

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:
Biologie
Studijní obor:
Buněčná biologie



Bc. Tomáš Hájek

**Role Myotubularinu 9 (MTMR9) a jeho vazebných partnerů MTMR6 a MTMR8 v
makropinocytóze**

**Exploring the Role of Myotubularin 9 (MTMR9) and its Binding Partners MTMR6 and
MTMR8 in Macropinocytosis**

Diplomová práce

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

Praha, 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. V rámci psaní práce jsem využil nástroje umělé inteligence (ChatGPT), a to výhradně za účelem jazykových úprav, stylistických návrhů a formátování textu.

V Praze, 5. 8. 2025



.....

Tomáš Hájek

Poděkování

Tímto bych chtěl velice poděkovat své školitelce a vedoucí této práce Mgr. Lence Doubravské Ph.D. za pomoc, ochotu, čas a vstřícnost. Rád bych poděkoval Mgr. Ondřeji Šebestovi za poskytnutí zkušeností a odborné podpory při práci s mikroskopy a MVDr. Jozefu Jandovi, PhD. a Mgr. Zuzaně Brůhové za pomoc při průtokové cytometrii. Také bych rád sdělil díky Mgr. Marii Macůrkové Ph.D., RNDr. Lence Libusové Ph.D. a všem kolegům z Laboratoře molekulární genetiky za cenné rady a příjemné pracovní prostředí. V neposlední řadě děkuji za podporu své rodině a blízkým.

Abstrakt

Makropinocytóza je na aktinu závislá a neselektivní endocytární dráha, která hraje důležitou roli v řadě fyziologických i patologických procesů. Podobně jako jiné endocytární dráhy je makropinocytóza regulována časoprostorovou distribucí fosfoinositidů, které slouží jako klíčové signální lipidy a zajišťují membránovou identitu, váčkový transport i další buněčné procesy. Jejich hladiny jsou v buňkách řízeny specifickými kinázami a fosfatázami, mezi které patří i myotubularin (MTM) a jemu příbuzné proteiny (MTMRs). MTMR fosfatázy rozpoznávají fosfatidylinositol-3-fosfát a fosfatidylinositol-3,5-bisfosfát (PI(3)P a PI(3,5)P₂) jako substrát a defosforylují je na pozici 3. Během makropinocytózy se PI(3)P hromadí v cytoplazmatické membráně a spolu s PI(3,5)P₂ také v membráně nově vznikajících makropinozomů, čímž se podílí na jejich vzniku i maturaci.

Dřívější studie ukázala, že MTMR9 a jeho dimerizační partner MTMR6 lokalizují do cytoplazmatické membrány během makropinocytózy a snížení jejich exprese v nádorových buňkách vede ke snížení příjmu makropinocytárního nákladu. V této diplomové práci jsme se zaměřili na snížení i zvýšení exprese MTMR9, MTMR8 a MTMR6 ve fyziologicky makropinocytujících buňkách RPE-1. Cílem práce bylo sledovat vliv těchto fosfatáz na úroveň příjmu fluorescenčně značeného dextranu jako modelového makropinocytárního nákladu. Snížení exprese MTMR9 a MTMR6 vedlo k mírnému, ale konzistentnímu zvýšení příjmu fluorescenčně značeného dextranu. Nadprodukce všech studovaných myotubularinů zvýšila počet váčků nesoucích sledovaný náklad. Výsledky ukazují, že míra exprese MTMRs může u RPE-1 buněk ovlivňovat příjem makropinocytárního nákladu, přesto ale tyto fosfatázy nejsou pro proces nezbytné a spíše jej jemně modulují. Vzhledem k rozdílům mezi studii, limitům použitých experimentálních přístupů a možné závislosti efektu na konkrétním buněčném typu a podmínkách kultivace zůstává přímá role MTMR9 a jeho vazebných partnerů v regulaci makropinocytózy nadále nejasná.

Klíčová slova: Myotubularin, MTMR9, MTMR6, MTMR8, fosfoinositidy, makropinocytóza, fluorescenční dextran, RPE-1 buňky

Abstract

Macropinocytosis is an actin-dependent, non-selective endocytic pathway involved in various physiological and pathological processes. Like other endocytic routes, it is regulated by the spatiotemporal distribution of phosphoinositides, key signaling molecules that define membrane identity, mediate vesicular trafficking, and coordinate numerous cellular events. Their intracellular levels are tightly controlled by specific kinases and phosphatases, including the myotubularin (MTM) family and related proteins (MTMRs), which dephosphorylate phosphatidylinositol 3-phosphate (PI(3)P) and phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate (PI(3,5)P₂) at the 3-position. During macropinocytosis, PI(3)P accumulates at the plasma membrane and, together with PI(3,5)P₂, on the membranes of nascent macropinosomes, contributing to their formation and maturation.

Previous studies have shown that MTMR9 and its dimerization partner MTMR6 localize to the plasma membrane during macropinocytosis, and that their knockdown reduces macropinocytic cargo uptake in cancer cells. In this diploma thesis, we investigated both knockdown and overexpression of MTMR9, MTMR6, and MTMR8 in RPE-1 cells, which perform macropinocytosis under physiological conditions. Our aim was to assess the impact of these phosphatases on the uptake of fluorescently labeled dextran as a model macropinocytic cargo. Silencing of MTMR9 and MTMR6 led to a modest but consistent increase in dextran uptake, while overexpression of all three phosphatases resulted in a higher number of cargo-containing vesicles. These results indicate that MTMR expression levels can influence macropinocytic uptake in RPE-1 cells, although they are not essential for the process and more likely function as fine-tuning modulators. However, due to discrepancies between studies, limitations of the experimental approaches, and possible cell-type and culture-condition dependencies, the direct role of MTMR9 and its binding partners in the regulation of macropinocytosis remains to be clearly defined.

Key words: Myotubularin, MTMR9, MTMR6, MTMR8, phosphoinositides, macropinocytosis, fluorescent dextran, RPE-1 cells

Obsah

1.	Teoretický úvod.....	1
1.1.	Fosfoinositidy.....	1
1.1.1.	Fosfatidylinositol je prekurzor fosfoinositidů.....	1
1.1.2.	Fosfoinositidy (PIPs) jako deriváty fosfatidylinositolu.....	1
1.1.2.1.	PI(4,5)P ₂ a PI(4)P	1
1.1.2.2.	PIP ₃ a PI(3,4)P ₂	2
1.1.2.3.	PI(3)P	4
1.1.2.4.	PI(3,5)P ₂ a PI(5)P	6
1.2.	Rodina myotubularinů	8
1.2.1.	Myotubulariny jako PI-specifické fosfatázy.....	8
1.2.1.1.	Obecná struktura	8
1.2.1.2.	Mutace v MTMRs a onemocnění.....	10
1.2.2.	Myotubularin 9 a podrodina MTMR6/7/8.....	11
1.2.2.1.	Myotubularin 8	11
1.2.2.2.	Myotubularin 6	13
1.2.2.3.	Myotubularin 9	15
1.3.	Makropinocytóza	17
1.3.1.	Makropinocytóza jako typ endocytózy	17
1.3.1.1.	Makropinocytóza se od ostatních endocytóz liší	17
1.3.1.2.	Fáze makropinocytózy.....	17
1.3.2.	Makropinocytóza v savčích buňkách a nádorech	18
1.3.2.1.	Makropinocytóza buněk imunitního systému.....	18
1.3.2.2.	Makropinocytóza mimo imunitní systém.....	19
1.3.2.3.	Makropinocytóza a nádorové onemocnění	19
1.3.3.	PIPs a jejich enzymy v makropinocytóze.....	20
1.3.3.1.	PIPs při formování makropinocytárního pohárku	20
1.3.3.2.	PIPs při uzavírání makropinocytárního pohárku	22
1.3.3.3.	PIPs při maturaci makropinosomu	24
2.	Cíle	27
3.	Materiál a metody	28
3.1.	Vektory.....	28
3.2.	Primery	29
3.3.	siRNA.....	30
3.4.	Protilátky.....	30

3.5.	Práce s buněčnými kulturami.....	30
3.6.	Příprava vektorů pro tvorbu knockout (KO) buněčných linií metodami genetického klonování.....	31
3.7.	Příprava knockout (KO) buněčných linií	32
3.8.	Testování knockout buněčných linií	32
3.9.	Příprava retrovirálních vektorů pro tvorbu buněčných linií stabilně exprimující značené MTMRs 33	
3.10.	Příprava buněčných linií stabilně nadprodukující MTMRs	34
3.11.	Knockdown (KD) MTMR9, MTMR8 a MTMR6 u RPE-1.....	34
3.12.	Měření makropinocytózy průtokovou cytometrií (FACS)	35
3.13.	Mikroskopie živých buněk	36
4.	Výsledky	37
4.1.	Snížení produkce MTMR9, MTMR6 a MTMR8 v RPE-1 linii	37
4.1.1.	Generování knockout RPE-1 linií pro MTMRs.....	37
4.1.2.	Generování knockdown RPE-1 linií pro MTMRs	38
4.2.	Vytvoření RPE1 linií nadprodukující MTMRs.....	39
4.3.	Příjem dextranu u HeLa KO buněk	40
4.4.	RPE1 mají vysoce dynamickou cytoplazmatickou membránu	41
4.4.1.	RPE-1 jsou makropinocytárně aktivní.....	41
4.4.2.	Lokalizace MTMRs do membránového zvlnění	44
4.5.	Změny v makropinocytóze u RPE-1 linií se sníženou expresí MTMRs.....	45
4.6.	Změny v makropinocytóze u RPE-1 linií s nadprodukcí MTMRs	47
4.6.1.	TRITC-dextran nelze používat při průtokové cytometrii.....	47
4.6.2.	Mikroskopická analýza RPE-1 buněk s přijatým TRITC-dextranem.....	49
4.7.	Inhibitor EIPA je přijímán endocytárně	51
5.	Diskuse	53
6.	Závěr	61
7.	Seznam použité literatury	63
8.	Přílohy	74
8.1.	Seznam uvedených videí s odkazem na online uložení (Google Disk).....	74
8.2.	Seznam použité literatury (reference) v RIS formátu	74

Seznam použitých zkratk

Akt/PKB	Proteinkináza B	Protein kinase B
AP-2	Adaptorový proteinový komplex 2	Adaptor-related protein complex 2
APC	Antigen prezentující buňky	Antigen presenting cells
ARP2/3	Aktinu příbuzný protein 2/3	Actin related protein 2/3
ATG14	S autofagií spojený gen 14	Autophagy-related gene 14
BAR	Bin/Amfifysin/Rvs	Bin/Amphiphysin/Rvs
CaSR	Extracelulární vápník vazebný receptor	Calcium sensing receptor
CC	„Coiled-coil“	Coiled-coil
CDC42	Homolog proteinu 42 kontroly buněčného dělení	Cell division control protein 42 homolog
CDP	Cytidin difosfát	Cytidine diphosphate
COS buňky	Fibroblastům podobná buněčná linie odvozená z tkáně africké zelené opice	Fibroblast-like cell lines derived from monkey kidney tissue
CPM	Cytoplazmatická membrána	Plasma membrane
CTD	C-terminální doména	C-terminal domain
DAG	Diacylglycerol	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid	Dimethyl sulfoxide
DMEM	Dulbeccovem modifikované Eagleovo médium	Dulbecco's modified Eagle medium
DNA	Deoxyribonukleová kyselina	Deoxyribonucleic acid
DSB	Dvouřetězcové zlomy	Double-strand break
EBSS	Earleův vyvážený solný roztok	Earle's balanced salt solution
ECVs	Endozomální transportní vezikuly	Endosomal carrier vesicles
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermální růstový faktor	Epidermal growth factor
EGFP	Zesílený zelený fluorescenční protein	Enhanced green fluorescent protein
EIPA	5-(N-ethyl-N-isopropyl) amilorid	5-(N-ethyl-N-isopropyl) amilorid
ER	Endoplazmatické retikulum	Endoplasmatic reticulum
ERK	Extracelulárními signály regulovaná kináza	Extracellular signal-regulated kinase

ESCRT	Endozomální třídící komplex nezbytný pro transport	Endosomal sorting complex required for transport
FACS	Průtoková cytometrie	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetálním bovinním sérem	Fetal bovine serum
FITC	Fluorescein isothiokyanát	Fluorescein isothiocyanate
FRAP	Obnovení fluorescence po fotovybělení	Fluorescence recovery after photobleaching
FYVE	FAB1, YOTB, Vac1, EEA1	FAB1, YOTB, Vac1, EEA1
GAP	GTPázu aktivující protein	GTPase-activating protein
GDP	Guanosinbisfosfát	Guanosinebisphosphate
GEF	Guanin nukleotid vyměňující faktor	Guanine nucleotide exchange factor
GPCR	Receptory spřažené s trimerními G proteiny	G protein-coupled receptor
GTP	Guanosintrisfosfát	Guanosinetrisphosphate
GTPáza	Guanosintrisfosfát fosfohydroláza	Guanosinetrisphosphate phosphohydrolase
HeLa buňky	Z Henrietty Lackové	From Henrietta Lacks
HGF	Hepatocytární růstový faktor	Hepatocyte growth factor
IDAA	Detekce indelů pomocí analýzy Amplicon	Indel detection by Amplicon analysis
INPP4B	Inositol-3,4-bisfosfát-4-fosfatáza typu II	Type II inositol 3,4,-bisphosphate 4-phosphatase
INPP5	Inositol polyfosfát 5-fosfatáza	Inositol polyphosphate 5-phosphatase
IP ₃	Inositoltrisfosfát	Inositol trisphosphate
ILVs	Intraluminární váčky	Intraluminal vesicles
LAMP1	S lysozomem asociovaný membránový glykoprotein 1	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex	Major histocompatibility complex
MTM	Myotubularin	Myotubularin
MTMR	Myotubularinu příbuzný protein	Myotubularin-related protein
MVB	Multivezikulární tělísko	Multivesicular body
mTORC1	Mechanistický cíl rapamycinu v komplexu 1	Mechanistic target of rapamycin complex 1
NF1	Neurofibromin1	Neurofibromin1
NHE	sodno-protonový antiportér	Sodium–proton exchanger

NHEJ	Nehomologní spojování volných konců	Non-homologous end joining
NRK buňky	Potkaní buňky z normální ledviny	Normal rat kidney cells
OCRL	Protein spojený s Loweho okulocerebrorenálního syndromem	Lowe oculocerebrorenal syndrome protein
PA	Kyselina fosfatidová	Phosphatidic acids
PBS	Fosfátový pufr	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerázová řetězová reakce	Polymerase chain reaction
PH	Pleckstrinu homologická	Pleckstrin homology
PHAFIN2	PH a FYVE doménu obsahující protein 2 Pleckstrinu homologická-	PH and FYVE domain-containing protein 2 Pleckstrin homology-Glucosyltransferases,
PH-GRAM	glucosyltransferáza, aktivátory Rab-like GTPáz a myotubulariny	Rab-like GTPase activators and Myotubularins
PI	Fosfatidylinositol	Phosphatidylinositol
PI(3)P	Fosfatidylinositol-3-fosfát	Phosphatidylinositol 3-phosphate
PI(3,4)P ₂	Fosfatidylinositol-3,4-bisfosfát	Phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate
PI(3,5)P ₂	Fosfatidylinositol-3,5-bisfosfát	Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate
PI(4)P	Fosfatidylinositol-4-fosfát	Phosphatidylinositol 4-phosphate
PI(4,5)P ₂	Fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PI(5)P	Fosfatidylinositol-5-fosfát	Phosphatidylinositol 5-phosphate
PI3K	Fosfatidylinositol-3-kináza	Phosphatidylinositol 3-kinase
PI4KII α	Fosfatidylinositol 4-kináza typu II α	Type II α phosphatidylinositol 4-kinase
PI4KIII α	Fosfatidylinositol 4-kináza typu III α	Phosphatidylinositol 4-kinase III α
PIKfyve	Fosfatidylinositol-3-fosfát 5-kináza	Phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase
PI(3,4,5)P ₃	Fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
PIPKI	Fosfatidylinositol-4-fosfát 5-kinázy typu I	type I
PIPs	Fosfoinositidy	Phosphoinositides
PLC	Fosfolipáza C	Phospholipase C
PRL1/3	Fosfatáza regenerující játra 1/3	Phosphatase regenerating liver 1/3
PTEN	Fosfatáza a homolog tensinu	Phosphatase and tensin homolog
PTP	Protein tyrozin fosfatáza	Protein tyrosine phosphatase
RAB	Příbuzný Ras v mozku	Ras-related in brain

RAC1	Ras-příbuzný C3 botulotoxinový substrát 1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RAS	Virus potkaního sarkomu	Rat sarcoma virus
RGBARG	Protein obsahující RCC1, RhoGEF, BAR a RasGAP domény	RCC1, RhoGEF, BAR a RasGAP-containing protein
RHO	Homologický Ras	Ras homology
M-CSF	Makrofág-kolonie stimulující faktor	Macrophage colony-stimulating factor
RTK	Receptor tyrozin kináza	Receptor tyrosine kinase
RPE	Pigmentový epitel sítnice	Retinal pigment epithelium
SAP	Alkalická fosfatáza z krevet	Shrimp alkaline phosphatase
SCAR	Supresor cAR	Suppressor of cAR
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného	Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis
SHIP	Inositol polyfosfát 5-fosfatáza obsahující Src homologickou 2 (SH2) doménu	Src homology 2 (SH2) domain containing inositol polyphosphate 5-phosphatase
siRNA	Malá interferující ribonukleová kyselina	Small interfering ribonucleic acid
SNP	Jednonukleotidový polymorfismus	Single nukleotid polymorphism
SNX	Třídící nexin	Sorting nexin
TAE pufr	Tris-acetát-EDTA pufr	Tris-acetate-EDTA buffer
TBE pufr	Tris-borát-EDTA pufr	Tris borate-EDTA buffer
TRITC	Tetramethylrhodamin isothiokyanát	Tetramethylrhodamine isothiocyanate
VPS34	Fosfatidylinositol 3-kináza třídy III	Class III phosphatidylinositol 3-kinase
WASP	Protein spojený se syndromem Wiskott-Aldrich	Wiskott-Aldrich syndrome protein
WAVE	Verprolin-homologní protein z rodiny WASP	WASP-family verprolin homologous protein

1. Teoretický úvod

1.1. Fosfoinositidy

1.1.1. Fosfatidylinositol je prekurzor fosfoinositidů

Fosfatidylinositol (PI) je amfipatická molekula patřící mezi glycerolfosfolipidy, která obsahuje v hydrofilní části cyklický alkohol inositol. Inositol je hexahydroxycyklohexan, jenž se v přírodě převážně vyskytuje v podobě stereoizomeru myo-inositolu (Obr. 1). Myo-inositol-1-fosfát, který se defosforylací mění na volný myo-inositol, vzniká z glukóza-6-fosfátu působením enzymu myo-inositol-3-fosfát syntázy [1]. Vlastní fosfatidylinositol je syntetizován na membráně endoplazmatického retikula (ER) z volného myo-inositolu a CDP-DAG (cytidin difosfát-diacylglycerolu). PI je následně membránovým transportem dopraven do cílových membrán, kde se společně se svými deriváty hromadí v cytosolicky orientovaných vrstvách.

1.1.2. Fosfoinositidy (PIPs) jako deriváty fosfatidylinositolu

PI je možné *in situ* fosforylovat a vytvářet tím monofosforylované fosfoinositidy, které mohou být dále fosforylovány. Fosforylace probíhají na pozicích 3, 4 a 5 myo-inositolu, díky čemuž vzniká 7 typů fosfoinositidů (Obr. 1). Tyto se liší mírou fosforylace a pozicí těchto fosfátových skupin. Každý je syntetizován i odbouráván specifickými PI-dependentními kinázami a fosfatázami. Ty lokalizují na příslušné membrány a zajišťují tím hromadění konkrétních PIPs, které zde mají klíčové signální a regulační role (Obr. 1). Jejich funkce spočívají zejména v interakcích s vazebnými partnery, které je mohou specificky rozpoznávat pomocí PI-vazebných domén. Vazba efektoru na fosfoinositid může vést k jeho konformační změně a aktivaci, vytvoření interakční platformy či oligomerizaci. Díky tomu fosfoinositidy fungují jako časoprostorové signály, které určují identitu membránových kompartmentů a regulují dynamiku procesů s nimi spojených [2].

1.1.2.1. PI(4,5)P₂ a PI(4)P

PI(4)P (fosfatidylinositol-4-fosfát) vytváří dvě oddělené frakce („pools“), z nichž jedna je přítomna v membráně Golgiho aparátu a druhá v cytoplazmatické membráně (CPM). CPM představuje hlavní místo obratu PI(4)P v klidových buňkách, kde je tento „pool“ nezbytný pro udržení membránové identity. Hlavním enzymem pro tvorbu PI(4)P v CPM je PI4KIII α (fosfatidylinositol 4-kináza typu III α), která se do membrány kotví pomocí interakce s dalšími proteiny v rámci komplexu [3, 4]. Přestože zde PI(4)P může sloužit jako prekurzor pro tvorbu PI(4,5)P₂ (fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu), inhibice či delece PI4KIII α vede k snížení množství PI(4)P v CPM, nikoli však PI(4,5)P₂. Z toho vyplývá, že oba fosfoinositidy vytvářejí frakce, které jsou oddělené a metabolicky nezávislé [3-5]. PI(4)P je rovněž

generován PI4KII α (fosfatidylinositol 4-kináza typu II α) v membráně recyklačních endozomů, což doprovází jejich fúzení s CPM a exocytózu [6].

PI(4,5)P₂ je fosfoinositid lokalizovaný v cytoplazmatické membráně, kde spolu s PI(4)P přispívá k jejímu polyaniontovému charakteru, navíc však slouží jako vazebné místo pro řadu efektorových proteinů. Klíčovou roli hraje v klathrinem zprostředkované endocytóze, kde umožňuje vazbu a zrušení autoinhibiční konformace AP-2 komplexu (adaptorový proteinový komplex 2) [7,8]. Pro odštěpení klathrinového váčku je nezbytná GTPáza (guanosintrisfosfát fosfohydroláza) dynamin, která svou PH (pleckstrinu homologickou) doménou také váže PI(4,5)P₂ [9].

PI(4,5)P₂ je rovněž klíčový faktor pro regulaci polymerace aktinových vláken. Vazba PI(4,5)P₂ na kofilin, protein fragmentující aktinová vlákna, vede k jeho inhibici [10]. Dále pozitivně ovlivňuje polymeraci a větvení aktinových vláken vazbou WASP (Wiskot–Aldrich syndrom proteinů), které aktivují ARP2/3 (aktinu příbuzný protein 2 a 3) nukleační komplexy [11, 12]. PI(4,5)P₂ je tak klíčový nejen pro klathrinem zprostředkovanou endocytózu, ale i fagocytózu, makropinocytózu a buněčnou migraci. Například během fagocytózy dochází k lokální akumulaci PI(4,5)P₂ v důsledku přechodné aktivace PIPKII α (fosfatidylinositol-4-fosfát 5-kinázy typu I α) v místě fagozomálního pohárku, což je nezbytné pro polymeraci a remodelaci aktinového cytoskeletu v této oblasti [13]. Deplece PI(4,5)P₂ z CPM buněk vyúsťuje k rapidní ztrátě pučících klathrinových váčků i aktinové dynamiky v periférii buněk [14].

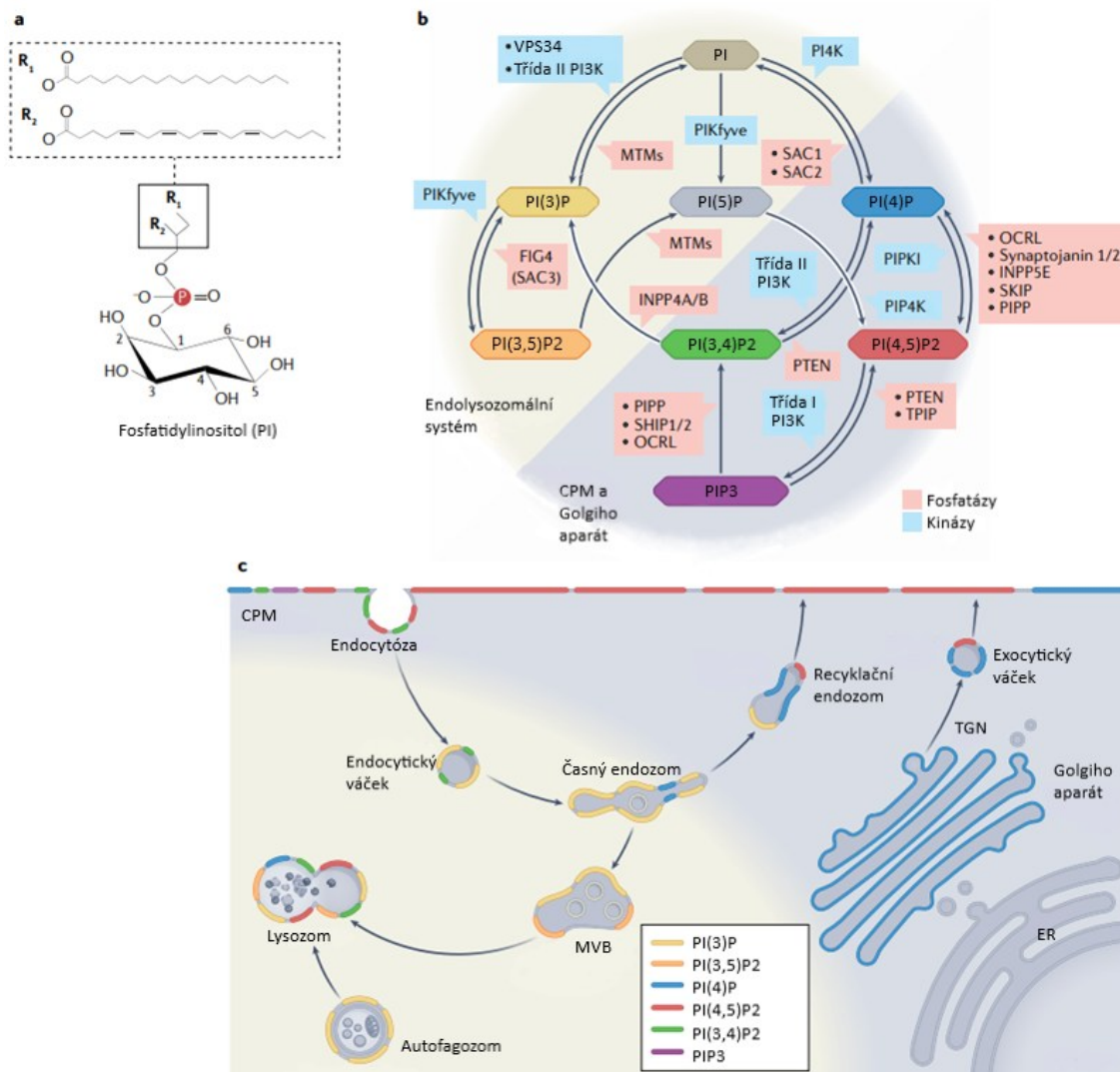
Některé enzymy využívají PI(4,5)P₂ jako substrát. Obecně známým enzymem, který hydrolyzuje tento PIP₂ na DAG a IP₃ (inositol-(1,4,5)-trisfosfát) je fosfolipáza C (PLC). Některé izoformy, jako například PLC δ 1, mají navíc PH doménu, kterou jsou schopné vázat PI(4,5)P₂ i IP₃ mimo aktivní místo [15]. Deplece PI(4,5)P₂ může probíhat pomocí PI5-fosfatáz, které generují PI(4)P. Příkladem může být synaptojanin 1 (Synj1), který udržuje balanc mezi tvorbou a deplecí PI(4,5)P₂ v endocytických procesech a jeho aktivita podporuje odštěpování výsledných endocytických váčků od CPM [16]. Podobně jako u Synj1 vede ztráta PI5-fosfatázy OCRL (protein spojený s Loweého okulocerebrorenálního syndromem), která také rozpoznává PI(4,5)P₂ jako substrát, k defektům v klathrin-dependentní endocytóze [17]. Naopak fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K) třídy I využívají PI(4,5)P₂ jako substrát pro tvorbu PI(3,4,5)P₃ (fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát; dále jen PIP₃).

1.1.2.2. PIP₃ a PI(3,4)P₂

PIP₃ je hlavním produktem PI3K třídy I, které jsou signálními transdukčními stimulatelné kinázy. PI3K IA jsou aktivované RTK (receptor tyrozin kinázovou) signalizací, zatímco PI3K třídy IB jsou aktivovány přes GPCR (receptory spřažené s trimerními G proteiny). Klíčovým efektozem PIP₃ je proteinkináza B (PKB/AKT), která váže tento fosfoinositid s vysokou afinitou díky své N-koncové PH doméně. V nepřítomnosti PIP₃ se PKB nachází jako volná v cytosolu v autoinhibiční konformaci, ve které

dochází k vazbě PH domény na kinázovou doménu enzymu. Díky nahromadění PIP_3 v CPM může docházet k rozrušení této autoinhibiční konformace, což je společně s fosforylacemi kinázy nezbytné pro její aktivaci [18, 19]. PKB má rozsáhlé pole působnosti a ovlivňuje v buňkách metabolismus cukrů, podporuje proteosyntézu a proliferaci a inhibuje apoptózu. K PI3K I antagonisticky působí PTEN (fosfatáza a homolog tensinu). Jelikož PTEN přeměňuje PIP_3 zpět na $PI(4,5)P_2$ a negativně tím ovlivňuje signalizaci PKB, funguje v buňkách jako důležitý tumor-supresor, který je často mutován v různých nádorech. Ztráta tohoto genu může podporovat progresi nádoru a jeho maligní vlastnosti [20, 21].

Dalšími enzymy, které rozpoznávají PIP_3 jako substrát jsou fosfatázy SHIP1 a SHIP2 (inositol polyfosfát 5-fosfatáza obsahující Src homologickou 2 (SH2) doménu 1/2), které defosforylují 5-fosfát a tím generují $PI(3,4)P_2$. Kromě toho může $PI(3,4)P_2$ vznikat přímo aktivitou $PI(3)K C2\alpha$ z $PI(4)P$, čímž vznikají dvě původem odlišné frakce, obě v cytoplazmatické membráně. Fosfatázou, která rozpoznává $PI(3,4)P_2$ jako substrát je INPP4B (inositol-3,4-bisfosfát-4-fosfatáza typu II), jejíž zvýšená exprese vede k narušení tvorby klathrinových váčků, podobně jako deplece $PI(4,5)P_2$ [22]. Klíčovým efektem $PI(3,4)P_2$ je SNX9 (třídící nexin 9), který váže fosfoinositid specificky BAR (Bin, Amphiphysin, Rvs) doménou, čímž se podílí na zakřivování membrány během endocytózy a vytváření klathrinové jamky před vlastním odškrcením váčku [22]. SNX9 mimo jiné přímo interaguje s OCRL fosfatázou a podporuje tím její rekrutaci do membrány vznikajícího váčku, kde dochází k depleci $PI(4,5)P_2$ [17]. Kromě INPP4 fosfatáz je $PI(3,4)P_2$ *in vivo* rozpoznáván PTEN fosfatázou, která jej přeměňuje na $PI(4)P$ [23]. Na rozdíl od PTEN, aktivita INPP4 fosfatáz vede k akumulaci $PI(3)P$.



Obrázek 1: (A) Fosfatidylinositol (PI) je glycerolfosfolipid obsahující myo-inositol. (B) Fosfoinositidy (PIPs) představují skupinu sedmi derivátů PI, jejichž vzájemné přeměny jsou katalyzovány specifickými lipidovými kinázami (světle modrá) a fosfatázami (lososová/růžová). (C) Schématické znázornění kanonické subcelulární lokalizace jednotlivých PIPs v membránách eukaryotické buňky. Je třeba zmínit, že PIPs netvoří izolované domény a oblasti s jejich akumulací se mohou překrývat. Některé PIPs mohou lokalizovat i mimo oblasti znázorněné v tomto schématu. Převzato [24] a upraveno.

1.1.2.3. PI(3)P

PI(3)P v endolysozomálním systému

PI(3)P je hlavním fosfoinositidem lokalizovaným v časných endozomech. Výrazně se hromadí zejména ve vakuolární a multivezikulární oblasti časného endozomu, kde se formují intraluminární váčky (ILVs) prostřednictvím aktivity ESCRT (endosomálních třídících komplexů nezbytných pro transport) komplexů. PI(3)P je rovněž přítomen v membráně endozomálních transportních vezikulů (ECVs), které představují přechodový stav mezi časným endozomem a multivezikulárním tělískem (MVB). Nicméně 90 % signálu v ECVs značícího PI(3)P pochází z intralumenárních váčků, nikoli z vlastní membrány

kompartmentu. Na druhou stranu, u plně vyvinutých MVB je celkové množství výrazně nižší, a to jak na membráně kompartmentu, tak na ILVs. Avšak delecí VPS34, kinázy nezbytné pro tvorbu PI(3)P, dochází k poškození tvorby intralumenárních váčků i lysozomální maturaci [25]. Funkce PI(3)P se neomezuje pouze na časný endozom, ale má důležitou roli napříč celým endolysozomálním systémem.

PI3K III (VPS34)

Zásadním enzymem mající roli v tvorbě PI(3)P v buňkách je PI3K III (fosfatidylinositol 3-kináza třídy III), VPS34. Delece genu kódujícího VPS34 vede k poškození funkce endolysozomální degradační dráhy, tvorby ILVs a abnormální morfologii endozomů. Naproti tomu časný endozomy si po ztrátě VPS34 zachovávají základní recyklační funkce, což ukazuje na existenci alternativních zdrojů PI(3)P [26]. VPS34 je tedy klíčovým, nikoli však jediným enzymem odpovědným za produkci PI(3)P v endozomálních kompartmentech.

Role PI(3)P ve fagocytóze

Dalším místem akumulace PI(3)P je fagocytární váček. Při fagocytóze dochází k obalení extracelulární částice buněčnými výběžky a jejímu následnému pohlcení. Aktivita VPS34 a akumulace PI(3)P v membráně fagozomu jsou klíčové pro jeho pohyb po mikrotubulech, fúzi s endozomy nebo lysozomy a konečnou degradaci obsahu. Vypnutím funkce genu VPS34 dochází k rapidní akumulaci nezpracovaných fagozomů uvnitř buněk [27]. Samotné vytvoření fagozomu však probíhá i bez aktivity VPS34. Naopak během tvorby fagocytárního pohárku obklopujícího pohlcovanou částici je nezbytná aktivita PI3K třídy I, které produkují PIP₃. Z těchto výsledků vyplývá, že maturace, nikoli vznik fagozomu závisí na produkci PI(3)P zprostředkované PI3-kinázou VPS34 [27, 28].

PIP₃ vytvořený PI3K I je defosforylován na PI(3,4)P₂, který je dále přeměňován na PI(3)P fosfatázou INPP4, jež se rekrutuje do membrány fagocytárního pohárku. Tato frakce PI(3)P vzniká v časných fázích vývoje fagozomu před samotnou aktivitou VPS34. Nicméně snížení exprese nebo poškození funkce genu INPP4 fosfatázy v makrofázích vede ke zvýšení míry fagocytózy [29]. Navíc bylo zjištěno, že aktivita PI3K třídy I není důležitá pro vznik PI(3)P, který je nutný pro následnou maturaci fagozomu. Při inhibici této třídy kináz stále dochází ke vzniku frakce PI(3)P nezbytné pro degradaci fagocytózou pohlceného materiálu [28]. Je tak možné, že frakce PI(3)P vzniklá PI3K I má doplňkovou nebo alternativní funkci, která zatím není plně objasněna. Aktivita PI3-kináz třídy I i III je rovněž nezbytná pro makropinocytózu.

Role PI(3)P v autofagii

V neposlední řadě má PI(3)P roli během makroautofagie (dále jen autofagie). Během tohoto buněčného procesu dochází k obalení cytosolického materiálu dvojitou membránou a vzniku autofagozomu, který fúzuje s lysozomy. Při hladovění buněk vznikají autofagozomy na specifických doménách endoplazmatického retikula zvaných omegazomy, ve kterých se akumuluje PI(3)P. To je

atypické, jelikož za normálních okolností PI(3)P nekoliduje s markery ER [27]. Inhibicí nebo snížením exprese VPS34 nedochází k lokalizaci PI(3)P v těchto doménách ER a následně tvorbě omegazomů [30]. Nahromaděný PI(3)P poté umožňuje lokalizaci proteinů důležitých pro autofagii do nascentně vznikajícího autofagozomu [30]. V některých studiích byly v nepřítomnosti VPS34 pozorovány struktury připomínající autofagozomy. Tyto struktury obsahovaly dvojitou membránu a autofagické markery, nicméně nebyly funkční a nedocházelo u nich k dokončení autofagie [27]. Tyto poznatky naznačují, že regulace autofagie a role PI(3)P v jejím zahájení jsou komplexnější, než se původně předpokládalo.

Pro PI(3)P frakci vznikající během autofagie má klíčovou roli protein ATG14 (s autofagií spojený gen 14). ATG14 má schopnost lokalizovat do membrány ER a následně rekrutovat VPS34 do společného komplexu, čímž podporuje aktivitu této kinázy. Snížení exprese ATG14, podobně jako VPS34, nebo narušení jejich vzájemné interakce vede k poruše formování autofagozomu [31, 32]. V endolyzomálním systému se VPS34 stává součástí odlišného komplexu, který neobsahuje ATG14 [31]. To umožňuje nezávislou regulaci aktivity VPS34 a tím i tvorbu PI(3)P v autofagii a endocytóze.

Během autofagie hrají důležitou roli některé PI(3)P-fosfatázy, zejména členové rodiny MTMR (myotubularinu příbuzné proteiny). Jejich funkce je silně závislá na časoprostorovém kontextu procesu, jelikož byly popsány jako negativní i pozitivní regulátory autofagie. Například MTMR14 (Jumpy), působí jako negativní regulátor iniciace autofagie. Lokalizuje do časných autofagozomů a snížení jeho exprese vede ke zvýšení počtu funkčních autofagozomů i autolyzomů [33]. Naproti tomu v pozdějších fázích maturace autofagozomu dochází ke snížení množství PI(3)P. Kompletní autofagozomy neobsahují ATG14 a nedochází zde k další syntéze PI(3)P pomocí VPS34 [31]. Navíc do membrány autofagozomu lokalizují některé myotubulariny, jako MTMR8, které zde aktivně snižují hladinu PI(3)P, čímž regulují autofagický tok.

1.1.2.4. PI(3,5)P₂ a PI(5)P

PI(3,5)P₂ generuje PI5-kináza PIKfyve

PI(3)P je rovněž důležitý jako prekurzor PI(3,5)P₂ v endolyzomálním systému. Klíčovým a jediným dosud popsaným enzymem zajišťujícím tvorbu PI(3,5)P₂ je PIKfyve. PIKfyve je PI(3)P-specifická 5-kináza, jejíž lokalizace a aktivita jsou zajištěny interakcí s multimerním komplexem a dále regulována fosforylací [34]. Snížení exprese nebo inhibice PIKfyve vede k poklesu hladiny buněčného PI(3,5)P₂ na téměř nulové hodnoty [35]. Jelikož dlouho neexistovala sonda pro sledování subcelulární lokalizace PI(3,5)P₂, výzkum dříve cílil na lokalizaci PIKfyve. Proto je intracelulární distribuce samotného PI(3,5)P₂ doposud jen málo probádána.

PIKfyve lokalizuje na membrány endolyzozomálního kompartmentu

Je důležité zmínit, že se většina PIKfyve vyskytuje jako volný enzym v cytosolu [36]. Obsahuje však charakteristickou FYVE doménu (Fab1p, YOTB, Vac1p a EEA1), která váže PI(3)P s afinitou závislou na buněčném kontextu. Tato interakce a předchozí akumulace PI(3)P jsou klíčové pro lokalizaci PIKfyve na cílové membrány [37]. Kináza se proto alespoň částečně nachází ve stejných kompartmentech jako PI(3)P. Například z velké části lokalizuje do časných endozomů, avšak do jiných mikrodomén než jsou lokalizovány efekторы PI(3)P a pouze částečně zde kolokalizuje s PI(3)P [38]. PIKfyve dále lokalizuje do pozdních endozomů. Exprese enzymaticky neaktivní varianty této kinázy vede k tvorbě velkých vakuol, které představují aberantně zvětšené pozdní endozomy s narušenou morfologií. Dochází přitom k poruše maturace těchto kompartmentů a jejich omezené fúzi s funkčními lysozomy [39, 40]. PIKfyve a její produkt PI(3,5)P₂ jsou tedy klíčové pro udržení endolyzozomální homeostázy a správný tok endocytovaného materiálu do degradačních organel.

PI(3,5)P₂ mimo endozomy

Jsou popsány lokalizace PIKfyve do membrán i mimo hlavní endolyzozomální systém. Například, PI(3,5)P₂ hraje dvojí roli během autofagie. Inhibice PIKfyve vede k akumulaci autofagozomů v důsledku ztráty schopnosti fúzovat s lysozomy [41, 42]. Naopak, aby k fúzi docházelo správně, je nezbytná deplece lyzozomální frakce PI(3,5)P₂ pomocí INPP5E (inositol polyfosfát 5-fosfatázy E), která lokalizuje na membránu lysozomu [43]. Hladina PI(3,5)P₂ je tedy velmi přísně regulována. Jak jeho syntéza, tak degradace jsou zásadní pro správné vytvoření autolyzozomů.

Malá frakce PIKfyve (přibližně 3 % z celkového množství) lokalizuje do cytoplazmatické membrány. Analýza aktivity PIKfyve odhalila, že cytoplazmaticky lokalizovaná frakce vykazuje přibližně pětinasobně vyšší aktivitu ve srovnání s ostatními [36]. Pomocí nově vyvinuté sondy pro detekci PI(3,5)P₂ je popsána akumulace tohoto fosfoinositidu v membráně vzniklého fagozomu a makropinozomu, čemuž předchází nábor PIKfyve do těchto váček [44].

PI(5)P

PI(5)P je jedním z nejméně prostudovaných fosfoinositidů. Jeho nízká koncentrace v buňce a omezené detekční nástroje ztěžují pochopení jeho specifických funkcí. Aktivita PIKfyve a tvorba PI(3,5)P₂ jako prekursoru je klíčová pro hromadění PI(5)P v buňkách. Snížení exprese PIKfyve vede nepřímou ke ztrátě většiny PI(5)P [35]. Tento fosfoinositid vzniká defosforylací PI(3,5)P₂ působením MTMRs. PI(5)P je funkčně spojován s PI(3)P-dependentní i alternativní, VPS34-nezávislou dráhou autofagie [42]. Sonda určená k detekci PI(5)P se lokalizuje i na cytoplazmatickou membránu, autoři však nevyklučují možnost nespecifické vazby tohoto nástroje na jiné fosfoinositidy [42].

1.2. Rodina myotubularinů

1.2.1. Myotubulariny jako PI-specifické fosfatázy

Rodina myotubularinů (MTM/MTMR) zahrnuje celkem 14 savčích proteinů, z nichž MTM1 je historicky první objevený člen, zatímco ostatní jsou označovány jako myotubularinu příbuzné proteiny (MTMR1-14). Rodina obsahuje 8 enzymaticky aktivních PI3-fosfatáz, jež jako společný substrát rozpoznávají a defosforylují PI(3)P a PI(3,5)P₂ na PI a PI(5)P (Obr. 2) [45, 46]. Zbýlých 6 členů rodiny tvoří pseudofosfatázy, které nemají katalyticky důležitý cystein v konzervovaném HCX₅R motivu.

MTMR hrají roli v endomembránové dynamice, autofagii, proliferaci a diferenciaci. Mutace v genech této rodiny jsou spojeny s řadou závažných onemocnění, včetně X-vázané centronukleární myopatie a Charcot-Marie-Toothovy neuropatie typu 4B [47]. Na základě homologie mohou být MTMRs dále rozděleny do podrodin.

1.2.1.1. Obecná struktura

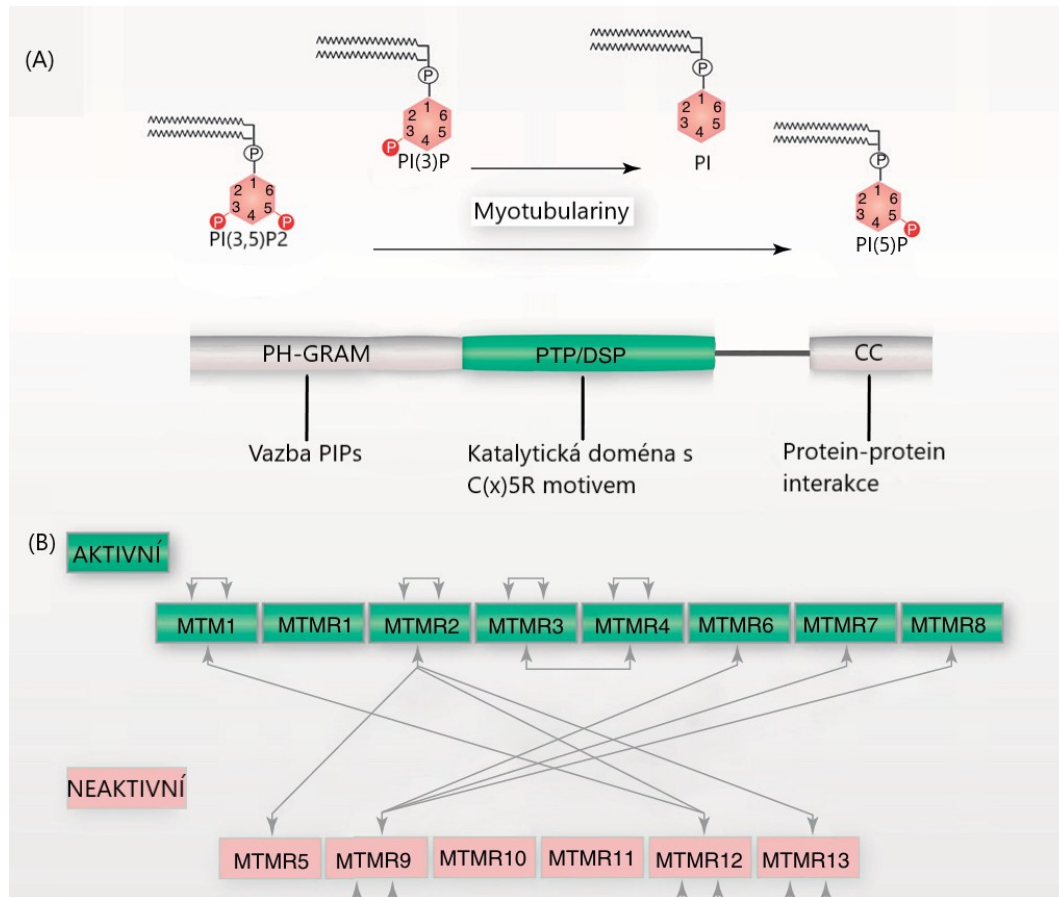
Enzymaticky aktivní i neaktivní MTMRs sdílejí funkční domény a jejich struktury. Obsahují N-koncovou PH-GRAM (Pleckstrinu homologická-glucosyltransferáza, aktivátory Rab-like GTPáz a myotubulariny) doménu, katalytickou (protein tyrozin fosfatázovou; PTP) doménu s konzervovaným motivem a C-koncovou CC („coiled-coil“) doménu (Obr. 2) [47]. CC doména se nachází v rámci C terminální oblasti (CTD), která je, s výjimkou samotné CC domény, převážně nestrukturovaná. Sekvencí i celkovou délkou se jednotliví členové MTMR rodiny liší. Variabilita v sekvenci a délce platí i pro CTD a CC doménu, což ovlivňuje jejich interakce i funkční specifitu [48].

Katalytická doména obsahující HCX₅R motiv je enzymaticky příbuzná proteinovým tyrozinovým/duálně specifickým fosfatázám [47]. Některé MTMRs obsahují přídatné domény, např. MTMR3 obsahuje C-koncovou FYVE doménu [49]. MTMR14, nebo-li Jumpy obsahuje konzervovanou PTP doménu a rozpoznává stejné fosfoinositidy, nicméně neobsahuje další pro myotubulariny charakteristické domény a standardně se jako člen rodiny neuvádí [47].

MTMRs nefungují jako monomery

Díky CC doméně může docházet k homo a heterodimerizacím MTMRs (Obr. 2). Heterodimerizace typicky probíhá mezi enzymaticky neaktivními a aktivními členy myotubularinové rodiny. Tato interakce vede k zvýšení stability, katalytické aktivity a specifické funkce enzymaticky aktivních partnerů [47, 50]. Nicméně existují i heterodimerizace mezi dvěma enzymaticky aktivními členy, například interakce MTMR3-MTMR4 [51]. Oligomerizace do vyšších, než dimerních struktur není pro většinu MTMR proteinů typická. U MTM1 však byla popsána tvorba heptamerních kruhových komplexů, ke které dochází po alosterické aktivaci monomerů vazbou PI(5)P. Tento mechanismus vytváří pozitivní

zpětnovazebnou smyčku, kdy vznikající PI(5)P podporuje oligomerizaci a tím i další aktivaci MTM1 [45, 49]. Podobný princip regulace vykazuje MTMR3, který tvoří dimery. Vazba fosfoinositidů mimo samotné aktivní místo katalytické domény představuje důležitý regulační mechanismus v rámci celé rodiny MTMR proteinů. Klíčovým nástrojem této interakce jsou přídatné fosfoinositid-vazebné domény. U MTMRs zaujímají takovou roli PH-GRAM domény.



Obrázek 2: (A) Myotubulariny jsou lipidové fosfatázy s charakteristickou substrátovou specifitou. Základem je fosfatázová doména (PTP/DSP) obsahující katalytický Cys v konzervovaném motivu HC(X)₅R. Kromě PTP obsahují N-koncovou PH-GRAM doménu, pomocí které vázají různé PIPs, což podporuje jejich lokalizaci do cílových membrán. Na C-konci mají nestrukturovanou oblast, která obsahuje strukturovanou „coiled-coil“ (CC) doménu pro proteinové interakce. (B) Rodina MTMR obsahuje 8 enzymaticky aktivních a 6 neaktivních členů. Neaktivní obsahují mutovaný Cys v konzervovaném motivu HC(X)₅R katalytické domény. MTMRs dominantně dimerizují, typická je heterodimerizace neaktivní fosfatázy s aktivní. U vybraných může ovšem docházet k homodimerizacím, nebo k tvorbě oligomerů. Převzato [47] a upraveno.

PH-GRAM doména váže PIPs

Pro funkci MTMRs je velice důležitá PH-GRAM doména. Tato doména umožňuje adiční vazbu fosfoinositidů mimo aktivní místo enzymu, což je klíčové pro správné cílení enzymu v buňce a jeho

biologickou funkci. Například PH-GRAM doména je zcela nezbytná pro správnou vazbu MTMR2 a MTMR3 do membrán a jejich následnou enzymatickou aktivitu. Mutace v těchto doménách vedou k rapidnímu snížení lokalizace MTMRs do cílových kompartmentů [49, 52].

PH-GRAM domény jsou vysoce strukturně konzervovány. Typicky tvoří β -sandwich strukturu složenou ze sedmi β -listů a jednoho α -helixu [53, 54]. Nicméně sekvence, pozice a orientace PH-GRAM domén v rámci celého proteinu se u jednotlivých MTMRs může lišit. Sekvenční homologie PH-GRAM domén MTMRs jsou velmi nízké, s méně než 20% identitou. Vlastní aminokyselinová sekvence je jedním z možných determinujících prvků zajišťující specifické funkce každého MTMR [55].

U většiny MTMRs, například MTMR1 a MTMR2, je PH-GRAM doména strukturně těsně spojena s katalytickou PTP doménou, a to prostřednictvím vysoce konzervovaného rozhraní tvořeného několika α -helixy a smyčkami. Toto uspořádání stabilizuje prostorovou strukturu enzymu a napomáhá jeho funkci. U MTMR6 ovšem PH-GRAM doména neinteraguje s PTP doménou, což je důsledkem nižší míry konzervace aminokyselin v místě jejich kontaktu. PH-GRAM doména se pak může vyskytovat v odlišné konformaci a účastnit se tak odlišných interakcí [54].

Obecně platí vysoká promiskuita PH-GRAM domén vůči fosfoinositidovým derivátům. V následující tabulce (Tab. 1) je přehled všech dostupných vazebných specifit PH-GRAM domén MTMR fosfatáz.

Tabulka 1:

	PI	PI(3)P	PI(4)P	PI(5)P	PI(3,5)P ₂	PI(4,5)P ₂	PI(3,4)P ₂	PIP ₃	Kyselina fosfatidová (PA)
MTM1	-	+	+	+	++	-	+	+	?
MTMR2	-	-	+	+	+	-	-	+	?
MTMR3	-	+	+	+	+	-	-	-	-
MTMR6	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Symbol „+“ označuje detekovanou afinitu PH-GRAM domény k danému fosfoinositidu; „++“ značí nejvyšší popsanou afinitu v rámci daného myotubularinu; „-“ indikuje nepřítomnost detekovatelné vazby. Symbol „?“ označuje chybějící data. MTMR2 [52], MTM1 [56], MTMR3 [49], MTMR6 [57, 58].

1.2.1.2. Mutace v MTMRs a onemocnění

Poškození funkce celé řady členů z rodiny myotubularinů vedou k závažným dědičným onemocněním. Nejvíce prostudovanými, ale ne jedinými, jsou X-vázaná myotubulární myopatie a Charcot-Marie-Toothův syndrom 4B.

Mutace v MTM1 způsobují myotubulární myopatii

Mutace v genu MTM1 způsobují závažné vrozené onemocnění známé jako X-vázaná centronukleární myopatie (XLCNM, též X-vázaná myotubulární myopatie). Projevuje se těžkou hypotonií již při narození a většina pacientů umírá během prvních měsíců života na respirační selhání v důsledku hypoventilace. Svalová vlákna pacientů vykazují znaky vývojového defektu s centrálně lokalizovanými jádry a dezorganizací kontraktálního aparátu [59].

Bylo nalezeno více než 130 mutací MTM1 u různých pacientů, přičemž většina z nich vede ke ztrátě funkce fosfatázy. Některé bodové mutace poškozují PH-G doménu a její schopnost vázat fosfoinositidy, čímž se omezuje plná funkce myotubularinu [56, 59].

Mutace v MTMR2 a MTMR13 způsobují Charcot-Marie-Toothův syndrom

Charcot-Marie-Toothův syndrom (CMT) je skupina dědičných periferních neuropatií postihující funkci motorických i senzitivních nervů. Mutace v genech MTMR2 a MTMR13 způsobují vzácné autosomálně recesivní formy typu CMT4B. U těchto forem dochází ke snížení myelinizovaných vláken a vzniku atypických myelinových záhybů („outfoldings“) v periferních nervech. Klinicky se CMT4B projevuje již v dětství progresivní slabostí a atrofií distálních svalů, deformitami nohou, areflexií a sensorickými poruchami [60].

Podobně jako u MTM1, s CMT4B je spojena řada mutací v genu MTMR2. Velká část vede k úplné ztrátě fosfatázové aktivity, např. bodové mutace v PTP doméně, sestřihová mutace nebo předčasné stop kodony [46]. Jiné mutace ovlivňují další domény MTMR2 i MTMR13, včetně PH-GRAM či CC domén, což postihuje jejich funkci, respektive lokalizaci na membrány [60].

1.2.2. Myotubularin 9 a podrodina MTMR6/7/8

Podrodina složená z MTMR6, MTMR7, MTMR8 a MTMR9 vykazuje zvýšenou sekvenční a funkční příbuznost. MTMR6, 7 a 8 jsou aktivní PI3-fosfatázy, MTMR9 naopak postrádá klíčový konzervovaný cystein nezbytný pro katalýzu. MTMR9 je však prostřednictvím své „coiled-coil“ domény schopen interagovat se všemi členy podrodiny [47, 51, 61]. Ve své biologicky aktivní podobě mohou MTMR7/MTMR9 působit v endolyzozomálním systému, zatímco MTMR6/MTMR9 a MTMR8/MTMR9 jsou důležité v regulaci autofagie a apoptózy [61]. Nicméně dostupných studií o této podskupině MTMR proteinů je relativně málo a většina jejich biologických rolí tak zůstává nedostatečně prozkoumána.

1.2.2.1. Myotubularin 8

Gen pro lidský MTMR8 je lokalizován na chromozomu X, z něhož alternativním sestřihem vzniká několik transkriptů. Kanonická izoforma podle UniProt (ID: Q96EF0) obsahuje 704 aminokyselin a má

molekulovou hmotnost přibližně 78,9 kDa. Stejně jako zbylí členové podrodiny si MTMR8 zachovává standartní doménovou strukturu bez přídatných domén.

Interakce MTMR8 s MTMR9 a tvorba heterodimeru MTMR8/9 zvyšuje stabilitu MTMR8 a její bazální enzymatickou aktivitu vůči PI(3)P až čtyřkrát, naproti tomu PI(3,5)P₂ pouze 1,4-krát [62]. Podle autorů tak komplex MTMR8/MTMR9 reguluje zejména hladiny PI(3)P v buňce. To podporuje pozorování, že nadprodukce MTMR8 s MTMR9 nevede ke zvýšení PI(5)P v buňkách. Naopak touto nadprodukcí dochází k signifikantnímu snížení buněčného PI(3)P [62].

MTMR8 reguluje autofagii

MTMR8 lokalizuje v cytosolu a perinukleární oblasti [51]. Jeho nejvíce studovanou funkcí je schopnost regulovat autofagii. V jedné ze starších studií bylo pozorováno, že nadprodukce MTMR8 s MTMR9 vedla k blokaci degradace autofagického nákladu. Naopak snížení jejich exprese indukovalo autofagii a urychlilo degradaci autofagického materiálu [62]. Na základě těchto pozorování byl MTMR8 považován za negativní regulátor autofagického toku.

Detailnější vhled do funkce MTMR8 přinášejí až novější studie, které ukazují, že nadprodukce MTMR8 sama o sobě zvyšuje tvorbu autofagozomů a autofagický tok [63]. To se může zdát v rozporu s dřívějšími výsledky, nová data však naznačují, že role MTMR8 je komplexnější a závislá na kontextu.

Při snížené expresi, enzymatické inaktivaci nebo deleci PH-GRAM domény MTMR8 dochází ke zvýšení počtu autolyzozomálních váčků. Tyto autolyzozomy mají ovšem poškozenou maturaci a hromadí se v buňkách jako vakuolární struktury [63]. Narušení funkce takovýchto lysozomů vede k translokaci transkripčního faktoru EB (TFEB) do jádra, kde indukuje expresi genů podporujících autofagii a správnou funkci lysozomů [64]. Výsledkem je kompenzační zpětnovazebná smyčka, která zvyšuje míru autofagie i přes to, že primárním efektem ztráty MTMR8 je poškozená degradace autofagického materiálu [63]. Tato data naznačují, že nadměrná exprese MTMR8 aktivuje a podporuje autofagickou degradaci, zatímco inaktivace MTMR8 vede ke zhoršení degradace a následné aktivaci autofagie skrze TFEB.

U *Drosophily* má podobnou funkci v regulaci autofagie homolog savčího MTMR6, dMtmr6. Tyto poznatky naznačují možnost, že ztráta funkce MTMR8 v savčích buňkách může být do určité míry kompenzována právě MTMR6. dMtmr6 má u *Drosophily* kromě autofagie roli i ve fagocytóze a nespécifickém příjmu extracelulárního materiálu, přičemž oba tyto procesy jsou v depletovaných buňkách poškozeny [63]. Zajímavé je, že funkce dMtmr6 v autofagii není pevně daná, ale mění se v závislosti na nutričních podmínkách. Zatímco při dostatku živin dMtmr6 podporuje autofagii v pozdní fázi maturace autofagozomu, při hladovění působí antagonisticky a brání formování autofagozomu [65].

Tento stavově závislý funkční posun („condition-dependent functional shift“) předkládá možnou roli savčích orthologů MTMR6 nebo MTMR8 v autofagii.

MTMR8 a nemoci

Byl popsán SNP (jednonukleotidový polymorfismus) v genu MTMR8, který je asociovaný s náchylností k roztroušené skleróze [66]. Jedná se o záměnovou („nonsense“) mutaci vedoucí k předčasnému ukončení translace MTMR8 a ztrátě jeho fosfatázové domény. V důsledku toho MTMR8 ztrácí schopnost ovlivňovat autofagii, která hraje významnou roli v regulaci zánětlivých procesů a neurodegeneraci. Ztráta funkce MTMR8 tak může přispívat k progresi onemocnění skrze deregulovanou autofagii a zvýšený zánětlivý stres [66].

Ztráta počtu kopií genu MTMR8 byla také spojena s nádorovým onemocněním. Ve více než 65 % vzorků pacientů s *glioblastoma multiforme* byla detekována ztráta počtu kopií genů MTMR8, stejně tak MTM1 [67]. To předkládá možnou roli MTMR8 jako nádorového supresoru.

1.2.2.2. Myotubularin 6

Gen pro lidský MTMR6 se nachází na chromozomu 13 a je exprimován ve více izoformách v důsledku alternativního sestřihu. Podle UniProt (ID: Q9Y217) obsahuje hlavní izoforma 621 aminokyselin s molekulovou hmotností přibližně 72 kDa. Jako většina MTMRs, i MTMR6 je exprimovaný v cytoplasmě a podobně jako MTMR8 se akumuluje v cytosolu a perinukleární oblasti. Některé studie navíc uvádějí, že membránově vázaný MTMR6 částečně kolokalizuje s markery ER a Golgiho aparátu [51, 57, 68].

MTMR6 také vytváří prostřednictvím své CC domény heterodimer s MTMR9 [57, 68]. Tato interakce výrazně zvyšuje afinitu PH-GRAM domény MTMR6 ke všem fosfoinositidům, které váže. Zároveň podporuje enzymatickou aktivitu MTMR6 a stabilitu obou vazebných partnerů [57]. Na rozdíl od MTMR8, dimerizace MTMR6 s MTMR9 podporuje jeho enzymatickou aktivitu vůči PI(3,5)P₂ až 30-krát, oproti tomu vůči PI(3)P pouze 2-krát [62]. Nadprodukcí MTMR6 s MTMR9 dochází k trojnásobnému zvýšení množství buněčného PI(5)P, nikoli však ke snížení hladiny PI(3)P. Podle autorů tak MTMR6 na rozdíl od MTMR8 reguluje zejména hladinu PI(3,5)P₂ v buňkách [62].

Antiapoptotická role MTMR6

V několika studiích autoři popisují sníženou viabilitu buněčné linie HeLa v důsledku snížení exprese MTMR6. Zejména snížení exprese MTMR6 společně s MTMR9 vede k výrazné indukci apoptózy. Oproti tomu deregulace MTMR8 s MTMR9 ke změnám viability HeLa buněk nevede [57, 62, 63]. Nicméně knockdown MTMR6 v COS-7 buněčné linii (fibroblastům podobná buněčná linie odvozená z tkáně africké zelené opice) nevyúsťuje k snížení buněčné viability [63]. Tento rozdíl naznačuje, že je antiapoptotická role MTMR6 buď buněčně specifická, nebo je v některých buněčných liniích kompenzována jinými členy MTMR rodiny.

Role MTMR6 v autofagii

Role MTMR6 v autofagii rovněž není plně objasněna. Na rozdíl od knockdownu MTMR8 s MTMR9, při snížení exprese MTMR6 s MTMR9 nedochází k indukci autofagie. Autoři proto navrhuji, že MTMR8 reguluje autofagii a MTMR6 reguluje apoptózu [62]. Nicméně jak bylo demonstrováno u MTMR8, problematika může být mnohem komplexnější.

Příkladem je studie, ve které autoři pozorují funkci MTMR6 v autofagii u myší buněčné linie (NRK buňky) [68]. Snížení exprese MTMR6 zde nevede ke změně počtu autofagických buněk, ale narušuje tvorbu PI(3)P pozitivních tubulárních omegazomů. To naznačuje, že MTMR6 reguluje hladinu PI(3)P v omegazomu během iniciace autofagie [68]. Nicméně je klíčové, že myší genom neobsahuje gen pro MTMR8 [63]. Do jaké míry hraje MTMR6 roli v autofagii a zda u hlodavců není tato funkce důsledkem kompenzace chybějícího genu pro MTMR8 zůstává otázkou.

Struktura MTMR6 mu dává unikátní funkci

Již bylo zmiňováno, že MTMR6 obsahuje významné strukturní rozdíly ve srovnání s jinými MTMRs. Jeho PH-GRAM doména není v těsném spojení s PTP doménou a jejich vzájemná pozice se výrazně liší. Ve struktuře získané rentgenovou krystalografií interaguje PH-GRAM doména jedné molekuly MTMR6 s PTP doménou sousední molekuly. Tato interakce je ve zcela odlišném prostorovém uspořádání než intramolekulární vazby těchto domén pozorované u jiných MTMR proteinů [54]. Neobvyklá orientace domén MTMR6 může souviset s jeho unikátní funkcí; interagovat s proteiny mimo MTMR rodinu.

MTMR6 přímo váže KCa3.1

Příkladem proteinu, který interaguje s MTMR6, nikoli však s jinými MTMRs, je Ca^{2+} -aktivovaný K^+ kanál KCa3.1. Tato interakce je závislá na CC i PH-GRAM doméně MTMR6. Poškozením jedné z těchto domén MTMR6 ztrácí schopnost inhibovat draselný kanál. Pro efektivní inhibici KCa3.1 je také nezbytná funkční PTP doména a jí katalyzovaná deplece PI(3)P z cílové membrány. Zajímavé je, že i inhibicí VPS34 generující PI(3)P dochází k blokaci KCa3.1 kanálu. To naznačuje, že PI(3)P působí jako pozitivní regulátor KCa3.1, a že MTMR6 tento kanál inhibuje prostřednictvím defosforylace PI(3)P [58, 69]. Nejen přímá interakce CC doménou, ale i fosfatázová aktivita MTMR6 jsou nezbytné pro inhibici KCa3.1.

Důležité je, že KCa3.1 lokalizuje do cytoplazmatické membrány buněk, kde zprostředkovává tok draselných iontů a ovlivňuje elektrický potenciál membrány. Stejně tak MTMR6 i MTMR9 lokalizují do CPM, kde kolokalizují k KCa3.1 [57, 58]. Autoři popisují, že PH-GRAM doména MTMR6 je nezbytná k jeho lokalizaci do cytoplazmatické membrány [58]. Zatím však není jasné, zda MTMR6 interaguje s KCa3.1 nezávisle na MTMR9, nebo zda k efektivní inhibici kanálu dochází až v rámci trimerního komplexu (MTMR9-MTMR6-KCa3.1). Možnou existenci trimerního komplexu podporují recentní

studie, podle kterých MTMR9 prostřednictvím své CC domény preferenčně interaguje do trimerů, nikoli do dimerů [48].

KCa3.1 je v buňkách aktivován v důsledku vylití Ca^{2+} z intracelulárních kompartmentů, což vede k hyperpolarizaci CPM. Taková změna membránového potenciálu následně v pozitivní zpětné smyčce zvyšuje tok vápenatých iontů z extracelulárního prostoru do cytoplazmy. To se zdá být důležité u pomocných CD4^+ T lymfocytů, u kterých je aktivita KCa3.1 a vtok extracelulárního Ca^{2+} nezbytný pro jejich proliferaci po reaktivaci. MTMR6 působí jako negativní regulátor tohoto procesu – snižuje množství PI(3)P v cytoplazmatické membráně, čímž tlumí aktivitu KCa3.1. To vede k menšímu přílivu Ca^{2+} a následně k omezení proliferace lymfocytů [70]. Inhibice MTMR6 má proto terapeutický potenciál, například při infekci *Leishmanii donovani*, která snižuje odpověď imunitního systému hostitele. Tato parazitární infekce indukuje expresi MTMR6 v makrofázích, jakožto hostitelských buňkách. Inhibice MTMR6 by mohla obnovit proliferaci a diferenciaci leukocytů, čímž by se zvýšila i efektivita imunitní odpovědi proti infekci [71, 72]. Také je popsána role MTMR9 v diferenciaci CD4^+ lymfocytů. Snižováním exprese MTMR9 dochází k stimulaci diferenciaci subpopulace CD4^+ buněk, Th1 (T-pomocných 1) lymfocytů [73].

MTMR6 přímo interaguje s Rab1B u myši

Dalším přímým interakčním partnerem je monomerní GTPáza Rab1B (Příbuzný Ras v mozku 1B), která preferenčně interaguje s MTMR6 ve své neaktivní konformaci. Tato nízkoafinní vazba je zcela závislá na PH-GRAM doméně MTMR6. Aktivní Rab1B sdílí a podporuje lokalizaci MTMR6 v oblasti okolo Golgiho aparátu a intermediálního kompartmentu. Změna konformace Rab1B z GTP do GDP formy vede ke zvýšené interakci s MTMR6 a současně narušuje jeho schopnost lokalizovat na membrány cílových kompartmentů. Tyto výsledky naznačují, že Rab1B reguluje lokalizaci MTMR6 mechanismem závislým na jeho GTPázové aktivitě [68].

Autoři dále popisují funkci MTMR6 s Rab1B v rámci sekretorické dráhy. Jejich výsledky naznačují, že MTMR6 negativně reguluje transport proteinů z ER do Golgiho aparátu [68]. Je však důležité zmínit, že regulace MTMR6 Rab1B GTPázou a jejich role v sekretorické dráze je popsána na buněčné linii odvozené z myši (NRK buňky) [68]. Při obdobném experimentu provedeném na lidských buňkách není kolokalizace mezi MTMR6 a RAB1 GTPázami detekována [74].

1.2.2.3. Myotubularin 9

Gen pro lidský MTMR9 se nachází na chromozomu 8 a kóduje více transkriptů, přičemž hlavní izoforma podle UniProt (ID: Q96QG7) obsahuje 549 aminokyselin s molekulovou hmotností kolem 63,5 kDa. MTMR9 je enzymaticky neaktivní fosfatáza z rodiny MTMR, která je schopna svou „coiled-coil“ doménou interagovat s MTMR6, MTMR8 a MTMR7. Tato heterodimerizace vede k jejich stabilizaci,

zvýšení afinity vůči fosfoinositidům, posílení enzymatické aktivity i podpoře jejich biologické funkce [57, 61, 62, 74]. C-koncová oblast (CTD) MTMR9 je výrazně zkrácená a téměř celou její délku tvoří CC doména. MTMR9 tak disponuje nejkratším CTD, ale zároveň nejdelší CC doménou ze všech členů rodiny MTMRs. Tato strukturální zvláštnost může přispívat k jeho atypickému chování, včetně schopnosti tvořit homotrimery namísto homodimerů [48].

MTMR9 sám o sobě postrádá schopnost vázat jakékoli fosfoinositidy [57]. Lokalizuje převážně v cytoplazmě, ale také v membránách Golgiho aparátu, intermediálního kompartmentu a cytoplazmatické membrány, přičemž výrazně kolokalizuje s RAB1A GTPázou [74]. Navíc se MTMR9 akumuluje ve vezikulárních strukturách v perinukleární oblasti. MTMR9 v těchto váčcích ale nevykazuje kolokalizaci s markery časných, pozdních i recyklačních endozomů ani s markery lysozomů [57, 74].

MTMR9 reguluje sekreční dráhu

Vyřazení genu pro MTMR9 vede ke změně lokalizace RAB1A, který se v těchto buňkách nachází více v membránách intermediálního kompartmentu a méně v Golgiho aparátu. Zároveň dochází k rozpadu kompaktního Golgiho aparátu a jeho fragmentaci. Důsledkem těchto změn je výrazné zpomalení sekreční dráhy, nikoli však její úplné zablokování. Nadměrná exprese MTMR9 rovněž vede ke zpomalení transportu materiálu z ER k cytoplazmatické membráně [74]. Tyto výsledky ukazují, že množství MTMR9 ovlivňuje průběh sekreční dráhy kvantitativně a pro zajištění efektivního transportu musí být jeho hladina přesně regulována.

MTMR9 souvisí s některými nemocemi

Některé jednonukleotidové polymorfismy (SNP) jsou spojovány se vznikem onemocnění. U asijských populací je popsán SNP (rs2293855) lokalizovaný v intronu 9, který významně souvisí s rizikem metabolických syndromů [75]. Konkrétně je asociována s hypertenzí, poškozením metabolismu glukózy a koncentrací lipoproteinů v krvi [76]. Dále je tento SNP popsán v souvislosti s poškozením inzulínové sekrece a senzitivity a významně asociuje s obezitou [75, 77]. MTMR9 je dále identifikován jako jeden z genů spojených s prognózou karcinomu vaječníků a jícnu [78, 79].

Ačkoliv dosavadní poznatky naznačují, že se MTMR9 podílí na regulaci sekreční dráhy a může hrát roli v patogenezi metabolických i nádorových onemocnění, doposud zůstává jen velmi málo prozkoumaný. Tato skutečnost z něj činí atraktivní cíl výzkumu, zejména v kontextu jeho biologické funkce a možného zapojení do transportních nebo endocytických procesů.

1.3.Makropinocytóza

1.3.1. Makropinocytóza jako typ endocytózy

Makropinocytóza, také označována jako buněčné pití, je díky svým unikátní vlastnostem jedinečný typ endocytózy. Těmito vlastnostmi jsou například závislost na aktinové polymeraci, neselektivita vůči endocytovanému materiálu, či tvorba váčků, které mají v průměru 0,2-5 μm [80]. Poprvé byla pozorována světelnou mikroskopií na tkáňové kultuře savčích buněk v 30. letech 20. století. Původně byla označena jako pinocytóza, jelikož klathrin-dependentní endocytóza a další mikropinocytické procesy byly popsány až v druhé polovině minulého století [81].

1.3.1.1. Makropinocytóza se od ostatních endocytóz liší

Svémi vlastnostmi se makropinocytóza odlišuje od klathrin-dependentní endocytózy, která zprostředkovává internalizaci materiálu prostřednictvím receptorů do malých váčků o průměru do zhruba 200 nm. Caveolin-dependentní endocytóza umožňuje tvorbu větších váčků než na klathrinu-závislá dráha, nicméně jejich velikost zpravidla nepřesahuje 500 nm [82]. Tato velikostní omezení jednotlivých mechanismů demonstrují úzkou souvislost mezi rozměry vnitrobuněčných váčků a konkrétní endocytickou dráhou.

Makropinocytóza sdílí molekulární a signální mechanismy regulace s fagocytózou. V obou procesech se tvoří pohárkové konstrukce, ve kterých dochází k invaginaci membrány a tvorbě protruzí obalujících extracelulární materiál. Oba procesy jsou zcela závislé na aktinovém cytoskeletu, RAS (virus potkaního sarkomu) GTPáze a akumulaci PIP_3 v membráně pohárku. V případě fagocytózy je formování fagozomu iniciováno přímou interakcí mezi receptory na povrchu buňky a ligandy na povrchu cílové částice. Tato interakce spouští postupné přiléhání membrány k částici podle modelu zipu, kdy se membrána zapíná přes povrch částice. Oproti tomu makropinocytóza není vázána na přítomnost konkrétní částice a objemově internalizuje jak tekutinu, tak suspendované částice bez nutnosti specifické ligand receptorové vazby [80].

1.3.1.2. Fáze makropinocytózy

Během makropinocytózy dochází k internalizaci relativně velké části cytoplazmatické membrány. Proces začíná membránovým zvlněním řízeným aktinovým cytoskeletem, které vzniká spontánně nebo jako odpověď na stimulaci růstovými faktory. Tato dynamická membránová aktivita se odehrává v periferních nebo dorzálních oblastech buňky. V určitém okamžiku může docházet k rozšíření a zakřivení membránových zvlnění, která vytvářejí kráterovité, pohárkovité struktury. Vznik těchto makropinocytárních pohárků se nazývá uzavření membránového zvlnění. Následuje přiblížení distálních okrajů pohárku, odškrcení membrány a vzniku makropinozomu v kroku zvaném uzavírání

pohárku. Celý proces je řízen intracelulárními mechanismy nezávisle na distribuci a vazbě přijímaného nákladu [80, 83].

Pro správné vytvoření a uzavření makropinocytárního pohárku je nezbytné lokální nahromadění klíčových regulačních molekul v dané oblasti cytoplazmatické membrány. Tyto molekuly se mohou v ploché membráně a v bazální části pohárku šířit volně, avšak na jeho distálním okraji narážejí na výrazné difúzní bariéry. Pohárek tak vytváří membránovou doménu, která omezuje laterální pohyb lipidů i proteinů, čímž umožňuje jejich lokální akumulaci a amplifikaci signálu nezbytného pro správný průběh makropinocytózy [84].

1.3.2. Makropinocytóza v savčích buňkách a nádorech

Makropinocytóza je využívána velkým množstvím různých organismů. Můžeme ji pozorovat u jednobuněčných jako je hlenka *Dictyostelium discoideum* [85]. Také je využívána specializovanými buňkami bezobratlých, například coelomocyty háďátka *Caenorhabditis elegans* tímto způsobem přijímají „tekutinu“ z tělní dutiny [86]. V savčích buňkách má důležité tkáňově a buněčně specifické funkce a celá řada parazitických organismů využívá makropinocytózu k internalizaci do hostitelských buněk. Příkladem může být SARS-CoV-2, jehož replikační cyklus i samotný vstup do buněk byl blokován obecně užívaným inhibitorem makropinocytózy EIPA (5-(N-ethyl-N isopropyl) amilorid) [87].

1.3.2.1. Makropinocytóza buněk imunitního systému

Makropinocytóza je unikátní a specifický děj, kterým fyziologicky disponují pouze vybrané typy savčích buněk. V imunitním systému je důležitá pro hlavní antigen prezentující buňky (APC), makrofágy a dendritické buňky. Makropinocytózu u těchto buněk je potřeba aktivovat; u makrofágů je to stimulace pomocí cytokinu M-CSF (Makrofág-kolonie stimulující faktor) [88]. Aktivace umožňuje buňkám neselektivně přijímat extracelulární proteiny, které následně zpracovávají a prezentují pomocí molekul hlavního histokompatibilního komplexu II (MHCII). Inhibice makropinocytózy významně snižuje schopnost APC prezentovat antigeny a tím brání i efektivní aktivaci pomocných CD4⁺ T lymfocytů [89]. Makrofágy a dendritické buňky jsou kromě faktory stimulované makropinocytózy schopné i její konstitutivní formy. Konstitutivní makropinocytóza je na rozdíl od faktory stimulované závislá na extracelulárním vápníku, který jsou schopné vázat na vápník senzitivní receptor (CaSR) [90].

Makropinocytózy jsou schopné i jiné imunitní buňky. Příkladem jsou jak pomocné CD4⁺, tak cytotoxické CD8⁺ T lymfocyty. Tyto buňky makropinocytózou přijímají aminokyseliny, což je nezbytné pro stimulaci anabolických drah a růstu T lymfocytů po jejich aktivaci. K tomu dochází i za podmínek s optimální dostupností živin a volných aminokyselin v médiu [91].

1.3.2.2. Makropinocytóza mimo imunitní systém

Makropinocytóza není buněčný proces vyhrazený pouze buňkám imunitního systému. Během fetálního vývoje savců hraje klíčovou roli v buňkách trofoblastu, které zajišťují výměnu plynů a živin mezi matkou a plodem. Makropinocytóza je u buněk trofoblastu posílena v důsledku aminokyselinové deprivace a s tím spojené signalizace. U myší vede inhibice makropinocytózy v těchto buňkách k poškození placentárního transportu a nepříznivě ovlivňuje vývoj embrya [92].

Postembryonálně probíhá makropinocytóza u buněk pigmentového epitelu sítnice („retinal pigment epithelium“; RPE buňky). RPE buňky aktivně řídí odštěpování a pohlcování částí vnějších segmentů fotoreceptorových buněk v rámci jejich recyklace prostřednictvím aktin-závislé endocytózy podobné fagocytóze. Jelikož nedochází k internalizaci již odštěpených částí buněk, ale RPE „okusují“ části fotoreceptorů, autoři navrhují pojmenovat tento proces trogocytóza [93].

Kromě trogocytózy využívají RPE buňky široké spektrum endocytických drah, včetně klathrin-dependentních a klathrin-independentních cest. Ty slouží k příjmu živin a transportu metabolitů, čímž RPE vytváří a kontrolují prostředí sítnice [94]. Ačkoli funkční význam makropinocytózy v RPE není zatím detailně popsán, některé studie tyto buňky využívají jako modelový systém ke studiu makropinocytózy, zejména v kontextu regulace aktinového cytoskeletu a tvorby i maturace makropinozomů [95, 96].

1.3.2.3. Makropinocytóza a nádorové onemocnění

V nádorové biologii představuje makropinocytóza důležitý mechanismus alternativního příjmu živin, kde vzniká v důsledku aberantních aktivací signálních drah. Příkladem mohou být buňky karcinomu prostaty. Fyziologicky nevykazuje epitel prostaty žádné znaky aktivní makropinocytózy. Makropinocytóza je u těchto buněk spojena s nádorovým fenotypem a ztrátou PTEN fosfatázy. PTEN-deficientní buňky karcinomu prostaty mají posílenou makropinocytózu zejména v prostředí s nutriční deprivací, což jim poskytuje výhodu v přežití a proliferaci *in vitro* i *in vivo* v myším modelu [97].

Makropinocytóza je stimulována i u nádorových buněk, které endogenně exprimují onkogenní RAS GTPázu. Tyto buňky vykazují výrazně vyšší makropinocytózu ve srovnání s buňkami s „wild-type“ GTPázou, což bylo prokázáno i *in vivo* po transplantaci lidských nádorových buněk do myší [98]. RAS přímo interaguje s PI3K třídy I a výrazně podporuje jejich enzymatickou aktivitu [99]. RAS i PTEN tedy regulují hladinu PIP₃ v buňkách, což podtrhuje klíčovou roli tohoto fosfoinositidu v regulaci makropinocytózy.

Nádorové buňky nemusí skrze makropinocytózu přijímat pouze sérové proteiny jako albumin. Naopak, podle studií se zdá nekrotické debris, které se v nádorovém mikroprostředí hojně vyskytuje, jako

důležitý a komplexní zdroj živin. Pouze nádorové makropinocytující buňky, jako buňky karcinomu prostaty či rakoviny prsu, jsou schopné efektivně pohlcovat nekrotické zbytky. Takové nádorové buňky mají rovněž zvýšenou rezistenci vůči chemoterapii, která v nádorovém mikroprostředí indukuje buněčnou smrt [97, 100].

Metabolismus a přežití nádorových buněk je výrazně závislé na příjmu glutaminu. Recentní studie ukazují, že při glutaminové deprivaci nebo ztrátě transportérů pro glutamin zůstávají nádorové buňky na této aminokyselině nadále závislé a aktivují makropinocytózu. Ta jim slouží jako kompenzační mechanismus a adaptace umožňující příjem glutaminu z extracelulárních zdrojů [101, 102].

1.3.3. PIPs a jejich enzymy v makropinocytóze

Fosfoinositidy hrají důležitou regulační roli ve všech fázích makropinocytózy. Jejich časoprostorově řízená akumulace v cytoplazmatické membráně a později i v membráně makropinosomu je nezbytná pro koordinaci signálních a strukturních změn spojených s tímto procesem. Stejně jako u jiných typů endocytózy podléhají fosfoinositidy během makropinocytózy dynamickým přeměnám prostřednictvím specifických kináz a fosfatáz (Obr. 3). Po svém vzniku a nahromadění jsou rozpoznávány specifickými efektory, které řídí cytoskeletální reorganizaci, membránovou dynamiku i vnitrobuněčný transport.

1.3.3.1. PIPs při formování makropinocytárního pohárku

PI(4,5)P₂ a RAC1 jsou důležité pro membránové zvlnění

V membránovém zvlnění dochází k výraznému zvýšení hladiny PI(4,5)P₂ ve srovnání s okolní plochou membránou [103]. Zatím však není experimentálně prokázáno, jakým způsobem zde tento fosfoinositid vzniká. Pro indukci aktin-závislého membránového zvlnění a následné formování pohárku je ovšem nezbytná lokální aktivita GTPázy RAC1 (Ras-příbuzný C3 botulotoxinový substrát 1). Selektivní aktivace této monomerní GTPázy vede k stimulaci tvorby aktinových filament a formaci membránového zvlnění. Naopak její inaktivace způsobuje rozpad aktinového cytoskeletu a utišení membránové dynamiky [104].

RAC1 přímo interaguje s PIPK1 α , což indukuje její aktivaci. Enzymaticky neaktivní varianta PIPK1 α funguje jako dominantně negativní mutant a narušuje RAC1-indukovanou polymeraci aktinu [105]. To podporuje model, ve kterém aktivace RAC1 vede k rekrutaci PIPK1 α a akumulaci PI(4,5)P₂ v cytoplazmatické membráně, což indukuje aktinovou polymeraci a tvorbu membránového zvlnění.

Pro tvorbu pohárku je nezbytná akumulace PIP₃

Aktivita RAC1 a koncentrace PI(4,5)P₂ dále roste v makropinocytárním pohárku a nabývá svého vrcholu před jeho uzavřením. Lokálně však může hladina PI(4,5)P₂ v této oblasti klesat v důsledku konverze na PIP₃ [103]. Aktivita PI3K třídy I a tvorba PIP₃ je nezbytná pro správné vytvoření a zrání membránového

pohárku, nikoli ale pro polymeraci aktinu a vznik samotného membránového zvlnění. Zvýšení hladiny PIP_3 výrazně koreluje s uzavíráním membránového zvlnění, maximálních hodnot však dosahuje ještě před uzavřením pohárku. Na rozdíl od $PI(4,5)P_2$, PIP_3 je akumulován zejména na bázi makropinocytárního pohárku a doprovází rozpad aktinových vláken v této oblasti [83, 103].

Novější studie potvrzují, že oba fosfoinositidy dosahují svých vrcholových koncentrací před uzavřením makropinocytárního pohárku, avšak nárůst $PI(4,5)P_2$ předchází PIP_3 . Nicméně ještě před samotným odškrcením makropinozomu dochází k prudkému poklesu koncentrace obou lipidů [106].

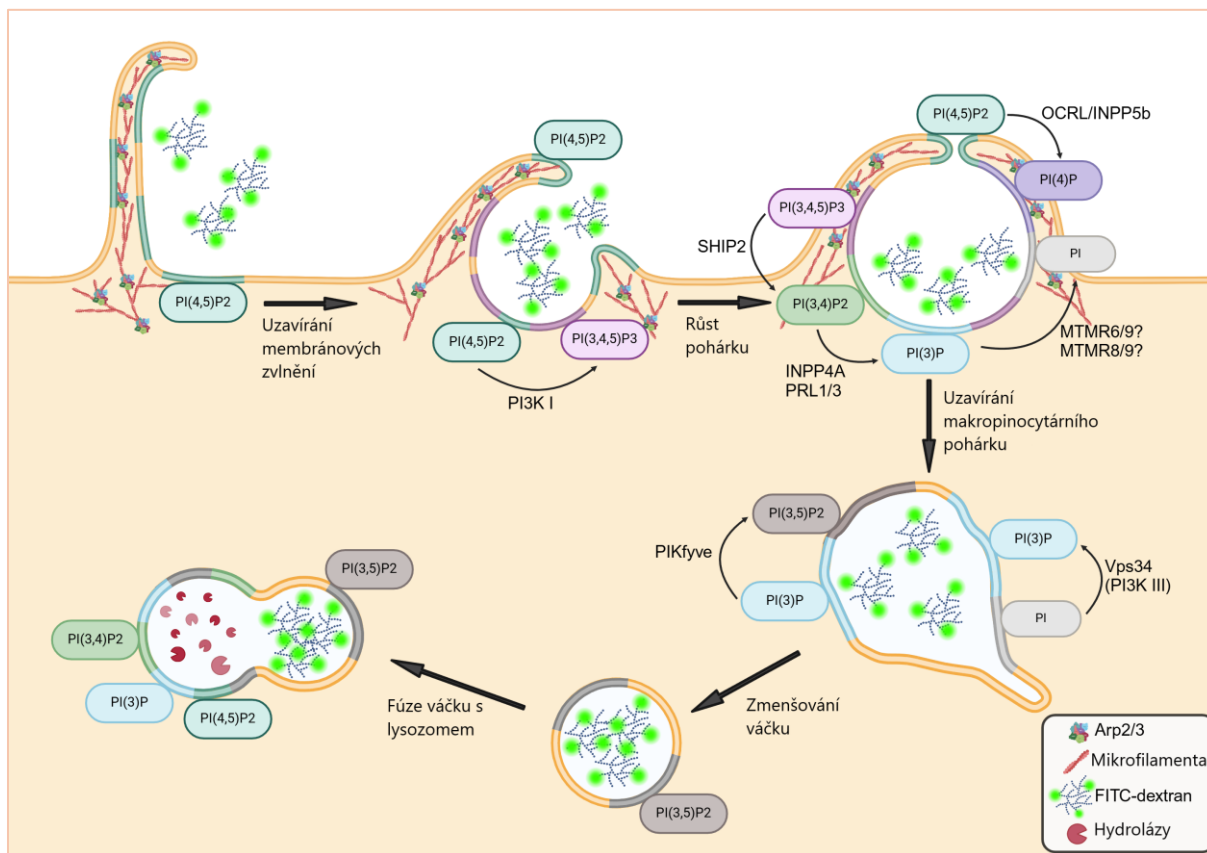
Již bylo demonstrováno, že nadměrná akumulace PIP_3 v důsledku ztráty PTEN nebo hyperaktivací RAS vyúsťuje ve zvýšenou makropinocytózu v buňkách. Hladina PIP_3 a aktivita RAS GTPázy proto musí být velice striktně regulovány. Pro regulaci míry makropinocytózy jsou důležité i RAS GTPázu aktivující proteiny (RasGAP), které stimulují její hydrolytickou aktivitu a přechod do inaktivního stavu. Příkladem takového negativního regulátoru je tumor-supresor neurofibromin 1 (NF1). Ztráta genu pro NF1 v savčích makrofázích vede k zvýšené aktivitě RAS a výraznému posílení makropinocytózy, která je zcela blokována inhibicí PI3K třídy I [107].

Model organizace makropinocytárního pohárku u hlenky *Dyctiostelium dyscoideum*

U *Dyctiostelia* NF1 nepůsobí na aktivitu Ras globálně, ale lokalizuje se přímo v oblasti dynamických makropinocytárních zvlnění, kde negativně reguluje aktivitu GTPázy. Tím omezuje i velikost PIP_3 domén a samotných makropinozomů, které jsou v NF1 mutovaných liniích podstatně větší [108]. U hlenky je ovšem popsán další klíčový faktor, který reguluje aktivitu Ras, ale i Rac GTPáz. Jedná se o multidoménný protein RGBARG (RCC1, RhoGEF, BAR, a RasGAP-obsahující protein), který na rozdíl od NF1 nereguluje velikost, ale tvar makropinocytárního pohárku. Tento protein lokalizuje do distálních (protruzních) okrajů pohárků, kde vytváří rozhraní, ve kterém svou RhoGEF aktivitou stimuluje Rac a naopak svou RasGAP aktivitou inhibuje Ras. Podle autorů je tak v protruzní oblasti pohárku aktivní pouze Rac GTPáza, která přesahuje oblast s aktivní Ras a s hromadícím se PIP_3 [109].

Pokud Ras či PIP_3 negativně regulují Rac-řízenou polymeraci aktinu, RGBARG by mohl zajišťovat koordinaci tvorby aktinových vláken pouze do protruzní oblasti. To podporují i pozorování, že nukleační faktory jako SCAR/WAVE (Supresor cAR/ Verprolin-homologní protein z rodiny WASP) komplexy lokalizují do prstence právě v distálním okraji pohárku, mimo jeho centrum obsahující Ras/ PIP_3 domény [110]. SCAR/WAVE komplex patří do rodiny WASP proteinů, nicméně pro jeho plnou aktivaci je nezbytná přímo RAC1 GTPáza [111]. Absence RGBARG však nebrání rekrutaci SCAR/WAVE komplexu do distálního okraje pohárku, což naznačuje, že tento protein nefunguje jako hlavní koordinátor, ale spíše

reguluje dynamiku a tvar této struktury [109]. Jak přesně komplexní pohárkovitá struktura vzniká a jaké faktory regulují její dynamiku v savčích buňkách zatím nebylo objasněno.



Obrázek 3: PIPs se hromadí v makropinosytárních membránách. Schéma zobrazuje hlavní fosfoinositidové domény v jednotlivých fázích makropinosytózy a přechody mezi těmito fázemi (černé rovné šipky). Jednotlivé PIPs jsou zobrazeny jako barevné úseky membrány, ve které se dominantně hromadí. Tyto domény od sebe však nejsou izolované, nýbrž se mohou alespoň částečně prolínat. Enzymy katalyzující přeměnu jednotlivých fosfoinositidů (PI-specifické kinázy a fosfatázy) jsou vyznačeny zakřivenými šipkami a označeny svými názvy. FITC-dextran je uveden jako příklad neselektivního nákladu internalizovaného makropinosytózou. Obrázek byl vytvořen pomocí BioRender.

1.3.3.2. PIPs při uzavírání makropinosytárního pohárku

Pro správné uzavření makropinosytárního pohárku do váčku je nezbytná deaktivace RAC1 GTPázy v membráně pohárku. Buňky s trvale aktivní RAC1 mají poškozené uzavírání makropinosytárního pohárku a sníženou tvorbu i maturaci makropinosomů [104]. Během uzavírání pohárku rovněž dochází k výrazné depleci PI(4,5)P₂ [103, 106]. Nadprodukce PI5-kináz PIPK1α/β vedoucí ke stabilní přítomnosti PI(4,5)P₂ v membráně pohárku inhibuje jeho uzavírání a příjem makropinosytárního nákladu [112]. Pro efektivní uzavření makropinosytárního pohárku je proto nezbytná jak inaktivace RAC1, tak lokální odstranění PI(4,5)P₂ z jeho membrány.

Odbourávání PIP₃ a PI(3,4)P₂ z pohárku

Během uzavírání pohárku dochází k prudkému poklesu koncentrace PIP₃, který je doprovázen akumulací PI(3,4)P₂. Koncentrace PI(3,4)P₂ vrcholí v době, kdy je tvorba makropinocytárního pohárku dokončena a úzce souvisí s jeho uzavíráním [106, 113]. PI(3,4)P₂ tak pravděpodobně hraje klíčovou roli při maturaci pohárku, kde je produkován fosfatázou SHIP2 lokalizující na membrány těchto struktur. Snížení exprese SHIP2 vede ke ztrátě schopnosti akumulovat PI(3,4)P₂ v doménách CPM, které souvisejí s makropinocytózou [86, 113]. SHIP2 tedy zajišťuje přeměnu PIP₃ na PI(3,4)P₂, čímž přispívá k jeho akumulaci v membráně makropinocytárního pohárku.

Odbourávání PI(3,4)P₂ z membrány pohárku je pro úspěšnou makropinocytózu také nezbytné. Snížením exprese fosfatázy INPP4B, která přeměňuje PI(3,4)P₂ na PI(3)P, dochází k blokaci formování makropinozomů, nikoli však k inhibici aktinové polymerace a membránového zvlnění [86]. Nově jsou popsány PRL3 a PRL1 (fosfatázy regenerující játra 3 a 1) jako lipidové fosfatázy, které přeměňují PI(3,4)P₂ a PI(3,5)P₂ na PI(3)P. Ablace genu pro PRL3 vede k snížení příjmu makropinocytárního nákladu, naopak nadprodukce zmíněných fosfatáz stimuluje tvorbu pohárkových struktur a makropinocytózu [114]. Podle těchto výsledků se zdá být důležitá akumulace PI(3)P v samotné membráně makropinocytárního pohárku.

PI(3)P se hromadí v membráně pohárku

Skutečně je popsáno, že se PI(3)P hromadí již v membráně makropinocytárního pohárku v době jeho uzavírání poté, co začne hladina PI(3,4)P₂ klesat [83, 106]. Podle Maekawa et. al, 2014 [86] vznikl tento pool PI(3)P sekvenčním odbouráváním PIP₃ → PI(3,4)P₂ → PI(3)P. Zároveň však pozorovali, že se pravděpodobně jednalo o tranzientní produkt, který byl následně defosforylován na PI.

Ve své studii autoři použili epidermoidní linii A431, u které stimulovali makropinocytózu EGF (epidermálním růstovým faktorem) a inhibovali ji amiloridem. U buněk se sníženou expresí MTMR6 a MTMR9 zaznamenali významný pokles makropinocytózy, přičemž transfekce exogenní varianty MTMR6 rezistentní vůči siRNA (malé interferující ribonukleové kyselině) makropinocytózu obnovila. Při lokalizaci MTMR6 a MTMR9 pozorovali nahromadění signálu v aktin bohatých a dynamických membránových zvlnění. Autoři ovšem popsali, že buňky se sníženou expresí MTMR6 a MTMR9 neměly poškozenou aktinovou dynamiku ani membránové zvlnění. Avšak formování makropinozomu bylo u těchto buněk výrazně narušeno. Vyvodili proto závěry, že MTMR6 a MTMR9 mají roli v pozdějších fázích vývoje makropinocytárního pohárku, respektive při jeho uzavírání [86].

Podobných výsledků dosáhli i při inhibici kanálu KCa3.1, který se po stimulaci EGF lokalizoval do oblastí membránového zvlnění. Jeho inhibice nebo snížení exprese vedlo k poškození tvorby makropinozomů, nikoli však k ovlivnění membránového zvlnění. Z těchto výsledků vyplývá, že je potřebná jak syntéza,

tak degradace PI(3)P již v membráně makropinocytárního pohárku před jeho uzavřením a že je celý proces striktně časoprostorově organizován [86].

RAB5 lokalizuje na membrány pohárku

RAB5 je monomerní GTPáza, která je charakteristickým markerem časných endozomů. Díky izoprenoidové kotvě dochází k vazbě tohoto proteinu na membrány, kde interaguje a ovlivňuje další enzymy. PI(3)P výrazně podporuje rekrutaci RAB5 na cílové membrány, kde tato GTPáza na oplátku přímo interaguje s endozomálním VPS34 komplexem [115, 116]. Tím vzniká pozitivní zpětnovazebná smyčka mezi tvorbou PI(3)P a rekrutací RAB5, což umožňuje příslušným membránám získat identitu časných endozomů.

Přestože RAB5 dosahuje maximálních koncentrací v membráně makropinozomu až po jeho uzavření, hromadit se začíná již v membráně makropinocytárního pohárku, stejně jako PI(3)P [83, 106]. Navíc exprese dominantně negativní mutanty RAB5 vede ke snížení příjmu makropinocytárního nákladu, aniž by bylo ovlivněno membránového zvlnění [112]. Nejen PI(3)P, ale i RAB5 plní v makropinocytóze funkci před vznikem samotného váčku, a tedy i mimo svou roli v definování endozomální identity.

Skutečně je popsána role této GTPázy při uzavření pohárku a odštěpení makropinocytárního váčku. RAB5 zajišťuje rekrutaci fosfatáz OCRL a INPP5B, které umožňují odstranění PI(4,5)P₂ z membrány makropinocytárním pohárku. Snížení exprese těchto fosfatáz výrazně snižuje schopnost uzavřít pohárek do makropinozomu [112]. Již bylo popsáno, že během uzavírání pohárku dochází k snížení aktivity RAC1 a odstranění PI(4,5)P₂. K depleci PI(4,5)P₂ významně přispívá postupné odbourávání PIP₃ na PI(3)P a následná rekrutace jeho efektoru RAB5, který zprostředkovává nábor klíčových fosfatáz.

1.3.3.3. PIPs při maturaci makropinozomu

Nascentně vzniklý makropinocytický váček musí proniknout kortikální aktinovou sítí, být transportován od cytoplazmatické membrány, získat endozomální identitu, postupně maturovat a fúzovat s lysozomy. Pro každý z těchto procesů je důležité hromadění fosfoinositidů v membráně makropinozomu.

PHAFIN2 umožňuje průnik aktinovým obalem

Váček vzniklý uzavřením makropinocytárního pohárku se nachází v oblasti s hustou sítí kortikálního aktinu. Aby mohl být dále zpracován, musí skrze tento obal z aktinových vláken proniknout. K tomu se zdá být důležitý protein PHAFIN2 (PH a FYVE doménu obsahující protein 2), který prostřednictvím svých vazebných domén váže především PI(3)P, ale také PI(4)P, což řídí jeho lokalizaci. PHAFIN2 se rekrutuje do membrány velice záhy po uzavření makropinocytárního pohárku, což časově koreluje s průnikem makropinozomu z aktinového obalu. Kromě toho PHAFIN2 přímo interaguje s filamentárním aktinem a ovlivňuje jeho dynamiku. Tato aktivita by mohla přispívat k reorganizaci aktinového cytoskeletu kolem

makropinocytárního váčku, což by usnadnilo odstranění aktinového obalu a umožnilo váčku jeho následnou maturaci [95].

Zajímavé je, že autoři popisují bifázickou lokalizaci PHAFIN2. Tento protein se totiž začíná hromadit v membráně při uzavření makropinocytárního pohárku a následně z podstatné části z membrány váčku disociuje. K této prvotní lokalizaci je nezbytný pool PI(3)P, který vzniká nezávisle na VPS34. Později však hladina PHAFIN2 v membráně makropinozomu opět narůstá a jeho druhotná akumulace je blokována inhibitory VPS34 kinázy [95].

Jelikož je lokalizace PHAFIN2 primárně závislá na PI(3)P, tyto výsledky doplňují studie, podle kterých dochází při uzavírání pohárku k defosforylaci PIP₃ na tranzientní pool PI(3)P, který je přeměňován na PI. PI je následně využitý jako substrát pro VPS34 kinázu v membráně maturujícího makropinozomu. Podobně jako je popsáno u fagocytózy, PI(3)P v makropinocytóze vzniká aktivitou PI3K I i PI3K III a tyto dvě frakce jsou od sebe alespoň částečně časoprostorově odlišené.

Časnou fází maturace váčku doprovází tubulace

PI(3)P i RAB5 hromadící se v membráně vzniklého makropinocytárního váčku jsou klíčové pro jeho následnou maturaci. Například PI(3)P přímo interaguje a pravděpodobně tak rekrutuje do membrány nově zformovaných makropinozomů SNX5. Vazba tohoto třídícího nexinu na membránu výrazně koreluje s její dynamikou a s tvorbou i prodlužováním tubulárních extenzí v procesu zvaném tubulace. Během tubulace dochází ke zmenšení plochy membrány váčku bez výrazného ovlivnění jeho obsahu, což vede ke zvýšení tenze ve zbylé membráně. Díky tomuto procesu se makropinozom zmenšuje, zahušťuje svůj obsah, výrazně se zakulacuje a stabilizuje. SNX5 se hromadí na bázi rostoucích tubulů, přičemž následné snížení jeho rekrutace do membrány koreluje s rapidním poklesem rychlosti tubulace [117]. Rovněž je popsána role PHAFIN2 jako faktoru významně podporujícího tubulaci makropinozomů, což může souviset s jeho druhotnou akumulací v membránách makropinocytárních váčků [95, 96]. Z těchto výsledků vyplývá, že PI(3)P prostřednictvím rekrutace efektorů ovlivňuje maturaci makropinozomů.

Konverze RAB5 na RAB7

Již bylo zmiňováno, že pro časný endozom je typická akumulace PI(3)P a markeru RAB5 v membránách. V degradační dráze se během maturace RAB5 GTPáza uvolňuje z membrán endozomů. Současně s tím v těchto váčcích dochází k hromadění GTPázy RAB7, která je charakteristickým markerem pozdních endozomů. Konverze RAB5 na RAB7 je nezbytná pro následnou maturaci endozomů a umožňuje vstup nákladu do degradačního prostředí [118].

Po uzavření makropinocytárního pohárku do váčku dochází k postupné akumulaci a aktivaci RAB5, v určité fázi však nastává její rychlá inaktivace a následná disociace z membrány [119]. Aktivace RAB5 je

řízena několika GEF proteiny, které hrají klíčovou roli v různých buněčných procesech. Během makropinocytózy je nezbytný GEF ALS2, který lokalizuje na membrány již během uzavírání pohárku a jeho deplece zabraňuje aktivaci RAB5 v tomto typu endocytózy. Následná disociace ALS2 i inaktivace RAB5 na membráně makropinozomu jsou závislé na rekrutaci a aktivaci RAB7 v rámci tohoto kompartmentu [120]. Během makropinocytózy tedy dochází ke konverzi RAB GTPáz obdobně jako při endozomální maturaci. Konverze RAB5 na RAB7 umožňuje makropinocytickému váčku získat identitu pozdního endozomu a vstoupit do degradační dráhy.

Pozdní fáze maturace makropinozomu

U hlenky se PI(3,5)P₂ začíná hromadit v membráně makropinozomu několik minut po uzavření pohárku, čemuž předchází rekrutace PIKfyve [44]. S postupným narůstáním hladiny RAB7 a úbytkem RAB5 dochází i ke snížení množství SNX5 v membráně makropinocytárního váčku, což je provázeno omezením tubulace [117]. Konverze RAB5 na RAB7 a přeměna PI(3)P na PI(3,5)P₂ mohou být důvodem pro sníženou schopnost SNX5 vázat membránu makropinozomu a pro ukončení tubulární fáze jeho maturace. Váček tímto získává identitu pozdního endozomu a vstupuje do zatím málo prozkoumaných pozdějších fází maturace.

Marker lysozomů LAMP1 lokalizuje na membrány makropinozomů v pozdních fázích jejich maturace, ve kterých se na membráně nachází i RAB7 [121]. Bylo pozorováno, že makropinozomy podléhají fúzi s lysozomy, přičemž se tento fúzní kompartment následně rychle zmenšuje. Pro zmenšování makropinozomu po jeho fúzi s lysozomem je rovněž nezbytná kináza PIKfyve. Inhibice PIKfyve totiž vede k prodloužení její asociace s membránou makropinocytárních váčků, což brání jejich zmenšení [122]. To demonstruje roli PI(3,5)P₂ v pozdních fázích maturace makropinozomů. Přesný mechanismus procesů v pozdních fázích ani obrat tohoto fosfoinositidu však zůstávají nejasné. Vzhledem k tomu, že MTMRs rozpoznávají kromě PI(3)P také PI(3,5)P₂, nelze vyloučit jejich potenciální roli v pozdní maturaci makropinozomů.

2. Cíle

Makropinocytóza je na aktinu závislý typ endocytózy umožňující nspecifický příjem velkého objemu extracelulárního materiálu. Klíčovými signálními molekulami, které regulují časoprostorovou organizaci jednotlivých fází makropinocytózy, jsou fosfoinositidy [80]. Mezi fosfoinositidy hromadící se v membránách během makropinocytózy patří i PI(3)P a PI(3,5)P₂ [44, 83, 106]. Tyto fosfolipidy jsou substráty PI-specifických fosfatáz a kináz, které je přeměňují a ovlivňují tím jejich hladinu v membránách.

Cílem této diplomové práce je zjistit, zda PI(3)P a PI(3,5)P₂-specifické fosfatázy [47] z rodiny myotubularinů, konkrétně MTMR9 a jeho vazební partneři MTMR6 a MTMR8 [51, 62], hrají roli v regulaci makropinocytózy.

Za tímto účelem byly stanoveny následující dílčí cíle:

1. Zvolit vhodnou fyziologicky makropinocytující buněčnou linii a dysregulovat v ní expresi MTMR9, MTMR6 a MTMR8
 - a. Vytvořit buněčné linie s deletovanými geny příslušných MTMRs pomocí systému CRISPR/Cas9
 - b. Vytvořit buněčné linie se stabilní nadprodukcí příslušných MTMRs pomocí retrovirální transdukce
2. Analyzovat příjem makropinocytárního nákladu ve formě fluorescenčně značeného dextranu
 - a. Kvantifikovat celkový příjem nákladu pomocí průtokové cytometrie
 - b. Kvantifikovat makropinocytární aktivitu pomocí světelné a fluorescenční mikroskopie
3. Vyhodnotit, zda změny v expresi MTMR9, MTMR6 a MTMR8 ovlivňují makropinocytózu a příjem extracelulárního nákladu

3. Materiál a metody

3.1. Vektory

Tabulka 2: **Vektory**

Název	Gen zájmu	Účel	Výrobce
pMXs-EF1-Bsd	Bsd rezistence	PCR Bsd rezistence	Cell Biolabs, Inc.
pSpCas9(BB)-2A-Puro MTMR9sg1	hMTMR9	Genetické klonování	-
pSpCas9(BB)-2A-Puro MTMR9sg2	hMTMR9	Genetické klonování	-
pSpCas9(BB)-2A-Puro MTMR6sg1	hMTMR6	Genetické klonování	-
pSpCas9(BB)-2A-Puro MTMR6sg2	hMTMR6	Genetické klonování	-
pSpCas9(BB)-2A-Puro MTMR8sg1	hMTMR8	Genetické klonování	-
pSpCas9(BB)-2A-Puro MTMR8sg2	hMTMR8	Genetické klonování	-
pSpCas9(BB)-2A-Bsd MTMR9sg1	hMTMR9	CRISPR/Cas9	-
pSpCas9(BB)-2A-Bsd MTMR9sg2	hMTMR9	CRISPR/Cas9	-
pSpCas9(BB)-2A-Bsd MTMR6sg1	hMTMR6	CRISPR/Cas9	-
pSpCas9(BB)-2A-Bsd MTMR6sg2	hMTMR6	CRISPR/Cas9	-
pSpCas9(BB)-2A-Bsd MTMR8sg1	hMTMR8	CRISPR/Cas9	-
pSpCas9(BB)-2A-Bsd MTMR8sg2	hMTMR8	CRISPR/Cas9	-
pEGFP_N3	EGFP	mikroskopování	Clontech
hMTMR9-pEGFP_N3	hMTMR9-EGFP	Tranzientní exprese, mikroskopování	-
hMTMR6-pEGFP_N3	hMTMR6-EGFP	Tranzientní exprese, mikroskopování	-
hMTMR8-pEGFP_N3	hMTMR8-EGFP	Tranzientní exprese, mikroskopování	-
pMXs-Puro	-	Genetické klonování	Cell Biolabs, Inc.
pMXs-puro_EGFP	EGFP	Transdukce a stabilní exprese, mikroskopování, FACS	-

pMXs-puro_MTMR9-EGFP	hMTMR9-EGFP	Transdukce a stabilní exprese, mikroskopování, FACS	-
pMXs-puro_MTMR6-EGFP	hMTMR6-EGFP	Transdukce a stabilní exprese, mikroskopování, FACS	-
pMXs-puro_MTMR8-EGFP	hMTMR8-EGFP	Transdukce a stabilní exprese, mikroskopování, FACS	-
pcDNA4/TO/myc-His A-MTMR9	hMTMR9-myc-His	siRNA	Abgent
pcDNA4/TO/myc-His A-MTMR6	hMTMR6-myc-His	siRNA	Abgent
pcDNA4/TO/myc-His A-MTMR8	hMTMR8-myc-His	siRNA	Abgent
Rac1_G12V_pEGFP-C1	Rac1G12V	Mikroskopování	-

3.2.Primery

Tabulka 3: **Primery**

Název	sekvence	Cílové místo	Účel
Bsd_EcoRI_Forward	aaaGAATTCATGGTTCCTTTGTCTC	pMXs-EF1-Bsd	PCR genu Bsd rezistence
Bsd_EcoRI_Reverse	aaagaattcTTAGCCCTCCCACAC	pMXs-EF1-Bsd	PCR genu Bsd rezistence, kontrola ligace
Bsd_Seq_F	ACCAGAGCATCACCG	pSpCas9(BB)-2A-Bsd MTMR9/6/8 sg1/2	Sekvenace, kontrola ligace
MTMR9_int5_F	AATACGTTACCATGGCAGGC	Genomová DNA	Genomová PCR
MTMR9_int6_R	GCCAGACTCTAGGCACACAC	Genomová DNA	Genomová PCR
Mtmr6_int3_F	CAATCTCAGATTGATATGTGTGC	Genomová DNA	Genomová PCR
Mtmr6_ex5_R	CTCCTTATCTTGATGATAGTAGG	Genomová DNA	Genomová PCR
Mtmr8_int2_F	GTTTTCTAACACTGCAGTCTGC	Genomová DNA	Genomová PCR
Mtmr8_int3_R	CCCCTTGAAGAGCTTTTACTC	Genomová DNA	Genomová PCR
MTMR6_PacI_F	acTTAATTAAatggagcatatccggacgacc	hMTMR6-pEGFP_N3	PCR genu MTMR6-EGFP
MTMR8_PacI_F	acTTAATTAAatggatcatattacggtaccc	hMTMR8-pEGFP_N3	PCR genu MTMR8-EGFP
EGFP-stop_XhoI_R	gccCTCGAGTTACTTGACAGCTCGTCC	hMTMR6/8-pEGFP_N3	PCR genu MTMR6/8-EGFP
pMX_FW_SEQ	CGGCATCGCAGCTTGGATAC	pMXs	Sekvenace

3.3.siRNA

Tabulka 4: siRNA

Název	Sekvence	Výrobce	siRNA ID
MTMR9 A	GCGAAUUCAUAAGUCCAUtt	AMBION	s35355
MTMR6 A	GACCAAAAGAAGUACUUAAtt	AMBION	s17377
MTMR6 B	GACAACUAUUCCAUAUUAtt	AMBION	s17378
MTMR8 A	CCCAGUCCUAGACUGUAUtt	AMBION	s31079
MTMR8 B	CCAUAACUGUUGUGAGAUUtt	AMBION	s31078
MTMR8 C	GGCAAUUAAUGGAACAGUtt	AMBION	s31077

3.4.Protilátky

Tabulka 5: Primární protilátky

Název	Výrobce	Katalogové číslo	Ředění pro western blot	Ředění pro mikroskopii
Anti-GFP	Roche	11814460001	1:4000/1:2000	-
Anti-Myc (9E10)	Exbio	11-433-C100	1:2000	-
MTMR9 polyclonal Antibody	Thermo Fisher Scientific	PA5-21901	1:1000	-
GAPDH Antibody	Santa Cruz	sc-365062	1:1000	-
Anti- α -Tubulin (DM1A)	Sigma-Aldrich	T9026	1:10000	-
LAMP-1 (D4O1S)	Cell Signaling	15665	-	1:300
Rab5 (C8B1)	Cell Signaling	3547	-	1:300

Tabulka 6: Sekundární protilátky

Název	Výrobce	Katalogové číslo	Ředění pro western blot	Ředění pro mikroskopii
GAR-HRP	Jackson Immunores./Spinchem	111-035-045	1:10000	-
GAM-HRP	Jackson Immunores./Spinchem	115-035-146	1:10000	-
DAM/Cy5	Jackson Immunores./Spinchem	715-175-150	-	1:400
GAR/A405	Jackson Immunores./Spinchem	111-475-003	-	1:400

3.5.Práce s buněčnými kulturami

Lidské buněčné linie HeLa, hTERT-RPE-1 a Platinum-A buňky byly kultivovány v Dulbeccově modifikovaném Eagleově médium (DMEM; Thermo Fisher Scientific) s 10% fetálním bovinním sérem (FBS) (Gibco) a 1% penicilin/streptomycin (Biowest) (DMEM+/+). Pro některé experimenty bylo kromě DMEM +/+ využito i bezsérové DMEM -/-, nebo EBSS (Earleův vyvážený solný roztok, Thermo Fisher Scientific).

Adherentní buněčné linie byly kultivovány v termostatu u při 37 °C a 5 % CO₂ na kultivačních miskách. Pro deadhezi buněk při pasážování, zamrazování, či nasazování byl používán 1x trypsin/EDTA (0,05% trypsin, 0,02% EDTA; Thermo Fisher Scientific) ve fyziologickém roztoku PBS (fosfátový pufr; Thermo Fisher Scientific).

Za účelem dlouhodobého uchování buněk byly zamrazovány ve vhodném kryoprotektivním médiu. Buněčná suspenze byla centrifugována (5 min, 260 g), supernatant odstraněn a buňky resuspendovány v kultivačním médiu s 10 % DMSO (Dimetylsulfoxid; Sigma-Aldrich). Po rozdělení do kryozkumavek byly vzorky pomalu zmrazeny v isopropanolové nádobě při -80 °C a následně přeneseny do tekutého dusíku. Při opětovném rozmrazení buněk byl příslušný alikvot zamražené buněčné suspenze ponechán roztát a urychleně byl přenesen do falkony s DMEM. Po následné centrifugaci a odsátí supernatantu byla peleta buněk resuspendována v 5 ml kompletního média.

3.6. Příprava vektorů pro tvorbu knockout (KO) buněčných linií metodami genetického klonování

Za účelem selekce knockout (KO) linií hTERT-RPE-1 byla provedena modifikace plazmidu pSpCas9(BB)-2A-Puro nahrazením genu pro puromycinovou rezistenci genem pro rezistenci na blasticidin (Bsd). Důvodem bylo, že buňky hTERT-RPE-1 již obsahovaly puromycinovou rezistenci a selekce na puromycin by tedy nebyla efektivní. Celkem bylo vygenerováno šest vektorů pSpCas9(BB)-2A-Bsd, každý obsahující jednu ze dvou navržených gRNA (sg1 nebo sg2) cílících na společné exony genů MTMR9, MTMR6 nebo MTMR8 (Tab. 2).

3.6.1. PCR amplifikace genu pro Bsd rezistenci a klonování do pSpCas9(BB)-2A-Puro
Gen pro Bsd rezistenci byl amplifikován z vektoru pMXs-EF1-Bsd pomocí PCR (polymerázové řetězové reakce) s navrženými primery (Tab. 3) a polymerázou Phusion (Thermo Fisher Scientific). Denaturační krok byl proveden při 95 °C, elongace při 72 °C 20 s. Produkty PCR byly čistěny a ověřeny agarózovou gelovou elektroforézou (Ethidium bromid i agaróza od Sigma-Aldrich) s 1% gelem připraveným z 1x TAE pufru (Tris-acetát-EDTA pufr). Pro identifikaci velikosti produktů byl použit GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Izolace DNA (deoxyribonukleové kyseliny) probíhala za využití GeneJET Gel Extraction Kitu (Thermo Fisher Scientific).

Amplifikovaný Bsd fragment a vektory pSpCas9(BB)-2A-Puro byly štěpeny restriční endonukleázou FastDigest™ EcoRI (Thermo Fisher Scientific). Pro zamezení samoligace byly štěpené vektory defosforylovány fosfatázou SAP („Shrimp Alkaline Phosphatase“; Thermo Fisher Scientific). Pro identifikaci naštěpených vektorů byla provedena agarózová gelová elektroforéza a izolace DNA z gelu. Fragменты byly ligovány přes noc pomocí T4 DNA ligázy (Thermo Fisher Scientific).

3.6.2. Transformace bakterií, izolace plasmidové DNA a screening

Pro množení plasmidů byl použit kmen kompetentních *E. Coli* DH5 α , který byl kultivován ve standardním LB („lysogeny broth“) médiu. Ligované konstrukty byly transformovány do DH5 α bakterií pomocí teplotním šoku a nanесeny na LB agarové (Difco) plotny s ampicilinem (Roth; 100 μ g/ml).

Pro ověření integrace Bsd fragmentu byla provedena „colony PCR“ z lyzátů bakteriálních kolonií pomocí primerů Bsd_Seq_F a Bsd_EcoRI_R za použití polymeráz PFU/TAQ. Denaturační krok byl proveden při 95 °C, elongace při 72 °C 20 s. Detekce PCR produktů na 1% agarózový gelu z 1x TBE pufru (Tris-borát-EDTA pufr) umožnila následnou identifikaci pozitivních kolonií nesoucích gen zájmu. Pozitivní kolonie byly kultivovány v tekutém LB médiu s ampicilinem. Byl zhotoven miniprep či midiprep podle protokolu komerčních souprav GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) nebo Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen). Získaná plasmidová DNA byla kvantifikována pomocí spektrofotometru. Následovala sekvenace vybraných plasmidů za účelem ověření správné integrace genu pro blastidicinovou rezistenci do vektorů.

3.7. Příprava knockout (KO) buněčných linií

hTERT-RPE-1 buňky byly transfekovány dvojicemi vektorů pSpCas9(BB)-2A-Bsd nesoucími dvě navržené sgRNA (sg1 a sg2) pro příslušný MTMR (Tab. 2).

Pro každý cílový gen byla připravena transfekční směs obsahující 1 μ g vektorů (sg1 a sg2 v poměru 1:1) a 1,5 μ l lipofekčního činidla X-tremeGENE™ Transfection Reagent (Sigma-Aldrich) na jeden ml média s buňkami. Den po transfekci byl přidán blastidicin (5 μ g/ml). Selektivní kultivace trvala 1-2 týdny se 1-2 výměnami média.

Buňky byly po selekci deadherovány a část byla zamrazena. Zbýlé množství buněk bylo spočítáno a vyředěno odpovídajícím množstvím kultivačního média tak, aby buňky byly kultivovány samostatně po jedné a dali vzniknout klonům vhodným pro hledání KO linie. Zhruba po 3-4 týdnech byly klony dostatečně narostlé pro následné testování.

3.8. Testování knockout buněčných linií

3.8.1. Imunoblotování

Potenciální knockout klony buněčné linie pro MTMR9 byly hledány pomocí imunoblotování. Zvolené „single-cell“ kolonie byly sklizeny a centrifugovány (260g, 5 min, 4°C). Po odlytí supernatantu byly vzorky smíchány s Laemmliho lyačním pufrem (odpovídající 1 mil. buněk/100 μ l 2x pufru). Vzorky byly

sonikovány (UP100H, Hielscher), následně denaturovány při 95 °C po dobu 5 minut a skladovány při -80 °C.

K rozdělení proteinů vzorků byla použita SDS-PAGE elektroforéza s 10% gelem. Pro určení velikosti proteinů byl použit PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa (Thermo Fisher Scientific). Pro přenesení proteinů na nitrocelulózovou membránu bylo prováděno polosuché nebo mokré blotování. Po blokování membrány 5% mlékem (Roth) v TBST (45min) byla inkubována s primární protilátkou proti MTMR9 (Tab. 5) přes noc při 4 °C. K detekci signálu byla využita sekundární protilátka GAR-HRP a Immobilon® ECL Ultra Western HRP Substrate (EMD Millipore).

3.8.2. Genomová PCR

Vzhledem k nespecifickému barvení MTMR9 protilátek a absenci kvalitních protilátek pro MTMR6 a MTMR8 byla validace KO klonů provedena PCR z genomové DNA cílící na hypoteticky deletované exony. Buňky byly lyzovány v 30 mM Tris-HCl (pH 8; 100 µl na 0,5 milionu buněk) obsahujícím 2 µl 20 mM proteinkinázy K. Inkubace probíhala přes noc a následně byla proteináza K inaktivována zahřátím na 95 °C (10 min). Po zchlazení na pokojovou teplotu byl lyzát použit jako templát pro PCR (1 µl reakční směsi na reakci). Amplifikace DNA byla provedena pomocí polymerázy PFU a primerů navržených do blízkosti místa štěpení Cas9 (Tab. 3). Produkty byly separovány elektroforézou na 3-4% agarózovém gelu z TBE pufru.

3.9. Příprava retrovirálních vektorů pro tvorbu buněčných linií stabilně exprimující značené MTMRs

Pro přípravu vektorů pMXs-puro_MTMR6-EGFP a pMXs-puro_MTMR8-EGFP bylo nezbytné vložit hMTMR6/8-EGFP gen do vektoru pMXs-Puro (Cell Biolabs, Inc.). Vektory pMXs-Puro_EGFP a pMXs-Puro_MTMR9-EGFP byly již zhotoveny. hMTMR6/8-EGFP sekvence byly získány z vektorů hMTMR6/8-pEGFP_N3 metodou PCR popsanou v kapitole 3.6.1. Pro PCR byly využity primery MTMR6/8-EGFP_PacI_F a EGFP_stop_XhoI_R.

Pro štěpení PCR produktů i pMXs-Puro vektoru byly využity restriktázy FastDigest™ XhoI a PacI (Thermo Fisher Scientific). Vlastní štěpení i ligace probíhali ve stejných podmínkách jako je popsáno výše. Pro prvotní identifikaci bylo využito štěpení ligovaných vektorů s PCR produktem FastDigest™ BamHI a HindIII restriktčními endonukleázami (Thermo Fisher Scientific). Potenciálně ligované vektory byly poslány na sekvenaci pomocí primeru pMX_FW_SEQ.

3.10. Příprava buněčných linií stabilně nadprodukcující MTMRs

Pro přípravu buněčných linií RPE-1, které stabilně exprimují EGFP (zesílený zelený fluorescenční protein) nebo fúzní proteiny MTMR9/6/8-EGFP byla využita retrovirální transdukce. Pro tvorbu retrovirálních částic s příslušnými vektory byla použita pakážovací buněčná linie Platinum-A. Celý proces retrovirální transdukce probíhal dle pravidel práce s viry v laminárním boxu přizpůsobenému úrovni biologické bezpečnosti BSL2 (Biosafety Level 2).

3.10.1. Transdukce

Buňky Platinum-A byly nasazeny do 6jamkových destiček a transfekovány vektory pMXs-puro_EGFP, pMXs-puro_MTMR9-EGFP, pMXs-puro_MTMR6-EGFP nebo pMXs-puro_MTMR8-EGFP pomocí X-tremeGENE™ Transfection Reagent podle optimalizovaného protokolu výrobce.

Po 72 hodinách byla média obsahující retrovirální částice odebrána, centrifugována (500 g, 10 min, 4 °C) a supernatant byl přenesen do nových Falcon zkumavek. Pro koncentraci virionů byl přidán Retro-X™ Concentrator (Takara Bio) v poměru 1:3 a směs byla inkubována 24 h při 4 °C. Vzorky byly následně centrifugovány (1500 g, 45 min, 4 °C) a získané pelety byly resuspendovány v 0,9 ml DMEM. Pro zvýšení účinnosti transdukce bylo k suspenzi přidáno transfekční činidlo Polybrene Infection/Transfection Reagent (Milipore Corps; 1:2000).

RPE-1 buňky nasazené do 6jamkových destiček byly po odstranění média inkubovány s připraveným transdukčním médiem obsahujícím retrovirální částice a Polybrene po dobu 24 h. Platinum-A buňkám bylo opět odebráno médium, které bylo uloženo při 4 °C bez koncentrace. Z důvodu zvýšení efektivity transdukce byla následující den aplikace transdukčního média na RPE-1 buňky opakována. Po 24 h bylo transdukční médium odstraněno a buňky byly přesazeny.

Selekce EGFP pozitivních populací RPE-1 buněk probíhala pomocí průtokové cytometrie na přístroji MA900 Multi-Application Cell Sorter (Sony Biotechnology) v Laboratoři cytometrie. Buňky byly před sortováním sklizeny, resuspendovány do PBS/10% FBS a udržovány na ledu. Sortované buňky byly sbírány do kompletního média.

3.11. Knockdown (KD) MTMR9, MTMR8 a MTMR6 u RPE-1

Za účelem snížení exprese (tzv. knockdown) MTMR9, MTMR8 nebo MTMR6 byla do RPE-1 buněk transfekována patřičná siRNA (Tab. 4). Oligofekce siRNA byla provedena u RPE-1 „wild type“ (WT), RPE-1 stabilně exprimujících MTMR9/8/6-EGFP a u RPE-1 tranzientně transfekovaných pcDNA4/TO/myc-His A-MTMR9/8/6. Buňky exprimující fúzní MTMR9/8/6 s EGFP nebo s myc-His byly využity pro ověření účinnosti knockdownu prostřednictvím imunoblotování. U RPE-1 transfekovaných

pcDNA4/TO/myc-His A-MTMR9/8/6 byla oligofekce provedena 48 hod po transfekci. Knockdown MTMRs u RPE-1 WT buněk byl prováděn pro měření příjmu makropinocytárního nákladu.

Oligofekce byla provedena pomocí Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific) při konečné koncentraci 5 nM siRNA. Pro knockdown MTMR9 byla použita jedna siRNA, zatímco pro MTMR6 a MTMR8 byly použity kombinace dvou, respektive tří siRNA. Buňky byly kultivovány po dobu 48-72 hod od oligofekce a následně analyzovány. Pro tvorbu negativních kontrol byla použita nespecifická siRNA.

RPE-1 stabilně exprimující MTMR9/8/6-EGFP a RPE-1 transfekované pcDNA4/TO/myc-His A-MTMR9/8/6 byly po inkubaci promyty v PBS a lyzovány v Laemmliho pufru. Po následném zmražení (-80 °C, 5 min) byly lyzáty sklizeny do mikrozkušavek, sonikovány a povařeny. Pro ověření snížení exprese proteinů byla provedena SDS-PAGE elektroforéza (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného) na 10% gelu. Postup imunoblotování byl shodný s výše popsaným. Jako primární protilátky byly použity Anti-GFP či Anti-Myc (9E10), viz tabulka (Tab. 5). Pro srovnání proteinového zatížení („loadu“) mezi vzorky byl barven α -tubulin primární protilátkou Anti- α -Tubulin (DM1A).

3.11.1. Kvantifikace relativní exprese MTMRs

Pro kvantifikaci účinnosti siRNA byla použita analýza intenzity bandů v softwaru Fiji (ImageJ; verze 2.16.0). Intenzita signálu příslušných MTMRs v jednotlivých bandech western blotu byla vydělena intenzitou odpovídajícího kontrolního proteinu (α -tubulin). Tento poměr vyjadřuje relativní expresi cílového MTMR. Následně byl vytvořen poměr nespecifické kontrolní siRNA (ns) vůči specifické siRNA (siRNA) pro každou variantu MTMR. Tento poměr vyjadřuje míru potlačení exprese cílového proteinu (ns/siRNA).

3.12. Měření makropinocytózy průtokovou cytometrií (FACS)

U buněčných linií HeLa WT nebo KO MTMRs, RPE-1 s kontrolním KD nebo KD MTMRs a RPE-1 stabilně produkujícími EGFP nebo MTMRs-EGFP byla makropinocytóza analyzována pomocí průtokové cytometrie. Buňky byly kultivovány v DMEM+/+, DMEM-/-, či EBSS médiu po vybranou dobu (15 min-15 h) podle experimentálního designu. Pro sledování příjmu makropinocytárního nákladu byl do příslušného kultivačního média přidáván dextran s průměrnou hmotností 40 kDa konjugovaný s fluorescenčními barvivy FITC nebo TRITC (Fluorescein isothiokyanát (FITC)-dextran, Tetramethylrhodamin isothiokyanát (TRITC)-dextran; Sigma-Aldrich) v konečné koncentraci 1 μ g/ml. V některých experimentech byl k RPE-1 buňkám přidáván růstový faktor HGF (HumanKine® recombinant human Hepatocyte growth factor; proteintech; 10-50 ng/ml), či inhibitor makropinocytózy EIPA

(5-(N-ethyl-N-isopropyl)amilorid; MedChemEx; 25-50 μM). Inkubace s těmito látkami započala 30 minut před přidáním dextranu.

Po inkubaci byly buňky promyty, ztrypsinizovány a převedeny do 1,5 ml mikrozkušavek. Vzorky byly centrifugovány (260 g, 5 min, 4 °C), pelety dvakrát promyty ve FACS pufru (1x PBS, 0,6% BSA (bovine serum albumine; Sigma Aldrich) 0,1% NaN_3 (azid sodný; Sigma-Aldrich)). Následně byly buněčné pelety resuspendovány ve 100 μl FACS pufru s Hoechst 33258 (Thermo Fisher Scientific) v koncentraci 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pro vyhodnocení viability buněk.

Vzorky byly měřeny na průtokovém cytometru BC CytoFLEX (Beckman Coulter) a užitím laserů 405 nm (Hoechst 33258), 488 nm (FITC, GFP) a 561 nm (TRITC). Detekce signálů probíhala pomocí emisních filtrů BP 450/45 (Hoechst 33258), BP 525/40 (FITC, GFP) a BP 585/42 (TRITC). Data byla zpracována pomocí softwaru CytExpert (verze 2.4, Beckman Coulter).

3.12.1. Gating strategie

Pro analýzu dat z průtokové cytometrií byla použita gating strategie zahrnující úvodní selekci jednotlivých buněk na základě rozptylových parametrů (FSC-A vs. SSC-A) a následné odstranění doubletů (FSC-H vs. FSC-A). Živé buňky byly vybrány na základě barvení Hoechst 33258. Fluorescenční signál FITC-dextranu byl detekován v kanálu B1-A (ex. 488 nm / em. 525/40 nm), TRITC-dextranu v kanálu G1-A (ex. 561 nm / em. 585/42 nm). V experimentech s RPE1 buňkami stabilně exprimujícími MTMRs-eGFP byly GFP-pozitivní buňky vybrány zvlášť podle intenzity v kanálu B1-A.

3.13. Mikroskopie živých buněk

Světelná i fluorescenční mikroskopie byla použita pro analýzu buněk RPE1 WT a RPE1 stabilně nebo tranzientně exprimující EGFP, fúzní MTMRs s EGFP a Rac1G12V s EGFP. Pro kvantitativní měření příjmu dextranu byly buňky kultivovány stejným postupem, jako je popsáno u průtokové cytometrie. Buňky byly kultivovány na 35 mm miskách se skleněným dnem v DMEM+/+ nebo DMEM-/-.

Obrazová data byla získávána pomocí konfokálního mikroskopu Leica TCS SP8 (Leica Microsystems) s imerzním objektivem HC PL APO 63x/1.4 Oil. Pro světelnou mikroskopii, sledování buněk v širokém zorném poli a kvantitativní měření makropinocytózy byl použit inverzní („widefield“) mikroskop Nikon Eclipse Ti2 s imerzním objektivem Plan Apo delta 60x Oil DIC N2 a s odpovídajícími fluorescenčními filtry pro Hoest 33258, GFP a TRITC. Snímání živých buněk bylo prováděno za podmínek 37 °C a 5 % CO_2 pomocí komorového systému (Okolab Bold Line).

Ke kvantitativnímu měření na mikroskopu byly použity RPE-1 exprimující EGFP nebo fúzní EGFP s MTMR9/8/6 po kultivaci s TRITC-dextranem. Snímání probíhalo v jedné rovině ostrosti za využití PFS

(Perfect Focus System). Každý snímek byl nasnímán v 16bitovém rozlišení a byl zhotoven jako plachta o velikosti 5x5 s překryvem snímků 15 %.

Před vlastní analýzou ve FIJI (ImageJ; verze 2.16.0) proběhla dekonvoluce snímků v softwaru Hyugens professional (Scientific Volume Imaging). V červeném kanálu (TRITC-dextran) byl aplikován mediánový filtr (poloměr 1,0 pixel) a automatický práh Triangle. Pro optimalizaci prahování byly intenzity obrazu lineárně přeškálovány na dynamický rozsah odpovídající 15bit obrazu. Tento krok, aplikovaný konzistentně na všechny snímky, zlepšil účinnost algoritmu Triangle, který v původním 16bit rozsahu často nastavoval práh příliš vysoko a opomíjel slabší signály odpovídající TRITC-dextran pozitivním váčkům. Po odstranění buněk mimo zorné pole a artefaktů byly analyzovány partikule větší než 200 nm pomocí funkce *Analyze Particles*.

4. Výsledky

4.1. Snížení produkce MTMR9, MTMR6 a MTMR8 v RPE-1 linií

4.1.1. Generování knockout RPE-1 linií pro MTMRs

Za účelem objasnění role MTMR9, MTMR6 a MTMR8 byla navržena strategie pro generování buněčných linií RPE-1 s deletovanými myotubulariny pomocí systému CRISPR/Cas9. Stejný přístup byl již dříve úspěšně použit k vytvoření knockout linií v buňkách HeLa.

Strategie využívala vektory pSpCas9(BB)-2A-Puro, které nesou sgRNA cílené do transkripčně aktivních oblastí příslušných genů: u MTMR9 do exonu 6 (5'-AACACATAACATGGACCGATGG-3' a 5'-CCTAGCGGCTCAGTGCATCGAC-3'; vzdálenost 62 bp), u MTMR8 do exonu 3 (5'-CCACTGTGGAGAAGTTACCCATC-3' a 5'-CCACTGTGGAGAAGTTACCCATC-3'; vzdálenost 26 bp), a u MTMR6 do exonu 4 (5'-ATTCAGAACGAC TACAAGGCTGG-3' a 5'-ATCTCGCTGAGGAATATAAGAGG-3'; vzdálenost 10 bp). Vybrané exony zaručují případnou delecí všech izoform myotubularinů.

Protože hTERT-RPE-1 obsahovaly gen pro rezistenci vůči puromycinu (Puro), bylo potřeba ve vektorech pSpCas9(BB)-2A-Puro vyměnit tuto selekční značku za rezistenci vůči blastidinu (Bsd). Metodami genetického klonování bylo úspěšně vytvořeno všech šest pSpCas9(BB)-2A-Bsd vektorů (Tab. 2).

Po transfekci těchto vektorů do RPE-1 a selekci blastidinem (5µg/ml) byly izolovány jednotlivé klony. Kvůli nespecifickému barvení protilátek proti MTMR9 a absenci komerčně dostupných protilátek proti MTMR6 a MTMR8 byla k prvotnímu testu klonů použita PCR genomové DNA a gelová elektroforéza s 3-4% agarózovým gelem. Účinnost knockoutu byla u vybraných klonů vyhodnocena pomocí sekvenování PCR produktů z genomové DNA v oblasti zasažených exonů. Všechny testované klony však vykazovaly „wild-type“ sekvence cílových genů bez známek mutací. Z těchto výsledků vyplývá, že

použitá CRISPR/Cas9 strategie není vhodná pro generování knockout linií MTMR9, MTMR6 a MTMR8 v RPE-1 buňkách, přestože byla úspěšně aplikována v HeLa.

4.1.2. Generování knockdown RPE-1 linií pro MTMRs

V důsledku neúspěšného generování knockout buněčných linií RPE-1 byla exprese cílových proteinů snížena pomocí siRNA. Byly použity komerčně dostupné siRNA uvedeny v tabulce (Tab. 4).

Účinnost jednotlivých siRNA byla nejprve testována v RPE-1 buňkách transientně exprimujících fúzní MTMR9/8/6 s myc-His značkou (z vektorů pcDNA4/TO/myc-His A-MTMR9/8/6). Oligofekce MTMR9 cílené siRNA a kombinace dvou siRNA proti MTMR6 vedly k výraznému snížení hladin příslušných proteinů. Naproti tomu žádná z testovaných siRNA pro MTMR8, ani jejich kombinace, nevedla k efektivnímu snížení exprese proteinu (Fig. 1A, B).

Účinnost siRNA byla dále ověřována na RPE-1 stabilně exprimujících MTMR9/8/6-EGFP paralelně s experimenty na průtokovém cytometru. Výsledky byly konzistentní s předchozími a na jejich základě byly pro následující funkční studie vybrány pouze siRNA cílené na MTMR9 a MTMR6 (Fig. 1C, D).

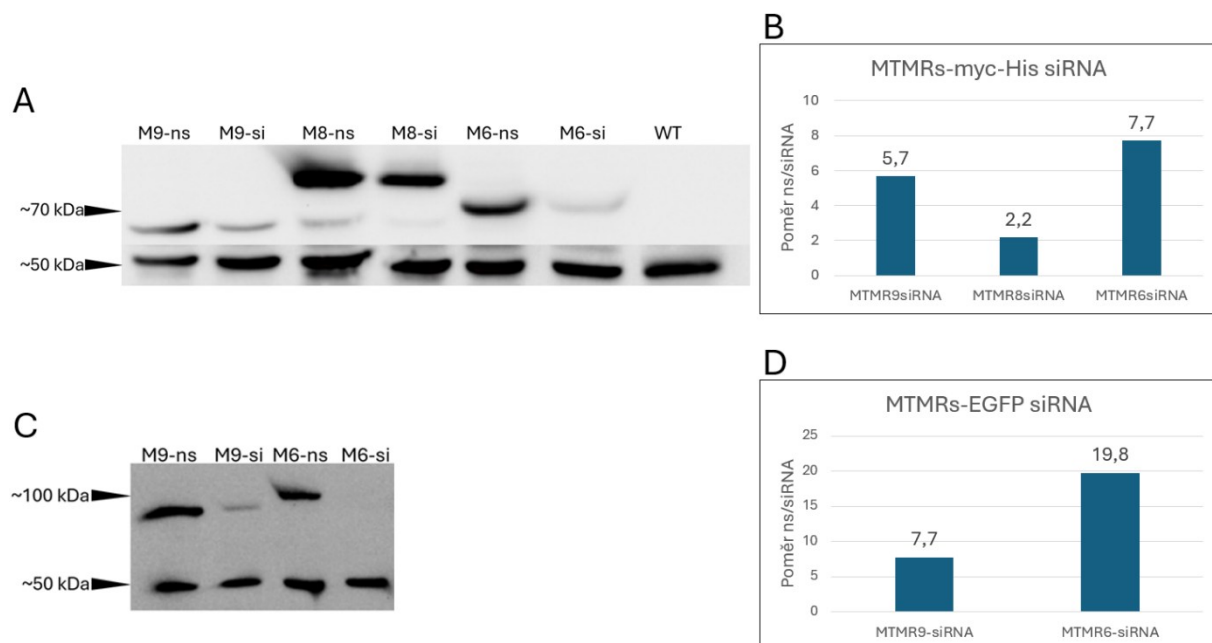


Figura 1: Účinnost siRNA pro MTMR9, MTMR6 a MTMR8 v RPE-1 buňkách. (A) Imunoblot RPE-1 buněk transientně exprimujících MTMR9/8/6-myc-His (~70 kDa). **(C)** Imunoblot RPE-1 stabilně exprimujících MTMR9/6-EGFP (~100 kDa). Buňky byly oligofekovány siRNA cílenými proti příslušným myotubularinům (M9/8/6-si), jako negativní kontroly byly použity buňky ošetřené nespecifickou siRNA (M9/8/6-ns). WT představují netransfekované RPE-1 sloužící jako negativní kontrola transfekce. Detekce cílových proteinů proběhla pomocí protilátek Anti-Myc a Anti-GFP. Jako kontrola nanášení lyzátu do gelu byl

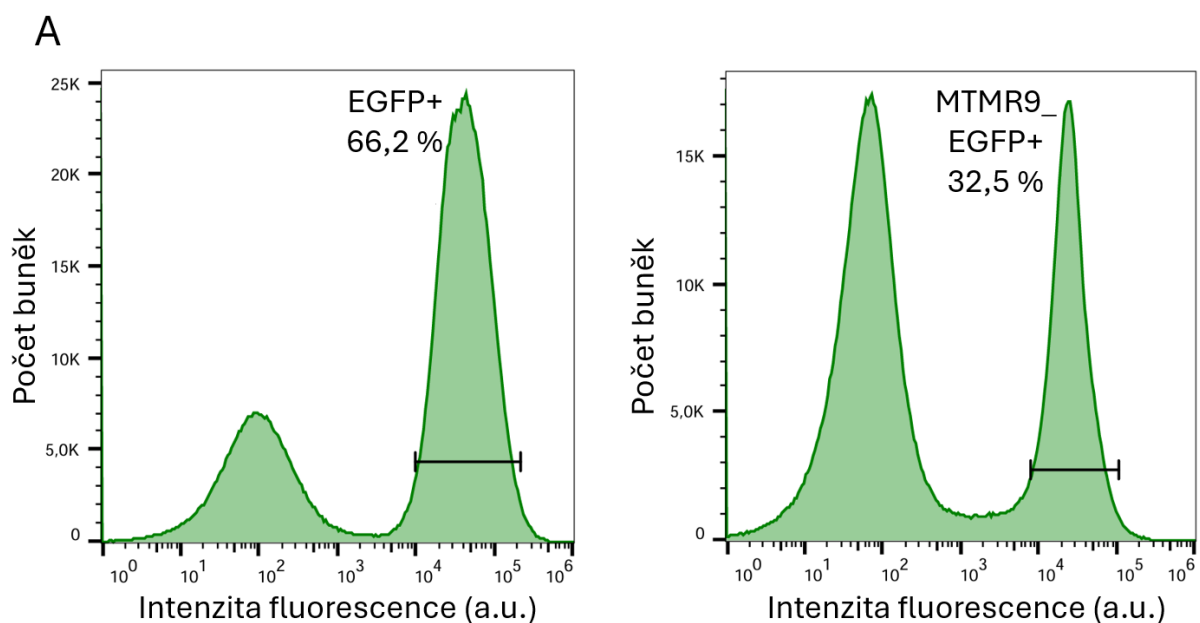
použit α -tubulin (~50 kDa). **(B, D)** Kvantifikace účinnosti siRNA. Intenzita cílového proteinu byla normalizována na α -tubulin a vyjádřena jako poměr mezi nespecifickou a specifickou siRNA (ns/siRNA).

4.2. Vytvoření RPE1 linií nadprodukcující MTMRs

Vedle buněk se sníženou expresí studovaných MTMRs bylo cílem vytvoření RPE-1 linií stabilně exprimující značené myotubulariny ve zvýšené míře. Pro současné sledování subcelulární lokalizace MTMRs v živých buňkách byly připraveny retrovirální vektory pMXs-puro umožňující expresi fúzních proteinů MTMR9-EGFP, MTMR6-EGFP a MTMR8-EGFP. Jako negativní kontrola sloužila linie RPE-1 stabilně exprimující samotný EGFP (pMXs-puro_EGFP).

Retrovirální transdukce byla provedena s využitím buněčné linie Platinum-A jako zdroje virových částic. Pro maximální účinnost transdukce bylo virové médium aplikováno na RPE-1 buňky opětovně, což vedlo k úspěšnému získání buněk stabilně exprimujících EGFP a MTMR9-EGFP. U vektorů pMXs-puro_MTMR6-EGFP a pMXs-puro_MTMR8-EGFP byla účinnost transdukce nižší; u MTMR6-EGFP se projevila nízká míra transdukce a u MTMR8-EGFP navíc neživotaschopnost transdukovaných buněk. Pro získání vhodných EGFP pozitivních populací bylo nutné tyto linie generovat opakovaně.

Selekce EGFP pozitivních populací buněk byla provedena sortováním pomocí průtokového cytometru. Výsledky ze sortování odhalily úspěšnost transdukci, která byla nejvíce účinná při použití vektoru pMXs-puro_EGFP. Naopak transdukce vektorem pMXs-puro_MTMR8-EGFP, obsahující nejdelší otevřený čtecí rámec, byla efektivní nejméně (Fig. 2A). Retrovirální transdukce tak představuje účinný nástroj pro generování RPE-1 linií s nadprodukcí MTMRs. Výsledky však naznačily, že velikost vkládané DNA může výrazně ovlivnit účinnost transdukce.



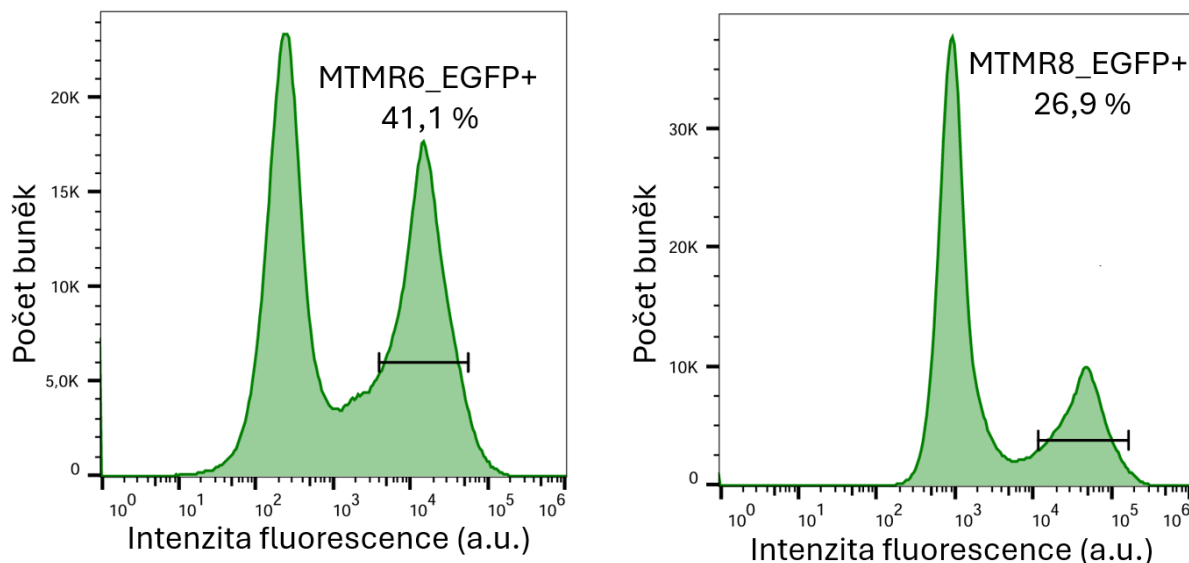


Figura 2: (A) Selektce RPE-1 EGFP pozitivních populací sortováním pomocí průtokového cytometru. Histogramy znázorňují podíl EGFP pozitivních a negativních buněk po retrovirální transdukcí vektorů *pMXs-puro_EGFP*, *pMXs-puro_MTMR9-EGFP*, *pMXs-puro_MTMR6-EGFP* a *pMXs-puro_MTMR8-EGFP*. V histogramech je vyznačena brána („gate“) EGFP pozitivní populace s jejich procentuálním zastoupením. Nejvyšší podíl EGFP pozitivních buněk byl zaznamenána u vektoru *pMXs-puro_EGFP*, zatímco transdukce vektorem *pMXs-puro_MTMR8-EGFP* vedla k nejnižšímu zastoupení EGFP pozitivních buněk.

4.3. Příjem dextranu u HeLa KO buněk

Před finálním zhotovením RPE-1 linií s dysregulovanými MTMR9, MTMR6 a MTMR8 byly jako modelový systém pro optimalizaci metodiky měření příjmu FITC-dextranu pomocí průtokové cytometrie použity HeLa buňky. Tato linie byla zvolena pro svou snadnou kultivaci a dostupnost již vytvořených MTMRs knockout variant. Experimenty na HeLa buňkách zároveň sloužily k získání praktických zkušeností s průtokovou cytometrií, která byla autorem práce použita poprvé.

Je však třeba poznamenat, že HeLa buňky nejsou pro studium makropinocytózy ideální model. Za využití světelné mikroskopie byla u této linie patrná méně dynamická membránová zvlnění bez výrazných protruzí a tvorby charakteristických makropinozomů. Příjem dextranu těmito buňkami pravděpodobně probíhal převážně mikropinocytickými cestami. Výsledky získané na HeLa buňkách přesto vhodně posloužily k metodické optimalizaci a orientačnímu měření příjmu FITC-dextranu.

Kontrolní HeLa buňky a linie s deletovanými MTMR9, MTMR8 a MTMR6 byly kultivovány 2 hodiny s FITC-dextranem ve finální koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$. Kultivace probíhala ve standardním DMEM+/+ médiu, nebo v podmínkách hladovění v EBSS médiu. V kompletním médiu bylo pozorováno signifikantní snížení příjmu FITC-dextranu u buněk s deletovaným MTMR6 nebo MTMR9 (Fig. 3A). Hladovění v EBSS

zvýšilo celkový příjem FITC-dextranu do buněk, avšak rozdíl mezi WT a MTMR6 knockout liniemi se v těchto podmínkách výrazně nezměnil. Naproti tomu u MTMR9 knockout linie došlo při hladovění k výraznějšímu snížení příjmu FITC-dextranu ve srovnání s kontrolními buňkami (Fig. 3B). Tyto výsledky naznačují, že ztráta MTMR6 a MTMR9 ovlivňuje internalizaci FITC-dextranu v HeLa buňkách. Jedná se o kompletní příjem dextranu všemi možnými způsoby, přičemž není rozlišováno, zda je náklad internalizován makropinocyticky či jinými endocytárními cestami.

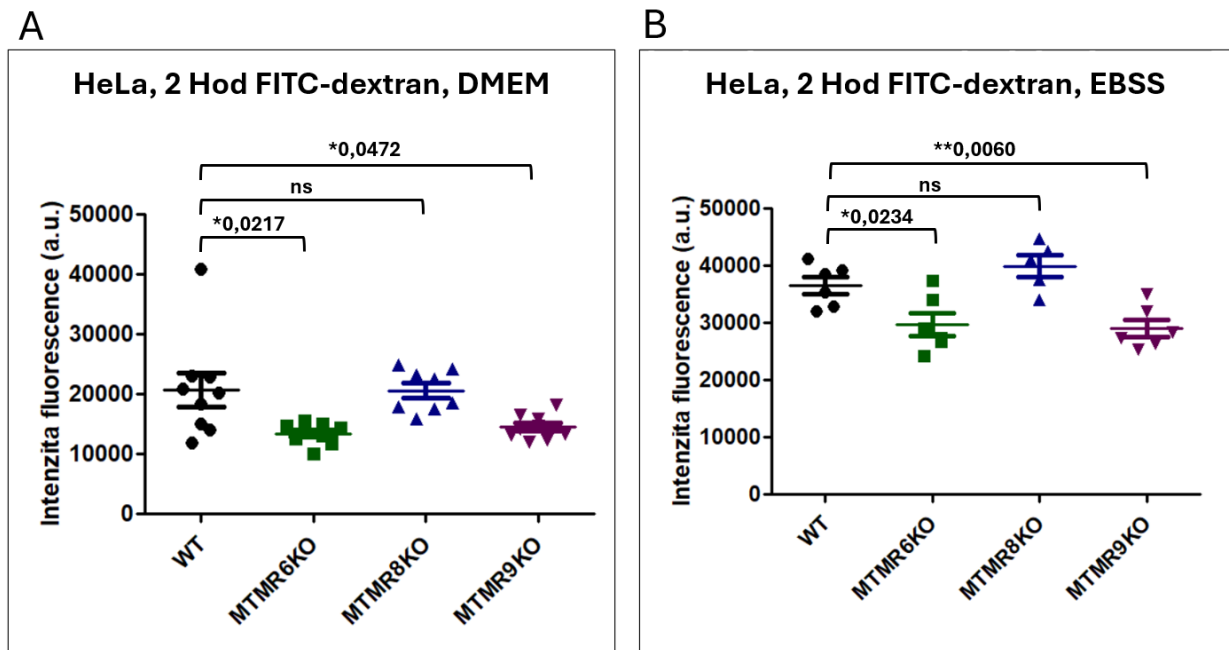


Figura 3: HeLa WT a HeLa s deletovanými MTMR9, MTMR8 a MTMR6 (MTMR6/8/9KO) byly testovány na příjem FITC-dextranu. Buňky byly kultivovány v (A) DMEM+/+ nebo (B) EBSS s FITC-dextranem po dobu 2 hodin. Intenzita fluorescence byla měřena průtokovou cytometrií a vyjádřena jako medián signálu z 10 000 živých buněk po odečtení autofluorescence (negativní kontrola; buňky bez FITC-dextranu). Každý bod reprezentuje jedno biologické opakování. Statistická významnost byla vyhodnocena oboustranným nepárovým t testem; výsledky s $p < 0,05$ byly považovány za signifikantní (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

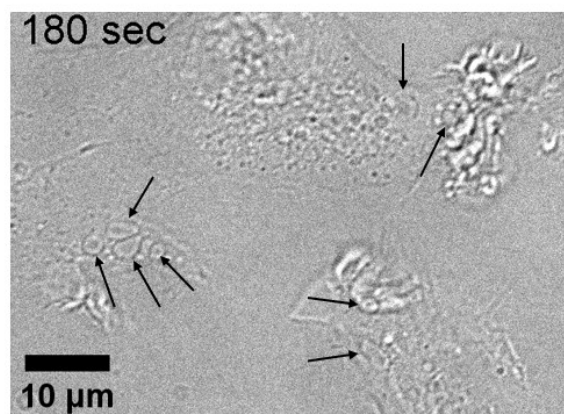
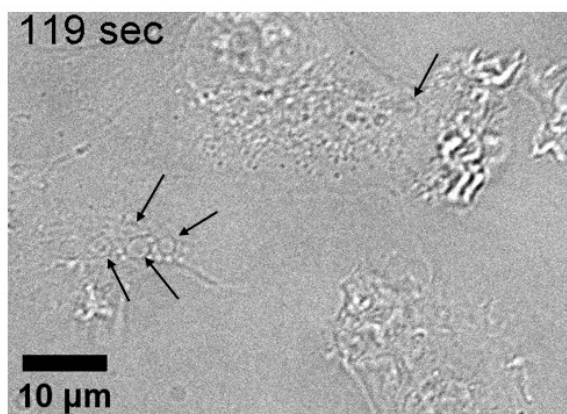
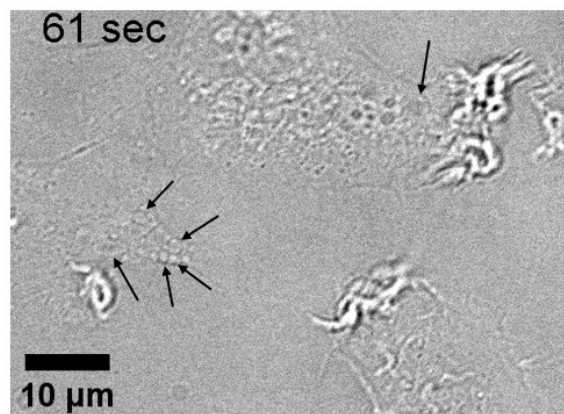
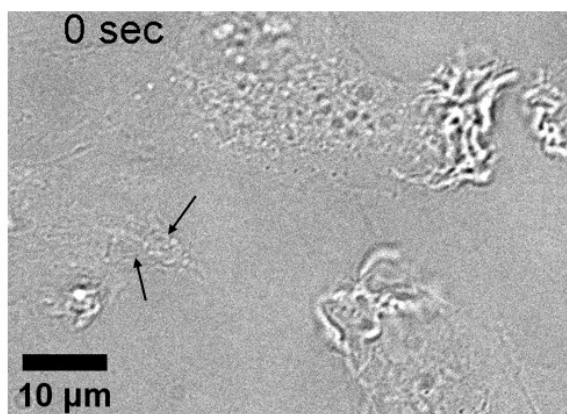
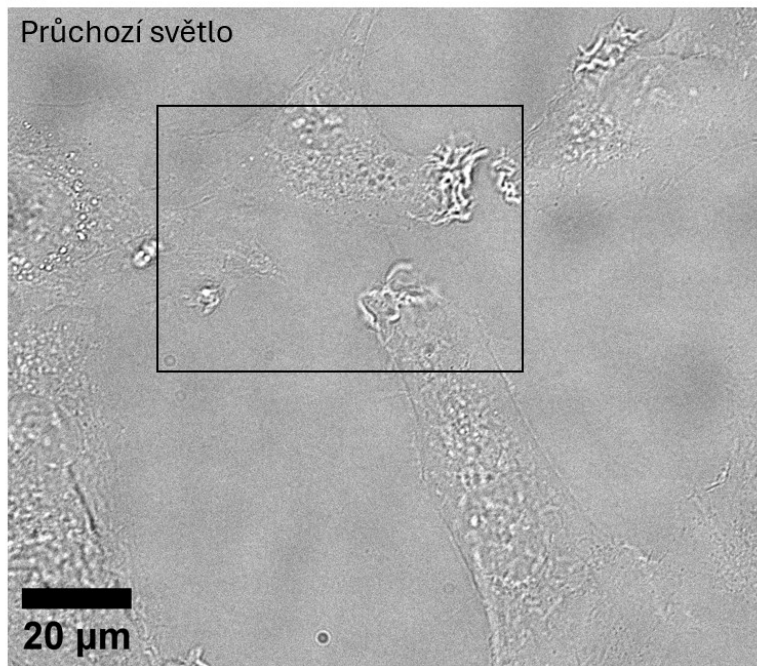
4.4. RPE1 mají vysoce dynamickou cytoplazmatickou membránu

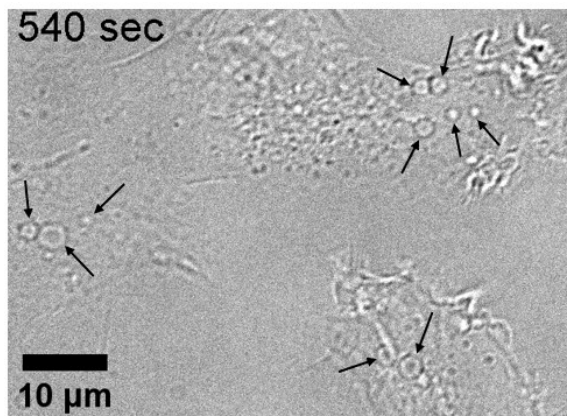
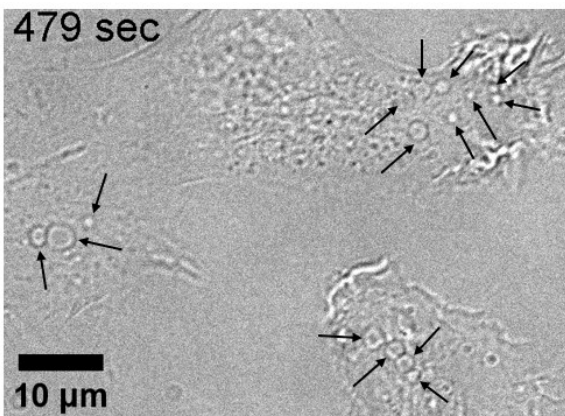
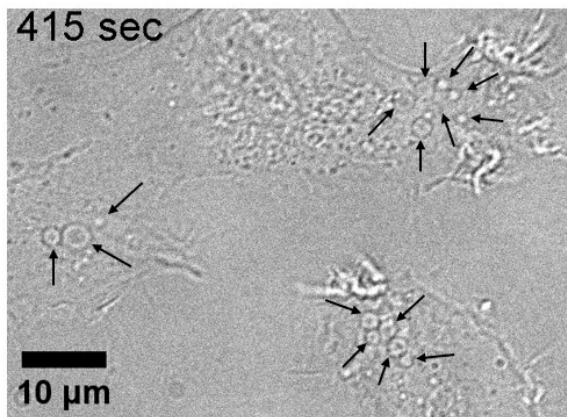
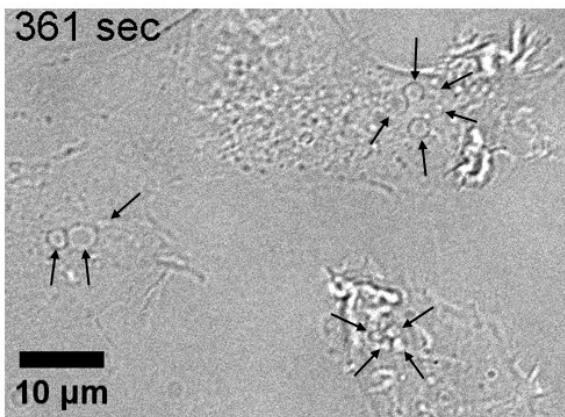
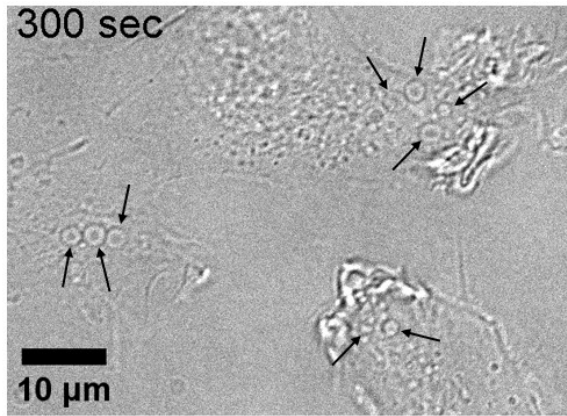
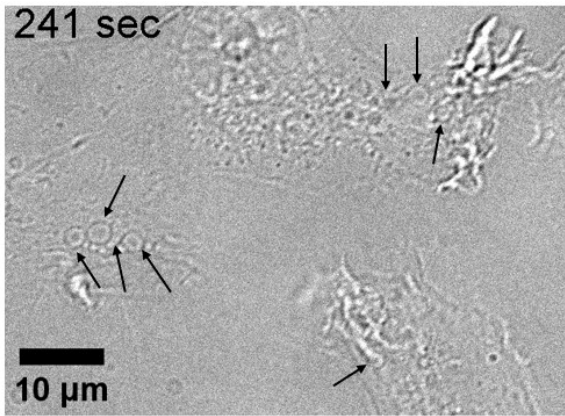
4.4.1. RPE-1 jsou makropinocytárně aktivní

Makropinocytóza živých buněk RPE-1 byla sledována pomocí světelné mikroskopie („live-cell imaging“). V nestimulovaném stavu tyto buňky vykazovaly výraznou membránovou dynamiku a tvorbu rozsáhlých váčků, které jsou typické pro makropinocytární aktivitu. Makropinozomy po svém vzniku měnily tvar, zmenšovaly se, nebo fúzovaly. V důsledku zesilující se cytoplazmy váčky při svém pohybu do středu buňky často mizely mimo rovinu ostroty (Fig. 4A, video 1). Na základě těchto pozorování lze usuzovat,

že RPE-1 mají vysokou bazální hladinu makropinocytózy. Po přidání TRITC-dextranu a tříhodinové inkubaci následované promytím byl patrný červený signál akumulující se uvnitř buněk, zejména v intracelulárních váčcích. Tento signál se postupně zvyšoval ve váčcích směrem do centra buňky, což odpovídalo koncentraci makropinocytárního materiálu během maturace váčku (Fig. 4B).

A





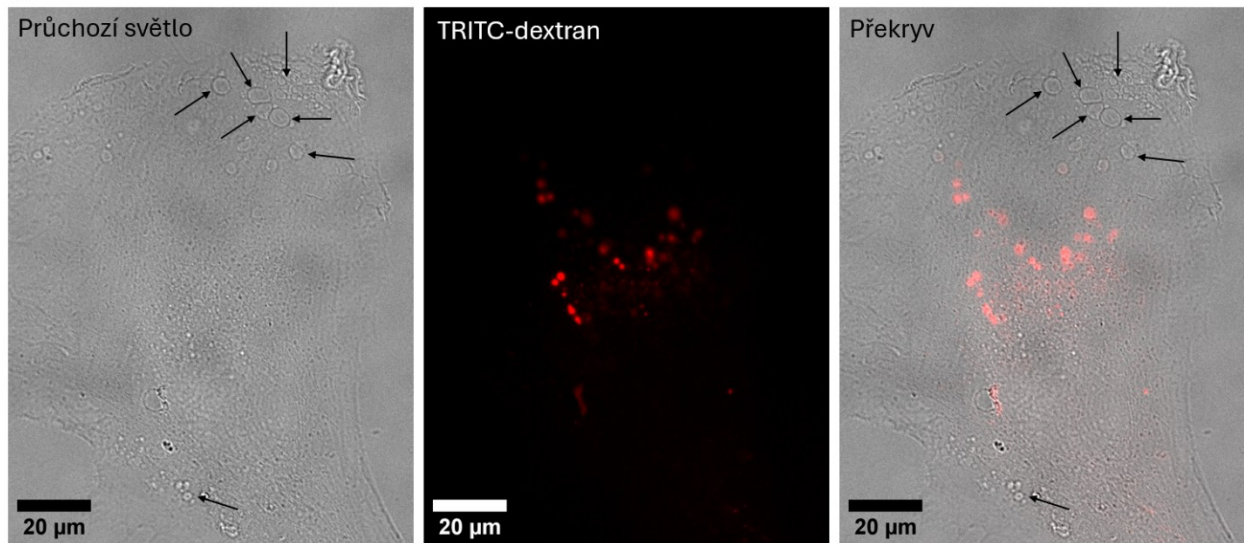
B

Figura 4: Zobrazení makropinocytární aktivity živých RPE-1 buněk pomocí světelné mikroskopie v širokém zorném poli. (A) Nestimulované RPE-1 WT byly kultivovány v DMEM+/+ a snímány světelnou mikroskopií s frekvencí snímků 2,26 s po dobu 9 min. Buňky mají vysoce dynamickou cytoplazmatickou membránu, ze které se vytváří objemné váčky (černé šipky), což naznačuje vysokou bazální hladinu makropinocytózy. Byly vybrány snímky s časovým rozestupem přibližně jedna minuta. **(B)** RPE-1 buňky byly kultivovány v kompletním médiu s TRITC-dextranem (3 hod) a po jeho odmytí snímány. Černou šipkou jsou označeny nascentní váčky, které vznikly po odmytí TRITC-dextranu. Červený signál se koncentruje ve váčkách v centru buňky.

4.4.2. Lokalizace MTMRs do membránového zvlnění

Při fluorescenční mikroskopii živých RPE-1 buněk stabilně exprimujících fúzní proteiny MTMR9-EGFP a MTMR6-EGFP byla pozorována převážně cytosolická distribuce signálu. U buněk exprimujících MTMR9-EGFP byl navíc zřetelný vezikulární vzor odpovídající váčkům rané sekrece. Fluorescenční signál se dále akumuloval v periferních částech buněk, zejména v oblastech se zvýšenou membránovou dynamikou a membránovým zvlněním (Fig. 5A, video 2). Myotubulariny MTMR6 i MTMR9 mohou asociovat s cytoplazmatickou membránou v místech její intenzivní dynamiky pomocí svých PH-GRAM domén (Tab. 1).

Při pozorování negativní kontroly (RPE-1 exprimujících samotný EGFP) byla fluorescence rovněž patrná v oblastech membránového zvlnění (Fig. 5B, video 3). Pro ověření, zda se jednalo o specifickou lokalizaci fosfatáz nebo o obecný jen společný cytosolickým proteinům, byla vytvořena pozitivní kontrola v podobě RPE-1 buněk tranzientně exprimujících konstitutivně aktivní variantu RAC1 (RAC1G12V) pomocí transfekce vektorem Rac1_G12V_pEGFP-C1. Aktivní Rac1 se lokalizuje do cytoplazmatické membrány prostřednictvím geranyl-geranylové kotvy na C-konci proteinu a polybazické oblasti vázající PI(4,5)P₂ a

PIP₃ [123]. Tyto buňky kumulovaly signál v periferních dynamických oblastech CPM obdobně (Fig. 5C, video 4).

Na základě těchto pozorování nelze s jistotou rozhodnout, zda fosfatázy MTMR9 a MTMR6 specificky lokalizují do oblastí membránového zvlnění, nebo zda je tato distribuce důsledkem obecného chování cytosolických proteinů v dynamických membránových strukturách. Nelze vyloučit, že pozorovaná akumulace signálu v oblastech membránového zvlnění odráží spíše zvýšenou tloušťku cytosolu v těchto dynamických strukturách oproti zbylé periferní části buňky než specifickou lokalizaci fosfatáz.

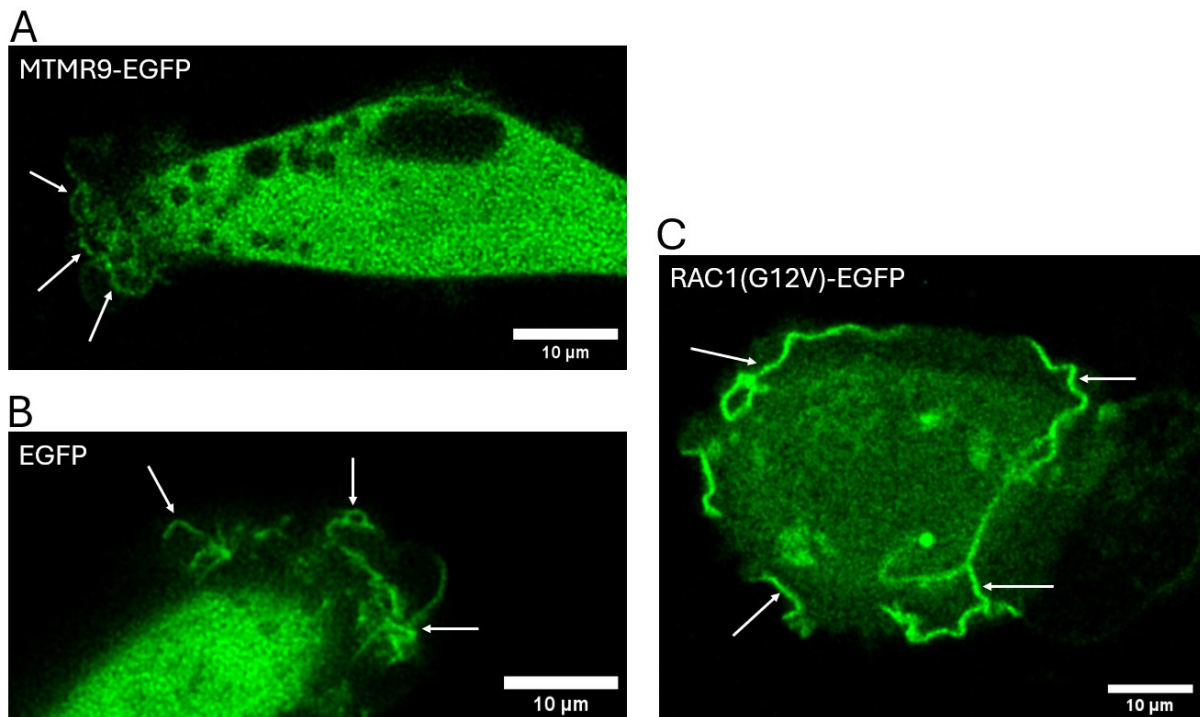


Figura 5: Lokalizace EGFP signálu v živých RPE-1 buňkách sledovaná konfokální mikroskopií. (A) RPE-1 buňky stabilně produkující MTMR9-EGFP vykazují převážně cytosolickou distribuci a akumulaci signálu v periferních oblastech s intenzivní membránovou dynamikou (bílé šipky). **(B)** Negativní kontrola: RPE-1 buňky stabilně exprimující samotný EGFP, u nichž byla fluorescence rovněž patrná v oblastech membránového zvlnění. **(C)** Pozitivní kontrola: RPE-1 buňky tranzientně exprimující konstitutivně aktivní variantu RAC1(G12V)-EGFP s výraznou akumulací signálu v dynamických periferních oblastech. Buňky byly kultivovány ve standardním DMEM médiu.

4.5. Změny v makropinocytóze u RPE-1 linií se sníženou expresí MTMRs

Za účelem objasnění role MTMR6 a MTMR9 v makropinocytóze byla u RPE-1 WT buněk specificky snížena exprese těchto dvou fosfatáz pomocí siRNA. Příjem FITC-dextranu byl měřen dva dny po oligofekci, kdy byla prokazatelně snížena exprese cílových myotubularinů (viz Fig. 1C, D). Pro standardizaci experimentálních podmínek byly buňky před měřením příjmu FITC-dextranu kultivovány v DMEM-/- (bez přidaného séra a růstových faktorů). Tento přístup minimalizoval variabilitu

způsobenou rozdílným složením séra a poskytl definované podmínky. Současná deprivace růstových faktorů částečně imitovala hladovějící stav, který stimuluje makropinocytární příjem extracelulárního materiálu. Hladovění bylo indukováno kultivací v DMEM-/- po dobu 1 hodiny, po které byl přidán FITC-dextran (1 µg/ml) na 2 hodiny. Jako negativní kontrola sloužily buňky transfekované nespecifickou siRNA. Kvantifikace intenzity FITC signálu byla provedena pomocí průtokové cytometrie.

Ve všech třech nezávislých experimentech vykazovaly buňky se sníženou expresí MTMR6 i MTMR9 mírně zvýšený příjem FITC-dextranu ve srovnání s kontrolními buňkami. Tyto rozdíly však nebyly statisticky významné (Fig. 6A). Po normalizaci dat, kde byl příjem dextranu u negativní kontroly nastaven na 100 %, byl pozorovaný trend zvýšeného příjmu ještě zřetelnější. Vzhledem k omezenému počtu biologických opakování však výsledky zůstávají neprůkazné (Fig. 6B). Tyto nálezy naznačují, že knockdown fosfatáz MTMR6 a MTMR9 nemá statisticky významný vliv na příjem FITC-dextranu a makropinocytózu u RPE-1 buněk.

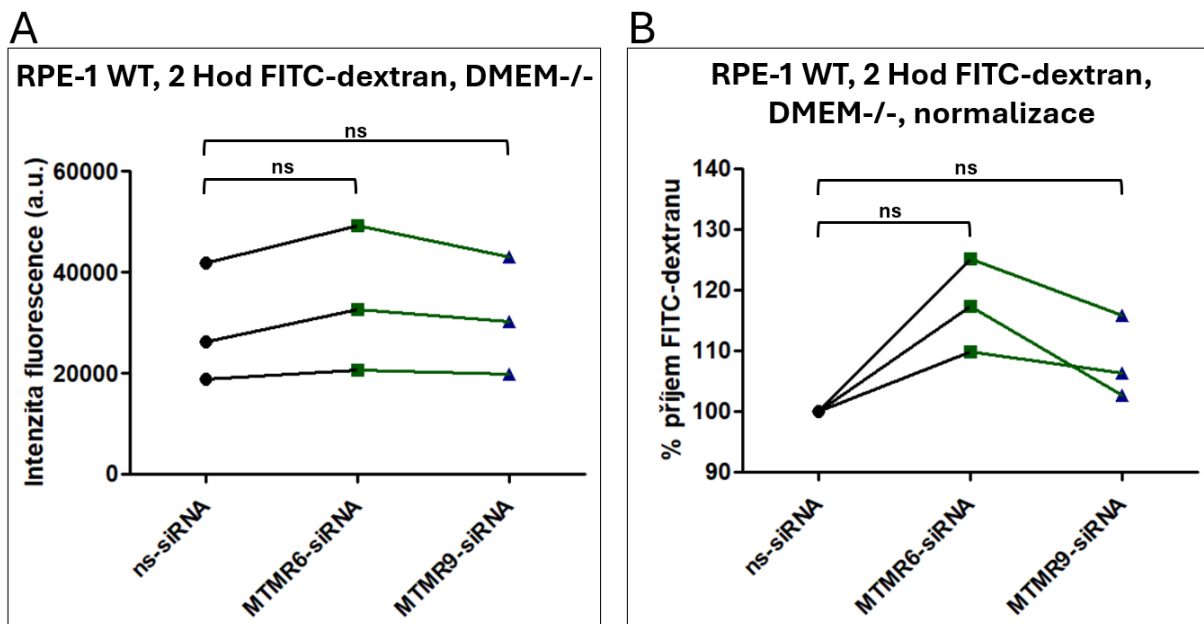


Figura 6: Měření příjmu FITC-dextranu u RPE-1 buněk se sníženou produkcí MTMR9 a MTMR6. **(A)** RPE-1 WT ošetřené nespecifickou siRNA (ns-siRNA) a siRNA cílící na MTMR9 (MTMR9-siRNA) a MTMR6 (MTMR6-siRNA) byly testovány na příjem FITC-dextranu. Buňky byly kultivovány 1 hodinu v DMEM-/- před přidáním FITC-dextranu (2 hod). Intenzita fluorescence byla měřena průtokovou cytometrií a vyjádřena jako medián signálu z 10 000 živých buněk po odečtení autofluorescence (negativní kontrola; buňky bez FITC-dextranu). **(B)** Normalizace výsledných hodnot pro získání relativního příjmu FITC-dextranu, kde negativní kontrola představuje 100 % pro každé opakování. Každý bod reprezentuje jedno biologické opakování. Opakování ze společného experimentu jsou propojena čarou. Statistická významnost byla vyhodnocena oboustranným nepárovým t testem; výsledky s $p < 0,05$ byly považovány za signifikantní.

4.6. Změny v makropinocytóze u RPE-1 linií s nadprodukcí MTMRs

4.6.1. TRITC-dextran nelze používat při průtokové cytometrii

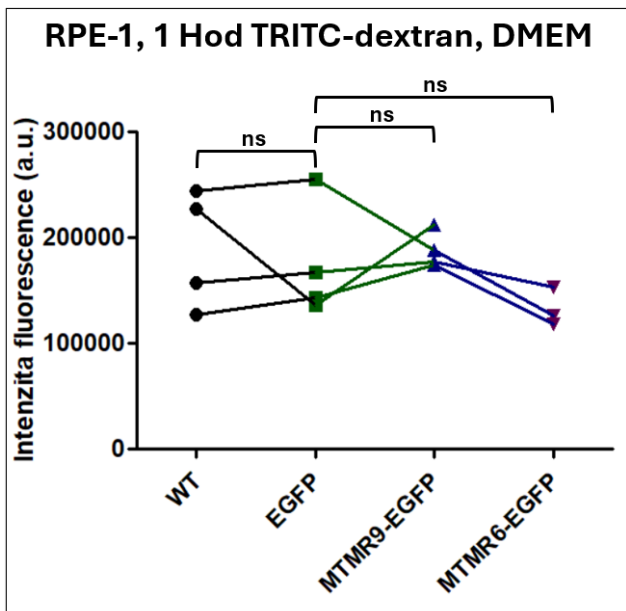
K hodnocení vlivu nadprodukce MTMR9, MTMR8 a MTMR6 na příjem makropinocytárního nákladu byly použity RPE-1 linie exprimující fúzní proteiny MTMRs-EGFP. Jako negativní kontrola zde sloužila linie RPE-1 stabilně exprimující EGFP. Vzhledem k překryvu excitačního a emisního spektra fluorochromů EGFP a FITC byl pro tyto experimenty použit TRITC-dextran.

Buňky byly nejprve kultivovány ve standardních podmínkách (DMEM+/+) s přidavkem TRITC-dextranu (1 µg/ml) po dobu 1 hodiny. Pro posouzení specifického přínosu makropinocytózy na příjem dextranu byl k části vzorků přidáván inhibitor makropinocytózy EIPA (25–50 µM, 30 min před TRITC-dextranem). Kvantifikace probíhala pomocí průtokové cytometrie.

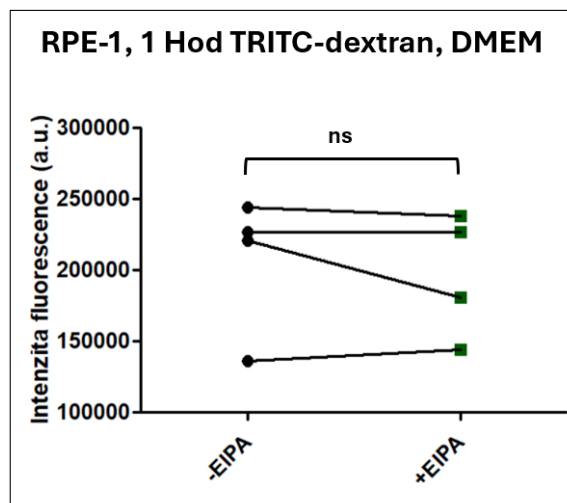
Opakované experimenty neodhalily rozdíly v intenzitě TRITC signálu mezi jednotlivými liniemi ani mezi buňkami ošetřenými inhibitorem EIPA (Fig. 7A, B). Následná mikroskopická analýza příjmu FITC- a TRITC-dextranu do RPE-1 WT buněk během dvouhodinové inkubace však odhalila zásadní rozdíl v distribuci fluorochromů. Přestože oba, FITC- i TRITC-dextran, vykazovaly jasný vezikulární vzor, TRITC-dextran se navíc akumuloval rozptýleně v cytoplazmě buněk (Fig. 7C-E). V buňkách exprimující MTMR9-EGFP vzrůstal cytosolický TRITC signál společně se zeleným signálem, přičemž se MTMR9 pozitivní váčky nepřekrývaly s TRITC pozitivními váčky (Fig. 7E).

Z těchto důvodů nemusí TRITC signál spolehlivě reflektovat vezikulární lokalizaci dextranu, pravděpodobně v důsledku nedokonalé konjugace fluorochromu k dextranu. Experimenty z průtokového cytometru využívající TRITC-dextran nelze považovat za relevantní, jelikož cytoplazmaticky se hromadící TRITC signál ovlivňuje výsledné intenzity fluorescence. Proto byla pro další kvantifikaci příjmu TRITC-dextranu použita fluorescenční mikroskopie.

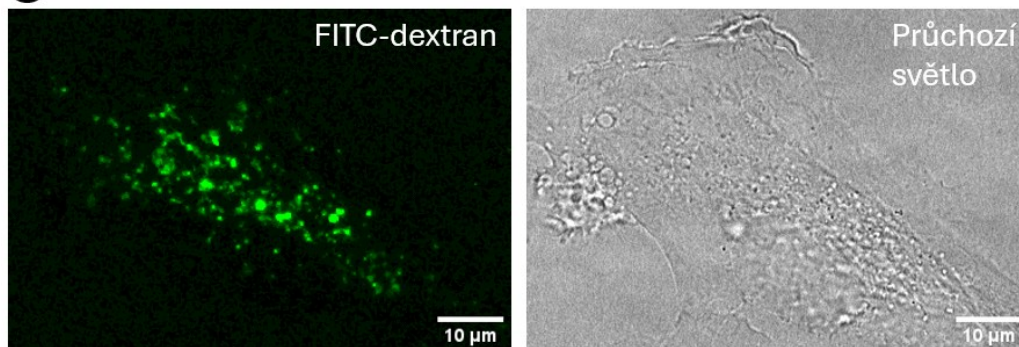
A



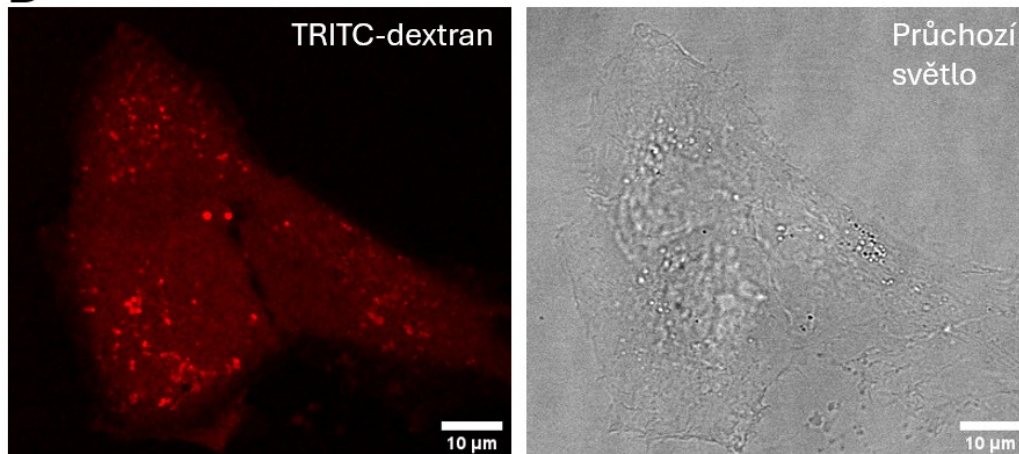
B



C



D



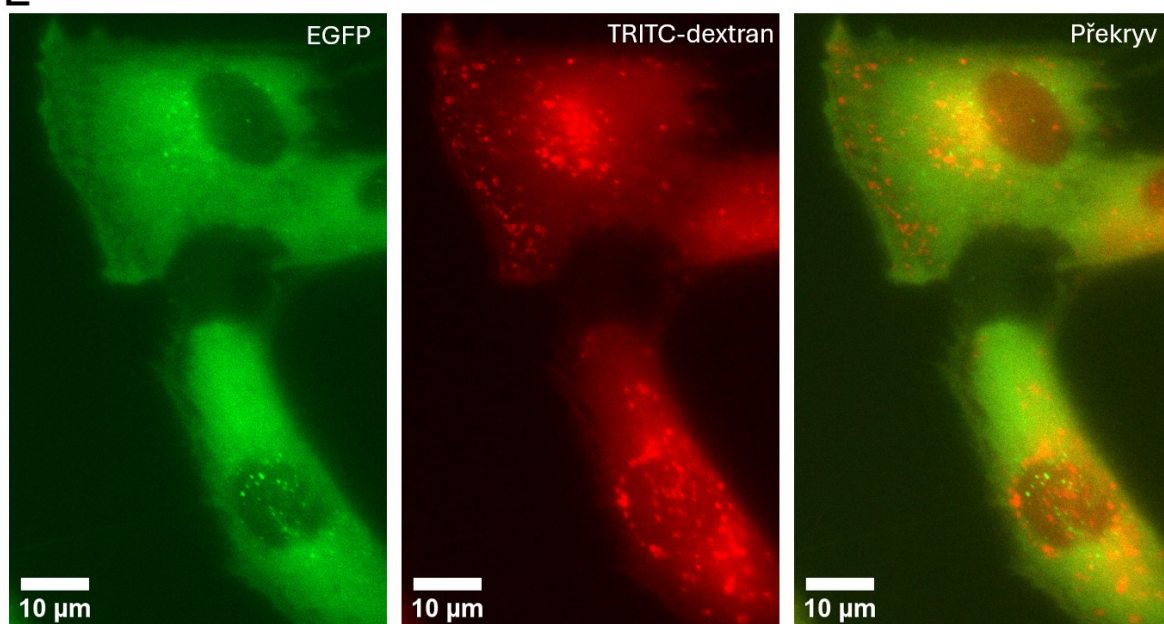
E

Figura 7: Analýza příjmu TRITC-dextranu v RPE-1 buňkách. (A) RPE-1 exprimující EGFP, MTMR9-EGFP a MTMR6-EGFP byly testovány na příjem TRITC-dextranu. **(B)** RPE-1 ošetřené makropinocytárním inhibítorem EIPA (25-50 µM, 30 min před TRITC-dextranem). Buňky byly inkubovány s TRITC-dextranem v DMEM+/+ po dobu 1 hodiny a analyzovány průtokovou cytometrií. Intenzita fluorescence byla vyjádřena jako medián signálu z 10 000 živých buněk po odečtení autofluorescence (negativní kontrola; buňky bez FITC-dextranu). Každý bod reprezentuje jedno biologické opakování. Opakování ze společného experimentu jsou propojena čarou. Statistická významnost byla vyhodnocena oboustranným nepárovým t testem; výsledky s $p < 0,05$ byly považovány za signifikantní. **(C)** Maximální intenzitní projekce Z-stacku RPE-1 WT buněk inkubovaných s FITC-dextranem (2 h) získaná pomocí konfokální mikroskopie. FITC signál si zachovává vezikulární lokalizaci. **(D)** Snímek RPE-1 WT buněk z konfokálního mikroskopu v jedné rovině ostrosti zachycující váčkovou i cytosolickou distribuci TRITC-dextranu (2 hod). **(E)** Mikroskopie v širokém zorném poli RPE-1 buněk stabilně exprimujících MTMR9-EGFP inkubovaných s TRITC-dextranem (3 hod) v jedné rovině ostrosti. TRITC-dextran není spolehlivý nástroj jako makropinocytární náklad, protože dochází k cytosolickému hromadění TRITC signálu.

4.6.2. Mikroskopická analýza RPE-1 buněk s přijatým TRITC-dextranem

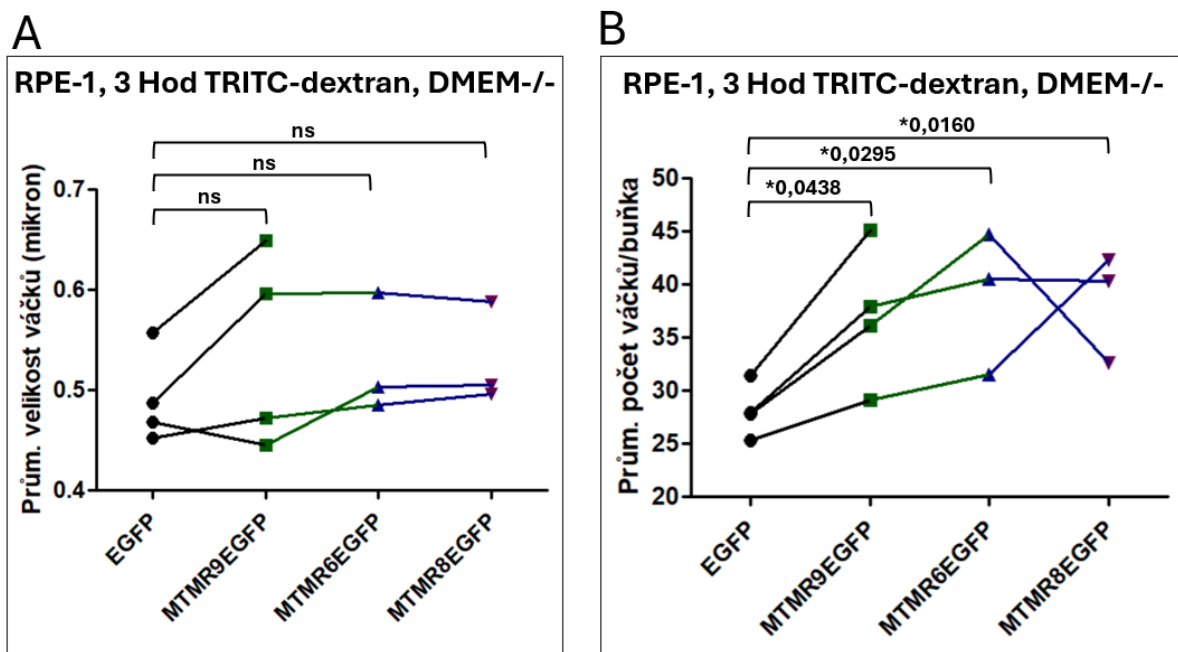
Před mikroskopickými experimenty byly RPE-1 linie exprimující EGFP nebo fúzní MTMRs-EGFP kultivovány přes noc v DMEM-/-. Tento krok sloužil k navození hladovějících podmínek a tím i ke stimulaci makropinocytózy, což mělo umožnit lepší rozlišení rozdílů v akumulaci dextranu mezi jednotlivými liniemi. Deprivace séra zároveň poskytla stabilní a reprodukovatelné podmínky napříč experimenty.

TRITC-dextran (1 µg/ml) byl přidáván na 3 hodiny, u části vzorků byl aplikován inhibitor EIPA (35 µM, 30 minut před dextranem). Pro vizualizaci jader a přesné určení počtu buněk ve snímaném poli byl 10 minut před promytím přidán Hoechst 33258 (1 µg/ml). Po promytí byly buňky mikroskopicky snímány jako živé („live-cell imaging“) ve světelném širokém zorném poli („widefield“ mikroskopie) ve formátu plachty obsahující 5x5 snímků.

Tímto způsobem bylo získáno 100-400 individuálních buněk ve vzorku, které byly následně analyzovány v programu FIJI. Kvantitativní analýza obrazu poskytla údaje o průměrné velikosti TRITC pozitivních váčků (> 200 nm) a jejich počtu na buňku. Průměrná velikost váčků zůstala mezi jednotlivými liniemi bez statisticky významných rozdílů (Fig. 8A). Naopak u všech tří MTMRs-EGFP produkujících linií byl zaznamenán významný nárůst počtu TRITC pozitivních váčků na buňku ve srovnání s kontrolními buňkami (Fig. 8B).

Pro kvantitativní vyhodnocení vlivu inhibitoru EIPA na příjem TRITC-dextranu u RPE-1 byl zvolen reprezentativní model MTMR9-EGFP linie, kde byl dostupný nejvyšší počet nezávislých experimentů. Ošetření buněk inhibitorem však nevedlo k žádné změně v parametrech (Fig. 8C, D). Stejné chování EIPA bylo rovněž pozorováno u ostatních RPE-1 buněčných linií.

Tyto výsledky naznačují, že nadprodukce MTMR9, MTMR6 a MTMR8 podporuje tvorbu TRITC-dextran pozitivních váčků a zvyšuje tak intravezikulární akumulaci dextranu. Vzhledem k limitacím TRITC-dextranu a absenci účinku EIPA však není možné jednoznačně určit, zda je tento efekt specifický pro makropinocytární příjem.



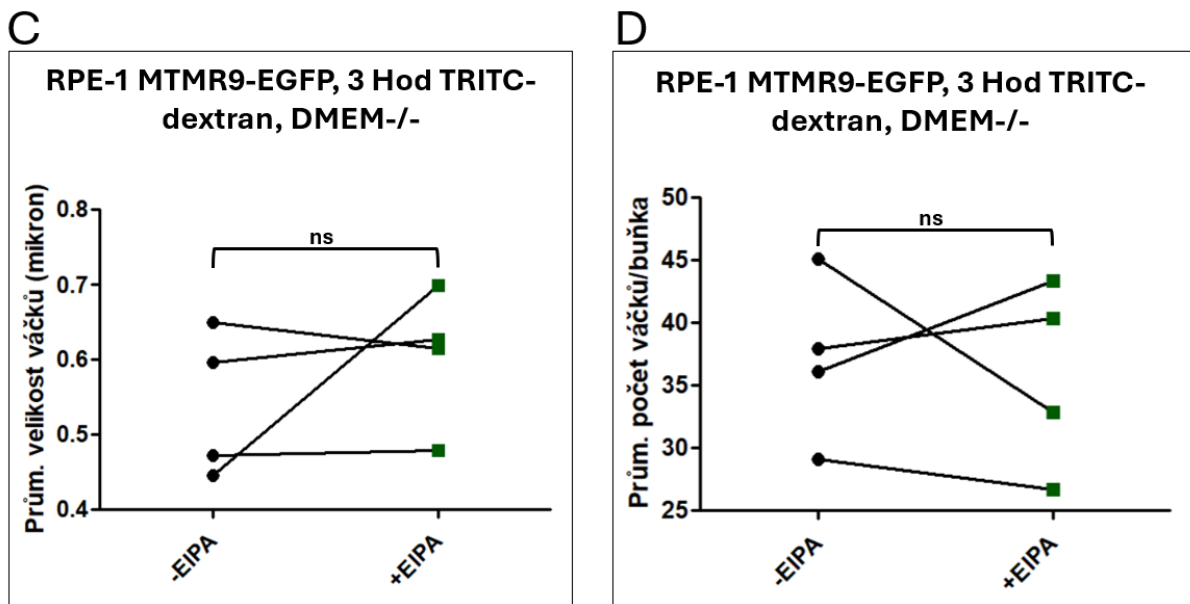


Figura 8: Mikroskopická analýza příjmu dextranu u RPE-1 nadprodukcující MTMR9, MTMR6 a MTMR8. Buňky byly před přidáním TRITC-dextranu (3 h) kultivovány přes noc v DMEM-/- . Po promytí byly snímány živé ve světelném mikroskopu v širokém zorném poli jako plachta 5x5 snímků. Analýza obrazu v programu FIJI poskytla údaje o průměrné velikosti TRITC pozitivních váčků a jejich průměrném počtu na buňku. **(A)** Srovnání průměrné velikosti váčků (μm) mezi liniemi exprimujícími EGFP nebo fúzní MTMRs-EGFP. **(B)** Srovnání průměrného počtu váčků ($> 200 \text{ nm}$) na buňku mezi těmito liniemi. **(C)** Srovnání průměrné velikosti váčků v linii exprimující MTMR9-EGFP s nebo bez inhibitoru EIPA ($35 \mu\text{M}$, 30 min před dextranem). **(D)** Srovnání průměrného počtu váčků na buňku v linii exprimující MTMR9-EGFP za stejných podmínek. Každý bod reprezentuje jedno biologické opakování; opakování ze stejného experimentu jsou propojena čarou. Statistická významnost byla hodnocena oboustranným nepárovým t-testem; hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za signifikantní.

4.7. Inhibitor EIPA je přijímán endocytárně

Při mikroskopické analýze RPE-1 WT buněk, které měly k dispozici inhibitor EIPA (2,5 hod; $35 \mu\text{M}$) byl pozorován nečekaný intracelulární vzor. Namísto difuzní distribuce v cytosolu se fluorescenčně aktivní inhibitor akumuloval ve velkých váčcích, z nichž se část jevila jako makropinozomy (Fig. 9A). Při současné kultivaci RPE-1 buněk s TRITC-dextranem (2 hod; $1 \mu\text{g/ml}$) a EIPA (30 min před dextranem; $35 \mu\text{M}$) byla pozorována kolokalizace obou molekul (Fig. 9B).

Z mikroskopických snímků nelze s jistotou určit původ těchto váčků, ale jejich velikost a přítomnost TRITC-dextranu nasvědčují tomu, že se z podstatné části jedná o makropinozomy a jejich starší verze v podobě lyzozomů. Tato pozorování naznačují, že se EIPA dostává do buněk endocytózou, zřejmě prostřednictvím makropinocytózy, a transportuje se až do lyzozomů.

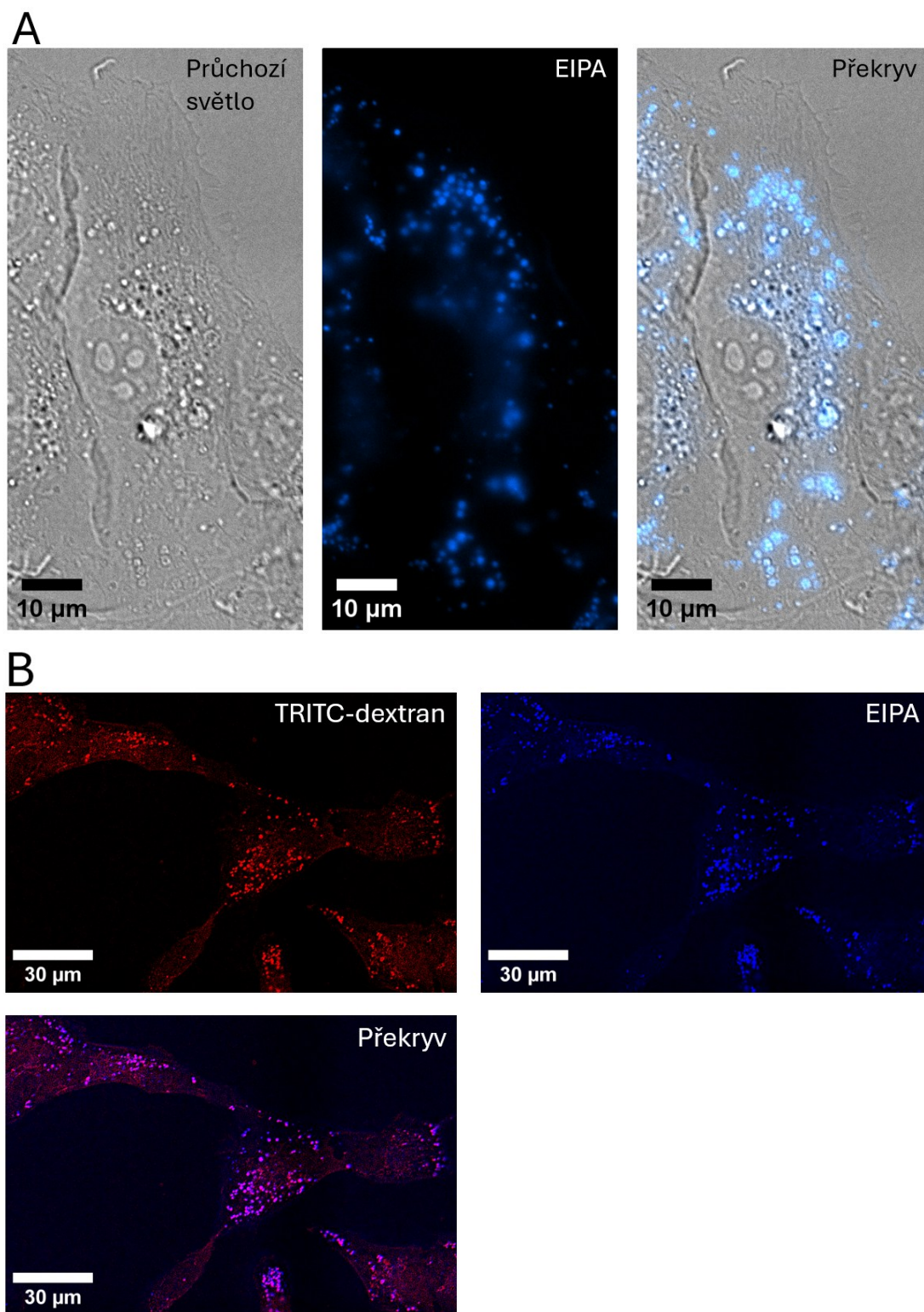


Figura 9: Zobrazení živých RPE-1 WT buněk po inkubaci s inhibítorem EIPA pomocí světelné mikroskopie v širokém zorném poli. Buňky byly kultivovány přes noc v bezsérovém DMEM a následně ošetřeny EIPA (35 μM) po dobu 2,5 hodiny. (A) Fluorescenční signál v modrém kanálu odpovídá přirozené fluorescenci EIPA, který se v buňkách akumuluje ve vezikulárních strukturách. (B) RPE-1 buňky ošetřené EIPA a inkubované s TRITC-dextranem (2 hod). Pro snížení cytosolického pozadí v TRITC kanálu

byly snímky upraveny dekonvolucí. Překryv modrého a červeného signálu (magenta) ukazuje kolokalizaci inhibitoru EIPA s endocytovaným dextranem, což naznačuje jejich společné ukládání ve vezikulárním kompartmentu.

5. Diskuse

Pro studium role vybraných MTMRs v makropinocytóze byly zvoleny imortalizované pigmentové epiteliální buňky sítnice (hTERT-RPE-1), z nichž byly vytvářeny linie s deletovanými příslušnými proteiny (RPE-1 KO) nebo linie tyto proteiny stabilně nadprodukcující. Příprava KO buněčných linií však nebyla úspěšná, jelikož nebyly nalezeny žádné klony s poškozením cílových genů. Identická strategie byla dříve úspěšně použita k vytvoření HeLa buněčných linií s delecemi v MTMR9, MTMR8 a MTMR6 genech a využívala vystřížení části exonu příslušného MTMR pomocí dvou sgRNA, které byly kódovány samostatnými vektory.

Skutečnost, že v linii RPE-1 nebyl nalezen jediný klon s deletovanými MTMR geny, naznačuje, že tyto buňky odpovídají na dvouřetězcové zlomy v genomu odlišným způsobem. HeLa buňky coby nádorová linie mohou mít méně účinný mechanismus zajišťující opravy poškození DNA. Například v důsledku nádorové transformace došlo u těchto buněk ke ztrátě funkčního tumor-supresorového proteinu p53. RPE-1 si zachovávají p53 funkční a delece některých genů u těchto buněk nevykazuje fenotyp, který byl pozorovaný u buněčné linie HeLa. Právě funkční p53 způsobuje maskování či oddálení některých fenotypových projevů prostřednictvím zpomalení buněčného cyklu nebo aktivací kontrolních mechanismů [124]. Avšak CRISPR/Cas9 knockout screening mezi RPE-1 WT a *TP53* KO liniemi neukazuje mezi buňkami zásadní rozdíly v efektivitě delecí genů. Autoři ale zdůrazňují, že pro úspěšné delece genů v buněčných liniích exprimujících funkční p53 je nutné přesné navržení strategie zahrnující vysokou sgRNA reprezentaci, monoklonální Cas9-exprimující populace a vektory nesoucí více sgRNA [125]. Dalším možným vysvětlením může být preference RPE-1 buněk využívat NHEJ (nehomologní spojování volných konců) jako hlavní mechanismus opravy dvouřetězcových zlomů (DSB) DNA. Studie ukazují, že tyto buňky vykazují nízkou úroveň homologní rekombinace, která je obecně přesnější a méně chybová [126]. Na rozdíl od toho NHEJ častěji generuje malé inserce či delece, jež jsou obtížně detekovatelné běžnou PCR z genomové DNA [127], na kterou jsme se museli spolehnout kvůli nedostupnosti kvalitních komerčních protilátek. V HeLa buňkách, jejichž oprava DSB může být méně účinná, dochází ke vzniku větších delecí a insercí, které je snazší metodou PCR detekovat.

Pro tvorbu knockout variant v RPE-1 buněčné linie proto nelze využít stejnou strategii jako u HeLa buněk. Možným způsobem, jak vytvořit RPE-1 s deletovanými MTMR9, MTMR8 a MTMR6 pomocí CRISPR/Cas9 strategie je použití buněk endogenně exprimujících Cas9 a vektory kódující větší počet

sgRNA na jeden cílový gen. Pro zajištění průkaznosti delecí pak bude vhodné nahradit PCR detekci metodami, které umožňují zachytit i malé inserce nebo delece. Například studie Zhang et al., 2015 využívá metodu IDAA (detekce indelů pomocí analýzy Amplicon) s rozlišením až na úrovni jednoho nukleotidu [127].

Pomocí retrovirální transdukce se podařilo získat RPE-1 buněčné linie exprimující EGFP nebo fúzní proteiny MTMR9/8/6 s EGFP. Účinnost transdukce výrazně klesala s délkou sekvence vkládané do vektoru pMXs-Puro. Zejména vektor kódující MTMR8-EGFP, obsahující nejdelší otevřený čtecí rámec (ORF) a tím i největší celkovou velikost konstruktů, vykazoval nejnižší úroveň transdukce (Fig. 2). Tyto výsledky ukazují významný vliv velikosti ORF na efektivitu retrovirálního přenosu. Retrovirální vektory jsou z principu omezeny svou balicí kapacitou (8 kb), která je dána fyzikálními limity sestavování virových částic. Při překročení této kapacity dochází ke snížení efektivity balení a produkce infekčních virových částic, což vede k nižší transdukční účinnosti. Naproti tomu lentivirové systémy poskytují vyšší balicí kapacitu (10 kb), a jsou proto vhodnější pro expresi větších ORF a fúzních proteinů [128]. Pro budoucí transdukční experimenty s konstrukty kódujícími fúzní proteiny MTMR9/8/6 s EGFP by proto bylo vhodné využití lentivirových systémů.

Z důvodu dostupnosti již existujících knockout variant MTMR9, MTMR8 a MTMR6 byly pro optimalizaci metodiky měření příjmu FITC-dextranu použity HeLa buňky. Získaná data naznačují, že delece MTMR6 a MTMR9 vede ke snížení internalizace FITC-dextranu jak ve standardních, tak v hladovějících podmínkách. Hladovění v EBSS zvyšuje celkový příjem dextranu všemi liniemi, přičemž u MTMR9 knockout buněk se v těchto podmínkách rozdíl oproti WT kontrolám dále zvětšuje (Fig. 3). Tyto výsledky naznačují možnou roli MTMR9 a MTMR6 v regulaci endocytárních procesů a shodují se s dřívějšími pozorováními příjmu TMR (tetramethylrhodamine)-dextranu epidermoidními buňkami A431 [86].

Je však třeba zvážit, do jaké míry lze HeLa buňky považovat za vhodný model pro studium makropinocytózy. Na rozdíl od RPE-1 buněk nejsou HeLa prokazatelně makropinocyticky aktivní. U nádorových buněk obecně bývají endocytární dráhy výrazně narušené, což vyúsťuje ke změnám v buněčné signalizaci, endozomální recyklaci a ztrátě polaritě buněk [129]. To může ovlivnit nejen příjem dextranu, ale i interpretaci role MTMR proteinů v těchto procesech. Z těchto zjištění vyplývají dvě neobjasněné otázky: (i) do jaké míry je internalizace FITC-dextranu u HeLa buněk zprostředkována makropinocytózou a nakolik přispívají jiné endocytární cesty; (ii) zda je role MTMR9 a MTMR6 při regulaci příjmu dextranu nádorovými buňkami relevantní i pro fyziologicky fungující makropinocytózu v nenádorových buněčných liniích.

S ohledem na rozdíly v endocytární aktivitě mezi nádorovými a nenádorovými liniemi je k těmto datům třeba přistupovat obezřetně a ověřit pozorované efekty i ve fyziologických systémech, jako jsou RPE-1

buňky. Přestože HeLa buňky nejsou ideálním modelem pro studium makropinocytózy, zmíněné experimenty poskytly orientační vhled do role MTMRs v endocytóze a umožnily optimalizovat podmínky pro následná měření v RPE-1 buňkách.

RPE-1 jsou fyziologicky makropinocytující buňky, které se experimentálně využívají pro studium tohoto typu endocytózy [95, 96]. RPE-1 mají jasnou buněčnou polarizaci a vysoce dynamickou cytoplazmatickou membránu vytvářející membránová zvlnění bez jakékoli stimulace. Z těchto zvlnění lze při světelné mikroskopii pozorovat tvorbu objemných váčků (Fig. 4). Těmito váčky RPE-1 přijímají fluorescenčně značený dextran jako makropinocytární náklad a v dříve publikované studii se jeho příjem podstatně snížil použitím inhibitoru makropinocytózy EIPA [95]. Proto byly RPE-1 buňky zvoleny jako model pro studium biologické funkce MTMR9, MTMR8 a MTMR6 v makropinocytóze.

V předchozích studiích autoři popisují lokalizaci MTMR6 i MTMR9 do cytoplazmatické membrány a uvádějí, že je pro jejich vazbu do CPM nezbytná PH-GRAM doména [57, 58]. Maekawa et al., 2014 pozorují lokalizaci MTMR9 a MTMR6 přímo do membránové zvlnění epidermoidních A431 buněk po jejich stimulaci růstovým faktorem [86]. Tato pozorování jsou ovšem prováděna na fixovaných buňkách a postrádají nezbytné negativní a pozitivní kontroly, které by vyloučily možnost artefaktů. Takové artefakty mohou vznikat fixací a permeabilizací buněk, nebo mohou být důsledkem přítomnosti cytosolického signálu v membránovém zvlnění.

V této práci byla použita metoda „live-cell imaging“, která umožňuje sledovat subcelulární lokalizaci fúzních proteinů MTMR9-EGFP a MTMR6-EGFP v živých RPE-1 buňkách bez jejich předchozí stimulace. Negativní kontrolu představovaly RPE-1 linie stabilně exprimující samotný EGFP, pozitivní kontrolu pak buňky tranzientně exprimující konstitutivně aktivní variantu RAC1 (RAC1G12V), která je známa svou schopností vázat CPM a indukovat výrazné membránové zvlnění [130]. Kromě cytosolické distribuce byla u MTMR9-EGFP i MTMR6-EGFP pozorována akumulace signálu v periferních oblastech buněk vykazujících zvýšenou membránovou dynamiku. Nicméně podobné hromadění signálu bylo patrné jak u samotného EGFP, tak u buněk exprimujících RAC1G12V (Fig. 5). Sledovaný jev proto nemusí být odrazem specifické lokalizace MTMR fosfatáz do CPM, ale může souviset s přítomností cytosolického signálu v dynamických membránových strukturách.

Nelze vyloučit, že pozorovaná akumulace fluorescence v oblastech membránového zvlnění spíše odráží zvýšenou tloušťku cytosolu v těchto strukturách než specifickou asociaci MTMR fosfatáz s cytoplazmatickou membránou. Indukce makropinocytózy růstovým faktorem u A431 buněk, jak ji popisují Maekawa et al. [86], vede ke zvýšené tvorbě membránových zvlnění, což může ovlivnit distribuci cytosolických proteinů. Pozorovaná akumulace MTMRs v těchto oblastech tedy nemusí nutně

odrážet specifickou vazbu k cytoplazmatické membráně, ale spíše prostorové změny cytosolu v dynamicky remodelovaných částech buňky.

Tyto výsledky zpochybňují dříve uváděnou membránovou lokalizaci MTMR6 a MTMR9 a poukazují na potřebu dalších experimentů. Pro ověření, zda jsou MTMR-EGFP proteiny skutečně asociovány s cytoplazmatickou membránou, by mohla být využita technika FRAP (obnovení fluorescence po fotovybělení). Tato metoda umožňuje sledovat, zda EGFP značené proteiny vykazují po svém vybělení dynamiku odpovídající volné difuzi v cytosolu, nebo zda obnova signálu odpovídá procesům laterální difuze v CPM a reverzibilní asociace s membránou [131].

Pro zjištění biologické funkce MTMR fosfatáz v makropinocytóze byl využit fluorescenčně značený dextran jako nástroj pro kvantitativní sledování příjmu extracelulárního materiálu. Zatímco FITC-dextran poskytoval konzistentní vezikulární signál, při experimentech s dextranem značeným TRITC (tetramethylrhodamin-isothiokyanátem) byla kromě vezikulárního vzoru pozorována difuzní akumulace signálu v cytoplazmě (Fig. 7C-E). Ta může reflektovat nedokonalou konjugaci fluorochromu k dextranu, případně jeho uvolňování během intracelulárního zpracování. Takový jev ztěžuje rozlišení mezi vezikulárním příjmem fluorochromu a jeho cytosolickou akumulací, což výrazně ovlivňuje interpretaci dat.

U malých, relativně lipofilních molekul je možný pasivní průnik přes lipidovou dvojvrstvu a některá fluorescenční barviva mají určitou pasivní permeabilitu. Mezi ně patří i rhodaminová barviva, včetně rhodaminu-123, který může difundovat skrze lipidové membrány pasivním způsobem. Rhodamin-123 prochází nebuněčnými lipidovými membránami během několika minut, přičemž limitujícím krokem je přeskok typu „flip-flop“, který následuje po navázání barviva na membránu [132]. Rychlost pasivní permeabilizace závisí na celkových vlastnostech fluorochromů a liší se mezi jednotlivými rhodaminovými deriváty [133].

Rhodamin-123 proniká i buněčnou membránou a sekvstruje se, což vede k jeho hromadění uvnitř buněk ve vyšší koncentraci, než je v okolním médiu. Tento derivát jako volný vykazuje relativně nízkou pasivní propustnost. Při koncentracích nad kritickou micelární koncentraci (CMC) však vytváří parciálně lipofilní molekuly rhodaminu-123 micely. Takto agregovaný do micel má výrazně vyšší schopnost pasivně difundovat skrze biologické membrány [134].

Podobně jako rhodamin-123 patří i TRITC mezi rhodaminové deriváty a sdílí s ním vysokou strukturní podobnost. Je tedy pravděpodobné, že si zachovává podobné chování. Pokud není TRITC efektivně konjugován s větší molekulou (např. dextranem), může docházet k uvolňování volného fluorochromu do média. Ten následně pasivně proniká do buněk a intracelulárně se hromadí. Takový jev významně

narušuje funkčnost značeného dextranu jako analytického nástroje, zejména při použití metod jako průtoková cytometrie, kde nelze odlišit subcelulární lokalizaci signálu. Vhodnějším přístupem je proto využití mikroskopických metod spolu s úpravou obrazových dat, který umožní odstranění cytosolického pozadí.

Aby bylo možné určit, zda je příjem dextranu zprostředkován převážně makropinocytózou, nebo i jinými endocytárními mechanismy, byla v dalších experimentech makropinocytóza inhibována. Tento přístup měl pomoci objasnit, do jaké míry se na internalizaci extracelulárního materiálu podílejí MTMR fosfatázy specificky v kontextu makropinocytózy. V současné době není znám selektivní inhibitor makropinocytózy. Pro blokaci tohoto buněčného procesu mohou být použity inhibitory PI(3)K (např. LY294002 nebo wortmanin) nebo látky narušující aktinovou dynamiku, jako je cytochalasin D [83, 103, 107]. Protože jsou takové inhibitory značně nespecifické, v současných experimentech se jako nejvíce selektivní inhibitor makropinocytózy používá derivát amiloridu EIPA [95, 107, 135, 136].

Amilorid funguje jako inhibitor sodnoprotonových transportérů (Na^+/H^+ exchangers; NHE). Pro zvýšení efektivity a selektivity inhibitoru vůči jednotlivým izoformám NHE byly vytvořeny syntetické deriváty amiloridu. Mezi ně patří i EIPA, která vykazuje nejvyšší selektivitu vůči NHE1 [137]. NHE1 se nachází v cytoplazmatické membráně, kde umožňuje export protonů z buňky a tím udržuje stabilní pH v submembránové oblasti. Blokace NHE1 ústí v lokální snížení cytosolického pH, což negativně ovlivňuje aktivitu RAC1 a CDC42 monomerních GTPáz, které jsou klíčové pro makropinocytózu. Podle autorů vede okyselení cytosolu a s tím spojené snížení aktivity RAC1 a CDC42 k omezení rekrutace ARP2/3 komplexu pod CPM. Blokadí NHE1 inhibitorem EIPA tedy dochází k snížení aktinové polymerace a makropinocytózy již ve fázi membránového zvlnění [136].

Příjem FITC- a TRITC-dextranu RPE-1 buněčnými liniemi v našem případě nepotvrdil snížení příjmu makropinocytárního nákladu v důsledku působení inhibitoru. Buňky ošetřené EIPA o koncentracích 25-50 μM měly výrazně sníženou vitalitu, schopnost tvořit velké, dextran pozitivní váčky si ovšem zachovávaly (Fig 8C, D a Fig. 9).

Amilorid je fluorescenční molekula, jejíž maximální emise byla pozorována při 409 nm po excitaci vlnovou délkou 364 nm [138]. Jeho fluorescenční spektrum se tak překrývá s jadernými barvivy jako je DAPI nebo Hoechst 33258. Derivát EIPA rovněž vykazuje vlastní fluorescenci, kterou lze využít ke sledování jeho intracelulární akumulace. Maximální fluorescence inhibitoru EIPA byla pozorována při excitaci okolo 390 nm s emisí na 420 nm [139].

Při fluorescenční mikroskopii živých RPE-1 buněk byla pozorována vezikulární akumulace inhibitoru EIPA, který kolokalizoval s TRITC-dextranem (Fig. 8A, B). U EIPA je podobný vezikulární vzor popsán ve

studii zabývající se NHE1 inhibitory jakožto potenciálními protinádorovými léčivy. U buněk karcinomu prsu se inhibitor hromadí ve váčcích v perinukleárním prostoru a částečně kolokalizuje s lysozomálním markerem LAMP-1 [139]. To podporuje hypotézu, že inhibitor EIPA vstupuje do buněk endocyticky a zůstává uvnitř váčků i během jejich maturace a fúze s lysozomy.

Autoři dále popisují výrazné cytotoxické účinky tohoto inhibitoru, které jsou multifaktoriální a nezávislé na inhibici NHE1. Ošetření buněk EIPA je spojeno s fragmentací mitochondrií, reorganizací endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu a rozsáhlou vakuolizací cytoplazmy, která souvisí s paraptózou. Na molekulární úrovni vede přidání EIPA ke zvýšenému hromadění markerů spojených s ER stresem, poškozením DNA a omezením autofagie. Zvýšená aktivita ERK kinázy (extracelulárními signály regulované kinázy), pozorovaná po ošetření tímto derivátem amiloridu, pravděpodobně funguje jako kompenzační mechanismus bránící EIPA indukované programované buněčné smrti [139].

Tyto výrazné cytotoxické účinky a komplexní ovlivnění intracelulární signalizace poukazují na nevhodnost použití EIPA jako selektivního inhibitoru makropinocytózy. Změny v oblasti autofagie, aktivity ERK kinázy a ER-stresu mohou prostřednictvím intracelulárních signálních drah ovlivňovat makropinocytózu nezávisle na inhibici NHE1. Vzhledem k těmto limitacím je nezbytné hledat nové, specifitější a méně toxické inhibitory, které by umožnily přesnější studium tohoto procesu. Jedním z nově popsaných inhibitorů membránového zvlnění a makropinocytózy u různých buněčných typů je imipramin, který vykazuje účinek bez cytotoxických dopadů a bez ovlivnění jiných endocytických drah [135].

Vzhledem k nemožnosti určit, zda je fluorescenčně značený dextran v RPE-1 buňkách internalizován primárně makropinocytózou, nelze pozorované rozdíly jednoznačně interpretovat jako změny v makropinocytární aktivitě. Pro zjištění biologické funkce MTMRs v příjmu dextranu byly použity linie RPE-1, které mají sníženou expresi příslušných proteinů. U RPE-1 buněk se sníženou expresí MTMR6 i MTMR9 byl pozorován mírně zvýšený příjem FITC-dextranu ve srovnání s kontrolními buňkami. Ačkoli rozdíl nebyl statisticky významný, pravděpodobně kvůli nízkému počtu biologických replikací, trend byl konzistentní napříč všemi třemi experimenty (Fig. 6). Tyto výsledky nejsou v souladu s publikovanou studií Maekawa et al. [86], kde knockdown MTMR6 nebo MTMR9 v epidermoidních A431 buňkách vedl k výraznému poklesu příjmu TMR-dextranu. Autoři na základě svých pozorování vyvodili závěr, že enzymatická aktivita MTMR6 nezbytná pro správný průběh makropinocytózy.

Rozpor mezi oběma studii může mít několik vysvětlení. Výsledky mohlo ovlivnit použití odlišných buněčných linií, jelikož je možné, že rozdíly v signálních drahách a bazální aktivitě makropinocytózy ovlivňují závislost buněk na jednotlivých regulátorech. Makropinocytóza u epidermoidní linie A431 byla stimulována EGF. Naopak makropinocytóza RPE-1 buněk v této práci nebyla stimulována růstovými

faktory, protože RPE-1 vykazovaly vysokou míru bazální makropinocytózy. RPE-1 buňky byly navíc kultivovány v bezsérovém médiu, což vedlo k jejich hladovění.

Důležitým faktorem, který může přispívat k rozdílům mezi oběma studii, je rozdílná aktivita kinázy mTOR v komplexu 1 (mTORC1; mechanistický cíl rapamycinu v komplexu 1), která je stimulována v přítomnosti růstových faktorů prostřednictvím PI3K/AKT dráhy [140]. Pro plnou aktivaci mTORC1 je klíčový dostatek aminokyselin, jež jsou do buňky dopravovány prostřednictvím makropinocytózy, která je také stimulována PI3K/AKT signalizací [141]. Růstové faktory tak aktivují PI3K/AKT dráhu, stimulují makropinocytózu a tím podporují příjem aminokyselin, což dále posiluje aktivitu mTORC1. Aktivní mTORC1 funguje jako nutriční senzor a podporuje anabolismus a proteosyntézu. Na druhou stranu při inhibici mTORC1 dochází k zdatelnému zesílení příjmu extracelulárního materiálu makropinocytózou [92, 142]. Kultivace buněk v hladovějících podmínkách, bez přítomnosti séra a růstových faktorů, vede k výraznému poklesu aktivity mTORC1, což makropinocytózu stimuluje [92, 143]. V podmínkách nutriční deprivace a nízké aktivity mTORC1 slouží makropinocytóza jako alternativní mechanismus získávání živin, čímž přispívá k přežívání buněk a jejich růstu [142]. Ve studii Maekawa et al. [86] byla makropinocytóza u A431 buněk indukována přidávkem EGF, což aktivuje PI3K/AKT dráhu a zvyšuje aktivitu mTORC1. Naproti tomu byly RPE-1 buňky kultivovány v bezsérovém médiu a lze tak předpokládat nízkou aktivitu mTORC1, což zvyšuje bazální úroveň makropinocytózy. Tento rozdíl v signalizaci a nutričních podmínkách může ovlivnit do jaké míry je aktivita MTMR6 a MTMR9 důležitá pro regulaci příjmu makropinocytárního nákladu.

Ačkoli aktuální data neumožňují formulovat definitivní závěr, podporují hypotézu, že funkce MTMR6/9 v makropinocytóze může být kontext-dependentní a závislá na typu buněk, úrovni jejich stimulace a dalších faktorech, které ovlivňují komplexní buněčnou signalizaci. Naše výsledky naznačují, že snížení exprese MTMR6 nebo MTMR9 může vést ke zvýšení lokální koncentrace fosfoinositidů, jako je PI(3)P nebo PI(3,5)P₂, což stimuluje příjem makropinocytárního nákladu. Z toho vyplývá, že MTMR6 a MTMR9 mohou fungovat jako jemní modulátoři spíše než esenciální faktory makropinocytózy. Z důvodu nedostatečně účinného snížení exprese MTMR8 nebylo možné ověřit jeho potenciální roli v makropinocytóze. Vzhledem k vysoké míře strukturální a funkční podobnosti mezi členy MTMR podrodiny také nelze vyloučit možnost kompenzace mezi jednotlivými paralogy. Pro potvrzení specifické role MTMR6 v regulaci makropinocytózy by proto bylo vhodné provést studie s využitím kombinovaných knockdownů, např. MTMR6 s MTMR8.

Pro určení vlivu MTMRs na příjem dextranu byly dále analyzovány RPE-1, které produkovaly tyto proteiny ve zvýšeném množství. Kvůli omezením TRITC-dextranu byla provedena mikroskopická analýza RPE-1 buněk stabilně exprimujících MTMR6/8/9-EGFP. Tyto linie vykazují zvýšený počet TRITC-dextran

pozitivních váčků na buňku ve srovnání s kontrolními buňkami exprimujícími pouze EGFP, aniž by se významně lišila průměrná velikost váčků (Fig. 8A, B). Jelikož byly použité buněčné linie vytvořeny transdukcí za použití konstruktů vedoucích k nadprodukcí jednotlivých MTMRs, lze předpokládat, že se právě tyto proteiny na pozorovaném jevu podílejí.

Jednou z možných interpretací dat je, že MTMR6, MTMR8 a MTMR9 přímo ovlivňují tvorbu TRITC-dextran pozitivních váčků prostřednictvím makropinocytózy. Zvýšený počet těchto váčků v takovém případě odráží vyšší míru internalizace extracelulárního materiálu. Pozorování, ve kterém vedlo snížení exprese MTMR6 a MTMR9 ke zvýšení příjmu FITC-dextranu (Fig. 6) podporují hypotézu, že MTMR6 a MTMR9 stimulují příjem dextranu při svém nedostatku i nadbytku. Podobné výsledky byly popsány u MTMR9 v regulaci sekrece, kdy snížení i zvýšení jeho exprese vedly ke zpomalení transportu materiálu z ER k cytoplazmatické membráně [74]. To podtrhuje představu, že MTMR9 a jeho vazební partneři působí jako jemní modulátoři udržující kvantitativně stabilní míru určitého buněčného procesu. Optimální hladina těchto proteinů se tak zdá jako klíčová pro zachování správné dynamiky intracelulárního transportu i makropinocytózy.

Tento závěr je však problematický, neboť samotná přítomnost TRITC-dextran pozitivních struktur jednoznačně nevyovídá o mechanismu jejich vzniku. Navíc v experimentálních podmínkách nevedlo ošetření inhibitorem EIPA, běžně používaným k inhibici makropinocytózy, k očekávanému potlačení příjmu makropinocytárního nákladu.

Alternativním vysvětlením pozorovaných dat může být, že MTMRs neovlivňují primárně tvorbu makropinocytárních váčků, ale spíše procesy spojené s jejich zráním a degradací endocytovaného materiálu. Narušení fúze makropinozomů s lysozomy, zpomalení jejich transportu nebo omezená degradace může vést ke zvýšené retenci dextranu uvnitř váčků, a tím i k vyššímu počtu detekovatelných struktur. PI(3,5)P₂ prostřednictvím svých efektorů reguluje fúzi makropinozomů s lysozomy a post-fúzní maturaci těchto kompartmentů [122, 144]. MTMRs jako lipidové fosfatázy, které snižují hladiny PI(3)P a PI(3,5)P₂, tak mohou ovlivňovat jak dynamiku zrání váčků, tak jejich schopnost fúzovat. Například, pokud by nadprodukce MTMR6, MTMR8 a MTMR9 vedla k akumulaci lysozomálních struktur, mohlo by to naznačovat jejich narušenou funkci nebo sníženou schopnost fúze.

Dextran o molekulové hmotnosti 40 kDa, na rozdíl od větších (např. 70 kDa), není zcela selektivním markerem makropinocytózy [145]. Dextrany o nižší molekulové hmotnosti, například 10 kDa, jsou považovány za obecný náklad pro endocytární dráhy [146]. Proto nelze vyloučit, že nadprodukce MTMRs ovlivňuje jiné typy endocytóz, jako je klathrin-dependentní nebo caveolin-dependentní internalizace. Například, indukce na klathrinu závislé endocytózy přítomností transferinu jakožto ligandu vede k signifikantnímu nárůstu počtu, ale i velikosti časných endozomů. Ke stejnému efektu

dochází v přítomnosti EGF, jehož receptory také interagují s klathrin-asociovaným proteiny a po vazbě ligandu jsou rapidně internalizovány [147, 148]. Jelikož stimulace klathrin-dependentní endocytózy zvyšuje počet a velikost endozomů, jejich množství může být ovlivněno i dysregulací této dráhy. Pokud je TRITC-dextran (40 kDa) internalizován touto cestou a nadprodukce MTMRs klathrin-dependentní dráhu ovlivní, může docházet k akumulaci TRITC-dextran pozitivních váčků (> 200 nm) nezávisle na makropinocytóze. Ačkoli si RPE-1 buňky po ošetření inhibitorem EIPA nadále zachovávaly schopnost tvořit membránová zvlnění a makropinozomy, uvedený mechanismus vysvětluje absenci inhibičního efektu.

Z těchto důvodů nelze jednoznačně určit, zda pozorovaný vliv MTMR9, MTMR8 a MTMR6 spočívá v přímé regulaci tvorby makropinozomů, nebo zda vyplývá z jejich vlivu na pozdější fáze endocytárního toku či z poškození lysozomální maturace a degradace. Pro potvrzení role MTMRs v makropinocytóze je potřeba dalších experimentů. Je nezbytné provést kolokalizační analýzy s TRITC-dextran pozitivními váčky a markery jednotlivých endocytárních kompartmentů, zejména makropinozomů a lysozomů. Je potřeba použít makropinocytární marker v podobě fluorescenčně značeného dextranu, který umožní spolehlivě určit celkové množství přijatého signálu. Vhodnou možností je vysokomolekulární dextran, který neumožní příjem fluorochromů mikropinocytickými cestami. Použití funkčního a selektivního makropinocytárního inhibitoru by rovněž poskytlo cenné informace.

Souhrnně lze říct, že zvýšený počet TRITC-dextran pozitivních struktur může být důsledkem jak zvýšené makropinocytózy, tak jiného typu endocytózy, nebo poruch v následné endo-lysozomální maturaci. Aby bylo možné rozlišit mezi těmito možnostmi, budou nutné další experimenty využívající specifické markery, funkční testy a inhibice jednotlivých drah.

6. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo prozkoumat potenciální roli PI(3)P a PI(3,5)P₂-specifických fosfatáz MTMR9, MTMR6 a MTMR8 v regulaci makropinocytózy u fyziologicky makropinocytující lidské epiteliální linie RPE-1. Za tímto účelem byla ovlivňována exprese příslušných MTMRs pomocí vybraných přístupů – knockout metodou CRISPR/Cas9, knockdown pomocí siRNA a retrovirální transdukce pro zvýšení exprese. Zatímco se nepodařilo vytvořit knockout linie, snížení exprese pomocí siRNA a stabilní nadprodukce pomocí retrovirální transdukce byly úspěšné a poskytly funkční modely pro další testování. U těchto buněk byl sledován příjem fluorescenčně značeného dextranu jako modelového makropinocytárního nákladu.

Výsledky ukazují, že snížení exprese MTMR6 a MTMR9 vede k mírnému, ale konzistentnímu zvýšení akumulace dextranu ve srovnání s kontrolní linií. Nadprodukce všech tří fosfatáz vede k nárůstu počtu

dextran pozitivních váčků. Ačkoliv role MTMR8 zůstává nejasná, data naznačují, že míra exprese MTMR6 a MTMR9 ovlivňuje příjem extracelulárního materiálu. Z dat však vyplývá, že je jejich vliv na makropinocytózu, respektive na příjem fluorescenčně značeného dextranu, spíše podpůrný a že MTMRs nejsou faktory zcela nezbytné.

Získané výsledky nejsou v souladu s předchozí studií (Maekawa et al., 2014 [86]), kde knockdown MTMR6 a MTMR9 inhiboval růstovým faktorem stimulovanou makropinocytózu u nádorové linie A431. V této práci byly použity nenádorové RPE-1 buňky kultivované v bezsérovém médiu bez stimulačních faktorů. Na základě těchto rozdílů je možné, že je role MTMR9 a MTMR6 v makropinocytóze buněčně nebo kontextově specifická.

Mezi limitace této práce patří především technická omezení kvantifikace příjmu fluorescenčně značeného dextranu pomocí průtokové cytometrie, která nemusí přesně rozlišit mezi aktivní endocytózou a pasivním průnikem. Inhibice makropinocytózy pomocí EIPA nevedla ke snížení příjmu dextranu, což zpochybňuje jeho účinnost v daném modelu a nevylučuje podíl jiných endocytárních mechanismů.

Do budoucna by bylo vhodné překonat uvedené technické limity a příjem dextranu analyzovat kombinací průtokové cytometrie a mikroskopie živých buněk s použitím markerů jednotlivých membránových kompartmentů. Dále by bylo zajímavé objasnit, na jaké úrovni příjmu makropinocytárního nákladu vzniká zvýšený počet váčků obsahujících dextran v buňkách s nadměrnou expresí studovaných MTMRs a zda je tento fenotyp univerzální.

7. Seznam použité literatury

- [1] R. M. Deraniew, Q. He, J. A. Caruso, a M. L. Greenberg, „Phosphorylation Regulates myo-Inositol-3-phosphate Synthase", *J. Biol. Chem.*, roč. 288, č. 37, s. 26822–26833, zář. 2013, doi: 10.1074/jbc.M113.479121.
- [2] F. Lolicato, W. Nickel, V. Haucke, a M. Ebner, „Phosphoinositide switches in cell physiology - From molecular mechanisms to disease", *J. Biol. Chem.*, roč. 300, č. 3, s. 105757, úno. 2024, doi: 10.1016/j.jbc.2024.105757. (*)
- [3] F. Nakatsu et al., „PtdIns4P synthesis by PI4KIII α at the plasma membrane and its impact on plasma membrane identity", *J. Cell Biol.*, roč. 199, č. 6, s. 1003–1016, pro. 2012, doi: 10.1083/jcb.201206095.
- [4] G. R. V. Hammond, G. Schiavo, a R. F. Irvine, „Immunocytochemical techniques reveal multiple, distinct cellular pools of PtdIns4P and PtdIns(4,5)P $_2$ ", *Biochem. J.*, roč. 422, č. Pt 1, s. 23–35, srp. 2009, doi: 10.1042/BJ20090428.
- [5] G. R. V. Hammond et al., „PI4P And PI(4,5)P $_2$ Are Essential But Independent Lipid Determinants Of Membrane Identity", *Science*, roč. 337, č. 6095, s. 727–730, srp. 2012, doi: 10.1126/science.1222483.
- [6] K. Ketel et al., „A phosphoinositide conversion mechanism for exit from endosomes", *Nature*, roč. 529, č. 7586, s. 408–412, led. 2016, doi: 10.1038/nature16516.
- [7] K. A. Beck a J. H. Keen, „Interaction of phosphoinositide cycle intermediates with the plasma membrane-associated clathrin assembly protein AP-2", *J. Biol. Chem.*, roč. 266, č. 7, s. 4442–4447, bře. 1991, doi: 10.1016/S0021-9258(20)64342-3.
- [8] B. T. Kelly et al., „AP2 controls clathrin polymerization with a membrane-activated switch", *Science*, roč. 345, č. 6195, s. 459–463, čvc. 2014, doi: 10.1126/science.1254836.
- [9] M. Achiriloaie, B. Barylko, a J. P. Albanesi, „Essential Role of the Dynamin Pleckstrin Homology Domain in Receptor-Mediated Endocytosis", *Mol. Cell. Biol.*, roč. 19, č. 2, s. 1410–1415, úno. 1999, doi: 10.1128/mcb.19.2.1410.
- [10] V. Y. Gorbatyuk et al., „Mapping the Phosphoinositide-Binding Site on Chick Cofilin Explains How PIP $_2$ Regulates the Cofilin-Actin Interaction", *Mol. Cell*, roč. 24, č. 4, s. 511–522, lis. 2006, doi: 10.1016/j.molcel.2006.10.007.
- [11] V. Papayannopoulos, C. Co, K. E. Prehoda, S. Snapper, J. Taunton, a W. A. Lim, „A Polybasic Motif Allows N-WASP to Act as a Sensor of PIP $_2$ Density", *Mol. Cell*, roč. 17, č. 2, s. 181–191, led. 2005, doi: 10.1016/j.molcel.2004.11.054.
- [12] L. M. Machesky et al., „Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, roč. 96, č. 7, s. 3739–3744, bře. 1999.
- [13] R. J. Botelho et al., „Localized Biphasic Changes in Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate at Sites of Phagocytosis", *J. Cell Biol.*, roč. 151, č. 7, s. 1353–1368, pro. 2000.
- [14] R. Zoncu et al., „Loss of endocytic clathrin-coated pits upon acute depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, roč. 104, č. 10, s. 3793–3798, bře. 2007, doi: 10.1073/pnas.0611733104.

- [15] K. M. Ferguson, M. A. Lemmon, J. Schlessinger, a P. B. Sigler, „Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain", *Cell*, roč. 83, č. 6, s. 1037–1046, pro. 1995, doi: 10.1016/0092-8674(95)90219-8.
- [16] B. Chang-Ileto, S. G. Frere, R. B. Chan, S. V. Voronov, A. Roux, a G. D. Paolo, „Synaptojanin 1-Mediated PI(4,5)P₂ Hydrolysis Is Modulated by Membrane Curvature and Facilitates Membrane Fission", *Dev. Cell*, roč. 20, č. 2, s. 206–218, úno. 2011, doi: 10.1016/j.devcel.2010.12.008.
- [17] R. Nández et al., „A role of OCRL in clathrin-coated pit dynamics and uncoating revealed by studies of Lowe syndrome cells", *eLife*, roč. 3, s. e02975, srp. 2014, doi: 10.7554/eLife.02975.
- [18] C. C. Thomas, M. Deak, D. R. Alessi, a D. M. F. van Aalten, „High-Resolution Structure of the Pleckstrin Homology Domain of Protein Kinase B/Akt Bound to Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphate", *Curr. Biol.*, roč. 12, č. 14, s. 1256–1262, čvc. 2002, doi: 10.1016/S0960-9822(02)00972-7.
- [19] L. Truebestein et al., „Structure of autoinhibited Akt1 reveals mechanism of PIP₃-mediated activation", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, roč. 118, č. 33, s. e2101496118, srp. 2021, doi: 10.1073/pnas.2101496118.
- [20] D.-S. Byun et al., „Frequent monoallelic deletion of PTEN and its reciprocal associatioin with PIK3CA amplification in gastric carcinoma", *Int. J. Cancer*, roč. 104, č. 3, s. 318–327, dub. 2003, doi: 10.1002/ijc.10962.
- [21] J. Reifengerger et al., „Allelic losses on chromosome arm 10q and mutation of the PTEN (MMAC1) tumour suppressor gene in primary and metastatic malignant melanomas", *Virchows Arch.*, roč. 436, č. 5, s. 487–493, kvě. 2000, doi: 10.1007/s004280050477.
- [22] Y. Posor et al., „Spatiotemporal control of endocytosis by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate", *Nature*, roč. 499, č. 7457, Art. č. 7457, čvc. 2013, doi: 10.1038/nature12360.
- [23] M. Malek et al., „PTEN Regulates PI(3,4)P₂ Signaling Downstream of Class I PI3K", *Mol. Cell*, roč. 68, č. 3, s. 566-580.e10, lis. 2017, doi: 10.1016/j.molcel.2017.09.024.
- [24] Y. Posor, W. Jang, a V. Haucke, „Phosphoinositides as membrane organizers", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, roč. 23, č. 12, s. 797–816, pro. 2022, doi: 10.1038/s41580-022-00490-x. (*)
- [25] D. J. Gillooly et al., „Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells", *EMBO J.*, roč. 19, č. 17, s. 4577–4588, zář. 2000, doi: 10.1093/emboj/19.17.4577.
- [26] N. Jaber et al., „Vps34 regulates Rab7 and late endocytic trafficking through recruitment of the GTPase-activating protein Arp2/3", *J. Cell Sci.*, roč. 129, č. 23, s. 4424–4435, pro. 2016, doi: 10.1242/jcs.192260.
- [27] F. He, R. M. Nichols, M. A. Agosto, a T. G. Wensel, „Roles of class III phosphatidylinositol 3-kinase, Vps34, in phagocytosis, autophagy, and endocytosis in retinal pigmented epithelium", *iScience*, roč. 28, č. 5, s. 112371, dub. 2025, doi: 10.1016/j.isci.2025.112371.
- [28] O. V. Vieira et al., „Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation", *J. Cell Biol.*, roč. 155, č. 1, s. 19–26, říj. 2001, doi: 10.1083/jcb.200107069.

- [29] K. Nigorikawa et al., „Inositol Polyphosphate-4-Phosphatase Type I Negatively Regulates Phagocytosis via Dephosphorylation of Phagosomal PtdIns(3,4)P₂“, PLoS ONE, roč. 10, č. 11, s. e0142091, lis. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0142091.
- [30] E. L. Axe et al., „Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum“, J. Cell Biol., roč. 182, č. 4, s. 685–701, srp. 2008, doi: 10.1083/jcb.200803137.
- [31] E. Itakura, C. Kishi, K. Inoue, a N. Mizushima, „Beclin 1 Forms Two Distinct Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes with Mammalian Atg14 and UVRAG“, Mol. Biol. Cell, roč. 19, č. 12, s. 5360–5372, pro. 2008, doi: 10.1091/mbc.E08-01-0080.
- [32] K. Matsunaga et al., „Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L“, J. Cell Biol., roč. 190, č. 4, s. 511–521, srp. 2010, doi: 10.1083/jcb.200911141.
- [33] I. Vergne et al., „Control of autophagy initiation by phosphoinositide 3-phosphatase jumpy“, EMBO J., roč. 28, č. 15, s. 2244–2258, srp. 2009, doi: 10.1038/emboj.2009.159.
- [34] J. A. Lees, P. Li, N. Kumar, L. S. Weisman, a K. M. Reinisch, „Insights into Lysosomal PI(3,5)P₂ Homeostasis from a Structural-Biochemical Analysis of the PIKfyve Lipid Kinase Complex“, Mol. Cell, roč. 80, č. 4, s. 736-743.e4, lis. 2020, doi: 10.1016/j.molcel.2020.10.003.
- [35] S. N. Zolov et al., „In vivo, PIKfyve generates PI(3,5)P₂, which serves as both a signaling lipid and the major precursor for PI5P“, Proc. Natl. Acad. Sci., roč. 109, č. 43, s. 17472–17477, říj. 2012, doi: 10.1073/pnas.1203106109.
- [36] A. Shisheva, B. Rusin, O. C. Ikonov, C. DeMarco, a D. Sbrissa, „Localization and Insulin-regulated Relocation of Phosphoinositide 5-Kinase PIKfyve in 3T3-L1 Adipocytes“, J. Biol. Chem., roč. 276, č. 15, s. 11859–11869, dub. 2001, doi: 10.1074/jbc.M008437200.
- [37] D. Sbrissa, O. C. Ikonov, a A. Shisheva, „Phosphatidylinositol 3-Phosphate-interacting Domains in PIKfyve: BINDING SPECIFICITY AND ROLE IN PIKfyve ENDOMEMBRANE LOCALIZATION“, J. Biol. Chem., roč. 277, č. 8, s. 6073–6079, úno. 2002, doi: 10.1074/jbc.M110194200.
- [38] A. Cabezas, K. Pattni, a H. Stenmark, „Cloning and subcellular localization of a human phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase, PIKfyve/Fab1“, Gene, roč. 371, č. 1, s. 34–41, dub. 2006, doi: 10.1016/j.gene.2005.11.009.
- [39] O. C. Ikonov, D. Sbrissa, a A. Shisheva, „Mammalian Cell Morphology and Endocytic Membrane Homeostasis Require Enzymatically Active Phosphoinositide 5-Kinase PIKfyve“, J. Biol. Chem., roč. 276, č. 28, s. 26141–26147, čvc. 2001, doi: 10.1074/jbc.M101722200.
- [40] O. C. Ikonov, D. Sbrissa, M. Foti, J.-L. Carpentier, a A. Shisheva, „PIKfyve Controls Fluid Phase Endocytosis but Not Recycling/Degradation of Endocytosed Receptors or Sorting of Procathepsin D by Regulating Multivesicular Body Morphogenesis“, Mol. Biol. Cell, roč. 14, č. 11, s. 4581–4591, lis. 2003, doi: 10.1091/mbc.e03-04-0222.
- [41] G. Sharma et al., „A family of PIKfyve inhibitors with therapeutic potential against autophagy-dependent cancer cells disrupt multiple events in lysosome homeostasis“, Autophagy, roč. 15, č. 10, s. 1694–1718, bře. 2019, doi: 10.1080/15548627.2019.1586257.
- [42] M. Vicinanza et al., „PI(5)P Regulates Autophagosome Biogenesis“, Mol. Cell, roč. 57, č. 2, s. 219–234, led. 2015, doi: 10.1016/j.molcel.2014.12.007.

- [43] J. Hasegawa, R. Iwamoto, T. Otomo, A. Nezu, M. Hamasaki, a T. Yoshimori, „Autophagosome-lysosome fusion in neurons requires INPP5E, a protein associated with Joubert syndrome", *EMBO J.*, roč. 35, č. 17, s. 1853–1867, zář. 2016, doi: 10.15252/embj.201593148.
- [44] J. H. Vines et al., „A PI(3,5)P2 reporter reveals PIKfyve activity and dynamics on macropinosomes and phagosomes", *J. Cell Biol.*, roč. 222, č. 9, s. e202209077, čer. 2023, doi: 10.1083/jcb.202209077.
- [45] J. Schaletzky, S. K. Dove, B. Short, O. Lorenzo, M. J. Clague, a F. A. Barr, „Phosphatidylinositol-5-Phosphate Activation and Conserved Substrate Specificity of the Myotubularin Phosphatidylinositol 3-Phosphatases", *Curr. Biol.*, roč. 13, č. 6, s. 504–509, bře. 2003, doi: 10.1016/S0960-9822(03)00132-5.
- [46] P. Berger, S. Bonneick, S. Willi, M. Wymann, a U. Suter, „Loss of phosphatase activity in myotubularin-related protein 2 is associated with Charcot–Marie–Tooth disease type 4B1", *Hum. Mol. Genet.*, roč. 11, č. 13, s. 1569–1579, čer. 2002, doi: 10.1093/hmg/11.13.1569.
- [47] K. Hnia, I. Vaccari, A. Bolino, a J. Laporte, „Myotubularin phosphoinositide phosphatases: cellular functions and disease pathophysiology", *Trends Mol. Med.*, roč. 18, č. 6, s. 317–327, čer. 2012, doi: 10.1016/j.molmed.2012.04.004. (*)
- [48] D. Saar, C. L. E. Lennartsson, P. Weidner, E. Burgermeister, a B. B. Kragelund, „The Myotubularin Related Proteins and the Untapped Interaction Potential of Their Disordered C-Terminal Regions", *Proteins*, roč. 93, č. 4, s. 831–854, dub. 2025, doi: 10.1002/prot.26774.
- [49] Ó. Lorenzo, S. Urbé, a M. J. Clague, „Analysis of phosphoinositide binding domain properties within the myotubularin-related protein MTMR3", *J. Cell Sci.*, roč. 118, č. 9, s. 2005–2012, kvě. 2005, doi: 10.1242/jcs.02325.
- [50] F. L. Robinson a J. E. Dixon, „The Phosphoinositide-3-phosphatase MTMR2 Associates with MTMR13, a Membrane-associated Pseudophosphatase Also Mutated in Type 4B Charcot-Marie-Tooth Disease", *J. Biol. Chem.*, roč. 280, č. 36, s. 31699–31707, zář. 2005, doi: 10.1074/jbc.M505159200.
- [51] Ó. Lorenzo, S. Urbé, a M. J. Clague, „Systematic analysis of myotubularins: heteromeric interactions, subcellular localisation and endosomelated functions", *J. Cell Sci.*, roč. 119, č. 14, s. 2953–2959, čvc. 2006, doi: 10.1242/jcs.03040.
- [52] P. Berger, C. Schaffitzel, I. Berger, N. Ban, a U. Suter, „Membrane association of myotubularin-related protein 2 is mediated by a pleckstrin homology-GRAM domain and a coiled-coil dimerization module", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, roč. 100, č. 21, s. 12177–12182, říj. 2003, doi: 10.1073/pnas.2132732100.
- [53] M. J. Begley, G. S. Taylor, S.-A. Kim, D. M. Veine, J. E. Dixon, a J. A. Stuckey, „Crystal Structure of a Phosphoinositide Phosphatase, MTMR2: Insights into Myotubular Myopathy and Charcot-Marie-Tooth Syndrome", *Mol. Cell*, roč. 12, č. 6, s. 1391–1402, pro. 2003, doi: 10.1016/S1097-2765(03)00486-6.
- [54] S. M. Bong et al., „Crystal Structure of Human Myotubularin-Related Protein 1 Provides Insight into the Structural Basis of Substrate Specificity", *PLOS ONE*, roč. 11, č. 3, s. e0152611, podzim 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0152611.

- [55] J. Y. Son et al., „Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of human myotubularin-related protein 3", *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.*, roč. 70, č. Pt 9, s. 1240–1243, srp. 2014, doi: 10.1107/S2053230X14015714.
- [56] K. Tsujita et al., „Myotubularin Regulates the Function of the Late Endosome through the GRAM Domain-Phosphatidylinositol 3,5-Bisphosphate Interaction", *J. Biol. Chem.*, roč. 279, č. 14, s. 13817–13824, dub. 2004, doi: 10.1074/jbc.M312294200.
- [57] J. Zou, S.-C. Chang, J. Marjanovic, a P. W. Majerus, „MTMR9 Increases MTMR6 Enzyme Activity, Stability, and Role in Apoptosis", *J. Biol. Chem.*, roč. 284, č. 4, s. 2064–2071, led. 2009, doi: 10.1074/jbc.M804292200.
- [58] P. Choudhury et al., „Specificity of the Myotubularin Family of Phosphatidylinositol-3-phosphatase Is Determined by the PH/GRAM Domain", *J. Biol. Chem.*, roč. 281, č. 42, s. 31762–31769, říj. 2006, doi: 10.1016/S0021-9258(19)84091-7.
- [59] J. Laporte, F. Blondeau, A. Buj-Bello, a J.-L. Mandel, „The myotubularin family: from genetic disease to phosphoinositide metabolism", *Trends Genet.*, roč. 17, č. 4, s. 221–228, dub. 2001, doi: 10.1016/S0168-9525(01)02245-4. (*)
- [60] S. C. Previtali, A. Quattrini, a A. Bolino, „Charcot–Marie–Tooth type 4B demyelinating neuropathy: deciphering the role of MTMR phosphatases", *Expert Rev. Mol. Med.*, roč. 9, č. 25, s. 1–16, zář. 2007, doi: 10.1017/S1462399407000439. (*)
- [61] Y. Mochizuki a P. W. Majerus, „Characterization of myotubularin-related protein 7 and its binding partner, myotubularin-related protein 9", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, roč. 100, č. 17, s. 9768–9773, srp. 2003, doi: 10.1073/pnas.1333958100.
- [62] J. Zou, C. Zhang, J. Marjanovic, M. V. Kisseleva, P. W. Majerus, a M. P. Wilson, „Myotubularin-related protein (MTMR) 9 determines the enzymatic activity, substrate specificity, and role in autophagy of MTMR8", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, roč. 109, č. 24, s. 9539–9544, čer. 2012, doi: 10.1073/pnas.1207021109.
- [63] E. A. Allen, C. Amato, T. M. Fortier, P. Velentzas, W. Wood, a E. H. Baehrecke, „A conserved myotubularin-related phosphatase regulates autophagy by maintaining autophagic flux", *J. Cell Biol.*, roč. 219, č. 11, s. e201909073, zář. 2020, doi: 10.1083/jcb.201909073.
- [64] M. Palmieri et al., „Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways", *Hum. Mol. Genet.*, roč. 20, č. 19, s. 3852–3866, říj. 2011, doi: 10.1093/hmg/ddr306.
- [65] A. Manžéger et al., „Condition-dependent functional shift of two *Drosophila* Mtmr lipid phosphatases in autophagy control", *Autophagy*, roč. 17, č. 12, s. 4010–4028, doi: 10.1080/15548627.2021.1899681.
- [66] K. Borziak a J. Finkelstein, „X-linked genetic risk factors that promote autoimmunity and dampen remyelination are associated with multiple sclerosis susceptibility", *Mult. Scler. Relat. Disord.*, roč. 66, říj. 2022, doi: 10.1016/j.msard.2022.104065.
- [67] M. G. Waugh, „Chromosomal Instability and Phosphoinositide Pathway Gene Signatures in Glioblastoma Multiforme", *Mol. Neurobiol.*, roč. 53, č. 1, s. 621–630, 2016, doi: 10.1007/s12035-014-9034-9.

- [68] Y. Mochizuki et al., „Phosphatidylinositol 3-Phosphatase Myotubularin-related Protein 6 (MTMR6) Is Regulated by Small GTPase Rab1B in the Early Secretory and Autophagic Pathways", *J. Biol. Chem.*, roč. 288, č. 2, s. 1009–1021, led. 2013, doi: 10.1074/jbc.M112.395087.
- [69] S. Srivastava et al., „The Phosphatidylinositol 3-Phosphate Phosphatase Myotubularin-Related Protein 6 (MTMR6) Is a Negative Regulator of the Ca²⁺-Activated K⁺ Channel KCa_{3.1}", *Mol. Cell. Biol.*, roč. 25, č. 9, s. 3630–3638, kvě. 2005, doi: 10.1128/MCB.25.9.3630-3638.2005.
- [70] S. Srivastava et al., „Phosphatidylinositol-3 Phosphatase Myotubularin-Related Protein 6 Negatively Regulates CD4 T Cells", *Mol. Cell. Biol.*, roč. 26, č. 15, s. 5595–5602, srp. 2006, doi: 10.1128/MCB.00352-06.
- [71] M. K. Jha et al., „Myotubularin-related protein-6 silencing protects mice from *Leishmania donovani* infection", *Int. Immunopharmacol.*, roč. 129, s. 111589, bře. 2024, doi: 10.1016/j.intimp.2024.111589.
- [72] S. Parveen et al., „Myotubularin-related protein 6 is an ion channel-associated pro-leishmanial phosphatase", *Int. Immunopharmacol.*, roč. 129, s. 111644, bře. 2024, doi: 10.1016/j.intimp.2024.111644.
- [73] L. Guo et al., „Lipid phosphatases identified by screening a mouse phosphatase shRNA library regulate T-cell differentiation and Protein kinase B AKT signaling", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, roč. 110, č. 20, s. E1849–E1856, kvě. 2013, doi: 10.1073/pnas.1305070110.
- [74] L. Doubravská, V. Dostál, F. Knop, L. Libusová, a M. Macůrková, „Human myotubularin-related protein 9 regulates ER-to-Golgi trafficking and modulates WNT3A secretion", *Exp. Cell Res.*, roč. 386, č. 1, s. 111709, led. 2020, doi: 10.1016/j.yexcr.2019.111709.
- [75] T. Yanagiya et al., „Association of single-nucleotide polymorphisms in MTMR9 gene with obesity", *Hum. Mol. Genet.*, roč. 16, č. 24, s. 3017–3026, pro. 2007, doi: 10.1093/hmg/ddm260.
- [76] K. Hotta et al., „Association of variations in the FTO, SCG3 and MTMR9 genes with metabolic syndrome in a Japanese population.", *J. Hum. Genet.*, roč. 56, č. 9, s. 647–651, zář. 2011.
- [77] L. Tang et al., „The MTMR9 rs2293855 polymorphism is associated with glucose tolerance, insulin secretion, insulin sensitivity and increased risk of prediabetes", *Gene*, roč. 546, č. 2, s. 150–155, srp. 2014, doi: 10.1016/j.gene.2014.06.028.
- [78] W. Fan, X. Chen, R. Li, R. Zheng, Y. Wang, a Y. Guo, „A prognostic risk model for ovarian cancer based on gene expression profiles from gene expression omnibus database", *Biochem. Genet.*, roč. 61, č. 1, s. 138–150, úno. 2023, doi: 10.1007/s10528-022-10232-5.
- [79] X. Y. Goh et al., „Integrative analysis of array-comparative genomic hybridisation and matched gene expression profiling data reveals novel genes with prognostic significance in oesophageal adenocarcinoma", *řij.* 2011, doi: 10.1136/gut.2010.234179.
- [80] J. A. Swanson, „Shaping cups into phagosomes and macropinosomes", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, roč. 9, č. 8, s. 639–649, srp. 2008, doi: 10.1038/nrm2447. (*)
- [81] G. Bloomfield a R. R. Kay, „Uses and abuses of macropinocytosis", *J. Cell Sci.*, roč. 129, č. 14, s. 2697–2705, čvc. 2016, doi: 10.1242/jcs.176149. (*)

- [82] J. Rejman, V. Oberle, I. S. Zuhorn, a D. Hoekstra, „Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis.", *Biochem. J.*, roč. 377, č. Pt 1, s. 159–169, led. 2004, doi: 10.1042/BJ20031253.
- [83] S. Yoshida, A. D. Hoppe, N. Araki, a J. A. Swanson, „Sequential signaling in plasma-membrane domains during macropinosome formation in macrophages", *J. Cell Sci.*, roč. 122, č. 18, s. 3250–3261, zář. 2009, doi: 10.1242/jcs.053207.
- [84] T. P. Welliver, S. L. Chang, J. J. Linderman, a J. A. Swanson, „Ruffles limit diffusion in the plasma membrane during macropinosome formation", *J. Cell Sci.*, roč. 124, č. 23, s. 4106–4114, pro. 2011, doi: 10.1242/jcs.091538.
- [85] U. Hacker, R. Albrecht, a M. Maniak, „Fluid-phase uptake by macropinocytosis in *Dictyostelium*", *J. Cell Sci.*, roč. 110, č. 2, s. 105–112, led. 1997, doi: 10.1242/jcs.110.2.105.
- [86] M. Maekawa et al., „Sequential breakdown of 3-phosphorylated phosphoinositides is essential for the completion of macropinocytosis", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, roč. 111, č. 11, s. E978–E987, bře. 2014, doi: 10.1073/pnas.1311029111.
- [87] Y.-Y. Zhang et al., „SARS-CoV-2 hijacks macropinocytosis to facilitate its entry and promote viral spike-mediated cell-to-cell fusion", *J. Biol. Chem.*, roč. 298, č. 11, s. 102511, zář. 2022, doi: 10.1016/j.jbc.2022.102511.
- [88] „Macrophage colony-stimulating factor (rM-CSF) stimulates pinocytosis in bone marrow-derived macrophages", *J. Exp. Med.*, roč. 170, č. 5, s. 1635–1648, lis. 1989.
- [89] A. von Delwig et al., „Inhibition of macropinocytosis blocks antigen presentation of type II collagen in vitro and in vivo in HLA-DR1 transgenic mice", *Arthritis Res. Ther.*, roč. 8, č. 4, s. R93, 2006, doi: 10.1186/ar1964.
- [90] J. Canton, D. Schlam, C. Breuer, M. Gütschow, M. Glogauer, a S. Grinstein, „Calcium-sensing receptors signal constitutive macropinocytosis and facilitate the uptake of NOD2 ligands in macrophages", *Nat. Commun.*, roč. 7, s. 11284, dub. 2016, doi: 10.1038/ncomms11284.
- [91] J. C. Charpentier et al., „Macropinocytosis drives T cell growth by sustaining the activation of mTORC1", *Nat. Commun.*, roč. 11, s. 180, led. 2020, doi: 10.1038/s41467-019-13997-3.
- [92] X. Shao et al., „Placental trophoblast syncytialization potentiates macropinocytosis via mTOR signaling to adapt to reduced amino acid supply", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, roč. 118, č. 3, s. e2017092118, led. 2021, doi: 10.1073/pnas.2017092118.
- [93] A. Umopathy et al., „Spatiotemporal Live-Cell Analysis of Photoreceptor Outer Segment Membrane Ingestion by the Retinal Pigment Epithelium Reveals Actin-Regulated Scission", *J. Neurosci.*, roč. 43, č. 15, s. 2653–2664, dub. 2023, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1726-22.2023.
- [94] T. Storm, T. Burgoyne, a C. E. Futter, „Membrane trafficking in the retinal pigment epithelium at a glance", *J. Cell Sci.*, roč. 133, č. 16, s. jcs238279, srp. 2020, doi: 10.1242/jcs.238279. (*)
- [95] K. O. Schink et al., „The phosphoinositide coincidence detector Phafin2 promotes macropinocytosis by coordinating actin organisation at forming macropinosomes", *Nat. Commun.*, roč. 12, č. 1, s. 6577, pro. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-26775-x.

- [96] K. W. Tan, V. Nähse, C. Campsteijn, A. Brech, K. O. Schink, a H. Stenmark, „JIP4 is recruited by the phosphoinositide-binding protein Phafin2 to promote recycling tubules on macropinosomes", *J. Cell Sci.*, roč. 134, č. 14, s. jcs258495, čvc. 2021, doi: 10.1242/jcs.258495.
- [97] S. M. Kim et al., „PTEN deficiency and AMPK activation promote nutrient scavenging and anabolism in prostate cancer cells", *Cancer Discov.*, roč. 8, č. 7, s. 866–883, čvc. 2018, doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-1215.
- [98] C. Commisso et al., „Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells", *Nature*, roč. 497, č. 7451, s. 633–637, kvě. 2013, doi: 10.1038/nature12138.
- [99] P. Rodriguez-Viciano, P. H. Warne, B. Vanhaesebroeck, M. D. Waterfield, a J. Downward, „Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation.", *EMBO J.*, roč. 15, č. 10, s. 2442–2451, kvě. 1996.
- [100] V. Jayashankar a A. L. Edinger, „Macropinocytosis confers resistance to therapies targeting cancer anabolism", *Nat. Commun.*, roč. 11, s. 1121, úno. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-14928-3.
- [101] G. Lambies et al., „Cell polarity proteins promote macropinocytosis in response to metabolic stress", 30. leden 2024, bioRxiv. doi: 10.1101/2024.01.16.575943.
- [102] K. Wahi et al., „Macropinocytosis mediates resistance to loss of glutamine transport in triple-negative breast cancer", *EMBO J.*, roč. 43, č. 23, s. 5857–5882, říj. 2024, doi: 10.1038/s44318-024-00271-6.
- [103] N. Araki, Y. Egami, Y. Watanabe, a T. Hatae, „Phosphoinositide metabolism during membrane ruffling and macropinosome formation in EGF-stimulated A431 cells", *Exp. Cell Res.*, roč. 313, č. 7, s. 1496–1507, dub. 2007, doi: 10.1016/j.yexcr.2007.02.012.
- [104] M. Fujii, K. Kawai, Y. Egami, a N. Araki, „Dissecting the roles of Rac1 activation and deactivation in macropinocytosis using microscopic photo-manipulation", *Sci. Rep.*, roč. 3, s. 2385, srp. 2013, doi: 10.1038/srep02385.
- [105] K. F. Talias, J. H. Hartwig, H. Ishihara, Y. Shibasaki, L. C. Cantley, a C. L. Carpenter, „Type I α phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase mediates Rac-dependent actin assembly", *Curr. Biol.*, roč. 10, č. 3, s. 153–156, úno. 2000, doi: 10.1016/S0960-9822(00)00315-8.
- [106] T. P. Welliver a J. A. Swanson, „A growth factor signaling cascade confined to circular ruffles in macrophages", *Biol. Open*, roč. 1, č. 8, s. 754–760, čer. 2012, doi: 10.1242/bio.20121784.
- [107] P. Ghoshal et al., „Loss of GTPase activating protein neurofibromin stimulates paracrine cell communication via macropinocytosis", *Redox Biol.*, roč. 27, s. 101224, kvě. 2019, doi: 10.1016/j.redox.2019.101224.
- [108] G. Bloomfield, D. Traynor, S. P. Sander, D. M. Veltman, J. A. Pachebat, a R. R. Kay, „Neurofibromin controls macropinocytosis and phagocytosis in *Dictyostelium*", *eLife*, roč. 4, s. e04940, doi: 10.7554/eLife.04940.
- [109] C. M. Buckley et al., „Coordinated Ras and Rac Activity Shapes Macropinocytic Cups and Enables Phagocytosis of Geometrically Diverse Bacteria", *Curr. Biol.*, roč. 30, č. 15, s. 2912-2926.e5, srp. 2020, doi: 10.1016/j.cub.2020.05.049.
- [110] D. M. Veltman et al., „A plasma membrane template for macropinocytic cups", *eLife*, roč. 5, s. e20085, doi: 10.7554/eLife.20085.

- [111] V. Koronakis et al., „WAVE regulatory complex activation by cooperating GTPases Arf and Rac1", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, roč. 108, č. 35, s. 14449–14454, srp. 2011, doi: 10.1073/pnas.1107666108.
- [112] M. E. Maxson, H. Sarantis, A. Volchuk, J. H. Brumell, a S. Grinstein, „Rab5 regulates macropinocytosis by recruiting the inositol 5-phosphatases OCRL and Inpp5b that hydrolyse PtdIns(4,5)P2", *J. Cell Sci.*, roč. 134, č. 7, s. jcs252411, dub. 2021, doi: 10.1242/jcs.252411.
- [113] J. Hasegawa et al., „SH3YL1 regulates dorsal ruffle formation by a novel phosphoinositide-binding domain", *J. Cell Biol.*, roč. 193, č. 5, s. 901–916, kvě. 2011, doi: 10.1083/jcb.201012161.
- [114] Z. Ye et al., „PRL1 and PRL3 promote macropinocytosis via its lipid phosphatase activity", *Theranostics*, roč. 14, č. 9, s. 3423–3438, kvě. 2024, doi: 10.7150/thno.93127.
- [115] S. Tremel et al., „Structural basis for VPS34 kinase activation by Rab1 and Rab5 on membranes", *Nat. Commun.*, roč. 12, s. 1564, bře. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-21695-2.
- [116] A. Cezanne, J. Lauer, A. Solomatina, I. F. Sbalzarini, a M. Zerial, „A non-linear system patterns Rab5 GTPase on the membrane", *eLife*, roč. 9, s. e54434, doi: 10.7554/eLife.54434.
- [117] M. C. Kerr et al., „Visualisation of macropinosome maturation by the recruitment of sorting nexins", *J. Cell Sci.*, roč. 119, č. 19, s. 3967–3980, říj. 2006, doi: 10.1242/jcs.03167.
- [118] J. Rink, E. Ghigo, Y. Kalaidzidis, a M. Zerial, „Rab Conversion as a Mechanism of Progression from Early to Late Endosomes", *Cell*, roč. 122, č. 5, s. 735–749, zář. 2005, doi: 10.1016/j.cell.2005.06.043.
- [119] W. D. Feliciano, S. Yoshida, S. W. Straight, a J. A. Swanson, „Coordination of the Rab5 Cycle on Macropinosomes", *Traffic Cph. Den.*, roč. 12, č. 12, s. 1911–1922, pro. 2011, doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01280.x.
- [120] S. Morishita, N. Wada, M. Fukuda, a T. Nakamura, „Rab5 activation on macropinosomes requires ALS2, and subsequent Rab5 inactivation through ALS2 detachment requires active Rab7", *FEBS Lett.*, roč. 593, č. 2, s. 230–241, 2019, doi: 10.1002/1873-3468.13306.
- [121] Y. Egami a N. Araki, „Spatiotemporal Localization of Rab20 in Live RAW264 Macrophages during Macropinocytosis", *Acta Histochem. Cytochem.*, roč. 45, č. 6, s. 317–323, pro. 2012, doi: 10.1267/ahc.12014.
- [122] S. Krishna et al., „PIKfyve regulates vacuole maturation and nutrient recovery following engulfment", *Dev. Cell*, roč. 38, č. 5, s. 536–547, zář. 2016, doi: 10.1016/j.devcel.2016.08.001.
- [123] A. Payapilly a A. Malliri, „Compartmentalisation of RAC1 signalling", *Curr. Opin. Cell Biol.*, roč. 54, s. 50–56, říj. 2018, doi: 10.1016/j.ceb.2018.04.009. (*)
- [124] K. L. McKinley a I. M. Cheeseman, „Large-Scale Analysis of CRISPR/Cas9 Cell-Cycle Knockouts Reveals the Diversity of p53-Dependent Responses to Cell-Cycle Defects", *Dev. Cell*, roč. 40, č. 4, s. 405-420.e2, úno. 2017, doi: 10.1016/j.devcel.2017.01.012.
- [125] A. R. Bowden et al., „Parallel CRISPR-Cas9 screens clarify impacts of p53 on screen performance", *eLife*, roč. 9, s. e55325, kvě. 2020, doi: 10.7554/eLife.55325.

- [126] Y. Katoh et al., „Practical method for targeted disruption of cilia-related genes by using CRISPR/Cas9-mediated, homology-independent knock-in system", *Mol. Biol. Cell*, roč. 28, č. 7, s. 898–906, dub. 2017, doi: 10.1091/mbc.e17-01-0051.
- [127] Z. Yang et al., „Fast and sensitive detection of indels induced by precise gene targeting", *Nucleic Acids Res.*, roč. 43, č. 9, s. e59, kvě. 2015, doi: 10.1093/nar/gkv126.
- [128] A. Simmons a J. Alberola-Ila, „Retroviral Transduction of T Cells and T Cell Precursors", *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, roč. 1323, s. 99–108, 2016, doi: 10.1007/978-1-4939-2809-5_8.
- [129] F. Simpson, B. Banushi, S. Joseph, B. Lum, a J. Lee, „Endocytosis in Cancer and Cancer Therapy", *Nat. Rev. Cancer*, roč. 23, kvě. 2023, doi: 10.1038/s41568-023-00574-6. (*)
- [130] D. Wang et al., „G Proteins G12 and G13 Control the Dynamic Turnover of Growth Factor-induced Dorsal Ruffles", *J. Biol. Chem.*, roč. 281, č. 43, s. 32660–32667, říj. 2006, doi: 10.1074/jbc.M604588200.
- [131] N. W. Goehring, D. Chowdhury, A. A. Hyman, a S. W. Grill, „FRAP Analysis of Membrane-Associated Proteins: Lateral Diffusion and Membrane-Cytoplasmic Exchange", *Biophys. J.*, roč. 99, č. 8, s. 2443–2452, říj. 2010, doi: 10.1016/j.bpj.2010.08.033.
- [132] G. D. Eytan, R. Regev, G. Oren, a Y. G. Assaraf, „The Role of Passive Transbilayer Drug Movement in Multidrug Resistance and Its Modulation", *J. Biol. Chem.*, roč. 271, č. 22, s. 12897–12902, kvě. 1996, doi: 10.1074/jbc.271.22.12897.
- [133] G. D. Eytan, R. Regev, G. Oren, C. D. Hurwitz, a Y. G. Assaraf, „Efficiency of P-glycoprotein-Mediated Exclusion of Rhodamine Dyes from Multidrug-Resistant Cells is Determined by their Passive Transmembrane Movement Rate", *Eur. J. Biochem.*, roč. 248, č. 1, s. 104–112, 1997, doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.00104.x.
- [134] S. Forster, A. E. Thumser, S. R. Hood, a N. Plant, „Characterization of Rhodamine-123 as a Tracer Dye for Use In In vitro Drug Transport Assays", *PLOS ONE*, roč. 7, č. 3, s. e33253, podzim 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0033253.
- [135] H. Lin et al., „Identification of novel macropinocytosis inhibitors using a rational screen of Food and Drug Administration-approved drugs", *Br. J. Pharmacol.*, roč. 175, č. 18, s. 3640–3655, zář. 2018, doi: 10.1111/bph.14429.
- [136] M. Koivusalo et al., „Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling", *J. Cell Biol.*, roč. 188, č. 4, s. 547–563, úno. 2010, doi: 10.1083/jcb.200908086.
- [137] B. Masereel, L. Pochet, a D. Laeckmann, „An overview of inhibitors of Na⁺/H⁺ exchanger", *Eur. J. Med. Chem.*, roč. 38, č. 6, s. 547–554, čer. 2003, doi: 10.1016/S0223-5234(03)00100-4. (*)
- [138] T. Kawasaki, C. Kaneko, R. Nakanishi, Y. Moriyama, a T. Nabekura, „Amiloride is a suitable fluorescent substrate for the study of the drug transporter human multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1)", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, roč. 592, s. 113–118, úno. 2022, doi: 10.1016/j.bbrc.2022.01.014.
- [139] M. G. Rolver, L. O. Elingaard-Larsen, A. P. Andersen, L. Counillon, a S. F. Pedersen, „Pyrazine ring-based Na⁺/H⁺ exchanger (NHE) inhibitors potently inhibit cancer cell growth in 3D culture, independent of NHE1", *Sci. Rep.*, roč. 10, č. 1, s. 5800, dub. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-62430-z.

- [140] S. Menon et al., „Spatial Control of the TSC Complex Integrates Insulin and Nutrient Regulation of mTORC1 at the Lysosome", *Cell*, roč. 156, č. 4, s. 771–785, úno. 2014, doi: 10.1016/j.cell.2013.11.049.
- [141] S. Yoshida, R. Pacitto, Y. Yao, K. Inoki, a J. A. Swanson, „Growth factor signaling to mTORC1 by amino acid–laden macropinosomes", *J. Cell Biol.*, roč. 211, č. 1, s. 159–172, říj. 2015, doi: 10.1083/jcb.201504097.
- [142] S. Sung, J. Choi, a H. Cheong, „Catabolic pathways regulated by mTORC1 are pivotal for survival and growth of cancer cells expressing mutant Ras", *Oncotarget*, roč. 6, č. 38, s. 40405–40417, lis. 2015, doi: 10.18632/oncotarget.6334.
- [143] M. Manifava et al., „Dynamics of mTORC1 activation in response to amino acids", *eLife*, roč. 5, s. e19960, říj. 2016, doi: 10.7554/eLife.19960.
- [144] Y. Wu, X. Hu, Z. Wei, a Q. Lin, „Cellular Regulation of Macropinocytosis", *Int. J. Mol. Sci.*, roč. 25, č. 13, Art. č. 13, led. 2024, doi: 10.3390/ijms25136963. (*)
- [145] M. Al Soraj et al., „siRNA and pharmacological inhibition of endocytic pathways to characterize the differential role of macropinocytosis and the actin cytoskeleton on cellular uptake of dextran and cationic cell penetrating peptides octaarginine (R8) and HIV-Tat", *J. Controlled Release*, roč. 161, č. 1, s. 132–141, čvc. 2012, doi: 10.1016/j.jconrel.2012.03.015.
- [146] L. Li, T. Wan, M. Wan, B. Liu, R. Cheng, a R. Zhang, „The effect of the size of fluorescent dextran on its endocytic pathway", *Cell Biol. Int.*, roč. 39, č. 5, s. 531–539, 2015, doi: 10.1002/cbin.10424.
- [147] N. Naslavsky a S. Caplan, „Receptor-mediated internalization promotes increased endosome size and number in a RAB4- and RAB5-dependent manner", *Eur. J. Cell Biol.*, roč. 102, č. 3, s. 151339, zář. 2023, doi: 10.1016/j.ejcb.2023.151339.
- [148] A. Sorkin, M. Mazzotti, T. Sorkina, L. Scotto, a L. Beguinot, „Epidermal Growth Factor Receptor Interaction with Clathrin Adaptors Is Mediated by the Tyr974-containing Internalization Motif", *J. Biol. Chem.*, roč. 271, č. 23, s. 13377–13384, čer. 1996, doi: 10.1074/jbc.271.23.13377.

Přehledové články a sekundární citace jsou označeny: (*).

8. Přílohy

8.1. Seznam uvedených videí s odkazem na online uložení (Google Disk)

Všechna videa uvedená v práci jsou uložena ve společné složce na Google Disku: Příloha_videa (https://drive.google.com/drive/folders/1G5laXYqkREXvK_6wmZLLAIKvABq6KGxb?usp=drive_link).

Videa slouží jako ilustrační doplněk. Pro správné zobrazení doporučuji stáhnout a přehrát v plné kvalitě. Přímé přehrávání může být zkreslené.

Video 1: Zobrazení makropinocytární aktivity živých RPE-1 buněk pomocí světelné mikroskopie v širokém zorném poli. Nestimulované RPE-1 WT byly kultivovány v DMEM+/+ a snímány světelnou mikroskopií s frekvencí snímků 2,26 s po dobu 9 min. Buňky mají vysoce dynamickou cytoplazmatickou membránu, ze které se vytváří objemné váčky, což naznačuje vysokou bazální hladinu makropinocytózy (https://drive.google.com/file/d/1ywMLxz9rnu-EZ6w2gDwf99JAArvx6nb3/view?usp=drive_link).

Video 2: RPE-1 buňky stabilně produkující MTMR9-EGFP. Signál vykazuje převážně cytosolickou distribuci, dále se akumuluje v periferních oblastech s intenzivní membránovou dynamikou (https://drive.google.com/file/d/1LNIPfnr27aa818zVG2v7h7ZYAgHeCdQK/view?usp=drive_link).

Video 3: Negativní kontrola – RPE-1 buňky stabilně exprimující samotný EGFP, u nichž byla fluorescence rovněž patrná v oblastech membránového zvlnění (https://drive.google.com/file/d/16kOQyBW4X17BgEH-R2q8ozcSsbTamMHS/view?usp=drive_link).

Video 4: Pozitivní kontrola – RPE-1 buňky tranzientně exprimující konstitutivně aktivní variantu RAC1(G12V)-EGFP s výraznou akumulací signálu v dynamických periferních oblastech (https://drive.google.com/file/d/1klmjsDU_26wV0oPT-A5RdF4tR6t8vAAW/view?usp=drive_link).

8.2. Seznam použité literatury (reference) v RIS formátu

Nahráno jako samostatný soubor (Příloha k práci).