekrece v buňkách MTMR6KO.

Pro masivní transfekci ligandem Wnt jsme zvolili transfekční činidlo PEI (Polyplus). Po přidání luciferázového substrátu k lyzátu buněk MTMR6KO a STF byly opakovaně naměřeny mnohonásobně vyšší hodnoty relativního světla než u buněk WT/STF, což naopak znamená zrychlení sekrece u buněk s deletovaným *MTMR6*. Hodnoty RLU pro lyzáty MTMR8KO/STF a MTMR9KO/STF se výrazně nelišily od hodnot buněk WT/STF. Výsledky některých experimentů ukazovaly na mírné zrychlení sekrece u buněk MTMR8KO a MTMR9KO, jiné zase na zpomalení. Odlišné výsledky jsou pravděpodobně způsobeny rozdílnou mírou transfekce při jednotlivých experimentech. Proto bude vhodné vytvořit stabilní linie WT a KO produkující ligand Wnt a stanovit míru sekrece bez vlivu transfekce.

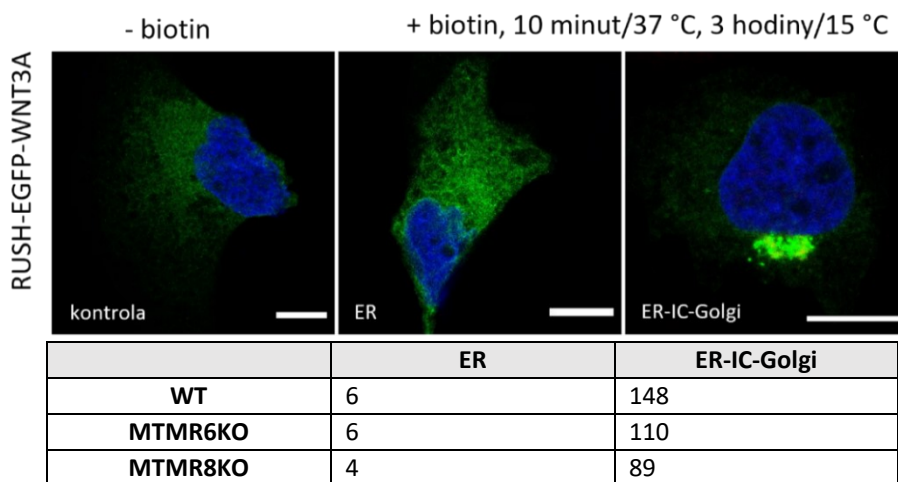


Figura 7: Vliv MTMR6 a MTMR8 na sekretorickou dráhu A) Vliv delece *MTMR6* a *MTMR8* na transport mezi ER a Golgi byl hodnocen pomocí systému RUSH („Retention Using Selective Hook“), který umožňuje synchronizované uvolnění proteinů z ER. WT, *MTMR6KO* a *MTMR8KO* buňky HeLa transfekované RUSH-EGFP-WNT3A (zelený kanál) byly ošetřeny biotinem a kultivovány 10 minut v 37 °C pro iniciaci transportu a následně 3 hodiny v 15 °C, aby byl transport zpomalen. Buňky byly rozděleny do dvou kategorií. První kategorie obsahovala buňky, ve kterých se WNT3A nacházel v ER. Do druhé kategorie byly zařazeny buňky, ve kterých jsme detekovali WNT3A také v intermediálním kompartmentu (IC) nebo Golgi. U buněk WT, ke kterým biotin přidán nebyl, zůstal WNT3A v ER. Tabulka ukazuje počet buněk WT, *MTMR6KO* a *MTMR8KO*, ve kterých jsme detekovali WNT3A pouze v ER, a ve kterých náklad ER opustil (ER-IC-Golgi). Uvedené mikroskopické obrázky odpovídají maximální projekci několika konfokálních rovin buněk WT. Měřítka: 10 μ m.

4.7. Vliv MTMR6 a MTMR8 na lysozomální systém

Jelikož bylo publikováno, že mutace v doméně PTP či PH-GRAM proteinu MTMR8 vede ke zvětšení lysozomů a snížení jejich počtu (Allen *et al.*, 2020), zajímalo nás, zdali se nachází podobný fenotyp i v buňkách s deletovaným *MTMR8*. Lysozomy jsme pozorovali prostřednictvím protilátky proti LAMP1 („Lysosomal-associated membrane protein 1”), markeru lysozomů. U buněk WT byl výrazný signál LAMP1 v perinukleární oblasti. V některých buňkách jsme detekovali populaci lysozomů také na periférii. Podobný vzor byl pozorován u buněk MTMR8KO a MTMR9KO. Většina lysozomů byla koncentrována v oblasti kolem jádra, některé lysozomy lokalizovaly na periférii nebo byly rozptýlené v cytoplasmě. U některých buněk MTMR6KO dochází k rozpadu perinukleární populace lysozomů. Lysozomy se nacházejí napříč cytoplasmou a vytvářejí shluky na periférii (Fig. 8A). Změnu rozložení lysozomů v KO liniích jsme analyzovali pomocí programu Fiji prostřednictvím kolokalizace mezi jádrem (DAPI - modrý kanál) a lysozomy (LAMP1 - zelený kanál). U buněk MTMR6KO došlo k významnému poklesu procenta kolokalizace, což potvrzuje vliv MTMR6 na distribuci lysozomů v buňce a jejich přesun z centrální části buňky. U buněk MTMR8KO a MTMR9KO nebyla změna procenta kolokalizace ve srovnání s buňkami WT statisticky významná (Fig. 8B). Dále jsme analyzovali počet lysozomů na buňku a jejich celkovou plochu. Buňky MTMR8KO a MTMR9KO obsahovaly menší počet lysozomů a celková plocha lysozomů se také zmenšila ve srovnání s buňkami WT. Nicméně vzhledem k variabilitě lysozomů je množství analyzovaných buněk MTMR8KO (n=11) a MTMR9KO (n=17) nedostačující a pro větší přesvědčivost výsledků je potřeba analyzovat více buněk. U buněk MTMR6KO (n=22) jsme nedetekovali statisticky významnou změnu ve srovnání s buňkami WT (n=27) ani v jednom ze sledovaných parametrů (Fig. 8C,D).

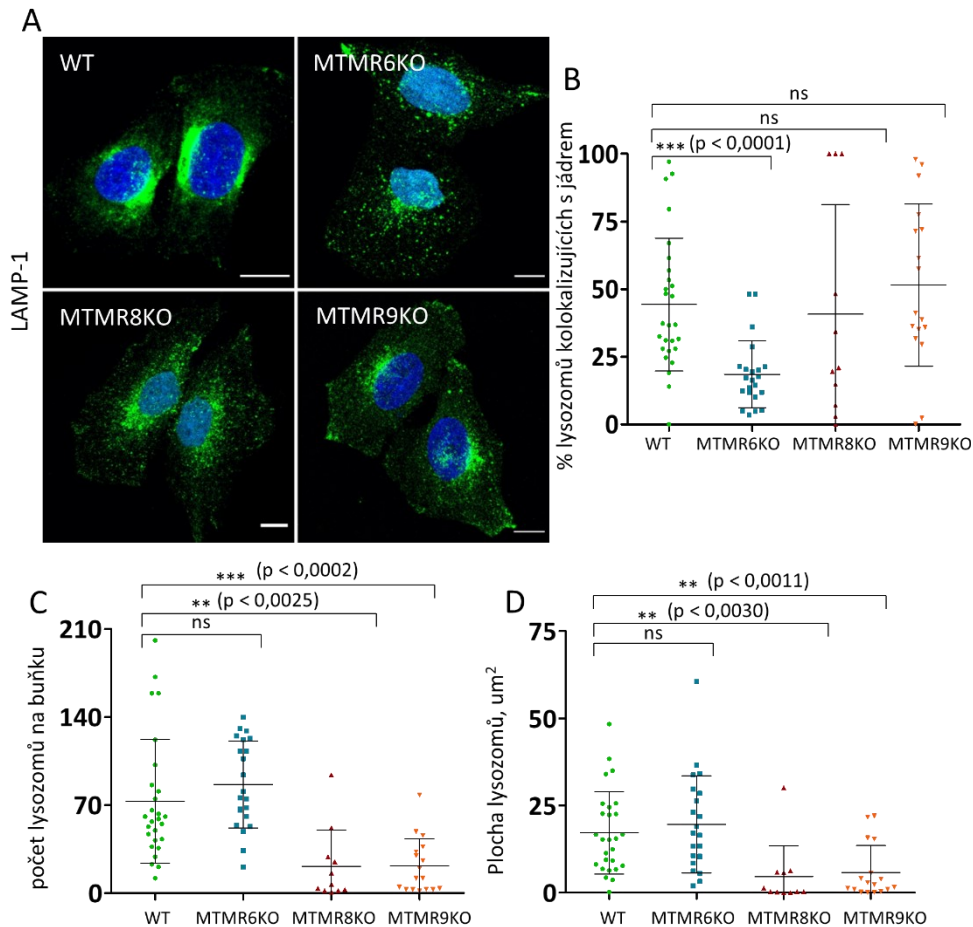


Figura 8: MTMR6 a MTMR8 ovlivňují strukturu lysozomálního systému. A) V MTMR6KO, MTMR8KO a MTMR9KO buňkách HeLa byl pozorován lysozomální systém barvený protilátkou proti proteinu LAMP1 (zelený kanál). Lysozomy jsou v buňkách WT, MTMR8KO a MTMR9KO koncentrovány v perinukleární oblasti. U některých buněk se lysozomy nachází i na periférii. Shluk lysozomů v perinukleární oblasti buněk MTMR6KO je narušen. Lysozomy jsou rozptýlené v cytoplasmě a koncentrovány na periférii. Uvedené mikroskopické obrázky odpovídají maximální projekci několika konfokálních rovin. Měřítka: 10 μm . B) U buněk MTMR6KO dochází ke změně procenta kolokalizace mezi jádrem a lysozomy. U buněk MTMR8KO a MTMR9KO nebyla detekována statisticky významná změna. C) Počet lysozomů je u buněk MTMR8KO a MTMR9KO nižší než u buněk WT. Změna počtu lysozomů u buněk MTMR6KO nebyla statisticky významná. D) Plocha lysozomů je u buněk MTMR8KO a MTMR9KO menší než u buněk WT. Změna plochy lysozomů u buněk MTMR6KO nebyla statisticky významná. V grafech černě vyznačen průměr a směrodatná odchylka. Data byla analyzována nepárovým t-testem, hladiny signifikance jsou uvedeny v grafu. $n(\text{WT}) = 27$, $n(\text{MTMR6KO}) = 22$, $n(\text{MTMR8KO}) = 11$, $n(\text{MTMR9KO}) = 17$. (Z důvodu nízkého počtu analyzovaných buněk MTMR8KO a MTMR9KO je nezbytné experiment opakovat.)

5. Diskuze

MTMR tvoří rozsáhlou rodinu evolučně konzervovaných lipidických fosfatáz s afinitou k PI(3)P a PI(3,5)P₂ (Raess *et al.*, 2017). Prvním popsaným členem rodiny byl MTM1 (Laporte *et al.*, 1996), následně do rodiny přibylo dalších třináct MTMR. Z celé rodiny MTMR jsou nejdětalněji popsané MTM1, MTMR2 a MTMR13, neboť mutace v těchto genech způsobují závažná, monogenně podmíněná onemocnění. Od počátku identifikace MTMR je snaha podrobně popsat funkce jednotlivých členů, jejich interakční partnery a najít vysvětlení velké početnosti této rodiny (Raess *et al.*, 2017).

MTMR6 a MTMR8 jsou katalyticky aktivní interakční partneři MTMR9, který má neaktivní fosfatázovou doménu (Zou *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2012). Cílem diplomové práce bylo prozkoumat vliv MTMR6 a MTMR8 na fenotypy popsané u buněk MTMR9KO nebo u buněk s uměle zvýšenou expresí MTMR9 (Doubravská *et al.*, 2020). Prostřednictvím systému CRISPR/Cas9 jsme získali buněčné linie MTMR6KO a MTMR8KO (Fig. 3A-E) a srovnali je s již popsanou buněčnou linií MTMR9KO (k dispozici z předchozí práce (Doubravská *et al.*, 2020)). Jako druhý přístup pro hodnocení funkce MTMR6 a MTMR8 jsme využili zvýšení hladiny těchto proteinů pomocí dočasné transfekce buněk vektory nesoucími MTMR6-EGFP a MTMR8-EGFP.

Nejprve jsme detailně analyzovali lokalizaci MTMR6-EGFP a MTMR8-EGFP v buňkách RPE-1. Transfekovaný MTMR6-EGFP jsme detekovali v cytoplasmě, na cytoplasmatické membráně a výrazný signál se objevoval v oblasti centrozomu (Fig. 1A-C), který organizuje mikrotubuly v buňce do prostorové sítě a je důležitý pro dělení jádra. Ačkoliv výskyt MTMR6 na centrozomu nebyl dříve popsán, není překvapivý, neboť MTMR6 interaguje s některými proteiny centrozomu (CEP170, CEP19) (<https://thebiogrid.org/114558>). MTMR6 byl detekován pomocí myši nekomerční protilátky na mikrotubulárních svazcích v blízkosti jádra (Mochizuki *et al.*, 2013). Při kultivaci buněk MTMR6KO bylo patrné, že se dělí pomaleji než buňky WT. Je možné, že se MTMR6 podílí na organizaci dělicího vřeténka a delece *MTMR6* vede k narušení dělení buněk.

V některých buňkách jsme pozorovali fluorescenční signál MTMR6-EGFP i v oblasti Golgi, nicméně nebyl tak častý jako v případě MTMR8-EGFP. MTMR8-EGFP stejně jako MTMR6-EGFP lokalizuje do cytoplasmy a na cytoplasmatickou membránu (Fig. 1A). Ani jeden z těchto proteinů nebyl na rozdíl od MTMR9-EGFP pozorován na váčcích a cytoplasmata měla téměř homogenní charakter. Absence detekovatelného MTMR6-EGFP nebo MTMR8-EGFP na membránách váčků může být překvapující vzhledem k výskytu MTMR9 a jeho schopnosti regulovat lokalizaci MTMR6 a MTMR8. V přítomnosti Ruby2-MTMR9 dochází ke změně lokalizace MTMR6-EGFP a MTMR8-EGFP na váčky, které se pohybují převážně anterográdně do Golgi (Doubravská *et al.*, 2020). Detekce transfekovaného MTMR6-EGFP a MTMR8-EGFP na váčcích při zvýšené hladině Ruby2-MTMR9 může být dána schopností MTMR9 stabilizovat interakční partnery a lokalizovat je na cílové membrány (Zou *et al.*, 2012; Doubravská *et al.*, 2020). Absence detekovatelných váčků v buňkách se zvýšenou hladinou

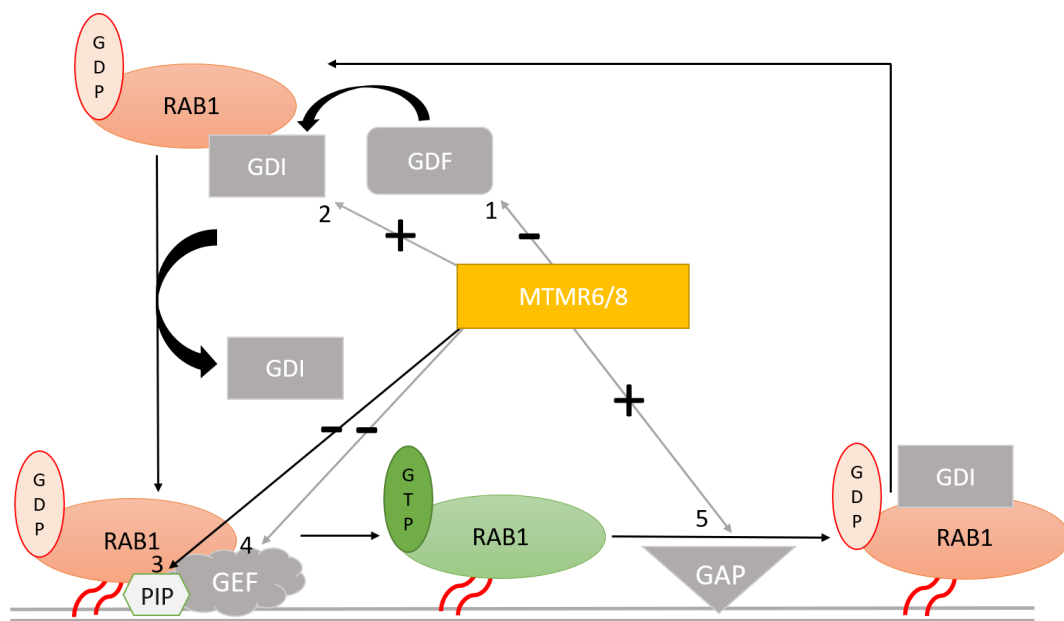
MTMR6-EGFP nebo MTMR8-EGFP na pozadí přirozené hladiny MTMR9 může být způsobena vysycením míst výskytu MTMR6 nebo MTMR8 na váčcích endogenními proteiny a nedostupností endogenního MTMR9 pro transfekované interakční partnery. Částečně odlišná lokalizace MTMR6 a MTMR8 pravděpodobně souvisí s rozdílnými interakčními partnery vedle společného vazebného partnera MTMR9 a naznačuje odlišné funkce těchto katalyticky aktivních fosfatáz. Lokalizace a specifická funkce MTMR8 může být také ovlivněna tím, zdali je ve formě heterodimeru MTMR8/MTMR9 nebo homodimeru MTMR8/MTMR8 (Yoo *et al.*, 2015).

Vychýlení přirozené hladiny MTMR9 vede ke změně lokalizace RAB1A (Fig. 2A,B), markeru časně sekrece. Pro experimenty byl použit exogenně exprimovaný RAB1A-MYC. V přítomnosti zvýšené hladiny MTMR9-EGFP se RAB1A-MYC ve velké míře přesouvá z cytoplasmy a Golgi do váčků, na kterých se nachází rovněž MTMR9-EGFP. V buňkách s deletovaným *MTMR9* se protein RAB1A-MYC hromadil především v Golgi, IC a ve váčcích přemísťujících se na periferii (Doubravská *et al.*, 2020). Zajímalo nás, zdali je lokalizace RAB1A ovlivněna aktivitou MTMR6 a MTMR8, které regulují hladinu PI(3)P a PI(3,5)P₂ (Zou *et al.*, 2012)

U buněk RPE-1 transfekovaných MTMR6-EGFP nebo MTMR8-EGFP společně s RAB1A-MYC nebyla pozorována změna v umístění RAB1A-MYC (Fig. 2B). Přirozená hladina MTMR je v buňce velice nízká, takže veškeré funkce mohou být zajištěny endogenními proteiny, a proto zvýšení hladiny MTMR pomocí transfekce nemuselo mít pozorovatelný efekt. Následně jsme se rozhodli hodnotit lokalizaci RAB1A v buňkách MTMR6KO a MTMR8KO. Výrazný přesun váčků obsahujících RAB1A-NG na periferii jsme u těchto buněčných linií nedetekovali. Nicméně jsme pozorovali nabohacení RAB1A-NG ve váčcích IC a celkové zvýšení počtu těchto váčků v cytoplasmě (Fig. 4A). Kvantitativní analýza obrazu potvrdila, že podíl RAB1A-NG detekovaného v Golgi vůči RAB1A-NG ve váčcích je u buněk MTMR6KO a MTMR8KO nižší (Fig 4B), ačkoliv je Golgi u těchto buněk větší než u buněk WT (Fig. 6C) (dále v textu). Zvýšená lokalizace RAB1A-NG na váčky u buněk MTMR6KO a MTMR8KO může vypovídat o změně dynamiky cyklování RAB1A, ale nemusí nutně znamenat úbytek RAB1A na Golgi.

Cyklování proteinů rodiny RAB mezi cytoplasmou a membránami je složitý a vysoce regulovaný proces, na kterém se podílí mnoho proteinů. Změna lokalizace RAB1A může být způsobena přímou interakcí MTMR6/MTMR8/MTMR9 s RAB1A, ale také interakcí MTMR6/MTMR8/MTMR9 s proteiny řídícími aktivitu a lokalizaci RAB1A (Hutagalung a Novick, 2011) nebo regulací hladiny PIP (Mathiowetz *et al.*, 2017). Již dříve byly popsány slabé vazebné interakce mezi doménou PH-GRAM proteinu MTMR6 a RAB1B-GDP. Autoři článku navrhují, že tyto interakce napomáhají lokalizaci MTMR6 na membrány, kde defosforyluje PIP. Po aktivaci RAB1B je MTMR6 uvolněn zpět do cytoplasmy (Mochizuki *et al.*, 2013). Jelikož byla *in vitro* prokázána také vazba RAB1 na PI(3)P (Mathiowetz *et al.*, 2017), je možné, že MTMR6 napomáhá snížením hladiny PIP opětovnému uvolnění

RAB1 zpět do cytoplasmy a zároveň negativně reguluje lokalizaci dalších proteinů RAB1A na membrány. Tím je zajištěna optimální aktivita RAB1A a jeho efektorů. U buněk MTMR6KO je negativní regulátor deletován a v důsledku toho se zvyšuje množství RAB1-NG na váčcích (Fig. 4A). MTMR8 je schopný defosforylovat stejný substrát (Zou *et al.*, 2012) a jeho lokalizace se s MTMR6 částečně překrývá (Fig. 1A), takže je možné, že jsou tyto fosfatázy při regulaci lokalizace RAB1A redundantní, a proto je fenotyp lokalizace RAB1-NG u buněk MTMR6KO a MTMR8KO velice podobný (Fig. 4A). Nicméně PI(3)P je hlavním substrátem MTMR8, ale pozorovaný fenotyp byl výraznější u buněk s deletovaným *MTMR6* (Fig. 4B), který preferenčně defosforyluje PI(3,5)P₂ (Zou *et al.*, 2012). Schopnost RAB1 vázat PI(3,5)P₂ *in vitro* nebyla prokázána (Mathiowetz *et al.*, 2017).



Obrázek 8: Možný vliv MTMR6 a MTMR8 na cyklování RAB1A. 1) MTMR6 a MTMR8 negativně ovlivňuje vazbu GDF na RAB1A-GDP a tím znemožňuje vyvázání GDI. 2) MTMR6 a MTMR8 pozitivně ovlivňuje vazbu GDI na RAB1-GDP a udržuje protein v této podobě v cytoplasmě. 3) MTMR6 v komplexu s RAB1-GDP relokalizuje na membrány (Mochizuki *et al.*, 2013), kde je RAB1 aktivován a MTMR6 defosforyluje PIP. PIP může být zapojen do lokalizace RAB1A (Mathiowetz *et al.*, 2017) nebo GEF na membrány (Brombacher *et al.*, 2009) a snížení jeho hladiny vlivem MTMR6 podporuje opětovné uvolnění RAB1A do cytoplasmy. 4) MTMR6 a MTMR8 negativně ovlivňují GEF buď přímo nebo prostřednictvím snižování hladiny PIP. 5) MTMR6 nebo MTMR8 pozitivně ovlivňují aktivitu GAP, RAB1A-GDP je následně uvolněn z membrány zpět do cytoplasmy pomocí GDI.

Další námi navrhované vysvětlení změny rozložení RAB1A-NG spočívá v regulaci lokalizace GEF prostřednictvím hladiny PIP. U bakterie *Legionella pneumophila* byla popsána vazba GEF pro RAB1 na fosfatidylinositol (4)-fosfát (PI(4)P) a s menší afinitou také na PI(3)P (Brombacher *et al.*, 2009). Savčí proteiny GEF pro RAB1, tzv. TRAPP, jsou složité komplexy a zůstává o nich mnoho neznámého. Kromě regulace výměny GDP za GTP se mohou podílet na lokalizaci RAB1 na cílovou membránu (Riedel *et al.*, 2018; Joiner *et al.*, 2021). U *Saccharomyces cerevisiae* komplex TRAPP^{III} lokalizuje na membrány prostřednictvím amfipatického alfa-helixu jedné z podjednotek komplexu. Stabilní asociace komplexu TRAPP^{III} s membránou je nezbytná pro mohutnou aktivaci RAB1 (Joiner *et al.*, 2021). Zda-li v asociaci TRAPP u savčích buněk hrají roli také PIP není zatím známo. V případě, že by k tomu skutečně docházelo, by delece *MTMR6* nebo *MTMR8* způsobila zvýšení hladiny PIP, četnost GEF pro

RAB1A na membráně by vzrostla, což by vedlo ke zvýšené lokalizaci a aktivaci RAB1A-NG na váčcích.

Zdali hraje roli v regulaci lokalizace RAB1A hladina PIP regulovaná fosfatázovou aktivitou MTMR6 a MTMR8 jsme bohužel nemohli ověřit. Dostupné sondy PIP nebyly schopné rozpoznat PI(3)P a PI(3,5)P₂ na membránách kompartmentů časné sekretorické dráhy, kde se RAB1A vyskytuje. To může být způsobeno nízkou hladinou těchto PIP na námi pozorovaných membránových kompartmentech nebo jejich nevhodností pro tyto membrány.

V diplomové práci jsme ukázali, že se lokalizace RAB1A-NG u buněk MTMR9KO částečně lišila od buněk MTMR6KO a MTMR8KO (Fig. 4A). Navrhujeme, že by MTMR9 mohl ovlivňovat lokalizaci RAB1A-NG nezávisle na svých interakčních partnerech. Samostatně transfekovaný MTMR9-EGFP výrazně lokalizuje na váčky IC na rozdíl od MTMR6-EGFP a MTMR8-EGFP. V buňce se pravděpodobně nachází více populací IC, které se liší funkcí, tvarem, dynamikou a umístěním (Ying *et al.*, 2000; Sannerud *et al.*, 2006; Marie *et al.*, 2009). Jedna z těchto populací propojuje perinukleární oblast buňky s periferií. Tato dráha nesouvisí přímo s transportem mezi ER a Golgi a není senzitivní k BFA (Sannerud 2006, Marie 2009). Je možné, že MTMR9 reguluje lokalizaci RAB1A také v této populaci IC. Po přidání BFA k buňkám transfekovaným současně MTMR9-MYC a RAB1A-NG došlo ke změně morfologie membránových struktur pozitivních na tyto proteiny v perinukleární oblasti. Nicméně systém váček na periferii významně narušen nebyl (Doubravská *et al.*, 2020). Delece *MTMR9* by mohla způsobit vychýlení rovnováhy této dráhy a přesun IC pozitivního na RAB1A-NG na periferii (Fig. 4A). MTMR6 a MTMR8 by naopak mohly hrát úlohu v regulaci RAB1A na IC lokalizovaný v oblasti mezi ER a Golgi (Marie *et al.*, 2009). Další možné vysvětlení odlišných fenotypů buněk MTMR9KO a MTMR6KO/MTMR8KO spočívá v redundanci MTMR6 a MTMR8 a předpokladu, že je aktivita MTMR6 a MTMR8 *in vivo* z velké míry ovlivňována přítomností MTMR9 (Zou *et al.*, 2012). V případě, že je v buňkách deletován *MTMR9*, dochází ke snížení aktivity a afinity obou katalyticky aktivních fosfatáz vůči substrátu. V důsledku toho je distribuce RAB1-NG u buněk MTMR9KO jiná než u buněk MTMR6KO nebo MTMR8KO. V těch se totiž vždy nachází jeden z plně funkčních komplexů MTMR6/MTMR9, MTMR8/MTMR9.

V této diplomové práci se nám podařilo prokázat vliv MTMR6 a MTMR8 na lokalizaci RAB1A-NG (Fig. 4B). U buněk s deletovaným *MTMR6* nebo *MTMR8* dochází k hromadění RAB1A-NG ve váčcích IC, což bylo popsáno také v případě delece *MTMR9* (Doubravská *et al.*, 2020). Nicméně zůstává nejasné, zdali k interakci MTMR6, MTMR8 nebo MTMR9 s RAB1A dochází přímo, prostřednictvím PIP či nějakého proteinu.

Jelikož má MTMR9 vliv na strukturu Golgi, zajímalo nás, zdali narušení hladiny MTMR6 nebo MTMR8 způsobí podobný fenotyp. Ukázalo se, že MTMR6 a MTMR8 skutečně regulují kompaktnost Golgi. Zvýšením hladiny MTMR6, MTMR8 nebo MTMR9 v buňkách RPE-1 dochází k zahuštění *cis*-

Golgi (Fig. 5A-C). Naopak v buňkách MTMR6KO, MTMR8KO a MTMR9KO se *cis*-Golgi rozvolňuje (Fig. 6A-C). Největší změny byly pozorovány v případě vychýlení hladiny MTMR6, méně v případě MTMR8 a nejmenší vliv na strukturu Golgi měl MTMR9. Ačkoliv se Golgi v buněčných liniích s deletovaným *MTMR9* zvětšilo, nerozpadlo se na více částí. To na rozdíl od lokalizace RAB1A naznačuje, že by pro udržování struktury Golgi byla podstatná aktivita katalyticky aktivních fosfatáz. Je známo, že struktura Golgi je během buněčného cyklu regulována fosforylací a defosforylací proteinů (Wang *et al.*, 2003). Otázkou zůstává, jakou roli ve struktuře Golgi hrají kinázy a fosfatázy lipidů.

Jedním z důvodů rozpadu Golgi může být změna rozložení RAB1A, kterou jsme popsali u buněk s deletovaným *MTMR6*, *MTMR8* nebo *MTMR9* (Fig. 4A). V buňkách MTMR6KO, MTMR8KO a MTMR9KO zřejmě dochází k procentuální změně zastoupení RAB1A v Golgi vůči celkovému množství RAB1A v buňce, což by mohlo přispět nebo být přímým důvodem změn struktury Golgi, neboť je RAB1A nepostradatelný pro jeho správnou strukturu (Alvarez *et al.*, 2003). Nicméně nejvýraznější změna lokalizace RAB1A byla pozorována u buněk MTMR9KO (Fig. 4A), zatímco větší rozvolnění struktury Golgi bylo u buněk MTMR6KO a MTMR8KO (Fig. 6A-C).

Pro detailnější poznání souvislosti mezi MTMR6, MTMR8 a RAB1A jsme v buňkách s deletovaným *MTMR6*, *MTMR8* a *MTMR9* pozorovali Golgi na pozadí zvýšené hladiny RAB1A. Předpokládali jsme, že při nadbytku RAB1A se fenotyp Golgi u KO linií přiblíží opět kontrole, neboť RAB1A zajišťuje kompaktnost Golgi (Alvarez *et al.*, 2003). V případě buněk MTMR6KO došlo po transfekci RAB1A ke statisticky významnému poklesu počtu částí a velikosti Golgi ve srovnání s netransfekovanými buňkami. Stejný efekt na snížení počtu částí tvořících *cis*-Golgi jsme pozorovali u buněk WT, velikost se vlivem RAB1A-NG nezměnila. Naopak u buněk MTMR8KO a MTMR9KO ke statisticky významnému poklesu překvapivě nedošlo (Fig. 6A,D,E). Výsledky transfekce RAB1A-NG do buněk MTMR6KO a MTMR8KO naznačují nepostradatelnost MTMR8 pro kompaktaci Golgi prostřednictvím RAB1A, nicméně větší vliv MTMR6 na strukturu Golgi (Fig 5A-C, Fig 6A-C) hypotézu částečně rozporuje. Výsledky podporují představu o specifických rolích deletovaných fosfatáz.

Jedna z dalších navrhovaných příčin změny struktury *cis*-Golgi u buněk MTMR6KO a MTMR8KO je interakce mezi MTMR a molekulárními motory. Molekulární motor dynein, který interaguje s proteiny *cis*-Golgi, se pohybuje k mínus konci mikrotubulů, čímž se nepřetržitě podílí na lokalizaci Golgi v blízkosti jádra a jeho kompaktnosti (Hicks a Machamer, 2002; Yadav *et al.*, 2012a). U buněk WT se fluorescenční signál MTMR6 překrýval s fluorescenčním signálem centrozomu (Fig. 1A-C) a z něj vycházejících mikrotubulů. Po přidání nokodazolu, inhibitoru polymerace mikrotubulů, došlo nejen k rozpadu sítě mikrotubulů, ale také k absenci fluorescenčního signálu MTMR6 kopírujícího fluorescenční signál mikrotubulů v perinukleární oblasti (Mochizuki *et al.*, 2013). Proto navrhuje, že v buňkách MTMR6KO by mohlo docházet ke změně funkce dyneinu a následnému rozpadu Golgi v důsledku ztráty MTMR6. MTMR6 by mohl fungovat jako interakční partner napomáhající lokalizaci

dyneinu nebo jako regulátor hladiny PIP a zajišťovat rozložení proteinů s doménou vázající PIP, se kterými molekulární motory interagují.

Změna struktury Golgi a lokalizace RAB1 je zajímavá z medicínského pohledu, neboť byla detekována u některých neurodegenerativních onemocnění (Martínez-Menárguez *et al.*, 2019). U pacientů s ALS byla popsána změna lokalizace RAB1 do intracytoplasmatických inkluzí. V důsledku toho pravděpodobně dochází k narušení transportu váčků do Golgi a Golgi se rozpadá (Soo *et al.*, 2015). V případě PD dochází k tvorbě Lewyho tělísek, ve kterých se akumuluje alfaSyn. U kvasinek akumulace alfaSyn způsobuje inhibici transportu mezi ER a Golgi, který může být obnoven zvýšenou expresí savčího RAB1 (Cooper *et al.*, 2006). V literatuře je také popsána souvislost mezi onemocněním nervové soustavy a výskytem jednonukleotidových polymorfismů a mutací v genech *MTMR8* nebo *MTMR9* (Holman *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2020). V diplomové práci jsme ukázali, že mutace v *MTMR6*, *MTMR8* a *MTMR9* mají vliv na strukturu Golgi a lokalizaci RAB1A (Fig 4A, Fig 5A-C, Fig 6A-C).

Jelikož jsme detekovali změny v rozložení RAB1A, klíčového regulátoru časně sekretorické dráhy, a rozpad *cis*-Golgi u buněk *MTMR6KO* a *MTMR8KO*, rozhodli jsme se u těchto buněk hodnotit také sekreci. Předpokládali jsme, že se transport nákladu zpomalí, jako tomu bylo u buněk *MTMR9KO* (Doubravská *et al.*, 2020). Vliv katalyticky aktivního MTMR na transport v buňce byl prokázán také při přepravě nákladu z časného endozomu do recyklačního endozomu. Snížení hladiny PI(3)P prostřednictvím MTM1 umožňuje odstrižení vznikajícího váčku od endozomu a jeho putování k recyklačnímu endozomu (Campa *et al.*, 2018). Nicméně pomocí systému RUSH jsme nedetekovali vliv delece *MTMR6* nebo *MTMR8* na transport (Fig. 7). Proto jsme využili jiný přístup pro hodnocení míry sekrece.

Buňky byly transfekovány ligandem Wnt. Wnt je sekretován a aktivuje signální dráhu Wnt v buňkách STF, které mají stabilně integrovaný luciferázový reportér SuperTOPFlash. Výsledky experimentů prováděných na buňkách *MTMR6KO* se lišily v závislosti na použitém transfekčním činidle. Ani u buněčné linie *MTMR8KO* se nám nepodařilo objasnit, zdali ke změně sekrece dochází. Rozdílné výsledky mohly být způsobeny odlišnou mírou transfekce ligandem Wnt v rámci jednotlivých experimentů. Pro odstranění chyby vnášené odlišnou mírou transfekce bude vhodné vytvořit buněčné linie WT, *MTMR6KO*, *MTMR8KO* a *MTMR9KO* stabilně exprimující Wnt3A. Wnt3A je uvolňován do média, což umožní hodnotit množství Wnt jak v lyzátu, tak v médiu.

Bylo publikováno, že *MTMR8* ovlivňuje autofagii a strukturu lysozomálního systému (Allen *et al.*, 2020). Důležitou úlohu v těchto procesech hraje obrat PIP. Membrána autofagozomu je významně obohacena PI(3)P (Wu *et al.*, 2014), hlavním substrátem *MTMR8* (Zou *et al.*, 2012), a membrána lysozomu obsahuje významné množství PI(3,5)P₂ (Takatori *et al.*, 2016), hlavního substrátu *MTMR6* (Zou *et al.*, 2012). Proto jsme ověřovali nejen již popsané změny lysozomálního systému způsobené

delecí *MTMR8*, ale zaměřili jsme se také na lysozomální systém v buňkách s deletovaným *MTMR6* a *MTMR9*.

Lysozomy se v buňkách WT nacházejí převážně v perinukleární oblasti, menší populace lysozomů je na periférii (Fig. 8A). Umístění lysozomů stejně jako jejich transport buňkou je z velké části regulovaný proces, na kterém se podílí cytoskelet, molekulární motory, ER (Bonifacino a Neeffjes, 2017), malé GTPázy a jejich efekторы (Marwaha *et al.*, 2017). V perinukleární oblasti, kde je zahuštěnější síť ER, tvoří lysozomy shluky. Shlukování lysozomů v této části buňky zvyšuje četnost fúzí s pozdními endozomy a dochází zde k degradaci materiálu (Ba *et al.*, 2018). Ačkoliv má lysozomální systém buněk *MTMR8KO* pod fluorescenčním mikroskopem podobnou strukturu jako v buňkách WT, tak jsme v této linii detekovali nižší počet lysozomů než v buňkách WT (Fig. 8C), což je ve shodě s publikovanými daty (Allen *et al.*, 2020). Celková plocha lysozomů v jedné buňce byla v porovnání s buňkou WT také menší (Fig. 8D). V buňkách *MTMR9KO* byl fenotyp podobný jako v buňkách *MTMR8KO* (Fig. 8A). Lysozomy byly koncentrované perinukleárně, v buňkách se jich nacházelo méně a zabíraly menší plochu (Fig. 8C,D). Pro správný průběh autofagické dráhy je podstatná role *MTMR8* jako aktivní fosfatázy snižující hladinu PI(3)P (Allen *et al.*, 2020). Podobné hodnoty pro počet a plochu lysozomů v buňce u *MTMR8KO* a *MTMR9KO* mohou odkazovat na funkci neaktivní fosfatázy *MTMR9* stabilizovat své interakční partnery, zvyšovat jejich afinitu a aktivitu vůči substrátu (Zou *et al.*, 2012).

U buněk *MTMR6KO* byl na mikroskopických snímcích patrný rozpad perinukleárního shluku lysozomů. Lysozomy byly rozptýlené v cytoplasmě a hromadily se na periférii buněk (Fig. 8A). Ačkoliv jsme na základě mikroskopických snímků předpokládali, že je lysozomů v buňkách *MTMR6KO* více a jsou větší, v celkové součtu plochy lysozomů na buňku nebyla zaznamenána statisticky významná změna ve srovnání s buňkami WT (Fig. 8D). Počet lysozomů se vlivem delece *MTMR6* také nezměnil (Fig. 8C). Kolokalizace jádra s lysozomy v těchto buňkách významně poklesla (Fig. 8B), což potvrzuje mikroskopické pozorování reorganizace lysozomálního systému u buněk *MTMR6KO*. Jedním z důvodů rozpadu perinukleárního shluku lysozomů u buněk *MTMR6KO* by mohlo být narušení asociace molekulárních motorů s membránovými proteiny lysozomů nebo pohybu molekulárních motorů po cytoskeletu. Lysozomy nejsou v buňce rozmístěny nahodile. Na regulaci lokalizace se podílí cytoskelet a molekulární motory (Bonifacino a Neeffjes, 2017). Toto pozorování podporuje výše zmíněnou hypotézu, že k rozpadu cis-Golgi dochází v důsledku narušení interakce mezi molekulárními motory a *MTMR6*. Dalším pozorováním podporujícím souvislost mezi *MTMR6* a molekulárními motory je změna struktury mitochondriální sítě v buňkách *MTMR6KO* (nepublikovaná data Mgr. Doubravské, Ph.D.). Distribuce mitochondrií je také závislá na cytoskeletu a jeho motorech (Henrichs *et al.*, 2020).

S lysozomy fúzíjí váčky pocházející z autofagické, endocytické a fagocytické dráhy (Inpanathan a Botelho, 2019). Narušení některé z těchto drah může vést ke změně struktury lysozomálního systému jakým je změna velikosti nebo počtu jednotlivých lysozomů. Je známo, že se *MTMR8* podílí na

negativní regulaci autofagické dráhy. Snížení hladiny MTMR8 vede ke zvýšení počtu autofagických struktur (Zou *et al.*, 2012; Allen *et al.*, 2020). Zároveň nebo v důsledku narušení autofagické dráhy dochází u buněk MTMR8KO k poškození funkce lysozomů (Allen *et al.*, 2020). Pro fúzi autofagozomu s lysozomem je nezbytná remodelace aktinové sítě na lysozomu (Lee *et al.*, 2010; Hasegawa *et al.*, 2016). Narušení aktinové sítě v buňkách MTMR8KO (nepublikovaná data Mgr. Doubravské, Ph.D.) by mohlo souviset se změnou počtu a celkové plochy lysozomů. Pro samotnou remodelaci aktinové sítě je nezbytná regulace hladiny PIP. Hasegawa *et al.* popsali vliv fosfatázové aktivity INPP5E na lysozomální systém u neuronů. Defosforylace PI(3,5)P₂ prostřednictvím INPP5E (za vzniku PI(3)P) je nezbytná pro stabilizaci aktinové sítě pomocí kortaktinu (Hasegawa *et al.*, 2016). Je možné, že se na regulaci hladiny PIP podílejí také MTMR6 nebo MTMR8 a jejich delece v buňce vede ke změně struktury lysozomálního systému. Odlišný fenotyp lysozomálního systému buněk MTMR6KO a MTMR8KO opět naznačuje odlišné role těchto fosfatáz.

Do regulace autofagické dráhy je zapojen také RAB1 (Zoppino *et al.*, 2010; Mochizuki *et al.*, 2013). Změna rozložení RAB1A v buňkách MTMR6KO a MTMR8KO by také mohla souviset se změnou struktury lysozomálního systému. RAB1 má mnoho efektorů, které regulují transport a fúzi váčků s cílovou membránou (Hutagalung a Novick, 2011).

MTMR tvoří velice rozsáhlou rodinu, která zahrnuje katalyticky aktivní členy se schopností defosforylovat stejný substrát. Proto je velice zajímavá otázka, zdali mají MTMR6 a MTMR8 jedinečné funkce nebo v buňce vystupují jako redundantní proteiny. V této diplomové práci jsme ukázali, že se MTMR6 a MTMR8 pravděpodobně v některých buněčných procesech, jakým je regulace struktury Golgi (Fig. 5,6) nebo lokalizace RAB1A (Fig. 4), zastupují. Dále pro redundanci hovoří i selhání vytvoření buněčné linie s dvojitou delecí *MTMR6* a *MTMR8*. Delece *MTMR6* vedla u většiny pozorovaných parametrů k výraznějšímu fenotypovému projevu (velikost a počet částí *cis*-Golgi, rozložení RAB1A) než delece *MTMR8*, což může být v souvislosti s evolučním stářím. MTMR8 je evolučně mladší než MTMR6 a hlodavci ho postrádají úplně (Raess *et al.*, 2017).

Každý z proteinů zastává v buňce pravděpodobně i jedinečné funkce. MTMR6 lokalizuje na rozdíl od MTMR8 na centrozom (Fig. 1), kde interaguje s jeho proteiny (<https://thebiogrid.org/114558>) a mohl by být zapojen do regulace dělení buněk. Buňky MTMR6KO se dělí pomaleji než buňky WT. V buňkách MTMR6KO byla pozorována změna struktury a rozložení sítě mitochondrií (nepublikovaná data Mgr. Doubravské, Ph.D.). U buněk MTMR8KO bylo netypické uspořádání mikrofilament (nepublikovaná data Mgr. Doubravské, Ph.D.). To je v souladu s publikovanými daty ukazujícími vliv MTMR8 na remodelaci aktinu a vývoj svalů u zebřičky (Mei *et al.*, 2009). Struktura lysozomálního systému a vliv zvýšené hladiny RAB1A-NG na strukturu Golgi se v buňkách MTMR6KO a MTMR8KO také liší.

6. Závěr

MTMR6 a MTMR8 patří do jedné z podskupin evolučně konzervované rodiny lipidických fosfatáz MTMR. Jelikož dosud nejsou spojovány s žádným monogenně podmíněným dědičným onemocněním, nebylo jim věnováno tolik pozornosti a zůstává o nich stále mnoho neznámého. Cílem diplomové práce bylo stanovení vlivu katalyticky aktivních fosfatáz MTMR6 a MTMR8 na fenotypy pozorované u buněk se změnou expresí katalyticky neaktivní fosfatázy MTMR9. Zjistili jsme, že u buněk MTMR6KO a MTMR8KO dochází ke změně procentuálního rozložení fluorescenčního signálu RAB1A-NG mezi Golgi a váčky v cytoplasmě se stejným trendem jako u buněk MTMR9KO, tedy RAB1A je výrazně posílen ve vácích intermediálního kompartmentu. RAB1A je markerem váců časné sekretorické dráhy a je důležitý pro zachování struktury Golgi, která byla u buněčných linií MTMR6KO, MTMR8KO a MTMR9KO změněna. Pomocí zvolených přístupů se nám nepodařilo přesvědčivě zhodnotit vliv MTMR6 a MTMR8 na sekreci proteinů. Prostřednictvím systému RUSH jsme neodhalili rozdíl v sekreci mezi buňkami WT a MTMR6KO nebo MTMR8KO buňkami. Výsledky luciferázového testu byly pravděpodobně ovlivněny rozdílnou mírou transientní transfekce vektorem nesoucím sekretovaný ligand Wnt. Proto je vhodné připravit stabilní linie WT a KO exprimující Wnt3A. Buněčné linie se současně deletovaným *MTMR6* a *MTMR8* se nám nepodařilo vytvořit navzdory velkému úsilí. Lze předpokládat, že v některých buněčných procesech se MTMR6 a MTMR8 zastupují, neboť mají schopnost defosforylovat stejné substráty. Nicméně částečně odlišná lokalizace MTMR6-EGFP a MTMR8-EGFP naznačuje i rozdílné funkce těchto fosfatáz. Také struktura lysozomálního systému se v buňkách MTMR6KO a MTMR8KO liší. Vliv RAB1A-NG na kompaktnost Golgi byl popsán pouze u buněk MTMR6KO. Pro hlubší pochopení vztahu mezi MTMR6, MTMR8, MTMR9 a RAB1A by bylo vhodné monitorovat hladinu PI(3)P a PI(3,5)P₂ na membránách příslušných kompartmentů.

U některých neurodegenerativních onemocnění byla pozorována změna struktury Golgi a lokalizace RAB1. Nicméně přesné příčiny vzniku zůstávají často nejasné. Zmíněné změny byly také vyvolány změnou expresí MTMR9 a jeho interakčních partnerů MTMR6 a MTMR8. V genech *MTMR8* a *MTMR9* byly detekovány mutace u pacientů s mentálním onemocněním. Detailnější popsání regulace sekretorické dráhy a souvislostí mezi jednotlivými molekulami zapojenými do sekrece by mohlo vést k objasnění příčin vzniku neurodegenerativních onemocnění.

7. Seznam použité literatury

„*“ označeno review

Allan, Bernard B., Bryan D. Moyer, and William E. Balch (2000) Rab1 Recruitment of P115 into a Cis-SNARE Complex: Programming Budding COPII Vesicles for Fusion. *Science* 289(5478). American Association for the Advancement of Science: 444–448.

Allen, Elizabeth A., Clelia Amato, Tina M. Fortier, *et al.* (2020) A Conserved Myotubularin-Related Phosphatase Regulates Autophagy by Maintaining Autophagic Flux. *The Journal of Cell Biology* 219(11).

* Alonso, Andres, Joanna Sasin, Nunzio Bottini, *et al.* (2004) Protein Tyrosine Phosphatases in the Human Genome. *Cell* 117(6). Elsevier: 699–711.

* Alory, Christelle, and William E. Balch (2001) Organization of the Rab-GDI/CHM Superfamily: The Functional Basis for Choroideremia Disease. *Traffic* 2(8): 532–543.

Alvarez, Cecilia, Rafael Garcia-Mata, Elizabeth Brandon, and Elizabeth Sztul (2003) COPI Recruitment Is Modulated by a Rab1b-Dependent Mechanism. *Molecular Biology of the Cell* 14(5): 2116–2127.

Aridor, Meir, and William E. Balch (2000) Kinase Signaling Initiates Coat Complex II (COPII) Recruitment and Export from the Mammalian Endoplasmic Reticulum *. *Journal of Biological Chemistry* 275(46). Elsevier: 35673–35676.

Axe, Elizabeth L., Simon A. Walker, Maria Manifava, *et al.* (2008) Autophagosome Formation from Membrane Compartments Enriched in Phosphatidylinositol 3-Phosphate and Dynamically Connected to the Endoplasmic Reticulum. *The Journal of Cell Biology* 182(4): 685–701.

Ba, Qinle, Guruprasad Raghavan, Kirill Kiselyov, and Ge Yang (2018) Whole-Cell Scale Dynamic Organization of Lysosomes Revealed by Spatial Statistical Analysis. *Cell Reports* 23(12): 3591–3606.

* Balla, Tamas (2005) Inositol-Lipid Binding Motifs: Signal Integrators through Protein-Lipid and Protein-Protein Interactions. *Journal of Cell Science* 118(10): 2093–2104.

Beck, Rainer, Simone Prinz, Petra Diestelkötter-Bachert, *et al.* (2011) Coatomer and Dimeric ADP Ribosylation Factor 1 Promote Distinct Steps in Membrane Scission. *The Journal of Cell Biology* 194(5): 765–777.

Beckers, C. J., D. S. Keller, and W. E. Balch (1987) Semi-Intact Cells Permeable to Macromolecules: Use in Reconstitution of Protein Transport from the Endoplasmic Reticulum to the Golgi Complex. *Cell* 50(4): 523–534.

Begley, Michael J., Gregory S. Taylor, Soo-A. Kim, *et al.* (2003) Crystal Structure of a Phosphoinositide Phosphatase, MTMR2: Insights into Myotubular Myopathy and Charcot-Marie-Tooth Syndrome. *Molecular Cell* 12(6). Elsevier: 1391–1402.

Beller, Mathias, Carole Sztalryd, Noel Southall, *et al.* (2008) COPI Complex Is a Regulator of Lipid Homeostasis. *PLOS Biology* 6(11). Public Library of Science: e292.

Ben-Tekaya, Houchaima, Kota Miura, Rainer Pepperkok, and Hans-Peter Hauri (2005) Live Imaging of Bidirectional Traffic from the ERGIC. *Journal of Cell Science* 118(2). The Company of Biologists Ltd: 357–367.

Bjørkøy, Geir, Trond Lamark, Andreas Brech, *et al.* (2005) P62/SQSTM1 Forms Protein Aggregates Degraded by Autophagy and Has a Protective Effect on Huntingtin-Induced Cell Death. *The Journal of Cell Biology* 171(4): 603–614.

- Blair, Ian P., Kelly L. Williams, Sadaf T. Warraich, *et al.* (2010) FUS Mutations in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Clinical, Pathological, Neurophysiological and Genetic Analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 81(6): 639–645.
- Blondeau, F., J. Laporte, S. Bodin, *et al.* (2000) Myotubularin, a Phosphatase Deficient in Myotubular Myopathy, Acts on Phosphatidylinositol 3-Kinase and Phosphatidylinositol 3-Phosphate Pathway. *Human Molecular Genetics* 9(15): 2223–2229.
- Bolino, Alessandra, Maria Muglia, Francesca Luisa Conforti, *et al.* (2000) Charcot-Marie-Tooth Type 4B Is Caused by Mutations in the Gene Encoding Myotubularin-Related Protein-2. *Nature Genetics* 25(1): 17–19.
- Bolte, S., and F. P. Cordelières (2006) A Guided Tour into Subcellular Colocalization Analysis in Light Microscopy. *Journal of Microscopy* 224(Pt 3): 213–232.
- Boncompain, Gaëlle, Severine Divoux, Nelly Gareil, *et al.* (2012) Synchronization of Secretory Protein Traffic in Populations of Cells. *Nature Methods* 9(5). Nature Publishing Group: 493–498.
- Bonifacino, Juan S, and Jacques Neefjes (2017) Moving and Positioning the Endolysosomal System. *Current Opinion in Cell Biology* 47. *Cell Organelles*: 1–8.
- Brombacher, Eva, Simon Urwyler, Curdin Ragaz, *et al.* (2009) Rab1 Guanine Nucleotide Exchange Factor SidM Is a Major Phosphatidylinositol 4-Phosphate-Binding Effector Protein of *Legionella Pneumophila*. *The Journal of Biological Chemistry* 284(8): 4846–4856.
- Campa, Carlo Cosimo, Jean Piero Margaria, Abhishek Derle, *et al.* (2018) Rab11 Activity and PtdIns(3)P Turnover Removes Recycling Cargo from Endosomes. *Nature Chemical Biology* 14(8): 801–810.
- Cao, Canhong, Jonathan M. Backer, Jocelyn Laporte, Edward J. Bedrick, and Angela Wandinger-Ness (2008) Sequential Actions of Myotubularin Lipid Phosphatases Regulate Endosomal PI(3)P and Growth Factor Receptor Trafficking. *Molecular Biology of the Cell* 19(8): 3334–3346.
- Capmany, Anahi, Azumi Yoshimura, Rachid Kerdous, *et al.* (2019) MYO1C Stabilizes Actin and Facilitates the Arrival of Transport Carriers at the Golgi Complex. *Journal of Cell Science* 132(8): jcs225029.
- Cervigni, Romina Ines, Raffaella Bonavita, Maria Luisa Barretta, *et al.* (2015) JNK2 Controls Fragmentation of the Golgi Complex and the G2/M Transition through Phosphorylation of GRASP65. *Journal of Cell Science* 128(12): 2249–2260.
- Chang, Wu-Lin, Shinya Yamamoto, Manish Jaiswal, *et al.* (2014) *Drosophila* Tempura, a Novel Protein Prenyltransferase α Subunit, Regulates Notch Signaling via Rab1 and Rab11. *PLoS Biology* 12(1): e1001777.
- Childers, Martin K, Romain Joubert, Karine Poulard, *et al.* (2014) Gene Therapy Prolongs Survival and Restores Function in Murine and Canine Models of Myotubular Myopathy. *Science Translational Medicine* 6(220): 220ra10.
- * Choy, Christopher H., Bong-Kwan Han, and Roberto J. Botelho (2017) Phosphoinositide Diversity, Distribution, and Effector Function: Stepping Out of the Box. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 39(12).
- Cole, N. B., N. Sciaky, A. Marotta, J. Song, and J. Lippincott-Schwartz (1996) Golgi Dispersal during Microtubule Disruption: Regeneration of Golgi Stacks at Peripheral Endoplasmic Reticulum Exit Sites. *Molecular Biology of the Cell* 7(4): 631–650.
- Cooper, Antony A., Aaron D. Gitler, Anil Cashikar, *et al.* (2006) Alpha-Synuclein Blocks ER-Golgi Traffic and Rab1 Rescues Neuron Loss in Parkinson's Models. *Science (New York, N.Y.)* 313(5785): 324–328.

- Corthésy-Theulaz, I., A. Pauloin, and S. R. Pfeffer (1992) Cytoplasmic Dynein Participates in the Centrosomal Localization of the Golgi Complex. *The Journal of Cell Biology* 118(6): 1333–1345.
- DeJesus-Hernandez, Mariely, Ian R. Mackenzie, Bradley F. Boeve, *et al.* (2011) Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Non-Coding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked Frontotemporal Dementia and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuron* 72(2): 245–256.
- Denu, John M., Jeanne A. Stuckey, Mark A. Saper, and Jack E. Dixon (1996) Form and Function in Protein Dephosphorylation. *Cell* 87(3). Elsevier: 361–364.
- Doerks, Tobias, Martin Strauss, Martin Brendel, and Peer Bork (2000) GRAM, a Novel Domain in Glucosyltransferases, Myotubularins and Other Putative Membrane-Associated Proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 25(10): 483–485.
- Doubravská, Lenka, Vojtěch Dostál, Filip Knop, Lenka Libusová, and Marie Macůrková (2020) Human Myotubularin-Related Protein 9 Regulates ER-to-Golgi Trafficking and Modulates WNT3A Secretion. *Experimental Cell Research* 386(1): 111709.
- Dove, S. K., F. T. Cooke, M. R. Douglas, *et al.* (1997) Osmotic Stress Activates Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphate Synthesis. *Nature* 390(6656): 187–192.
- Fan, Jing-Yu, Jürgen Roth, and Christian Zuber (2003) Ultrastructural Analysis of Transitional Endoplasmic Reticulum and Pre-Golgi Intermediates: A Highway for Cars and Trucks. *Histochemistry and Cell Biology* 120(6): 455–463.
- Faouzi, Malika, Frederic Hague, Dirk Geerts, *et al.* (2016) Functional Cooperation between KCa3.1 and TRPC1 Channels in Human Breast Cancer: Role in Cell Proliferation and Patient Prognosis. *Oncotarget* 7(24): 36419–36435.
- Fath, Stephan, Joseph D. Mancias, Xiping Bi, and Jonathan Goldberg (2007) Structure and Organization of Coat Proteins in the COPII Cage. *Cell* 129(7). Elsevier: 1325–1336.
- Fujimoto, Tetta, Tomoki Kuwahara, Tomoya Eguchi, *et al.* (2018) Parkinson’s Disease-Associated Mutant LRRK2 Phosphorylates Rab7L1 and Modifies Trans-Golgi Morphology. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 495(2): 1708–1715.
- Fujita, Yukio, Eisaku Ohama, Masamitsu Takatama, Safa Al-Sarraj, and Koichi Okamoto (2006) Fragmentation of Golgi Apparatus of Nigral Neurons with α -Synuclein-Positive Inclusions in Patients with Parkinson’s Disease. *Acta Neuropathologica* 112(3): 261–265.
- Guo, Yusong, and Adam D Linstedt (2014) Binding of the Vesicle Docking Protein P115 to the GTPase Rab1b Regulates Membrane Recruitment of the COPI Vesicle Coat. *Cellular Logistics* 3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4187009/>, accessed January 8, 2021.
- Gupta, Gagan D., Swetha M. G, Sudha Kumari, *et al.* (2009) Analysis of Endocytic Pathways in Drosophila Cells Reveals a Conserved Role for GBF1 in Internalization via GEECs. *PLOS ONE* 4(8). Public Library of Science: e6768.
- Haas, Alexander K., Shin-ichiro Yoshimura, David J. Stephens, *et al.* (2007) Analysis of GTPase-Activating Proteins: Rab1 and Rab43 Are Key Rabs Required to Maintain a Functional Golgi Complex in Human Cells. *Journal of Cell Science* 120(17). The Company of Biologists Ltd: 2997–3010.
- Harterink, Martin, Phillip Port, Magdalena J. Lorenowicz, *et al.* (2011) A SNX3-Dependent Retromer Pathway Mediates Retrograde Transport of the Wnt Sorting Receptor Wntless and Is Required for Wnt Secretion. *Nature Cell Biology* 13(8): 914–923.
- Hasegawa, Junya, Ryo Iwamoto, Takanobu Otomo, *et al.* (2016) Autophagosome-Lysosome Fusion in Neurons Requires INPP5E, a Protein Associated with Joubert Syndrome. *The EMBO Journal* 35(17): 1853–1867.

- * Hasegawa, Junya, Bethany S. Strunk, and Lois S. Weisman (2017) PI5P and PI(3,5)P2: Minor, but Essential Phosphoinositides. *Cell Structure and Function* 42(1): 49–60.
- Henrichs, Verena, Lenka Grycova, Cyril Barinka, *et al.* (2020) Mitochondria-Adaptor TRAK1 Promotes Kinesin-1 Driven Transport in Crowded Environments. *Nature Communications* 11(1): 3123.
- Hicks, Stuart W., and Carolyn E. Machamer (2002) The NH₂-Terminal Domain of Golgin-160 Contains Both Golgi and Nuclear Targeting Information. *The Journal of Biological Chemistry* 277(39): 35833–35839.
- Holman, S. K., T. Morgan, G. Baujat, *et al.* (2013) Osteopathia Striata Congenita with Cranial Sclerosis and Intellectual Disability Due to Contiguous Gene Deletions Involving the WTX Locus. *Clinical Genetics* 83(3): 251–256.
- Homma, Yuta, Riko Kinoshita, Yoshihiko Kuchitsu, *et al.* (2019) Comprehensive Knockout Analysis of the Rab Family GTPases in Epithelial Cells. *Journal of Cell Biology* 218(6): 2035–2050.
- * Hutagalung, Alex H., and Peter J. Novick (2011) Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology. *Physiological Reviews* 91(1): 119–149.
- * Inpanathan, Subothan, and Roberto J. Botelho (2019) The Lysosome Signaling Platform: Adapting With the Times. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 0. *Frontiers*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2019.00113/full>, accessed July 29, 2021.
- Ishii, Midori, Yasuyuki Suda, Kazuo Kurokawa, and Akihiko Nakano (2016) COPI Is Essential for Golgi Cisternal Maturation and Dynamics. *Journal of Cell Science* 129(17): 3251–3261.
- Jean, Steve, Sarah Cox, Eric J. Schmidt, Fred L. Robinson, and Amy Kiger (2012) Sbf/MTMR13 Coordinates PI(3)P and Rab21 Regulation in Endocytic Control of Cellular Remodeling. *Molecular Biology of the Cell* 23(14): 2723–2740.
- Johnson, Adam, Nilakshee Bhattacharya, Michael Hanna, *et al.* (2015) TFG Clusters COPII-Coated Transport Carriers and Promotes Early Secretory Pathway Organization. *The EMBO Journal* 34(6): 811–827.
- Joiner, Aaron MN, Ben P Phillips, Kumar Yugandhar, *et al.* (2021) Structural Basis of TRAPPIII-Mediated Rab1 Activation. *The EMBO Journal* n/a(n/a). John Wiley & Sons, Ltd: e107607.
- Jones, A T, and M J Clague (1995) Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity Is Required for Early Endosome Fusion. *Biochemical Journal* 311(Pt 1): 31–34.
- Joshi, Gunjan, Youjian Chi, Zheping Huang, and Yanzhuang Wang (2014) A β -Induced Golgi Fragmentation in Alzheimer's Disease Enhances A β Production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(13): E1230–E1239.
- Kaczmarek, Beata, Jean-Marc Verbavatz, and Catherine L. Jackson (2017) GBF1 and Arf1 Function in Vesicular Trafficking, Lipid Homeostasis and Organelle Dynamics. *Biology of the Cell* 109(12): 391–399.
- Kaiser, C. A., and R. Schekman (1990) Distinct Sets of SEC Genes Govern Transport Vesicle Formation and Fusion Early in the Secretory Pathway. *Cell* 61(4): 723–733.
- Kerk, David, and Greg BG Moorhead (2010) A Phylogenetic Survey of Myotubularin Genes of Eukaryotes: Distribution, Protein Structure, Evolution, and Gene Expression. *BMC Evolutionary Biology* 10(1): 196.
- Kim, Soo-A., Panayiotis O. Vacratsis, Ron Firestein, Michael L. Cleary, and Jack E. Dixon (2003) Regulation of Myotubularin-Related (MTMR)2 Phosphatidylinositol Phosphatase by MTMR5, a Catalytically Inactive Phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(8). *National Academy of Sciences*: 4492–4497.

- * Laporte, Jocelyn, Florence Bedez, Alessandra Bolino, and Jean-Louis Mandel (2003) Myotubularins, a Large Disease-Associated Family of Cooperating Catalytically Active and Inactive Phosphoinositides Phosphatases. *Human Molecular Genetics* 12(suppl_2). Oxford Academic: R285–R292.
- Laporte, Jocelyn, Ling Jia Hu, Christine Kretz, *et al.* (1996) A Gene Mutated in X-Linked Myotubular Myopathy Defines a New Putative Tyrosine Phosphatase Family Conserved in Yeast. *Nature Genetics* 13(2): 175–182.
- de Lartigue, Jane, Hannah Polson, Morri Feldman, *et al.* (2009) PIKfyve Regulation of Endosome-Linked Pathways. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 10(7): 883–893.
- Lee, Joo-Yong, Hiroshi Koga, Yoshiharu Kawaguchi, *et al.* (2010) HDAC6 Controls Autophagosome Maturation Essential for Ubiquitin-Selective Quality-Control Autophagy. *The EMBO Journal* 29(5): 969–980.
- Lee, T. H., and A. D. Linstedt (2000) Potential Role for Protein Kinases in Regulation of Bidirectional Endoplasmic Reticulum-to-Golgi Transport Revealed by Protein Kinase Inhibitor H89. *Molecular Biology of the Cell* 11(8): 2577–2590.
- Legland, David, Ignacio Arganda-Carreras, and Philippe Andrey (2016) MorphoLibJ: Integrated Library and Plugins for Mathematical Morphology with ImageJ. *Bioinformatics* 32(22): 3532–3534.
- Liu, Chunyi, Mei Mei, Qiuling Li, *et al.* (2017) Loss of the Golgin GM130 Causes Golgi Disruption, Purkinje Neuron Loss, and Ataxia in Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(2): 346–351.
- Lo, Min-Tzu, David A. Hinds, Joyce Y. Tung, *et al.* (2017) Genome-Wide Analyses for Personality Traits Identify Six Genomic Loci and Show Correlations with Psychiatric Disorders. *Nature Genetics* 49(1): 152–156.
- Marie, Michaël, Hege A. Dale, Ragna Sannerud, and Jaakko Saraste (2009) The Function of the Intermediate Compartment in Pre-Golgi Trafficking Involves Its Stable Connection with the Centrosome. *Molecular Biology of the Cell* 20(20): 4458–4470.
- Martinez, Hernán, Iris A. García, Luciana Sampieri, and Cecilia Alvarez (2016) Spatial-Temporal Study of Rab1b Dynamics and Function at the ER-Golgi Interface. *PLoS ONE* 11(8). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4976911/>, accessed January 13, 2021.
- * Martínez-Menárguez, José Ángel, Mónica Tomás, Narcisca Martínez-Martínez, and Emma Martínez-Alonso (2019) Golgi Fragmentation in Neurodegenerative Diseases: Is There a Common Cause? *Cells* 8(7). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6679019/>, accessed January 3, 2021.
- Marwaha, Rituraj, Subhash B. Arya, Divya Jagga, *et al.* (2017) The Rab7 Effector PLEKHM1 Binds Arl8b to Promote Cargo Traffic to Lysosomes. *The Journal of Cell Biology* 216(4): 1051–1070.
- Mathiowetz, Alyssa J., Emma Baple, Ashley J. Russo, *et al.* (2017) An Amish Founder Mutation Disrupts a PI(3)P-WHAMM-Arp2/3 Complex-Driven Autophagosomal Remodeling Pathway. *Molecular Biology of the Cell* 28(19): 2492–2507.
- Mei, Jie, Zhi Li, and Jian-Fang Gui (2009) Cooperation of Mtmr8 with PI3K Regulates Actin Filament Modeling and Muscle Development in Zebrafish. *PLOS ONE* 4(3). Public Library of Science: e4979.
- Mei, Jie, Sha Liu, Zhi Li, and Jian-Fang Gui (2010) Mtmr8 Is Essential for Vasculature Development in Zebrafish Embryos. *BMC Developmental Biology* 10(1): 96.
- Mochizuki, Yasuhiro, and Philip W. Majerus (2003) Characterization of Myotubularin-Related Protein 7 and Its Binding Partner, Myotubularin-Related Protein 9. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(17). National Academy of Sciences: 9768–9773.

- Mochizuki, Yasuhiro, Riuko Ohashi, Takeshi Kawamura, *et al.* (2013) Phosphatidylinositol 3-Phosphatase Myotubularin-Related Protein 6 (MTMR6) Is Regulated by Small GTPase Rab1B in the Early Secretory and Autophagic Pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 288(2): 1009–1021.
- Mohamed, Nguyen-Vi, Alexandre Desjardins, and Nicole Leclerc (2017) Tau Secretion Is Correlated to an Increase of Golgi Dynamics. *PloS One* 12(5): e0178288.
- Monetta, Pablo, Ileana Slavin, Nahuel Romero, and Cecilia Alvarez (2007) Rab1b Interacts with GBF1 and Modulates Both ARF1 Dynamics and COPI Association. *Molecular Biology of the Cell* 18(7): 2400–2410.
- Moti, Naushad, Jia Yu, Gaelle Boncompain, Franck Perez, and David M. Virshup (2019) Wnt Traffic from Endoplasmic Reticulum to Filopodia. *PloS One* 14(2): e0212711.
- Mourelatos, Z., H. Adler, A. Hirano, *et al.* (1990) Fragmentation of the Golgi Apparatus of Motor Neurons in Amyotrophic Lateral Sclerosis Revealed by Organelle-Specific Antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(11): 4393–4395.
- Moyer, B. D., B. B. Allan, and W. E. Balch (2001) Rab1 Interaction with a GM130 Effector Complex Regulates COPII Vesicle Cis--Golgi Tethering. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 2(4): 268–276.
- Mukherjee, Shaeri, Raymond Chiu, Som-Ming Leung, and Dennis Shields (2007) Fragmentation of the Golgi Apparatus: An Early Apoptotic Event Independent of the Cytoskeleton. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 8(4): 369–378.
- Murphy, Sinead M., Matilde Laura, Katherine Fawcett, *et al.* (2012) Charcot-Marie-Tooth Disease: Frequency of Genetic Subtypes and Guidelines for Genetic Testing. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 83(7): 706–710.
- Nakamura, N., M. Lowe, T. P. Levine, C. Rabouille, and G. Warren (1997) The Vesicle Docking Protein P115 Binds GM130, a Cis-Golgi Matrix Protein, in a Mitotically Regulated Manner. *Cell* 89(3): 445–455.
- Nakamura, N., C. Rabouille, R. Watson, *et al.* (1995) Characterization of a Cis-Golgi Matrix Protein, GM130. *The Journal of Cell Biology* 131(6 Pt 2): 1715–1726.
- Nelson, D. S., C. Alvarez, Y. S. Gao, *et al.* (1998) The Membrane Transport Factor TAP/P115 Cycles between the Golgi and Earlier Secretory Compartments and Contains Distinct Domains Required for Its Localization and Function. *The Journal of Cell Biology* 143(2): 319–331.
- Neumann, Manuela, Deepak M. Sampathu, Linda K. Kwong, *et al.* (2006) Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science (New York, N.Y.)* 314(5796): 130–133.
- Odorizzi, G., M. Babst, and S. D. Emr (1998) Fab1p PtdIns(3)P 5-Kinase Function Essential for Protein Sorting in the Multivesicular Body. *Cell* 95(6): 847–858.
- Orci, Lelio, Mylène Amherdt, Mariella Ravazzola, Alain Perrelet, and James E. Rothman (2000) Exclusion of Golgi Residents from Transport Vesicles Budding from Golgi Cisternae in Intact Cells. *The Journal of Cell Biology* 150(6): 1263–1270.
- * Parakh, S., E. R. Perri, C. J. Jagaraj, A. M. G. Ragagnin, and J. D. Atkin (2018) Rab-Dependent Cellular Trafficking and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 53(6): 623–651.
- * Phillips, Melissa J., and Gia K. Voeltz (2016) Structure and Function of ER Membrane Contact Sites with Other Organelles. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 17(2): 69–82.
- Plutner, H., A. D. Cox, S. Pind, *et al.* (1991) Rab1b Regulates Vesicular Transport between the Endoplasmic Reticulum and Successive Golgi Compartments. *The Journal of Cell Biology* 115(1): 31–43.

Poteryaev, Dmitry, Sunando Datta, Karin Ackema, Marino Zerial, and Anne Spang (2010) Identification of the Switch in Early-to-Late Endosome Transition. *Cell* 141(3): 497–508.

Presley, J. F., N. B. Cole, T. A. Schroer, *et al.* (1997) ER-to-Golgi Transport Visualized in Living Cells. *Nature* 389(6646): 81–85.

Puthenveedu, Manojkumar A., Collin Bachert, Sapna Puri, Frederick Lanni, and Adam D. Linstedt (2006) GM130 and GRASP65-Dependent Lateral Cisternal Fusion Allows Uniform Golgi-Enzyme Distribution. *Nature Cell Biology* 8(3). Nature Publishing Group: 238–248.

* Pylypenko, Olena, Hussein Hammich, I-Mei Yu, and Anne Houdusse (2017) Rab GTPases and Their Interacting Protein Partners: Structural Insights into Rab Functional Diversity. *Small GTPases* 9(1–2): 22–48.

* Raess, Matthieu A., Sylvie Friant, Belinda S. Cowling, and Jocelyn Laporte (2017) WANTED - Dead or Alive: Myotubularins, a Large Disease-Associated Protein Family. *Advances in Biological Regulation* 63: 49–58.

Rassu, Mauro, Maria Grazia Del Giudice, Simona Sanna, *et al.* (2017) Role of LRRK2 in the Regulation of Dopamine Receptor Trafficking. *PloS One* 12(6): e0179082.

Riedel, Falko, Antonio Galindo, Nadine Muschalik, and Sean Munro (2018) The Two TRAPP Complexes of Metazoans Have Distinct Roles and Act on Different Rab GTPases. *The Journal of Cell Biology* 217(2): 601–617.

* Robinson, Fred L., and Jack E. Dixon (2006) Myotubularin Phosphatases: Policing 3-Phosphoinositides. *Trends in Cell Biology* 16(8): 403–412.

Robinson, Fred L., Ingrid R. Niesman, Kristina K. Beiswenger, and Jack E. Dixon (2008) Loss of the Inactive Myotubularin-Related Phosphatase Mtmr13 Leads to a Charcot–Marie–Tooth 4B2-like Peripheral Neuropathy in Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(12): 4916–4921.

Rosen, D. R., T. Siddique, D. Patterson, *et al.* (1993) Mutations in Cu/Zn Superoxide Dismutase Gene Are Associated with Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Nature* 362(6415): 59–62.

Salehi, A., P. J. Lucassen, C. W. Pool, *et al.* (1994) Decreased Neuronal Activity in the Nucleus Basalis of Meynert in Alzheimer's Disease as Suggested by the Size of the Golgi Apparatus. *Neuroscience* 59(4): 871–880.

Sannerud, Ragna, Michaël Marie, Clément Nizak, *et al.* (2006) Rab1 Defines a Novel Pathway Connecting the Pre-Golgi Intermediate Compartment with the Cell Periphery. *Molecular Biology of the Cell* 17(4): 1514–1526.

Saraste, J., U. Lahtinen, and B. Goud (1995) Localization of the Small GTP-Binding Protein Rab1p to Early Compartments of the Secretory Pathway. *Journal of Cell Science* 108 (Pt 4): 1541–1552.

* Saraste, Jaakko, and Michaël Marie (2018) Intermediate Compartment (IC): From Pre-Golgi Vacuoles to a Semi-Autonomous Membrane System. *Histochemistry and Cell Biology* 150(5): 407–430.

Sasaki, T., A. Kikuchi, S. Araki, *et al.* (1990) Purification and Characterization from Bovine Brain Cytosol of a Protein That Inhibits the Dissociation of GDP from and the Subsequent Binding of GTP to Smg P25A, a Ras P21-like GTP-Binding Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 265(4): 2333–2337.

Sawade, Linda, Federica Grandi, Marianna Mignanelli, *et al.* (2020) Rab35-Regulated Lipid Turnover by Myotubularins Represses MTORC1 Activity and Controls Myelin Growth. *Nature Communications* 11(1). Nature Publishing Group: 2835.

Schindelin, Johannes, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, *et al.* (2012) Fiji - an Open Source platform for Biological Image Analysis. *Nature Methods* 9(7): 10.1038/nmeth.2019.

- Schmitt, H. D., P. Wagner, E. Pfaff, and D. Gallwitz (1986) The Ras-Related YPT1 Gene Product in Yeast: A GTP-Binding Protein That Might Be Involved in Microtubule Organization. *Cell* 47(3): 401–412.
- Schmittgen, Thomas D., and Kenneth J. Livak (2008) Analyzing Real-Time PCR Data by the Comparative C T Method. *Nature Protocols* 3(6). Nature Publishing Group: 1101–1108.
- Schweizer, A., J. A. Fransen, T. Bächli, L. Ginsel, and H. P. Hauri (1988) Identification, by a Monoclonal Antibody, of a 53-KD Protein Associated with a Tubulo-Vesicular Compartment at the Cis-Side of the Golgi Apparatus. *The Journal of Cell Biology* 107(5): 1643–1653.
- Shi, Zhangyan, Xueping Jia, Yajie Tian, *et al.* (2020) Genetic Variants of the MTMR9 Gene Are Associated with Nonspecific Intellectual Disability: A Family-Based Association Study. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* 24(10): 625–631.
- Silhankova, Marie, Phillip Port, Martin Harterink, Konrad Basler, and Hendrik C Korswagen (2010) Wnt Signalling Requires MTM-6 and MTM-9 Myotubularin Lipid-Phosphatase Function in Wnt-Producing Cells. *The EMBO Journal* 29(24). John Wiley & Sons, Ltd: 4094–4105.
- Sivars, Ulf, Dikran Aivazian, and Suzanne R. Pfeffer (2003) Yip3 Catalyses the Dissociation of Endosomal Rab–GDI Complexes. *Nature* 425(6960). Nature Publishing Group: 856–859.
- Soo, Kai Y., Mark Halloran, Vinod Sundaramoorthy, *et al.* (2015) Rab1-Dependent ER-Golgi Transport Dysfunction Is a Common Pathogenic Mechanism in SOD1, TDP-43 and FUS-Associated ALS. *Acta Neuropathologica* 130(5): 679–697.
- Spiro, Alfred J., G. Milton Shy, and Nicholas K. Gonatas (1966) Myotubular Myopathy: Persistence of Fetal Muscle in an Adolescent Boy. *Archives of Neurology* 14(1). American Medical Association: 1-14.
- Srivastava, Shekhar, Zhai Li, Lin Lin, *et al.* (2005) The Phosphatidylinositol 3-Phosphate Phosphatase Myotubularin- Related Protein 6 (MTMR6) Is a Negative Regulator of the Ca²⁺-Activated K⁺ Channel KCa3.1. *Molecular and Cellular Biology* 25(9): 3630–3638.
- Stieber, A., Z. Mourelatos, and N. K. Gonatas (1996) In Alzheimer’s Disease the Golgi Apparatus of a Population of Neurons without Neurofibrillary Tangles Is Fragmented and Atrophic. *The American Journal of Pathology* 148(2): 415–426.
- Sun, Kai-Hui, Yolanda de Pablo, Fabien Vincent, *et al.* (2008) Novel Genetic Tools Reveal Cdk5’s Major Role in Golgi Fragmentation in Alzheimer’s Disease. *Molecular Biology of the Cell* 19(7): 3052–3069.
- Taguchi-Atarashi, Naoko, Maho Hamasaki, Kohichi Matsunaga, *et al.* (2010) Modulation of Local PtdIns3P Levels by the PI Phosphatase MTMR3 Regulates Constitutive Autophagy. *Traffic* 11(4): 468–478.
- Takatori, Sho, Tsuyako Tatematsu, Jinglei Cheng, *et al.* (2016) Phosphatidylinositol 3,5-Bisphosphate-Rich Membrane Domains in Endosomes and Lysosomes. *Traffic* 17(2): 154–167.
- Tang, L., Y. Tong, H. Cao, *et al.* (2014) The MTMR9 Rs2293855 Polymorphism Is Associated with Glucose Tolerance, Insulin Secretion, Insulin Sensitivity and Increased Risk of Prediabetes. *Gene* 546(2): 150–155.
- Tenorio, María J., Charlotte Luchsinger, and Gonzalo A. Mardones (2015) Protein Kinase A Activity Is Necessary for Fission and Fusion of Golgi to Endoplasmic Reticulum Retrograde Tubules. *PLOS ONE* 10(8). Public Library of Science: e0135260.
- Tersar, Kristian, Matthias Boentert, Philipp Berger, *et al.* (2007) Mtmr13/Sbf2-Deficient Mice: An Animal Model for CMT4B2. *Human Molecular Genetics* 16(24): 2991–3001.
- Thomas, Janice D., Yan-Jie Zhang, Yue-Hua Wei, *et al.* (2014) Rab1A Is an MTORC1 Activator and a Colorectal Oncogene. *Cancer Cell* 26(5): 754–769.

- Tosch, Valérie, Holger M. Rohde, Hélène Tronchère, *et al.* (2006) A Novel PtdIns3P and PtdIns(3,5)P₂ Phosphatase with an Inactivating Variant in Centronuclear Myopathy. *Human Molecular Genetics* 15(21): 3098–3106.
- Touchot, N, P Chardin, and A Tavitian (1987) Four Additional Members of the Ras Gene Superfamily Isolated by an Oligonucleotide Strategy: Molecular Cloning of YPT-Related CDNAs from a Rat Brain Library. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(23): 8210–8214.
- Valderrama, F., T. Babià, I. Ayala, *et al.* (1998) Actin Microfilaments Are Essential for the Cytological Positioning and Morphology of the Golgi Complex. *European Journal of Cell Biology* 76(1): 9–17.
- Vallat, Laurent, Henri Magdelénat, Helene Merle-Béral, *et al.* (2003) The Resistance of B-CLL Cells to DNA Damage-Induced Apoptosis Defined by DNA Microarrays. *Blood* 101(11): 4598–4606.
- Veeman, Michael T., Diane C. Slusarski, Ajamete Kaykas, Sarah Hallagan Louie, and Randall T. Moon (2003) Zebrafish Prickle, a Modulator of Noncanonical Wnt/Fz Signaling, Regulates Gastrulation Movements. *Current Biology* 13(8). Elsevier: 680–685.
- Vergne, Isabelle, Esteban Roberts, Rasha A Elmaoued, *et al.* (2009) Control of Autophagy Initiation by Phosphoinositide 3-Phosphatase Jumpy. *The EMBO Journal* 28(15): 2244–2258.
- Vielh, E, N Touchot, A Zahraoui, and A Tavitian (1989) Nucleotide Sequence of a Rat CDNA: Rab1B, Encoding a Rab1-YPT Related Protein. *Nucleic Acids Research* 17(4): 1770.
- Walenta, J. H., A. J. Didier, X. Liu, and H. Krämer (2001) The Golgi-Associated Hook3 Protein Is a Member of a Novel Family of Microtubule-Binding Proteins. *The Journal of Cell Biology* 152(5):923-934.
- Wang, Chenran, Youngdong Yoo, Huaping Fan, *et al.* (2010) Regulation of Integrin β 1 Recycling to Lipid Rafts by Rab1a to Promote Cell Migration. *The Journal of Biological Chemistry* 285(38): 29398–29405.
- Wang, Yanzhuang, Joachim Seemann, Marc Pypaert, James Shorter, and Graham Warren (2003) A Direct Role for GRASP65 as a Mitotically Regulated Golgi Stacking Factor. *The EMBO Journal* 22(13): 3279–3290.
- Wang, Yuan, Xia Lei, Chengying Gao, *et al.* (2019) MiR-506-3p Suppresses the Proliferation of Ovarian Cancer Cells by Negatively Regulating the Expression of MTMR6. *Journal of Biosciences* 44(6).
- Warren, G., T. Levine, and T. Misteli (1995) Mitotic Disassembly of the Mammalian Golgi Apparatus. *Trends in Cell Biology* 5(11): 413–416.
- Waugh, Mark G. (2016) Chromosomal Instability and Phosphoinositide Pathway Gene Signatures in Glioblastoma Multiforme. *Molecular Neurobiology* 53(1): 621–630.
- Weide, Thomas, Michael Bayer, Miriam Köster, *et al.* (2001) The Golgi Matrix Protein GM130: A Specific Interacting Partner of the Small GTPase Rab1b. *EMBO Reports* 2(4): 336–341.
- Westrate, Laura M., Melissa J. Hoyer, Michael J. Nash, and Gia K. Voeltz (2020) Vesicular and Uncoated Rab1-Dependent Cargo Carriers Facilitate ER to Golgi Transport. *Journal of Cell Science* 133(14).
- Wu, Yanwei, Shiya Cheng, Hongyu Zhao, *et al.* (2014) PI3P Phosphatase Activity Is Required for Autophagosome Maturation and Autolysosome Formation. *EMBO Reports* 15(9): 973–981.
- Yadav, Smita, Manojkumar A. Puthenveedu, and Adam D. Linstedt, (2012a) Golgin160 Recruits the Dynein Motor to Position the Golgi Apparatus. *Developmental Cell* 23(1): 153–165. (2012b) Golgin160 Recruits the Dynein Motor to Position the Golgi Apparatus. *Developmental Cell* 23(1): 153–165.

- Yanagiya, Takahiro, Atsushi Tanabe, Aritoshi Iida, *et al.* (2007) Association of Single-Nucleotide Polymorphisms in MTMR9 Gene with Obesity. *Human Molecular Genetics* 16(24). Oxford Academic: 3017–3026.
- Yang, X., H. T. Matern, and D. Gallwitz (1998) Specific Binding to a Novel and Essential Golgi Membrane Protein (Yip1p) Functionally Links the Transport GTPases Ypt1p and Ypt31p. *The EMBO Journal* 17(17): 4954–4963.
- * Yang, Xianzhi, Xiaoxing Li, Yanjie Zhang, *et al.* (2016) Rab1 in Cell Signaling, Cancer and Other Diseases. *Oncogene* 35(44): 5699–5704.
- Ying, M., T. Flatmark, and J. Saraste (2000) The P58-Positive Pre-Golgi Intermediates Consist of Distinct Subpopulations of Particles That Show Differential Binding of COPI and COPII Coats and Contain Vacuolar H(+)-ATPase. *Journal of Cell Science* 113 (Pt 20): 3623–3638.
- Ying, Ming, Ragna Sannerud, Torgeir Flatmark, and Jaakko Saraste (2002) Colocalization of Ca²⁺-ATPase and GRP94 with P58 and the Effects of Thapsigargin on Protein Recycling Suggest the Participation of the Pre-Golgi Intermediate Compartment in Intracellular Ca²⁺ Storage. *European Journal of Cell Biology* 81(9): 469–483.
- Yoo, Ki-Young, Ji Young Son, Jee Un Lee, *et al.* (2015) Structure of the Catalytic Phosphatase Domain of MTMR8: Implications for Dimerization, Membrane Association and Reversible Oxidation. *Acta Crystallographica Section D* 71(7): 1528–1539.
- Yoshimura, Shin-ichiro, Andreas Gerondopoulos, Andrea Linford, Daniel J. Rigden, and Francis A. Barr (2010) Family-Wide Characterization of the DENN Domain Rab GDP-GTP Exchange Factors. *The Journal of Cell Biology* 191(2): 367–381.
- * Yu, Li, Yang Chen, and Sharon A. Tooze (2017) Autophagy Pathway: Cellular and Molecular Mechanisms. *Autophagy* 14(2): 207–215.
- Yu, Sidney, Ayano Satoh, Marc Pypaert, *et al.* (2006) MBet3p Is Required for Homotypic COPII Vesicle Tethering in Mammalian Cells. *The Journal of Cell Biology* 174(3): 359–368.
- Zeuschner, Dagmar, Willie J. C. Geerts, Elly van Donselaar, *et al.* (2006) Immuno-Electron Tomography of ER Exit Sites Reveals the Existence of Free COPII-Coated Transport Carriers. *Nature Cell Biology* 8(4): 377–383.
- Zhang, Jie-Lei, Dian-Hong Zhang, Ya-Peng Li, *et al.* (2020) Myotubularin-Related Protein 14 Suppresses Cardiac Hypertrophy by Inhibiting Akt. *Cell Death & Disease* 11(2). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7033093/>, accessed February 16, 2021.
- Zoppino, Felipe Carlos Martín, Rodrigo Damián Militello, Ileana Slavin, Cecilia Alvarez, and María I. Colombo (2010) Autophagosome Formation Depends on the Small GTPase Rab1 and Functional ER Exit Sites. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 11(9): 1246–1261.
- Zou, Jun, Shao-Chun Chang, Jasna Marjanovic, and Philip W. Majerus (2009) MTMR9 Increases MTMR6 Enzyme Activity, Stability, and Role in Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 284(4): 2064–2071.
- Zou, Jun, Philip W. Majerus, David B. Wilson, *et al.* (2012) The Role of Myotubularin-Related Phosphatases in the Control of Autophagy and Programmed Cell Death. *Advances in Biological Regulation* 52(1): 282–289.
- Zou, Jun, Chunfen Zhang, Jasna Marjanovic, *et al.* (2012) Myotubularin-Related Protein (MTMR) 9 Determines the Enzymatic Activity, Substrate Specificity, and Role in Autophagy of MTMR8. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(24). National Academy of Sciences: 9539–9544.