

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Reprodukční a vývojová biologie



Bc. Eliška Pácalová

Identifikace bazolaterálních lokalizačních motivů urátového transportéru
GLUT9 s využitím funkčních studií

Identification of basolateral localization motifs of the urate transporter GLUT9
using functional studies

Diplomová práce

Školitel: doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Ing. Jiří Vávra

Praha, 2023

Prohlášení

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

V Praze, ---

Bc. Eliška Pácalová

Podpis

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Ing. Vladimíru Krylovovi Ph.D. za odborné vedení diplomové práce a odborné a cenné rady při její zpracování. Velké poděkování patří také mému konzultantovi Mgr. Ing. Jiřímu Vávrovi za užitečné rady během celé diplomové práce, pomoc, trpělivost a motivaci při práci v laboratoři. Chtěla bych také poděkovat celému týmu laboratoře Vývojové biologie na PřF UK, jmenovitě pak Mgr. Anetě Vrzáčkové a Dominice Pánské. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala RNDr. Kristině Kejlové Ph.D. za pomoc při korektuře této práce.

Za trpělivost a neutuchající podporu bych také chtěla poděkovat svým přátelům, rodině a těm nejbližším.

Abstrakt

Transportér GLUT9, kódovaný genem *SLC2A9*, je jedním z klíčových proteinů zajišťujících přenos kyseliny močové přes membránu epitelálních buněk proximálního tubulu člověka. Tento protein se u člověka exprimuje přirozeně ve dvou sestřihových variantách: dlouhé (GLUT9L) a krátké (GLUT9S), které se vzájemně liší sekvencí N-konce. Každá z těchto izoform je lokalizována na jiný pól epitelální buňky, přičemž se předpokládá, že řídicí sekvence pro lokalizaci proteinu je přítomná právě ve vzájemně rozdílné N-koncové doméně. U proteinu byly také zjištěny četné alelické varianty měnící jeho transportní schopnosti. Tato diplomová práce se zabývá ověřením vlivu nově objevené alelické varianty představující záměnu valinu na pozici 114 za leucin (V114L, u krátké izoformy odpovídající alelická varianta V85L) na schopnost přenášet kyselinu močovou. Zároveň se práce snaží ověřit vliv mutací v motivech, které by mohly být zodpovědné za lokalizaci proteinu, na jeho umístění v buňce a rovněž tak na transport kyseliny močové. Testovány byly dva dileucinové motivy 12LGL14 a 33LL34 a tyrosinový motiv 84YIKA87. Funkční studie s ^{14}C radioaktivně značeným urátem prokázaly signifikantní snížení transportní funkce u alelické varianty V114L/V85L u obou izoform proteinu ve směru efluxu. Byly také testovány vytipované lokalizační motivy LL, LGL a YIKA, u kterých byl zjištěn vliv na přenos urátu a byl u nich pozorován slabší membránový signál a shlukování signálu uvnitř cytoplazmy buněk oproti divokým variantám proteinu. V poslední řadě byl testován vliv přítomnosti glukózy v inkubačním pufru na směr přenosu urátu u jednotlivých izoform a byl naznačen význam přítomnosti extracelulární glukózy pro přenos urátu z buněk do vnějšího prostředí, respektive ve směru efluxu.

Klíčová slova

Kyselina močová, urátové transportéry, GLUT9, *in vitro* transportní studie, HEK293A

Abstract

The GLUT9 transporter, coded by the *SLC2A9* gene, is one of the key proteins enabling the transfer of uric acid across the membrane in epithelial cells of the proximal tubule. In humans, this protein is naturally expressed in two variants: long (GLUT9L) and short (GLUT9S), which differ from one another by their N-terminus sequence. Each of these isoforms is localized on a different pole of the epithelial cell. The signal sequence/motif responsible for this difference is presumed to be located in the aforementioned N-terminus domain. Numerous allelic variants influencing the transport properties of the protein have also been described. The first aim of this thesis is to verify the influence of a newly discovered variant, characterized by substituting of valine for leucine in the 114th position (V114L, in the short form its corresponding variant V85L) on the ability to transport uric acid. Second aim is to verify the influence of mutations in selected motifs, which could be responsible for the localization of the protein, thus also changing its transport properties. Two dileucine motifs 12LGL14 and 33LL34 and one tyrosine motif 84YIKA87 were tested. Functional studies using ¹⁴C radiolabeled urate demonstrated significant decrease of transport ability for the V114L/V85L allelic variant in both isoforms of the protein in the efflux direction. The selected localization motifs LL, LGL and YIKA have also been examined. When compared to wild-type variants, all three have shown weaker membrane signals and greater clustering in the cell cytoplasm. They also influenced the urate transport ability. Lastly, influence of the presence of glucose in the incubation buffer has been tested. The preliminary results indicate possible importance of extracellular glucose for the urate efflux transport.

Key words

Uric acid, urate transporters, GLUT9, *in vitro* transport assay, HEK293A

Obsah

Seznam zkratk	3
1. Teoretický úvod	5
1.1. Kyselina močová v organismu	5
1.1.1. Kyselina močová a urikémie	7
1.1.2. Kyselina močová v evoluci	8
1.2. Urátové transportéry	9
1.3. SLC2A9 (GLUT9)	11
1.3.1. Struktura GLUT9	13
1.3.2. Izoformy proteinu GLUT9	14
1.3.3. Vliv alelických variant GLUT9 na přenos urátu	17
1.3.4. GLUT9 v živočišné říši	19
1.4. Cytoplazmatická membrána epitelálních buněk	20
1.4.1. Lokalizace proteinů v polarizovaných a nepolarizovaných buňkách	21
1.4.2. Lokalizační motivy	22
2. Cíle diplomové práce	24
3. Materiál a přístroje	25
3.1. Použité přístroje, buněčné linie, plazmidy a primery	25
3.2. Použitý materiál, chemikálie, kultivační média a kity	26
4. Metody	28
4.1. Kultivace buněčné linie HEK293A	28
4.2. Amplifikace původních plazmidů GLUT9L a GLUT9S	28
4.3. Klonování genů GLUT9L a GLUT9S do plazmidu	29
4.3.1. Amplifikace genů GLUT9L a GLUT9S s ligačními nástavci pro restriktázy Sgf1 a Not1	29
4.3.2. Restrikce genu z plazmidu pLenti-C-mGFP pomocí restrikčních endonukleáz Sgf1 a Not1	30
4.3.3. Gelová elektroforéza po restrikci pLenti-C-mGFP a vyříznutí rozštěpeného vektoru pLenti-C-mGFP z gelu	31
4.3.4. Ligace	31
4.3.5. Transformace bakterií DH α – T1 <i>E. coli</i>	31
4.3.6. Izolace plazmidu pomocí izolačního kitu, stanovení koncentrace DNA a sekvenace	32
4.4. Mutagenese	32
4.4.1. Příprava mutagenačních primerů	33
4.4.2. Oligonukleotidem řízená mutagenese (PCR)	33
4.4.2.1. Optimalizace mutagenesí pro jednotlivé varianty	34
4.4.3. Gelová elektroforéza	35
4.4.4. Rekombinační reakce	35

4.5.	Transientní transfekce buněčné linie HEK293A pomocí PEI	36
4.6	Příprava mikroskopických preparátů	36
4.6.1	Příprava mikroskopických preparátů pro kolokalizační pozorování	37
4.7	Funkční studie s C ¹⁴ radioaktivně značeným urátem	37
4.8	Bradfordova reakce na měření množství proteinů v buněčném lyzátu	38
4.9	Western blot.....	38
4.10	Statistická analýza	40
5	Výsledky.....	41
5.1	Výběr lokalizačních motivů k oligonukleotidem řízené mutagenézi.....	41
5.2	Funkční studie	41
5.2.1	Funkční studie alelické varianty V114L/V85L.....	42
5.2.1.1	Varianta GLUT9L V114L a GLUT9S V85L/V114L v HBSS pufru	43
5.2.1.2	Varianta GLUT9L V114L a GLUT9S V114L/V85L v HBSS depolarizačním pufru.....	47
5.2.2	Funkční studie vytipovaných lokalizačních sekvencí.....	51
5.2.2.1	Funkční studie varianty GLUT9L LL.....	52
5.2.2.2	Funkční studie varianty GLUT9L LGL	54
5.2.2.3	Funkční studie varianty GLUT9L YIKA.....	56
5.2.3	Funkční studie WT GLUT9L a GLUT9S v pufru bez přítomnosti glukózy, KRP pufru a bezglukózovém pufru.....	58
5.3	Western blot.....	61
5.4	Fluorescenční mikroskopie.....	62
5.4.1	Mikroskopie vytipovaných lokalizačních motivů v kolokalizaci s časnými endozomy a lysozomy 68	
6	Diskuze	74
6.1	Alelická varianta V114L u GLUT9L a V85L GLUT9S.....	78
6.2	Vytipované lokalizační motivy LL, LGL a YIKA.....	81
6.3	Směr transportu urátu u transportéru GLUT9 v odlišných podmínkách extracelulárního prostředí.....	84
7	Závěr.....	88
8	Literatura.....	89

Seznam zkratek

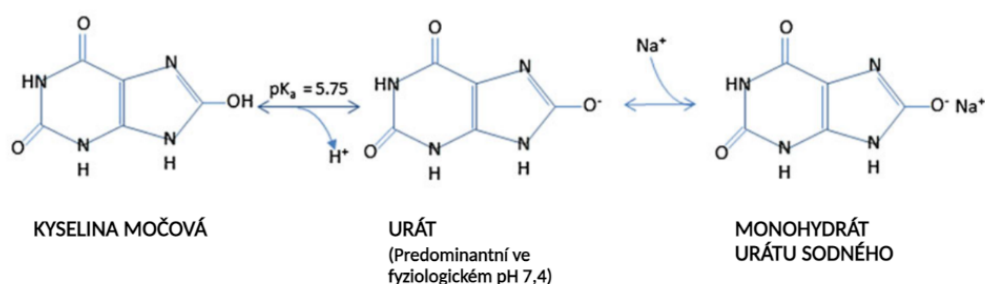
ZKRATKA	ANGLICKÝ NÁZEV	ČESKÝ NÁZEV
ABCC4	ATP-binding cassette subfamily C member 4	Protein 4 superrodiny C vázajících ATP
ABCG2	ATP-binding cassette subfamily G member 2	Protein 2 superrodiny G vázajících ATP
AKI	Acute kidney injury	Akutní selhání ledvin
AP 1-4	Adaptor protein 1-4	Adaptorový protein 1-4
BCRP	Breast cancer resistance protein	Protein rezistence nádoru prsu
bp	Base pair	Páry bází
BSA	Bovine serum albumin	Bovíní/Hovězí sérový albumin
CPM	Counts per minute	Počet záblesků za minutu
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindole	4',6-diamino-2-fenylindol
ddH ₂ O	Double distilled water/H ₂ O	Dvojitě destilovaná voda/H ₂ O
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Modifikované Dulbeccovo základní médium
DMSO	Dimethylsulfoxide	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleotidová kyseliny
DPM	Desintegration per minute	Počet rozpadů za minutu
DTT	Dichlorodiphenyltrichlorethane	Dichlorodifenyltrichlorethan
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EEA1	Early endosome antigen 1	Antigen 1 časných endozomů
EGF	Epidermal growth factor	Epidermální růstový faktor
EIARF	Exercise-induced acute renal failure	Akutní selhání ledvin vyvolané nadměrnou námahou
F Primer	Forward primer	„Přední“ primer
FBS	Fetal bovine serum	Fetální boviní sérum
GLUT9	Glucose transporter 9	Glukózový transportér 9
GPI	Glycosylphosphatidylinositol	Glykosylfosfatidylinositol
GWAS	Genom Wide Association study	Celogenomová asociační studie
HBSS	Hank's balanced salt solution	Hankův solný roztok
HEK293	Human embryonic kidney 293 cells	Buněčná linie lidských embryonálních buněk ledvin 293
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonová kyselina
ITM2B	Integral membrane protein 2B	Integrální membránový protein 2B
Km	Michaelis-Menten constant	Konstanta Michaelis Mentenové
KRP	Kreb's Ringer phosphate buffer	Krebsův Ringerův fosfátový pufr
LAMP1	Lysosomal-associated membrane protein 1	Membránový protein 1 spojený s lysozomy
LGL	Motif leucin-glycin-leucin	Motiv leucin-glycin-leucin
LL	Motif leucin-leucin	Motiv leucin-leucin
LRP1	Low density lipoprotein receptor-related protein 1	Protein související s nízkohustotním lipoproteinovým receptorem 1
MAFLD	Metabolic associated fatty liver disease	Ztukovatění jater spojené s metabolickou dysfunkcí
MCS	Multiple cloning site	Vícenásobné klonovací místo
MDCK	Madin-Darby canine kidney cell line	Buněčné linie Madin-Darby psích ledviných buněk
MEM	Minimal essential medium	Minimální základní médium
mGFP	Monomeric green fluorescent protein	Monomerní zelený fluorescenční protein

miRNA	MicroRNA	MikroRNA
MRP4	Multidrug resistance-associated protein 4	Protein 4 spojený s mnohočetnou lékovou resistencí
NPT1/4	Sodium-dependent phosphate transporter 1/4	Na sodíku závislý transportér fosfátu 1/4
OAT1/2/3/4/10	Organic anion transporet 1/2/3/4/10	Transportér organických aniontů 1/2/3/4/10
PBS	Phosphate buffered saline	Fosfátový pufr
PBST	Phosphate buffered saline with tween	Fosfátový pufr s tweenem
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerázová řetězová reakce
PDZK1	PDZ domain containing protein 1	Protein 1 s PDZ doménou
PEI	Polyethylenimine	Polyethylenimin
R Primer	Reverse primer	„Zpětný“ primer
RHUC	Hereditary renal hypouricemia	Dědičná renální hypourikémie
RHUC I	Hereditary renal hypouricemia type I	Dědičná renální hypourikémie typu I
RHUC II	Hereditary renal hypouricemia type II	Dědičná renální hypourikémie typu II
RNA	Ribonucleic acid	Ribonukleová kyselina
ROS	Reactive oxygen species	Reaktivní formy kyslíku
S.D.	Standard deviation	Směrodatná odchylka
siRNA	Small/Short interfering RNA	Malá/Krátká interferující RNA
SLC	Solute carrier family	Rodina proteinů přenašečů rozpuštěných látek
SNPs	Single nucleotide polymorphisms	Jednonukleotidové polymorfismy
SOC	Super Optimal Broth	Optimální bujón pro růst bakteriálních kultur
SUA	Serum uric acid	Kyselina močová v séru
TBE	Tris/Borate/EDTA buffer	Tris/Borát/EDTA pufr
TMD	Transmembrane domain	Transmembránový doména
UOX	Urate oxidase/uricase	Urát oxidáza/urikáza
URAT1	Urate transporter 1	Urátový transportér 1
URATv1	Voltage-driven urate transporter 1	Napětově závislý urátový transportér 1
WT	Wild type	Divoká varianta genu
YIKA	Motif tyrosine-isoleucine-lysine-alanine	Motiv tyrosin-isoleucin-lysin-alanin

1. Teoretický úvod

1.1. Kyselina močová v organismu

Kyselina močová je slabá kyselina vznikající jako produkt katabolismu purinů. U člověka a vyšších primátů jde o finální produkt této dráhy, jelikož nejsou schopni katabolizovat kyselinu močovou na další složky kvůli nefunkčnímu enzymu urát oxidáze/urikáze kódované pseudogenem *UOX*. U většiny savců je kyselina močová dále katabolizována až na allantoin, který je daleko rozpustnější. V těle se kyselina močová při fyziologickém pH 7,4 přednostně nachází jako urát, aniont kyseliny močové (viz *Obr.1*) (Wu *et al.*, 1992; Martillo *et al.*, 2014). Lidé a vyšší primáti mají obecně daleko vyšší koncentraci kyseliny močové v organismu než zbytek savců, v rozsahu 180-420 $\mu\text{mol/L}$ oproti průměrné koncentraci ostatních savců v rozsahu 30-120 $\mu\text{mol/L}$ (Hediger *et al.*, 2005). Koncentrace kyseliny močové v séru je označována zkratkou SUA neboli „serum uric acid“.

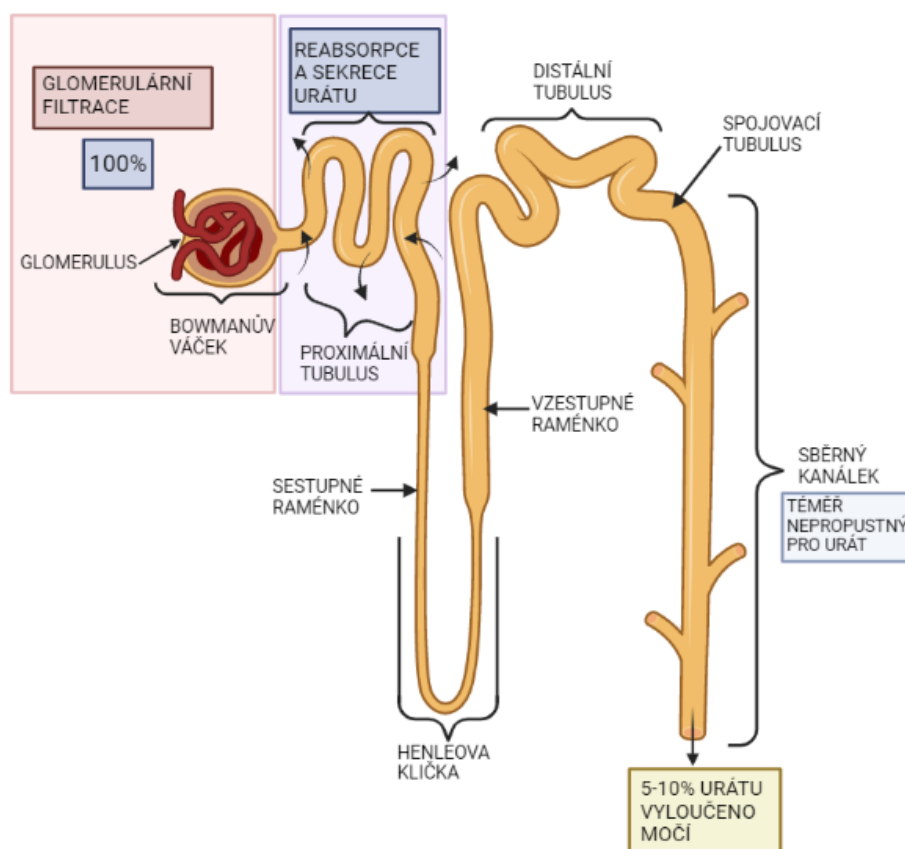


Obr.1: Kyselina močová v organismu a její formy: Kyselina močová, urát ve fyziologickém pH 7,4 a monohydrát urátu sodného jakožto forma v krystalcích typických pro onemocnění dna; upraveno podle (Martillo *et al.*, 2014).

Kyselina močová funguje v krvi jako silný antioxidant chránící buňky i celý organismus před volnými kyslíkovými radikály ROS. Pravděpodobně vychytává kyslíkové radikály (ROS) i samostatné singletové molekuly kyslíku a hydroxylové radikály (Ames *et al.*, 1981; Itahana *et al.*, 2014). V rámci organismu musí být udržována homeostáza kyseliny močové v těle, jelikož krátkodobé i dlouhodobé výkyvy mohou mít na organismus silnější či slabší negativní účinky. Jednorázové zvýšení urátu v těle může nastávat i v reakci na podněty, například při zvýšeném fyzickém vypětí. V odpovědi na zvýšenou fyzickou aktivitu a tím zvýšení oxidativního stresu dochází ke krátkodobému zvýšení SUA právě kvůli antioxidačním schopnostem urátu, což může být funkční odpovědí na právě způsobený zvýšený oxidativní stres (Ames *et al.*, 1981). Hladina kyseliny močové v séru se liší i v průběhu života. Nejnížší je krátce po narození, kdy dochází k velké exkreci urátu a nízkému příjmu purinů v potravě a v průběhu života stoupá (Stiburkova and Bleyer, 2012).

Výsledná koncentrace kyseliny močové v těle je dána dynamickou rovnováhou mezi poměrem její produkce, zpětné reabsorpce a sekrece. Hlavní orgánem nezbytným pro udržení určité koncentrace kyseliny močové v těle jsou ledviny (cca 70%), v menší míře pak střevo (cca 30%). V minulosti byl

uváděn 4 krokový systém cirkulace urátu v organismu: filtrace v ledvinách v glomerulu, reabsorpce a sekrece v ledvinách a případná konečná reabsorpce také v ledvinách. Nakonec je z těla vyloučeno cca 5-10% vznikajícího urátu (Diamond and Sharon, 1974; Levinson and Sorensen, 1980; Hyndman *et al.*, 2016). V současné době se vypouští čtvrtý krok a panuje shoda, že tato dráha má tři základní stupně: prvotní glomerulární filtrace, reabsorpce a sekrece v proximálním tubulu, u které však není známo, zda probíhá zároveň s reabsorpcí či jako další krok. Nefron, jeho jednotlivé části a cesta urátu ledvinným nefronem je zobrazena na *Obr.2*. Urát se takto dostává do krevního řečiště přes epiteliální buňky ledvin díky specifickým urátovým transportérům. Do střeva se kyselina močová dostává sekrecí z krevního řečiště či přítomností v tělních tekutinách například ve slinách, žaludečních šťávách a žluči. I v epitelu střeva může poté docházet k reabsorpci či sekreci přes specifické urátové transportéry. K zvýšené eliminaci urátu zde dochází obvykle při renální nedostatečnosti (Sorensen, 1965; Hyndman *et al.*, 2016). V ledvinách a střevu je urát přenášen výhradně přes urátové transportéry přes buňky epitelu transcelulárně, v placentě je mimo jiné urát přenášen i paracelulárně (Uehara *et al.*, 2014).



Obr.2: Ledvinový nefron a jeho části (glomerulus, Bowmanův váček, proximální tubulus, Henleova klička a její raménka, distální tubulus, spojovací tubulus a sběrný kanálek) a cesta urátu těmito částmi; šipky v proximálním tubulu značí směr přenosu urátu (Vytvořeno v aplikaci Biorender, www.biorender.com).

1.1.1. Kyselina močová a urikémie

Pokud některá ze složek produkce, zpětné absorpce či sekrece urátu nefungují správně, může docházet k výkyvu koncentrace urátu v těle. Pokud koncentrace kyseliny močové v séru klesne pod 2,0 mg/dL (~ 119-120 μmol/L) je tato patologie označována jako hypourikémie. Pokud se SUA nachází v rozmezí 2,0 mg/dL a 3,0 mg/dL (~ 178,5 μmol/L) hovoříme o mírné hypourikémii (Kawamura *et al.*, 2021). Naopak jako hyperurikémie je definována koncentrace v séru vyšší než 7 mg/dl (~ 416 μmol/L) u mužů a vyšší než 5,7-6,0 mg/dl (~ 339-357 μmol/L) u žen. Prevalence hyperurikémie a s ní spojených onemocnění je celosvětově mnohonásobně vyšší u mužů než u žen a stoupá se vzrůstajícím věkem (Koo *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2022). Například na území USA se uvádí, že prevalence hyperurikémie dosahovala až 21,6% populace v průměru ženské i mužské populace, kde koncentrace kyseliny močové v séru vyšší než 7 mg/dL byla nalezena u 13,2% této populace (Zhu *et al.*, 2011). Takto vysoká čísla mohou být spojena s epidemií obezity a hyperurikémií jakožto negativním důsledkem nezdravého životního stylu (Chen-Xu *et al.*, 2019). U asijských států je prevalence hyperurikémie podle dostupných studií mezi 5-12% (Kim *et al.*, 2018; Koo *et al.*, 2021). Ze zbytku světa je jen velmi málo takovýchto studií, které by udávaly alespoň přibližnou prevalenci hyperurikémie.

Nejčastějším onemocněním spojeným s dlouhodobou hyperurikémií je dna, kdy dochází k úplné saturaci séra kyselinou močovou. Jedná se o artropatii kloubů se vznikem typických krystalků usazené kyseliny močové tvořených i jejími dalšími formami jako například monohydrátem urátu sodného (viz. Obr.1) (Martillo *et al.*, 2014). Dna ovšem není specifická jen pro člověka a primáty s obecně vyšší koncentrací urátu v těle, ale může se objevit i u jiných živočichů. Paleontologické nálezy dokumentují výskyt onemocnění podobného dně i u vyhynulých skupin živočichů (např. striktně karnivorní *Tyrannosaurus rex*) (Rothschild *et al.*, 1997). Hyperurikémie je také jedním z vážných následků akutní leukemie a non-Hodgkinova lymfomu. I zde je prevalence vyšší u mužské části pacientů (Annemans *et al.*, 2003; Oka *et al.*, 2014).

Na druhé straně zastoupení jedinců trpících hypourikémií se v populacích pohybují mezi 1-2%, přičemž je vyšší v ženské části populací. Zajímavé je, že většina hypourikemických pacientek byly ženy mladší 50 let s vrcholem mezi 40-49 rokem. Data však pochází především z Asie a pro ostatní kontinenty a populace chybí. Je možné, že míra hypourikemických pacientů je v asijských zemích daleko vyšší než ve zbytku světa či jen zatím nebyla posbírána takto velká množství dat do evropských, afrických, amerických a dalších studií (Son *et al.*, 2016; Kawamura *et al.*, 2021; Koo *et al.*, 2021). Mimo Asii byly prováděny daleko menší studie ve velikosti jednotlivých rodin než celých populací (Dinour *et al.*, 2012; Mancikova *et al.*, 2016). Hypourikémie je u vysokého procenta pacientů spíše důsledkem jiných onemocnění a specifické medikace. Sama o sobě je hypourikémie na rozdíl od

hyperurikémie často asymptomatická (Son *et al.*, 2016). Lze tak nalézt hypourikémii u pacientů bez dalších onemocnění (Dinour *et al.*, 2012). Dokonce i pokud se SUA v organismu blíží nule, může být takto silná hypourikémie asymptomatická (Dinour *et al.*, 2012). Na druhé straně existuje jisté spojení mezi nízkou koncentrací urátu v séru a neurodegenerativními onemocněními jako Parkinsonova choroba (Church and Ward, 1994; Ellmore *et al.*, 2020). Hypourikémie je také spojena s horší prognózou u pacientů s kandidózou (Zhou *et al.*, 2022) a může být jedním z faktorů rozvoje roztroušené sklerózy a to především u žen (Zoccolella *et al.*, 2012). Dalšími důsledky hypourikémie u hypourikemických pacientů mohou být ledvinové kameny a akutní selhání ledvin neboli AKI (acute kidney failure), případně i EIARF (exercise-induced acute renal failure, akutní selhání ledvin vyvolané nadměrnou námahou, jedná se o typ AKI (Dinour *et al.*, 2010; Jiang and Hu, 2014). Pokud se nejedná o hypourikemické mutace ojedinělé, ale dědičné, můžeme tyto patologie rozdělit na RHUC (hereditary renal hypouricemia, dědičná renální hypourikémie) I. a II. typu podle toho v jakém urátovém transportéru dochází k deficienci. RHUC typu I je způsobena defekty v transportéru URAT1, naopak RHUC typu II je způsobena mutacemi v transportéru GLUT9 (Dinour *et al.*, 2012; Stiburkova *et al.*, 2013; Claverie-Martin *et al.*, 2018).

Nezanedbatelné nejsou ani krátkodobé výkyvy v SUA. Krátkodobé výkyvy v hladině urátu/kyseliny močové v těle mohou být předzvěstí MAFLD neboli steatózy jater spojené s metabolickou dysfunkcí (Metabolic associated fatty liver disease) (Zeng *et al.*, 2022). Koncentrace kyseliny močové v těle kolísá i v období těhotenství. Mnoho žen v období těhotenství může trpět hyperurikémií spojenou s preeklampií (Bainbridge and Roberts, 2008; Baumann *et al.*, 2019; Lüscher *et al.*, 2022). V nových studiích se dokonce ukazuje, že právě hyperurikémie ještě před těhotenstvím vede, minimálně na myším modelu, ke vzniku nebezpečné preeklampsie v průběhu těhotenství, což může mít za následky vážné problémy matky i vyvíjejícího se plodu (Baumann *et al.*, 2019; Lüscher *et al.*, 2022). Kyselina močová je produkována i samotnou fetoplacentální jednotkou a musí být transportována přes placentu do těla matky a vyloučena z organismu, aby nedocházelo k její akumulaci v plodu (Baumann *et al.*, 2019).

Ohledně samotného cyklu kyseliny močové v těle se stále nachází mnoho otazníků, na které je potřeba odpovědět. Například stále dochází k objevování a popisování dalších složek dráhy katabolismu kyseliny močové na allantoin, což může poskytnout nové cesty pro léčbu hyperurikémie (Ramazzina *et al.*, 2006).

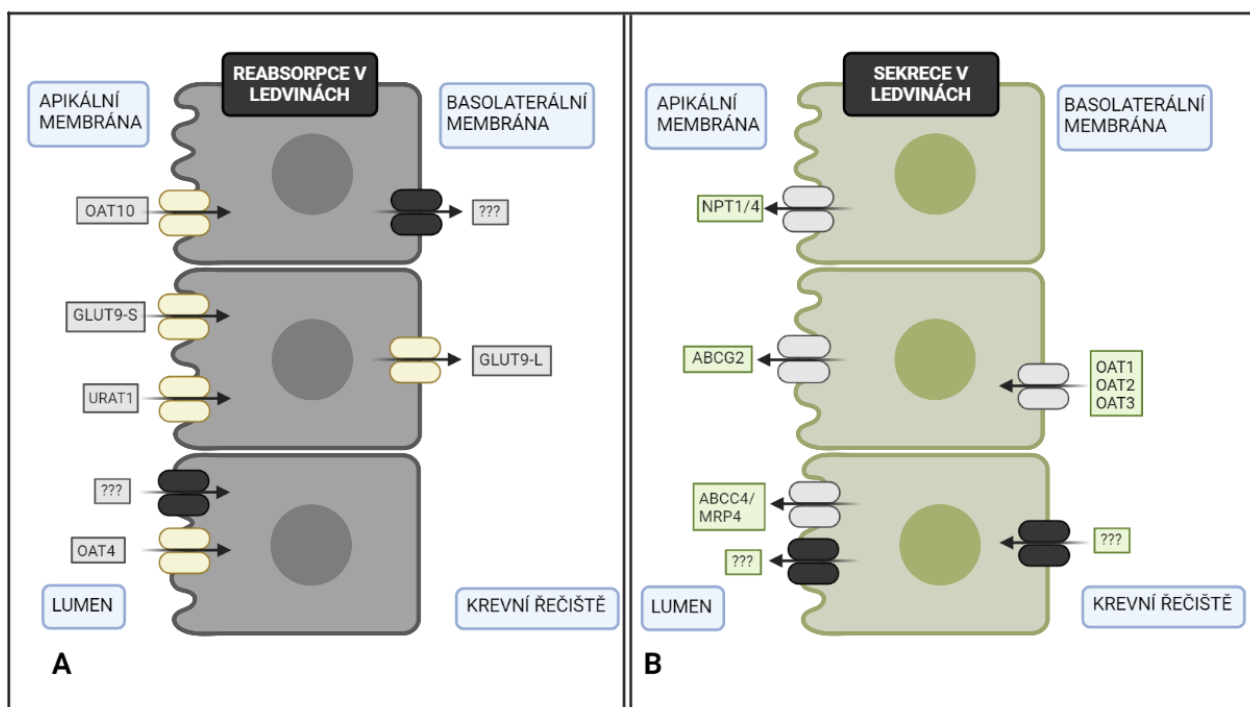
1.1.2. Kyselina močová v evoluci

V evoluci ke ztrátě funkčnosti urát oxidázy či dráhy katabolismu přeměny kyseliny močové došlo několikrát a nezávisle na sobě. Mimo vyšší primáty a člověka nejsou schopni přeměnit kyselinu močovou na allantoin ptáci, někteří pozemní plazi, hlísti rodu *Caenorhabditis*, zástupci hmyzu mimo

rod *Diptera* a některé rody kvasinek a bakterií (Ramazzina *et al.*, 2006). Vyšší primáti a člověk mají místo genu pro urikázu tzv. pseudogen *UOX*, kdy nedochází k transkripci a následné translaci ve funkční protein (Ramazzina *et al.*, 2006; Kratzer *et al.*, 2014). U každé skupiny nemuselo dojít ke ztrátě funkčnosti přímo urikázy jako u člověka a vyšších primátů, ale mohla být narušena dráha katabolismu kyseliny močové na allantoin v jiné složce této dráhy (Keebaugh and Thomas, 2010). Hominoide sdílí více stejných mutací v genu pro urát oxidázu jak v oblasti promotoru, tak i kódující oblasti genu. Jedna či více z těchto mutací zapříčinily pseudogenetizaci tohoto genu. Tato stejná mutace není sdílena s gibony, kteří také nemají tento enzym funkční. Muselo tedy dojít k minimálně dvěma mutačním událostem vedoucím ke ztrátě funkčnosti tohoto enzymu a celé katabolické dráhy kyseliny močové (Wu *et al.*, 1992; Oda *et al.*, 2002). Existuje několik teorií a hypotéz, proč právě u lidí a vyšších primátů byla evolučně výhodná neschopnost přeměny kyseliny močové až na allantoin vedoucí ke zvýšení koncentrace kyseliny močové v těle i přes fakt, že tato zvýšená koncentrace může vést k mnoha patologickým změnám. Většina se shoduje na tom, že to bylo potřebné k rozvoji mozku, přechodu k bipedii a díky svým vysokým antioxidačním schopnostem i k prodloužení délky života (Ames *et al.*, 1981; Yang *et al.*, 2022). Nejrozšířenější hypotéza se zabývá vztahem mezi zvýšením koncentrace kyseliny močové v těle, následnou zvýšenou zpětnou absorpcí sodíku zpět do těla a zvýšením krevního tlaku, který mohl napomoci přechodu k bipedii (Watanabe *et al.*, 2002). Další zajímavou hypotézou je takzvaná „Back-to-Africa“ hypotéza. K částečné ztrátě funkce urikázy postupně došlo v eocénu a k úplné v myocénu, kdy došlo k ochlazení Země. Podle této hypotézy ztráta aktivity urikázy mohla vést k vyšší schopnosti ukládat tukové zásoby z fruktózy a evolučně výhodným se tak stal návrat do teplejšího prostředí Afriky, kde strava byla bohatší na ovoce. Což podporuje i doložená migrace z Eurasie zpět do Afriky (Johnson and Andrews, 2010; Kratzer *et al.*, 2014).

1.2. Urátové transportéry

Kyselina močová ve své disociované i nedisociované formě nemůže volně procházet přes membránu buněk samovolně, potřebuje k tomu specifické transportéry. Obecně tyto transportéry můžeme rozdělit do několika skupin. Například do superrodiny ABC (ATP binding cassette), které potřebují k transportu látek přenosu energii ve formě ATP a superrodiny SLC (solute carriers family), které nepotřebují ke svému fungování ATP. Podle směru transportu urátu na transportéry reabsorpční, které se podílejí na reabsorpci urátu zpět do krevního řečiště, a sekreční, které naopak urát sekretují do lumen. V neposlední řadě pak na urátové transportéry ledvinové a střevní (Xu *et al.*, 2016).



Obr.3: Model reabsorpce a sekrece a jednotlivých zúčastněných urátových transportérů v proximálním tubulu ledvin; **A-** Model reabsorpce urátu v ledvinách; **B-** Model sekrece urátu v ledvinách; otazníky značí místo pro zatím nenalazené a nepopsané urátové transportéry; šipka značí směr přenosu urátu (Upraveno podle (Yang et al., 2022), vytvořeno v aplikaci Biorender, www.biorender.com).

Mezi reabsorpční urátové transportéry v ledvinách (Obr. 3) patří první popsaný urátový transportér URAT1 (Enomoto et al., 2002), vysokoafinitní přenašeč OAT10 (Higashino et al., 2020; Toyoda et al., 2022), OAT4 (Hagos et al., 2007) a dlouhá i krátká izoforma proteinu GLUT9, kterému je věnována kapitola 1.3. URAT1 je klíčový v reabsorpci urátu v proximálním tubulu ledvin, v distální části tubulu nefronu se nenachází vůbec. Na rozdíl od proteinu GLUT9 není napěťově závislý. V souvislosti s proteinem URAT1 bylo popsáno mnoho mutantních variant u pacientů s hypo- i hyperurikémií a u pacientů s idiopatickou renální hypourikémií v populacích po celém světě, včetně té české (Enomoto et al., 2002; Stiburkova et al., 2013; Kawamura et al., 2021). Spolu s delší variantou proteinu GLUT9 jsou nejdůležitějšími urátovými transportéry apikální membrány proximálního tubulu ledvin a zajišťují zde většinu zpětné reabsorpce urátu (Anzai et al., 2008; Dinour et al., 2010). Sekrece urátu v ledvinách naopak z krevního řečiště do lumen ledvin je závislá na vnějším gradientu sodných kationtů a je zprostředkována transportéry OAT (Organic anion transporter), přesněji na proteinech OAT1, OAT2 a OAT3, které byly do současnosti popsány jako jediné transportéry bazolaterální membrány zapojené v sekreci urátu (Bakhiya et al., 2003; Sweet et al., 2003; Xu et al., 2005). Na apikální membráně ledvinného epitelu se nachází sekreční ATP-závislý přenašeč ABCC4/MRP4 (Van Aubel et al., 2005), ABCG2 (Huls et al., 2008; Toyoda et al., 2019) a sekundárně závislý transportér NPT1/SLC17A1 (Chiba et al., 2015). Na Obr.3 je mimo zmíněné

transportéry nastíněno i místo pro kandidátní transportéry reabsorpční i sekreční dráhy urátu, které jsou stále zkoumány a zatím nepotvrzeny jako urátové transportéry.

Méně prozkoumanou oblastí jsou urátové transportéry ve střevu, i když zde dochází až k 1/3 veškeré sekrece urátu v těle. Tento poměr se může zvýšit, pokud dochází k renální nedostatečnosti v sekreci urátu (Xu *et al.*, 2016). Mezi zatím známé střevní urátové transportéry patří především OAT10 (SLC22A13), který se ovšem nachází i na apikální straně buněk distálního tubulu ledvin. U tohoto transportéru bylo také objeveno několik alelických variant, které mají přímou spojitost s hyperurikémií (Toyoda *et al.*, 2022). Mezi další střevní urátové transportéry patří ABCG2 z rodiny ABC (Toyoda *et al.*, 2019), MRP2 a MRP4 a jejich mnohé izoformy (Xu *et al.*, 2016) a výměníky NPT4 (Jutabha *et al.*, 2011a, 2011b). Ve střevu se nachází také delší izoforma proteinu GLUT9, GLUT9L, která se také podílí na sekreci urátu do lumen (Xu *et al.*, 2016). Mezi kandidátní urátové transportéry jsou MCT9 patřící také do rodiny SLC, avšak jeho funkce jako střevního urátového transportéru nebyla ještě zcela potvrzena (Nakayama *et al.*, 2013).

Jednonukleotidové záměny a další mutace byly postupně popsány u většiny zmíněných urátových transportérů, jak reabsorpčních, tak sekrečních. Tyto studie jsou stále aktuální a objevují se nové, což vede k dalšímu zkoumání komplexnosti oběhu urátu v těle a spojitostí s častými onemocněními (Xu *et al.*, 2005; Jutabha *et al.*, 2011a; Claverie-Martin *et al.*, 2018; Zeng *et al.*, 2022). U mnohých urátových transportérů byly objeveny jednonukleotidové záměny, resp. Jednonukleotidové polymorfismy (SNP), které částečně či úplně omezují jejich funkci.

1.3. SLC2A9 (GLUT9)

GLUT9, produkt genu *SLC2A9*, je uniportní membránový přenašeč řazený do třídy II transportérů glukózy. Ukazuje se však, že i když je schopný v malé míře přenášet D-glukózu i D-fruktózu, nejedná se o jeho primární substrát (Enomoto *et al.*, 2002; Anzai *et al.*, 2008; Bibert *et al.*, 2009; Witkowska *et al.*, 2012; Long *et al.*, 2015). Galaktózu však tento transportér přenášet nedokáže (Manolescu *et al.*, 2007). Glukóza i fruktóza mají také odlišné vazebné místo než hlavní substrát tohoto proteinu a nejsou ani jeho kompetitivními inhibitory (Caulfield *et al.*, 2008; Bibert *et al.*, 2009). Jeho hlavní substrátem je právě urát, proto tento transportér můžeme občas nalézt i pod označením URATv1 (Voltage-driven urate transporter 1). Od roku 2008 je GLUT9 brán jako významný urátový transportér a jeho význam na tomto poli stále roste (Anzai *et al.*, 2008; Witkowska *et al.*, 2012). GLUT9 byl testován na přenos i jiných molekul podobných urátu. Jednou z hypotéz bylo, že by se mohlo jednat o obecný transportér purinových a pyrimidinových nukleových bází. Obě izoformy transportéru GLUT9 mohou v malé míře přenášet adenin jakožto jedinou nukleovou bázi, avšak hlavním substrátem stále zůstává urát (Witkowska *et al.*, 2012). Přenos hexóz by ovšem neměl být zcela opomíjen, protože GLUT9 může případně transportovat i jiné substráty v závislosti na jejich

gradientu, resp. koncentraci. Nejen, že je tedy důležitý k udržení homeostáze urátu v těle, ale mohl by také napomáhat ke správné regulaci cukru v krvi (Long *et al.*, 2015). Jedná se o napětově závislý transportér nezávislý na sodných kationtech (Bibert *et al.*, 2009). Zvýšený transport vykazuje při depolarizaci membrány (po zvýšení extracelulární koncentrace draselných kationtů) (Anzai *et al.*, 2008; Bibert *et al.*, 2009). Se závislostí na chloridových aniontech je situace složitější, jelikož některé studie potvrzují jeho naprostou nezávislost na těchto iontech (Anzai *et al.*, 2008; Bibert *et al.*, 2009), naopak jiné studie ukazují správnou funkčnost proteinu jen při zvýšené koncentraci chloridových aniontů ve vnějším prostředí buněk, i když transportér sám o sobě chloridové anionty nepřenáší (Witkowska *et al.*, 2012; Baumann *et al.*, 2019). Po expresi v oocytech byl objeven i potenciální přenos intracelulárního urátu jakožto antiportu s extracelulárními molekulami D-glukózy (Caulfield *et al.*, 2008).

Obecně se tento protein nachází ve velkém množství různých orgánů, jako jsou ledviny, játra, tenké střevo, srdce, placenta, ale nalézá se například i v leukocytech a chondrocytech (Mobasher *et al.*, 2002, 2005). Ve vyvíjejících se embryích nalézáme jen velmi malé množství tohoto proteinu a to výhradně v proximálních tubulech ledvin a v mezenchymálních buňkách, chondrocytech a v kostní dřeni některých kostí (Mobasher *et al.*, 2005). V placentě GLUT9 hraje důležitou roli v udržení homeostáze jak matky tak i plodu (Mobasher *et al.*, 2005; Lüscher *et al.*, 2022).

Transportér GLUT9 se u člověka podílí ve velké míře na reabsorpci urátu v proximálním tubulu ledvin. Na membráně bazolaterální se zdá být jeho delší varianta GLUT9L i jediným potvrzeným urátovým transportérem, který zde přenáší urát z buněk ven do krevního řečiště. Je to nepostradatelný člen v udržení homeostázy kyseliny močové a urátu v organismu (Preitner *et al.*, 2009). GLUT9 je také důležitý k udržení homeostázy reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) v buňkách a zamezení poškození buňky v jejich nadměrné přítomnosti. Dokonce po zvýšení koncentrace ROS v *in vitro* buněčné kultuře a zvýšené expresi GLUT9 došlo k navrácení koncentrace ROS v těchto buňkách na fyziologickou hodnotu (Itahana *et al.*, 2014). Naopak nízká exprese GLUT9 je asociována s mnohými případy rakovinného bujení (Itahana *et al.*, 2014). Po iniciaci oxidativního stresu je zahájena dráha přes protein p53 vedoucí až ke zvýšené expresi GLUT9 v buňce (Itahana *et al.*, 2014). Exprese tohoto proteinu i jeho míra schopnosti přenášet urát je také pozitivně stimulována pomocí inzulínu obdobně jako je tomu u dalších urátových transportérů NPT1, OAT1, OAT3 a OAT10 (Mandal *et al.*, 2021).

Význam tohoto proteinu podtrhují i stále přibývající studie, kdy se u hypo- či hyperurikemických pacientů neobjevují SNP a ani inzerční či deleční mutace ve známých urátových transportérech (např. v URAT1), ale po sekvenování jsou objeveny právě v sekvenci proteinu GLUT9 (Baumann *et al.*, 2019). Význam a funkce GLUT9 a dalších urátových transportérů byla zatím zkoumána především s použitím

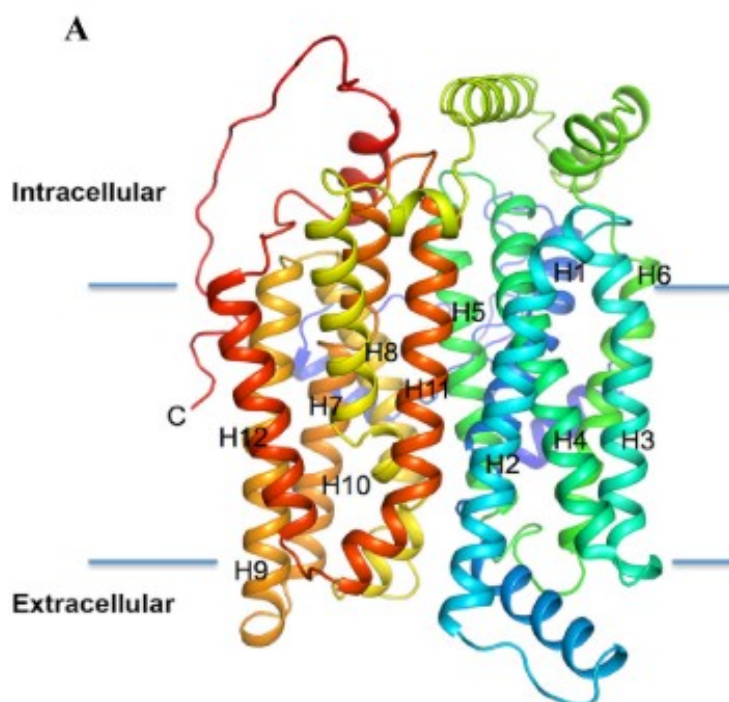
modelu oocytů žáby drápatky vodní (*Xenopus laevis*) (Jutabha *et al.*, 2011a; Witkowska *et al.*, 2012). Buňky/organismy s knock-outovaným GLUT9 se ve studiích z poslední doby velmi často používají jako modely pro hyperurikémii (Lüscher *et al.*, 2022). S jinými urátovými transportéry, jako např. s URAT1 sdílí i některé inhibitory jako látky benzbromaron nebo losartan (Caulfield *et al.*, 2008; Bibert *et al.*, 2009). Naopak další předpokládané inhibitory jako pyrazionát, candesartan, salicylát, probenecid nebo laktát nemají žádné či velmi nízké účinky na inhibici GLUT9 (Anzai *et al.*, 2008; Caulfield *et al.*, 2008; Bibert *et al.*, 2009). Phloretin, jakožto inhibitor rodiny glukózových transportérů GLUT, také vykazuje značnou inhibici přenosu urátu u tohoto proteinu (Bibert *et al.*, 2009). K úplnému umlčení genu *SLC2A9* pro tento protein může dojít i pomocí experimentálně vytvořené siRNA mířené proti tomuto genu (Caulfield *et al.*, 2008). K částečnému umlčení tohoto genu dochází i kvůli miRNA, přesněji miR-143-3p (Zhou *et al.*, 2019). V posledních letech jsou časté i výzkumy zaměřené na přírodní látky a extrakty a jejich vliv na sérovou hladinu kyseliny močové a funkci GLUT9. Příkladem je studie zkoumající vliv extraktu z čekanky (*Cichorium intybus*), který signifikantně snižuje hladinu kyseliny močové v krvi u hyperurikemických potkanů a celkově snižuje expresi proteinu GLUT9 (Jin *et al.*, 2018). Účinným inhibitorem pro GLUT9 je i přírodní antioxidant resveratrol (Li *et al.*, 2021).

1.3.1. Struktura GLUT9

Na základě vysoké podobnosti s transportérem GLUT1 (*SLC2A1*) byla vytvořena 3D struktura urátového transportéru GLUT9 s pravděpodobnou vysokou mírou přesnosti podle krystalové struktury proteinu GLUT1 (Deng *et al.*, 2014; Long *et al.*, 2015). Tento topologický model pro GLUT9 se skládá z 12 transmembránových helixů/domén (TMD, transmembrane domain) složených ze 2 opakujících se motivů, první od TMD1 do TMD6 a jejich opakováním TMD7 až TMD12 zobrazených na Obr.4 (Doerge *et al.*, 2000; Long *et al.*, 2015). Toto složení se také nazývá jako pseudo-C2 symetrie (Cachau *et al.*, 2023). Toto je typické i pro ostatní zástupce z rodiny GLUT přenašečů glukózy II. třídy. Mezi TMD6 a TMD7 intracelulárně vyčnívá dlouhá intracelulární doména. C- a N- konce proteinu se nachází také intracelulárně (Deng *et al.*, 2014).

Kritickou částí pro vazbu, přenos a regulaci přenosu urátu se zdá být tryptofan na pozici 110 (W110) v TMD2 spolu s hydrofobním isoleucinem na pozici 335 (I335) v TMD7, které jsou součástí samotného centrálního translokačního póru. Tryptofan na této pozici je důležitý kvůli svému aromatickému kruhu a se substrátem může reagovat přímo. Pokud byly vytvořeny mutované varianty s výměnou tryptofanu s aromatickým kruhem za hydrofobní aminokyselinu bez aromatického kruhu (v tomto případě za alanin, W110A), přenos urátu a jeho samotná vazba byla značně negativně ovlivněna. Na druhou stranu u mutantů se záměnou tryptofanu za fenylalanin taktéž s aromatickým kruhem (W110F) byl přenos substrátu ovlivněn jen mírně. Krucální postranní skupinou pro přenos

urátu a fruktózy (nikoliv však glukózy) v obou směrech se zdá být také I335. Obě tyto aminokyseliny také mohou mít vliv na změnu afinity k substrátům v případě potřeby (Long *et al.*, 2015).

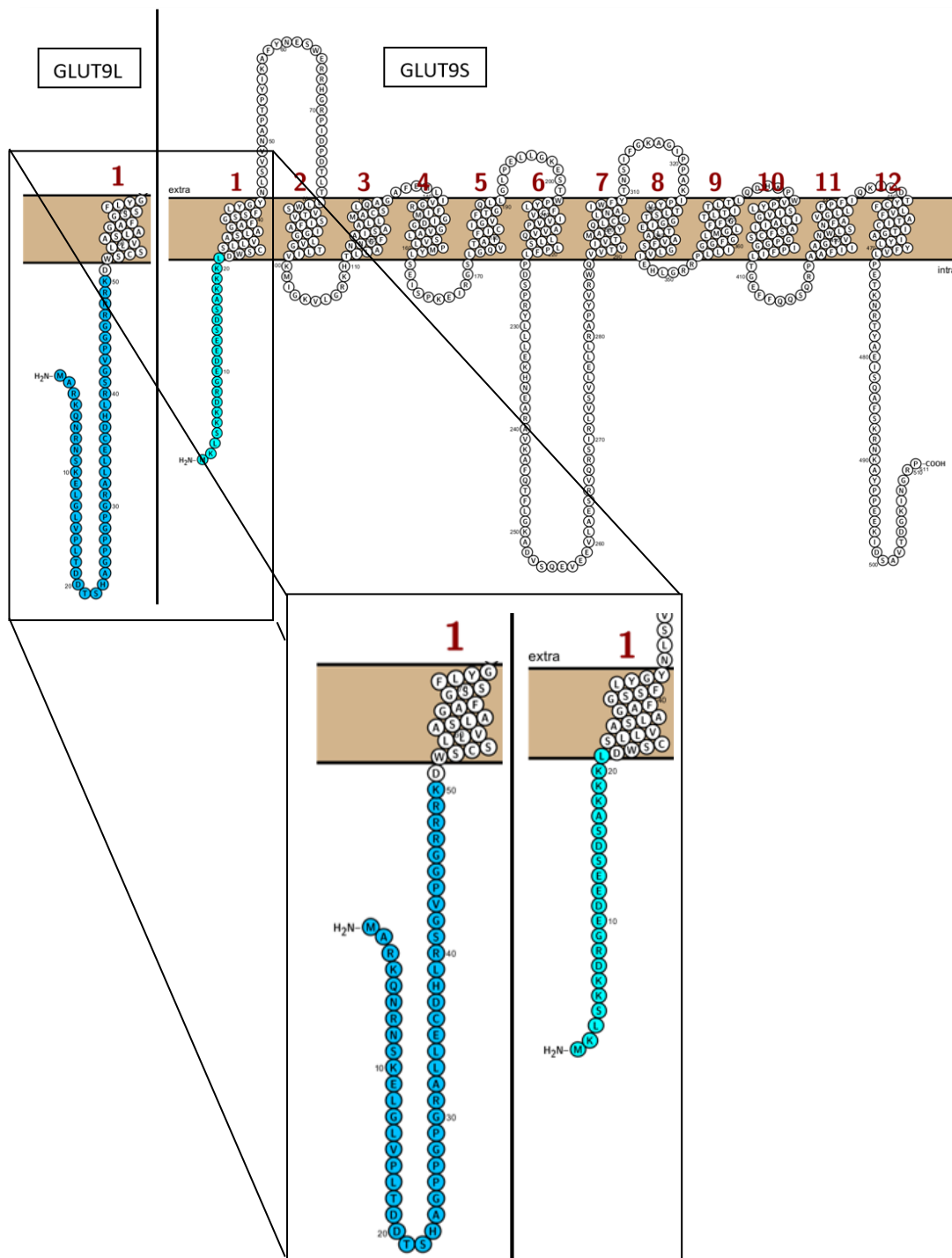


Obr.4: Topologický model proteinu GLUT9 s vyznačeným C- a N- koncem a transmembránovými doménami; H1-12 značí jednotlivé transmembránové domény (TMD) (Převzato z (Long *et al.*, 2015)).

V návaznosti na předchozí studie byla po objevení krystalové struktury dalšího glukózového transportéru II. třídy, proteinu GLUT5, tato studie rozšířena a byla zaměřena na jiné aminokyseliny s potenciálem pro regulaci proteinu a přenos urátu. GLUT9 sdílí s GLUT5 některé důležité aminokyseliny tvořící vazebné místo pro fruktózu. Urát i fruktóza jsou vázány do stejného vazebného místa, avšak každý substrát interaguje s jinými aminokyselinami v této vazebné kapse. Pro vazbu urátu byly popsány další nepostradatelné aminokyseliny, a to izoleucin 303, a pouze pro přenos urátu specifický asparagin na pozici 429 a cysteiny na pozici 181 a 398. Tyto aminokyseliny uvnitř aktivního místa tvoří s dalšími protilehlými hydrofobními aminokyselinami síť a ovlivňují vazbu a selektivitu transportéru. To jen podporuje důležitost TMD7 v selektivitě a přenosu substrátu (Long *et al.*, 2017).

1.3.2. Izoformy proteinu GLUT9

Gen *SLC2A6* pro protein GLUT9 je lokalizován na chromozomu 4, přesněji v jeho části 4p15.3-p16. Lidský protein GLUT9 má celkem 2 izoformy, které vznikají alternativním sestřihem původního proteinu. Porovnáním obou sekvencí lze pozorovat, že se liší v délce jejich N-konců. Delší varianta (dále označována jako GLUT9L) je složena jen z 12 exonů a celkem z 540 aminokyselin. Kratší (dále označována jako GLUT9S) z 512 aminokyselin a 13 exonů (Augustin *et al.*, 2004; Hurba *et al.*, 2014). Struktura obou variant je zobrazena na Obr.5.



Obr.5: Predikovaná struktura obou variant proteinu, GLUT9L i GLUT9S; přiblížení odlišných N-konců jednotlivých izoform; rozdílné N-konce značeny modrou barvou (Vytvořeno v Protter; (Omasits et al., 2014); upraveno).

Nejen že se jednotlivé izoformy proteinu GLUT9 odlišují v počtu aminokyselin, liší se také v lokalizaci jednotlivých variant v polarizovaných buňkách, ale i v jednotlivých tkáních a orgánech. GLUT9S se nachází výhradně v ledvinách, v jaterních hepatocytech a v placentě, kdežto delší varianta GLUT9L je navíc mimo tyto zmíněné orgány lokalizována i v epitelálních buňkách tenkého střeva či v chondrocytech a leukocytech (Mobasher *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 2022). Přesné rozmístění

v jednotlivých tkáních se druhově odlišuje. Například u člověka se GLUT9 nachází v ledvinách především v proximálním tubulu, u myši se GLUT9 nachází spíše distálně (Preitner *et al.*, 2009; Auberson *et al.*, 2018). V placentě byly objeveny obě izoformy proteinu opět na odlišných membránách buněk syncytiotrofoblastu. Delší varianta proteinu se nalézá přednostně na bazolaterální membráně buněk a kratší varianta na membráně apikální, kde se vyskytuje především v oblasti mikrokloků. U těhotenství zkomplikovaných těhotenskou cukrovkou dochází ke zvýšení exprese obou variant tohoto proteinu v placentě (Bibee *et al.*, 2011). Mimo výše uvedené rozdíly se jednotlivé varianty odlišují také svojí funkcí, i když afinita k urátu a samotná schopnost přenosu obou variant, s $K_m \sim 631\text{--}667 \mu\text{M}$ (Konstanta Michaelis-Mentenové) u myšičího proteinu a s $K_m \sim 590 \mu\text{M}$ u lidské varianty transportéru je stejná (Anzai *et al.*, 2008; Caulfield *et al.*, 2008; Vitart *et al.*, 2008; Bibert *et al.*, 2009). Kratší varianta na apikální membráně přenáší urát z vnějšího prostředí do buněk, naopak delší varianta tohoto proteinu na bazolaterální membráně se účastní druhého kroku reabsorpce urátu (první krok pravděpodobně provádí URAT1) a to tak, že převádí urát z buněk do peritubulárního intersticia (do krevního řečiště) (Enomoto *et al.*, 2002; Anzai *et al.*, 2008; Witkowska *et al.*, 2012).

Jednotlivé varianty také jinak odpovídají regulacím přenosu urátu. Delší varianta GLUT9L může být regulována pomocí zvýšení jodidových aniontů ve vnějším prostředí, kdežto kratší varianta GLUT9S na obdobné zvýšení jodidu nereagovala (Baumann *et al.*, 2019). Dalším předpokládaným místem regulace dlouhé varianty je serin na pozici 9 v intracelulárním N-konci proteinu jakožto místo fosforylace tohoto proteinu pomocí protein kinázy A, což může mít za následek ovlivnění další regulace proteinu, vazebných míst i samotného přenosu urátu (Witkowska *et al.*, 2012). Míra přenosu urátu může být značně ovlivněna i přítomností interagujících membránových proteinů, například membránovým regulačním proteinem ITM2B (Integral membrane protein 2B) (Mandal and Mount, 2019). Samotná exprese obou variant v buňce je také závislá a regulována například pomocí tumor supresoru p53 (Itahana *et al.*, 2014). Další urátové transportéry jako URAT1, OAT4 či NPT1 bývají regulovány lešenovým proteinem PDZK1, u proteinu GLUT9 regulace pomocí tohoto proteinu nebyla zatím nalezena (Anzai *et al.*, 2004; Hospital *et al.*, 2014).

Při stejných vnějších i vnitřních podmínkách prostředí se obě varianty zdají být funkčně symetrické, dokáží transportovat substrát z i do buněk v obdobné míře (Witkowska *et al.*, 2012). Ukazuje se, že schopnost každé z izoform přenášet urát jiným směrem je nejspíše způsobena především vlivem rozdílných podmínek vnějšího prostředí v lumen (pro apikální membránu) a krevního řečiště (pro membránu bazolaterální), rozdílným pH, polarizací membrány, popřípadě i některými regulačními vlivy vnitřního prostředí buňky, které ovlivňují rozdílný N-konec izoform. V souhře více fyziologických faktorů je umožněn uptake (absorbce) či eflux (sekrece) urátu pomocí

těchto proteinů. Tato prostředí se orgánově specificky liší složením některých iontů a právě složením molekul, které jsou schopny regulovat směr přenosu urátu obou variant GLUT9 (Witkowska *et al.*, 2012). Jedním z těchto vlivů je přítomnost hexóz (hlavně D-glukózy, případně i D-fruktózy) ve vnějším i vnitřním prostředí. Přítomnost těchto hexóz v lumen orgánů žene transportér do funkčního stavu absorbce urátu z prostředí do buňky a naopak zamezuje jeho přenosu z buněk ven. To brání zpětné reabsorpci urátu do lumen v této části orgánu. Tento způsob regulace pomocí přítomnosti hexóz je nejspíše orgánově a buněčně specifický a nemusí tak fungovat jako obecné pravidlo v celém organismu (Witkowska *et al.*, 2012). Také delší varianta proteinu reaguje zvýšením přenosu urátu na změny v intracelulárních koncentracích urátu, D-glukózy i D-fruktózy, což vede k myšlence, že v odlišném N-konci se mohou nacházet i intracelulární regulační místa proteinu (Witkowska *et al.*, 2012). V rozporu s předchozími studii jiní autoři naopak ve své studii potvrzují, že přenos urátu dovnitř i ven z buněk pomocí variant proteinu GLUT9 se nemění v přítomnosti či nepřítomnosti extracelulární D-glukózy i D-fruktózy, ale v přítomnosti extracelulárně vyšší koncentrace samotného urátu (Anzai *et al.*, 2008). V některých orgánech může také depolarizace membrány mnohonásobně zvýšit schopnost přenosu obou variant (Witkowska *et al.*, 2012).

Pokud bychom pohlédli blíže na studie zabývající se transportem urátu, většina těchto studií využívá model oocytů *Xenopus laevis* v nepřítomnosti glukózy v médiu. Proto nejspíše tyto studie v první řadě vyšetřují přenos urátu směrem do buněk a jejich výsledné kvantifikaci uptake urátu do 1 oocytu (Vitart *et al.*, 2008; Hurba *et al.*, 2014; Mancikova *et al.*, 2016; Baumann *et al.*, 2019). Funkční studie posledních let se ale také začínají provádět na embryonální buněčné linii HEK293 která je použita ke studiím i v této diplomové práci (Caulfield *et al.*, 2008; Mandal and Mount, 2019).

1.3.3. Vliv alelických variant GLUT9 na přenos urátu

Data z klinických studií zahrnujících pacienty s porušenou sérovou hladinou kyseliny močové jsou často založena na tzv. GWAS (Genom Wide Association Study), neboli celogenomových studiích. Sekvenací kohorty pacientů byly nalezeny různé alelické varianty tvořené nejčastěji jednobodovými záměnami (SNPs). Jednobodové záměny s vysokým vlivem na hladinu kyseliny močové jsou nejčastěji lokalizovány na intronu 4 a 6 původního genu *SLC2A9* (Döring *et al.*, 2008). Nejvíce těchto funkčních studií bylo provedeno na modelu oocytů žáby *Xenopus laevis* s radioaktivně ¹⁴C značeným urátem pomocí *in vitro* funkčních studií, kdy je vyšetřena změna míry přenosu urátu mutovaných variant oproti přirozeně se vyskytující variantě (wild type, WT) proteinu. Těmito studiemi se dokazuje případná korelace přítomnosti jednobodové záměny v kódující oblasti genu a výsledného urikemického fenotypu (Jutabha *et al.*, 2011a; Dinour *et al.*, 2012; Witkowska *et al.*, 2012; Stiburkova *et al.*, 2013). Existuje více mechanismů, kterými může daná alelická varianta ovlivnit fyziologickou

funkci transportéru. Nejčastěji je takový protein zadržován v endoplazmatickém retikulu či Golgiho komplexu, nedojde ke správnému sbalení proteinu, mutace může být v jeho aktivním místě a translokačním póru či může dojít k chybné lokalizaci proteinu na membránu (Stiburkova *et al.*, 2013). Různé mutace v tomto proteinu bychom mohli rozdělit na mutace nesynonymní, které mění celou aminokyselinu na aminokyselinu jinou, a mutace synonymní, kdy zůstává aminokyselina stejná a není tak změněn smysl a struktura proteinu. Některé mutace jsou v populacích časté a pravděpodobně dochází k jejich předávání mezi rodiči a potomky, ale najdeme některé vzniklé *de novo* (Vitart *et al.*, 2008).

Alelické varianty obou izoform proteinu GLUT9 byly pozorovány v různých populacích od chorvatské, německé, přes populaci USA až například po studie na kohortách českých pacientů (Stiburkova *et al.*, 2011; Hurba *et al.*, 2014; Sebesta and Stiburkova, 2014; Mancikova *et al.*, 2016). Mnoho mutací je sdíleno mezi různými populacemi z celého světa i mezi různými etnickými skupinami (Tin *et al.*, 2011; Claverie-Martin *et al.*, 2018; Kawamura *et al.*, 2021). Alelické varianty proteinu GLUT9 byly vyšetřeny co do korelace s hypourikémií, hyperurikémií, vznikem různých chorob jako dny či ve vztahu s diabetem II. typu. Některé mutace by mohly mít vliv i na vznik metabolického syndromu (Vitart *et al.*, 2008). Zajímavé je, že nalezneme mnoho polymorfismů v tomto proteinu jak ve vazbě s hypourikémií a s ní spojenými chorobami, tak i ve vztahu s hyperurikemickými pacienty (McArdle *et al.*, 2008; Dinour *et al.*, 2010; Mancikova *et al.*, 2016; Claverie-Martin *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2022). Hyperurikémie způsobená mutacemi v proteinu GLUT9 je spojená s nadměrnou reabsopcí kyseliny močové v proximálních tubulech ledvin nebo sníženou mírou její sekrece, hypourikémie naopak se sníženou reabsorpcí (Matsuo *et al.*, 2008; Dinour *et al.*, 2010). Nebyla ale nalezena spojitost mezi alelickými variantami tohoto proteinu s hypertenzí, jak se původně předpokládalo (Caulfield *et al.*, 2008; Preitner *et al.*, 2015). Mutace výrazněji ovlivňují primárně jednu či druhou izoformu proteinu GLUT9 či obě ve stejné míře (Dinour *et al.*, 2010).

Souhrnné označení pro dědičné hypourikemické mutace způsobené s deficiencí v proteinu GLUT9 je označováno jako RHUC II, neboli dědičná renální hypourikémie II typu. Různé alelické varianty mohou ovlivňovat SUA jak homozygotně, tak i heterozygotně. U proteinu GLUT9 byly identifikovány například alelické varianty R171Y, T125M s pravděpodobným vlivem na stabilitu póru pro přenos substrátu (Dinour *et al.*, 2012; Claverie-Martin *et al.*, 2018), P412R zaměňující nenabitý prolin za kladně nabitý arginin s pravděpodobným vlivem na přenos substrátu (Anzai *et al.*, 2008), R380W, R198C v intracelulárních nemembránových smyčkách (Matsuo *et al.*, 2008; Rhuc *et al.*, 2011), L75R (a L46R v GLUT9S) (Dinour *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2018) a mnoho dalších. Některé alelické varianty vedoucí ke snížení transportní funkce jsou sdíleny i mezi dalšími zástupci rodiny GLUT, například jako

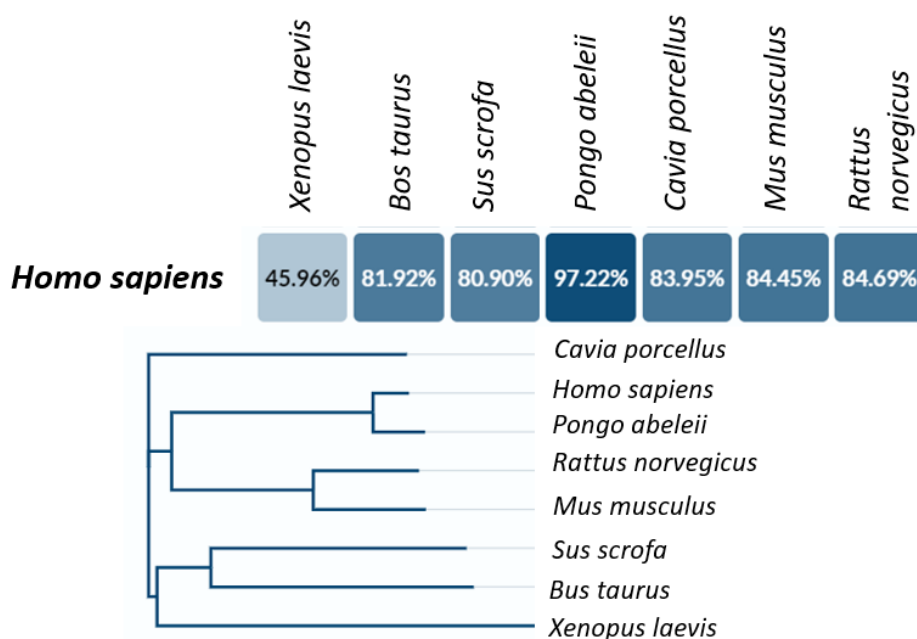
již zmíněné alelické varianty R198C a R380W u proteinu GLUT9 odpovídající alelickým variantám R153C a R333W u proteinu GLUT1 (Rhuc *et al.*, 2011). Lze nalézt i inserce, které vedly k vysoké míře hypourikémie sdílené v celé rodině (Stiburkova *et al.*, 2011), ale existují i SNPs, které sdílí alespoň homozygotně i více než 60% populace (Döring *et al.*, 2008). Pomocí celogenomových analýz bylo objeveno také několik mutací v CpG ostrůvcích, které měli signifikantní vliv na hladinu kyseliny močové v séru (Tin *et al.*, 2021). Bylo také objeveno několik desítek alelických variant, které jsou dědičné v celých rodinách, ale nevykazují žádné signifikantní změny v přenosu urátu či expresi a jsou tak klinicky němé (Hurba *et al.*, 2014).

Byl vyvinut také *in silico* model stimulující hospodaření s urátem v živém organismu. Tento model je schopen predikovat a nalézt změny v transportu urátu u pacientů s deficiencemi v transportních proteinech. Mohl by tak do budoucna sloužit jako pomocník při výzkumu nových alelických variant (Kaewlin *et al.*, 2021). V tomto roce byl také vytvořen *in silico* model pro predikci vlivu alelických variant založený na potvrzených funkcích alelických variant a na strukturním modelu tohoto transportéru (Cachau *et al.*, 2023).

1.3.4. GLUT9 v živočišné říši

Lidskému proteinu GLUT9 je sekvenčně velmi podobný myší (*Mus musculus*) ortolog GLUT9 s homologií až 85 %, ale s více odlišnými sestřihovými variantami, které také vykazují odlišnou lokalizaci napříč tkáněmi i v buňce samotné. V tomto případě se jedná o uniportní přenos urátu nezávislý na dalších iontech a jejich výměně (Diamond and Sharon, 1974; Bibert *et al.*, 2009). U myši se tento protein nachází především v distálním tubulu ledvin na apikální i bazolaterální membráně, v menší míře pak v tubulu proximálním a části kanálku spojujícím distální tubulus a sběrný kanálek (connecting tubule) (Preitner *et al.*, 2009). Hojně je tento protein zastoupen také v myších enterocytech a to především na membráně bazolaterální, v menší míře pak na membráně apikální (Debosch *et al.*, 2014). GLUT9 je také exprimován v Leydigových buňkách myších varlat i ve spermiiích samotných (Kim and Moley, 2007). Při experimentálním vyřazení myšího ortologu GLUT9 buď v celém organismu nebo jenom v částech se ukázalo, že pokud byly vytvořeny myši se systémově vyřazeným proteinem GLUT9, měli tito jedinci 5x-10x vyšší hladinu kyseliny močové v krvi, byla zvýšena míra renální sekrece urátu a naopak téměř potlačena renální reabsorpce urátu. Tito jedinci se také rodili s nefritidami a nefropatiemi v různé míře a tím pádem i se zhoršenou funkcí ledvin vedoucí k renální nedostatečnosti. V experimentech byli pozorováni i jedinci s místně vyřazeným genem pro GLUT9. Myši mají totiž aktivní enzym urikázu, který je schopný katabolizovat kyselinu močovou na allantoin. Ukázalo se, že GLUT9 v jaterních hepatocytech je pravděpodobně zapojen do procesu katabolizmu urátu (Preitner *et al.*, 2009). Pokud naopak byly vytvořeny myši s GLUT9-deficientními enterocyty,

vedla tato skutečnost k rozvoji vysokého krevního tlaku, hyperurisurii, hyperurikémii a počátečnímu rozvoji metabolického syndromu a kardiovaskulárních onemocnění (Debosch *et al.*, 2014).



Obr.6: Podobnost lidského proteinu GLUT9 s vybranými organismy, jejich příbuznost znázorněna fylogenetickým stromem založeném na sekvenci proteinu GLUT9 a uvedena v procentech; uveden *Homo Sapiens* a jeho podobnost s proteinu GLUT9 u *Xenopus laevis* (drápatka vodní) s podobností 45,96 %, *Bos taurus* (tur domácí) s podobností 81,92 %, *Sus scrofa* (prase divoké) s podobností 80,90 %, *Pongo abelii* (orangutan sumaterský) s podobností 97,22 %, *Cavia porcellus* (morče domácí) s podobností 83,95 %, *Mus musculus* (myš domácí) s podobností 84,45 % a *Rattus norvegicus* (potkan obecný) s podobností 84,69 % s lidským proteinem GLUT9; (Vytvořeno v www.uniprot.org; (Consortium, 2023)).

Ortology genu *SLC2A9* se nachází i u dalších skupin organismů, u nichž ale do současné doby nebyly experimentálně studovány a jejich funkce nebyla zatím řádně anotována. Pro názornost je uveden na *Obr.6* fylogenetický strom s uvedenými zástupci vybraných organismů zkonstruovaný na základě homologie polypeptidové sekvence ortologů GLUT9.

1.4. Cytoplazmatická membrána epitelálních buněk

V organismech nejen živočichů můžeme rozlišit buňky na buňky tzv. nepolarizované a buňky polarizované jako například neurony a epitelální buňky. U buněk polarizovaných se rozlišují odlišné domény plazmatické membrány. V orgánech různých tělních soustav tvoří jedno- či vícevrstevnou řadu buněk, tzv. epitel oddělující lumen orgánů od okolí. Jedná se o funkční i mechanickou bariéru, která řídí přesun odlišných molekul a iontů přes epitel. Do lumen směřuje apikální membrána často se zvětšeným povrchem pomocí mikrokloků, který je nezbytný pro typickou funkci daného epitelu specifickou pro daný orgán (např.: absorpce, reabsorpce). Jako membrána bazolaterální je souhrnně označována ta, na které se nachází mezibuněčné těsné spoje mezi buňkami (laterální membrány)

a část membrány směřující do krevního řečiště (bazální membrána). Tato membrána tedy směřuje vně orgánů a často je svým proteinovým složením shodná s membránou nepolarizovaných buněk. Bazální část cytoplazmatické membrány je také zodpovědná za adhezi buňky k bazální lamině prostřednictvím adhezních membránových proteinů. Apikální a bazolaterální membrána polarizovaných buněk se liší také složením lipidů a proteinů jako složením přenašečů a transportérů, čímž mohou rozhodovat o přenosu některých molekul určitým směrem v organismu (Cereijido *et al.*, 1978; Mellman *et al.*, 1993; Matter and Mellman, 1994).

1.4.1. Lokalizace proteinů v polarizovaných a nepolarizovaných buňkách

Odlišné zastoupení proteinů na apikální a bazolaterální membráně je způsobeno specifickou lokalizací proteinů na danou membránu na několika úrovních, i když přesný mechanismus lokalizace není ještě zcela znám. Nejprve je třeba specifická sekvence na proteinu samotném (tzv. lokalizační sekvence/motiv), na kterou se váží specifické lokalizační proteiny či komplexy adaptorových proteinů jako komplexy proteinů AP-1, AP-2, AP-3, AP-4 skládající se z různých podjednotek. Proteiny jsou poté rozdělovány do specifických váčků, dopravovány k membráně a v posledním kroku vystaveny na membránu (Delacour and Jacob, 2006; Mardones *et al.*, 2013). Adaptorové proteiny, samy či tvořící agregáty, pomáhají zabalení těchto bílkovin do správných váčků a jejich přesunu na cílovou membránu (Chanat and Huttner, 1991; Heilker *et al.*, 1996; Müsch *et al.*, 1996). K nasedání těchto proteinů dochází při tvorbě vezikulů na cisternách trans-Golgi (Müsch *et al.*, 1996). Lokalizační signál zodpovědný za lokalizaci na příslušnou membránu může být jen jeden, ale ve větším počtu případů se jedná o kooperaci více těchto lokalizačních motivů (Matter *et al.*, 1992; He *et al.*, 2002). Proteiny se mohou dostávat na specifickou membránu přímo z trans-Golgi, z trans-Golgi přes recyklující endozomy (Farr *et al.*, 2009) či transcytotickou cestou (Casanova *et al.*, 1991).

O tom, jak přesně se dostávají proteiny na membránu v nepolarizovaných buňkách, nalezneme více teorií. Velmi rozšířená je tzv. „bulk flow“ teorie (nebo také „bulk flow pathway“), podle které se dostávají proteiny na membránu přirozeně bez specifických lokalizačních sekvencí (Wieland *et al.*, 1987). Jiné studie ukazují, že minimálně některé proteiny obsahující lokalizační motivy specifické pro proteiny polarizovaných buněk mohou být rozdělovány pravděpodobně na základě těchto lokalizačních sekvencí do váčků rozdílných typů a až poté lokalizovány na membránu. Dostávají se tak na membránu obdobným mechanismem jako v buňkách polarizovaných, i když tento mechanismus může být daleko méně rozvinutý (Müsch *et al.*, 1996; Yoshimori *et al.*, 1996; Keller *et al.*, 2001). K rozdělení proteinů do odlišných váčků probíhá obdobně jako u polarizovaných buněk již na trans-Golgi. Ani rozmístění proteinů s lokalizačními signály na membráně nepolarizovaných buněk nemusí

být zcela rovnoměrné, jak by se mohlo na první pohled zdát. Apikální proteiny jsou přednostně dopravovány do oblastí membránových raftů na rozdíl od bazolaterálních, které jsou naopak přednostně lokalizovány mimo tyto rafty (Keller *et al.*, 2001). Je ovšem možné, že platí obě teorie, každý mechanismus je specifický pro daný protein a i v nepolarizovaných buňkách tak může probíhat anterográdní rozdělování proteinů na membránu různými způsoby a cestami (Müsch *et al.*, 1996). I pro lokalizaci proteinů na membránu byl vytvořen *in silico* model hledající možné lokalizační sekvence a predikující chování proteinu z hlediska jeho lokalizace (Dobson *et al.*, 2021).

1.4.2. Lokalizační motivy

Při lokalizaci proteinů na cílové membrány především polarizovaných buněk mají vliv kanonické a nekanonické lokalizační motivy. Motivy kanonické jsou pro lokalizace daleko častější a jsou konzervovány napříč živočišnou říší a v rodinách proteinů, zatímco motivy nekanonické jsou daleko méně časté a jedná se o ojedinělé motivy specifické pro daný protein. Mezi nejhojnější a nejčastější kanonické motivy v bazolaterální, ale i endocytotické a lyzozomální a případně i apikální lokalizaci jsou motivy dileucinové a tyrosinové (Hunziker and Fumey, 1994b), případně v menší míře ještě polyprolinové lokalizační signály (He *et al.*, 2002). Tyto sekvence se obvykle nachází mimo transmembránové domény proteinu, avšak v jejich bezprostřední blízkosti (Beau *et al.*, 1998). Schémata tyrosinových sekvencí se mohou lehce odlišovat. Za tyrosinové lokalizační motivy jsou nejčastěji považovány motivy se sekvencí YXXØ, kde X značí jakoukoliv aminokyselinu a Ø hydrofobní aminokyselinu (Subramanian *et al.*, 2009; Mardones *et al.*, 2013), případně motivy se sekvencí NPXY, kde N značí asparagin, P prolin, Y tyrosin a X opět jakoukoliv aminokyselinu (Donoso *et al.*, 2009). U sekvencí dileucinových se nejběžněji jedná o motiv dvou leucinů vedle sebe LL, případně s jinou aminokyselinou mezi těmito leuciny s obecným schématem LXL (Miranda *et al.*, 2001; He *et al.*, 2002; Dobson *et al.*, 2021). Pro apikální lokalizaci proteinů jsou v některých případech nezbytné i motivy s cysteiny, které tvoří mezi sebou disulfidické můstky (Takada *et al.*, 2005). Jelikož v některých případech mohou být dileucinové a tyrosinové lokalizační motivy využívány i jako motivy endocytotické či recyklační, dochází v buňkách polarizovaných i nepolarizovaných po mutaci těchto motivů mimo jiné k omezením v endocytóze či zpětné recyklaci těchto proteinů (Donoso *et al.*, 2009). Pokud je tato sekvence proteinu mutována, dochází k částečné či úplné absenci tohoto proteinu na příslušné membráně, nebo může být protein lokalizován na membránu apikální i bazolaterální zároveň (Matter *et al.*, 1992; Kimura *et al.*, 2014). Tyto motivy byly objeveny a potvrzeny například u IgG receptorů (Hunziker and Fumey, 1994a), lyzozomální kyselá fosfatázy (Prill *et al.*, 1993), epidermálního růstového faktoru (EGF) (He *et al.*, 2002), proteinu BCRP/ABCG2 (Takada *et al.*, 2005), LRP1 proteinu (Donoso *et al.*, 2009) či e-kadherinu (Miranda *et al.*, 2001) a mnohých dalších.

Větší význam je přikládán lokalizačním motivům pro bazolaterální transport. To dokazují i mnohé studie, kdy byly tyto vytipované lokalizační sekvence mutovány či zcela deletovány a takto mutované proteiny byly lokalizačním mechanismem buňky transportovány na membránu apikální. Naopak pokud do sekvence apikálně lokalizovaných proteinů byly přidány tyto lokalizační motivy, byly tyto proteiny lokalizovány na membránu bazolaterální (Klausner, 1992; Matter *et al.*, 1992; Prill *et al.*, 1993; Hunziker and Fumey, 1994b; Miranda *et al.*, 2001; Jespersen *et al.*, 2004; Peña-münzenmayer *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2011). Apikální transport a pro něj specifické lokalizační sekvence nejsou zdaleka tak prozkoumány a zdá se, že apikální lokalizační motivy jsou spíše ojedinělé. Transport na apikální membránu může probíhat i bez specifických sekvencí v závislosti na typu buněk a druhu. Apikální transport je závislý i na dalších faktorech jako je například O- a N-glykosylace proteinu, které ovšem nemohou být brány jako univerzálními markery apikálně lokalizovaných proteinů (Scheiffele *et al.*, 1995; Breuza *et al.*, 2002; Potter *et al.*, 2003). Bylo také mnohokrát potvrzeno, že proteiny obsahující GPI kotvící sekvenci v polarizovaných buňkách epitelu jsou preferenčně lokalizovány na apikální membránu (Brown and Rose, 1992; Delacour and Jacob, 2006).

Pokud chceme testovat lokalizační motiv hypoteticky zodpovědný za lokalizaci proteinu na membránu, nejlepším přístupem je si nejprve vytipovat sekvence, následně je mutovat a dále mikroskopicky analyzovat. Po mutování těchto motivů může docházet k odlišnému lokalizování proteinů (Hunziker and Fumey, 1994b) nebo k jejich akumulaci v endozomech buňky v polarizovaných i nepolarizovaných buňkách (Donoso *et al.*, 2009).

2. Cíle diplomové práce

Cíle této diplomové práce se týkají urátového transportéru GLUT9 studovaného na modelu transientně transfekovaných buněk buněčné linie HEK293A, a to jeho dlouhé (GLUT9L) i krátké (GLUT9S) izoformy.

Mezi jednotlivé cíle patří:

- 1) Ověření vlivu alelické varianty V114L/V85L transportéru GLUT9 na jeho membránovou lokalizaci a na transportní schopnost pomocí fluorescenční mikroskopie a testováním schopnosti transportovat radioaktivně značený urát**
- 2) Ověření vlivu *in silico* predikovaných kanonických peptidových motivů pro bazolaterální lokalizaci GLUT9L pomocí fluorescenční mikroskopie a testováním schopnosti transportovat radioaktivně značený urát**
- 3) Ověření směru transportu urátu přenašečem GLUT9 v závislosti na složení inkubačních médií**

Tato diplomová práce se týká urátového transportéru GLUT9 jako celku z několika pohledů. Nejprve z pohledu alelické varianty V114L/V85L objevené u hypourikemických pacientů s hypotézou, že daná alelická varianta vede ke snížení transportní schopnosti transportéru GLUT9 s touto alelickou variantou. Na tomto modelu jsou také optimalizovány metody dále používané v této diplomové práci. Dále se práce zabývá predikcí a testováním lokalizačních motivů pro bazolaterální lokalizaci dlouhé varianty proteinu GLUT9L. V rámci plnění tohoto cíle byla testována hypotéza, že v odlišné sekvenci N-konce dlouhé varianty se nachází jediný či jeden z několika lokalizačních motivů potřebných pro lokalizaci této izoformy proteinu na bazolaterální membránu v polarizovaných buňkách. Dále byl testován další typický tyrosinový lokalizační motiv YIKA mimo tento odlišný N-konec izoformy proteinu. V průběhu jednotlivých experimentů nás zaujala i problematika směru přenosu urátu oběma variantami tohoto transportéru vlivem vnějšího prostředí v buněčné linii HEK293A. V poslední části této práce proto byly vyzkoušeny funkčními studii odlišné inkubační pufrů s rozdílným složením především v koncentracích glukózy. V diplomové práci byl testován přenos urátu ve směru efluxu, neboli z buněk ven do extracelulárního prostředí, což je podstatné především z pohledu dlouhé izoformy proteinu (GLUT9L), protože na bazolaterální membráně při reabsorpci urátu v ledvinách nebyl žádný další eflukční transportér popsán.

3. Materiál a přístroje

3.1. Použité přístroje, buněčné linie, plazmidy a primery

Použité přístroje	Výrobce	Použité přístroje	Výrobce
Aparatura na agarové elektroforézy	Hoeffer	Konfokální mikroskop	Leica
Blotovací aparatura, Semi-dry	Hoeffer	Mikrocentrifuga MIKRO 185	Hettich
Cell counter	Invitrogen	Scintilační počítač PerkinElmer TriCarb 2900 TR	Perkin Elmer
Centrifuga 5810R	Eppendorf	SDS-PAGE aparatura	Hoeffer
Cycler pro PCR	BioER	Sonikátor UPH20	Hielscher
Flowbox EM Box 120	Schoeller Instruments	Spektrofotometr ND-1000	NanoDrop
Flowbox Fotron LF	Fotron	Termoblok TermoMixerC	Eppendorf
Fluorescenční mikroskop BX40F	Olympus	Termostat Dry block TDB-120	Biosan
ChemiDoc PM	Biorad	Třepací termoblok	Eppendorf
Inverzní mikroskop Dmi1	Leica	Zdroj Power Pro	Cleaver Scientific

Tabulka 1: Použité přístroje.

Mimo uvedené přístroje a byly použity i další základní komponenty vybavení laboratoře jako vodní lázně, lednice, mrazáky, analytické váhy, kývačky, pH metr, autokláv, pipety, skleněné pipety a další.

Použité buněčné linie	Výrobce	Katalogové číslo
HEK293A	Thermo Fisher	R705-07
MDCK	Sigma Aldrich	00062107
Použité plazmidy	Výrobce	Katalogové číslo
pGEM-T Easy	Promega	A137A
pLenti-C-mGFP-P2A-Puro (s původním genem SLC22A6)	Origene	RC218568L4V
Použité primery	Výrobce	Katalogová čísla
Navržené primery pro amplifikaci genů s ligačními nástavci	Objednány u IDT (Integrated DNA Technologies)	Sekvence jednotlivých primerů vypsány v kapitole 4.3.1
Navržené primery pro Oligonukleotidem řízenou mutagenézi	Objednány u IDT (Integrated DNA Technologies)	Sekvence jednotlivých primerů vypsány v kapitole 4.4.1
Navržené sekvenační primery	Objednány u IDT (Integrated DNA Technologies)	Sekvence jednotlivých sekvenačních primerů vypsány v kapitole 4.3.6

Tabulka 2: Použité buněčné linie, plazmidy a primery a jejich výrobce a katalogová čísla; U plazmidů vypsány odkazy na kapitoly, kde jsou jednotlivé sekvence primerů vypsány.

3.2. Použitý materiál, chemikálie, kultivační média a kity

Použitý materiál, látky a chemikálie	Výrobce	Použitý materiál, látky a chemikálie	Výrobce
Agaróza	Merc Life Science	L-glutamin	Sigma Aldrich
Aprotinin	Sigma Aldrich	Mowiol	Polyscience Inc.
Bis-akrylamid	Sigma Aldrich	Na ₂ HPO ₄	Penta
Bromfenolová modř	Sigma Aldrich	NaCl	Penta
DAPI	Intimex	NaHCO ₃	Sigma Aldrich
D-Glukóza	Sigma Aldrich	NaOH	Penta
DTT	Fluka Biochemika	Nitrocelulózová blotovací membrána	GE Healthcare
EDTA	Mach chemikálie	PEI (Polyethylenimin)	Sigma Aldrich
Ethidium bromid	Thermo Fisher	Poly-L-lysin	Sigma Aldrich
Fast Digest Restriktáza Not1	Thermo Fisher	Quick Start Bradford 1x Dye Reagent	Bio Rad
Fast Digest Restriktáza Sgf1	Thermo Fisher	Restriktční pufr	Thermo Fisher
FBS (Fetal bovine serum)	Thermo Fisher	Scintilační koktejl NBCB	Amersham Biosciences
Generuler 1kb DNA Ladder Ready-to-use	Thermo Fisher	SDS	Sigma Aldrich
Gentamycin	GIBCO	Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Fisher
Glycin	Sigma Aldrich	Sušené plnotučné mléko	Carl Roth
H ₃ BO ₄	Sigma Aldrich	T4 DNA ligáza	Thermo Fisher
Chloramfenikol	Thermo Fisher	Tris	Sigma Aldrich
Izotop urátu C ¹⁴ MC-1394	Hartman Analytic	Triton	Sigma Aldrich
KCl	Sigma Aldrich	Trypanová modř	Life Technologies
KH ₂ PO ₄	Sigma Aldrich	Trypsin	Thermo Fisher
Laemly pufr (2x koncentrovaný)	Sigma	Tween	Sigma Aldrich
Použité kity/soupravy	Význam	Poznámky	
Genart Side directed mutagenesis system	Kit pro oligonukleotidem řízenou mutagenezi	Invitrogen	
Microelute Gel extraction Kit	Kit pro extrakci z agarózového gelu	Omega	
Nutrient agar	Pevná půda pro kultivaci bakterií	Oxoid, Thermo Fisher	
One Shot™ MAX Efficiency™ DH5α-T1R Competent Cells	Chemokompetentní bakterie DH5αT1 a kit na jejich transformaci	Thermo Fisher	
Plasmid Midikit/Maxikit	Kity k izolaci plazmidu z bakterií	QIAGEN	
Plasmid Minikit PureYield A1222	Kit k izolaci plazmidu z bakterií v malém objemu	Promega	
SOC médium	Médium pro kultivaci bakterií	Thermo Fisher	
Supersignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate	Substrát pro imunodetekci na membráně	Thermo Fisher	
Tryptose phosphate broth	Tekutá půda pro kultivaci bakterií	Oxoid, Thermo Fisher	

Tabulka 3: Použitý materiál, chemikálie, barvy, protilátky a kity/soupravy.

Mimo uvedené chemikálie byly použity typické chemikálie a látky pro práci v laboratoři jako dH₂O, ddH₂O, ethanol, methanol, SAVO atd.

Název roztoku	Složení roztoku	Poznámky
Blotovací pufr	1,6 mM SDS, 49 mM glycin, 60 mM Tris	Těsně před použitím smíchán v poměru 4:1 s methanolem
Elektrodový pufr	192 mM glycin, 3,5 mM SDS, 25 mM Tris	Použití maximálně 14 dní od vytvoření
HBSS K ⁺ depolarizační pufr	1,26 mM CaCl ₂ , 0,49 mM MgCl ₂ , 0,41 mM MgSO ₄ , 143,26 mM KCl, 4,17 KHCO ₃ , 0,34 K ₂ HPO ₄ , 0,44 KH ₂ PO ₄ , 5,56 mM Glukóza	pH=7,4
HBSS Pufr	138 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl ₂ , 0,5 mM MgCl ₂ , 0,4 mM MgSO ₄ , 0,4 mM KH ₂ PO ₄ , 4 mM NaHCO ₃ , 0,3 mM Na ₂ HPO ₄ , 5,6 mM Glukóza	pH=7,4
HBSS pufr bez glukózy	138 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl ₂ , 0,5 mM MgCl ₂ , 0,4 mM MgSO ₄ , 0,4 mM KH ₂ PO ₄ , 4 mM NaHCO ₃ , 0,3 mM Na ₂ HPO ₄	pH=7,4
KRP pufr	120 mM NaCl, 5mM KCl, 2 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , 25 mM NaHCO ₃ , 5,5 mM D-glukóza	pH=7,4
Lyzační pufr	2% SDS, 50 mM Tris, 50 mM DTT	
TBE pufr	2 mM EDTA, 89 mM NaCl, 89 mM H ₃ BO ₄	pH=8,3
Bezglukózový pufr	141 mM NaCl, 2 mM KCl, 1,8 mM CaCl ₂ , 1mM MgCl ₂ , 5mM HEPES	pH=7,4
10x PBS	1,5 mM KCl, 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 136 mM NaCl, 2,25 mM KH ₂ PO ₄	pH=7,4; 1x PBS vytvořeno z 10x PBS ředěním v destilované H ₂ O
10x PBST	Vytvořeno z 10x PBS s 0,1% Tweenem	pH= 7,3; 1x PBST vytvořeno z 10x PBST ředěním v destilované H ₂ O
Název kultivačního média	Složení kultivačního média	Poznámky
DMEM médium s vyšší koncentrací glukózy (High glucose DMEM- 4,5 g/L) obsahující L-glutamin a bikarbonát	K původnímu médiu přidáno: 10% FBS, 1 mM pyruvát sodný, 50 μM gentamycin	Thermo Fisher ; 11965092
OPTIMEM	Složení shodné s DMEM médiem, jen není přidáno FBS	

Tabulka 4: Použité roztoky a kultivační média a jejich složení.

Použité protilátky	Výrobce/Dodavatel, katalogové číslo	Původce
Primární protilátka proti EEA1 (marker časných endozomů)	Invitrogen; MA5-14794	Králík
Primární protilátka proti LAMP1 (marker lyzozomů)	Invitrogen; MA1-164	Myš
Primární protilátka proti mGFP	Origene; TA180076	Myš
Primární protilátka proti β-actinu	Cell signaling; 3700S	Myš
Sekundární protilátka „goat anti-mouse“ Alexa Fluor 594 (proti myší protilátce, původce koza)	Thermo Fisher; A-11032	Koza
Sekundární protilátka „goat anti-rabbit“ Alexa Fluor 594 (proti králičí protilátce, původce koza)	Thermo Fisher; A-11012	Koza
Sekundární protilátka „Rabbit anti-mouse“ (proti myší protilátce, původce králík) s konjugovanou křenovou peroxidázou	Bethyl; A90-117P	Králík

Tabulka 5: Použité primární a sekundární protilátky, jejich výrobce/dodavatel, katalogové číslo a původce.

4. Metody

4.1. Kultivace buněčné linie HEK293A

Pro tuto diplomovou práci byla použita buněčná linie lidských embryonálních buněk HEK293A. Buněčná linie byla pasážována jednou za 3-4 dny a buňky mohly být po pasáži vysazeny do 12-jamkových destiček samotných či na sklíčka v množství $0,1 \times 10^6$ buněk, případně v množství $0,3 \times 10^6$ do 6-jamkových destiček. Buněčná linie HEK293A v DMEM médiu s 10% FBS a se zvýšenou koncentrací glukózy (glukóza=4,5 g/L). Pasážování buněčné linie HEK293 v laminárním flowboxu mělo několik kroků:

- 1) Slití stávajícího média z buněk
- 2) Přidání PBS s 10% trypsinem
- 3) Kultivace buněk s trypsinem 5 min
- 4) Rychlé opláchnutí dna kultivační lahve a přenesení PBS s trypsinem a buňkami do zkumavky s předpřipraveným 1 mL média pro zastavení reakce
- 5) Centrifugace 5 min při 950 G
- 6) Po centrifugaci slití supernatantu a resuspendace pelety buněk do 1 mL média
- 7) Měření počtu buněk na Cell counteru a jejich nasazení v příslušné koncentraci pro další experimenty

4.2. Amplifikace původních plazmidů GLUT9L a GLUT9S

Pro začátek práce bylo potřeba namnožit/amplifikovat jednotlivé varianty proteinu GLUT9 z původních plazmidů. K amplifikaci těchto plazmidů byla provedena PCR reakce pro GLUT9L a GLUT9S z původních vektorů s ligačními nástavci. Primery i dNTP byly do reakce použity v koncentraci 10 μ M. Složení reakční směsi je uvedeno v *Tabulce 7*, program pro PCR v *Tabulce 6*.

Počet opakování	Teplota	Čas jednotlivých kroků
1x	94°C	1 min
35x	94°C	30 s
	60°C	1 min
	72°C	2 min
1x	72°C	5 min
1x	4°C	

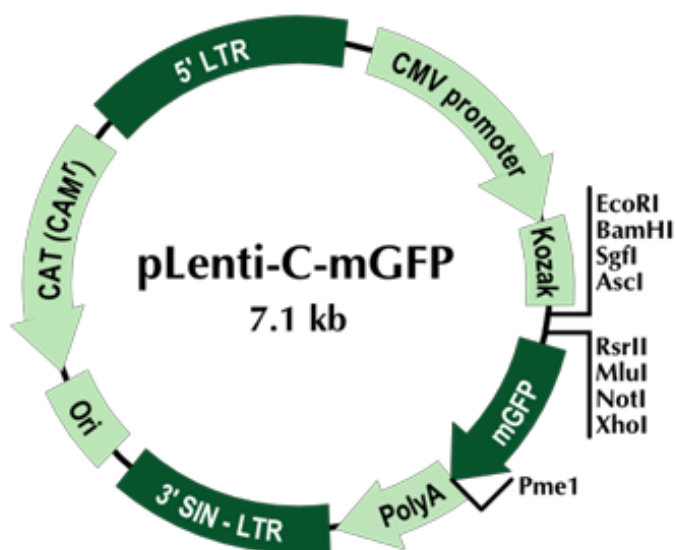
Tabulka 6: Program pro PCR pro GLUT9L a GLUT9S.

Složky směsi	Množství v μ L, finální koncentrace ()
PCR H ₂ O	40,1
10x Pufr	5,0 (1x)
Primer F (10 μ M)	1,0 (0,2 μ M)
Primer R (10 μ M)	1,0 (0,2 μ M)
dNTP (10 mM každý)	1,0 (0,2 mM každý)
Templát	1,0 (20 ng)
Ultra DNA polymeráza	0,9 (0,04 U/ μ L)
Celkem	50

Tabulka 7: Složení reakce pro PCR pro GLUT9L a GLUT9S.

4.3. Klonování genů GLUT9L a GLUT9S do plazmidu

Obě varianty genu GLUT9L i GLUT9S byly původně zaklonovány v pro náš účel nevhodném plazmidu pGEM-T-EASY. Tento plazmid není značen žádnou fluorescenční či jinou značkou a neobsahuje promotor pro expresi v savčích buňkách. Geny bylo tedy potřeba zaklonovat do plazmidu s promotorem pro savčí buňky. Pro tyto účely byl vybrán lentivirální vektor p-Lenti-C-mGFP-P2A-Puro, znázorněn na *Obr. 7*. Překlonování mělo několik základních bodů uvedených v Kapitolách 4.3.1-4.3.6.



Obr.7: Lentivirální vektor pLenti-C-mGFP s vyznačenými restričními místy.

4.3.1 Amplifikace genů GLUT9L a GLUT9S s ligačními nástavci pro restriktázy Sgf1 a Not1

Primer pro ligační nástavec GLUT9L pro Sgf1	5'-AAGCGATCGCATGGCAAGGAAACAAAATAG-3'
Primer pro ligační nástavec GLUT9L pro Not1	5'-TTGCGGCCGCTTAGGCCTTCCATTTATCTTAC-3'
Primer pro ligační nástavec GLUT9S pro Sgf1	5'-AAGCGATCGCATGAAGCTCAGTAAAAAGG-3'

Tabulka 8: Primery pro vytvoření genu s ligačními nástavci.

Pro geny GLUT9L a GLUT9S bylo potřeba vytvořit primery s tzv. ligačními nástavci a provést PCR (polymerázovou řetězovou reakci) s těmito ligačními nástavci pro zmnožení genů s vhodnými konci k ligaci do konečného plazmidu. Na 5' koncích primerů byly navrženy sekvence obsahující palindromy rozpoznávané restričními enzymy Sgf1 (SfaA1) a Not1, které jsou současně obsaženy v MCS (multiple cloning site) zvoleného akceptorového plazmidu pLenti-C-mGFP. Sekvence primerů byla navíc upravena tak, aby nedošlo k posunu čtecího rámce po zaklonování do akceptorového plazmidu. Jelikož primer pro Not1 nasedá na C-konec genu, který mají obě varianty shodný, bylo možné tento primer využít pro obě varianty. Jednotlivé primery s ligačními nástavci jsou vypsané v *Tabulce 8*,

složení a průběh reakce pak v *Tabulkách 9 a 10*. Na takto amplifikovaných genech s ligačními nástavci byla ještě provedena restrikce pro vytvoření lepivých konců obdobně jako v kapitole 4.3.2.

Složky směsi	Množství v μL , finální koncentrace ()
PCR H ₂ O	14,1
Ultra DNA Pufr 5x	4,0 (1x)
Primer F+R (10 μM každý)	0,4+0,4 (0,2 μM každý)
dNTP (10 mM každý)	0,4 (0,2 mM každý)
Templát	0,5 (20 ng)
Ultra DNA polymeráza	0,2 (0,02 U/ μL)
Celkem	20

Tabulka 9: Složení směsi pro PCR s ligačními nástavci pro restriktázy Sgf1 a Not1.

Počet opakování	Teplota	Čas jednotlivých kroků
1x	98°C	30 s
35x	98°C	10 s
	58°C	30 s
	72°C	1 min 30 s
1x	72°C	5 min
1x	4°C	

Tabulka 10: Program pro PCR s ligačními nástavci pro restriktázy Sgf1 a Not1.

4.3.2 Restrikce genu z plazmidu pLenti-C-mGFP pomocí restrikčních endonukleáz Sgf1 a Not1

Plazmid pLenti-C-mGFP původně obsahoval jiný gen (SLC2A6) používaný v naší laboratoři. Bylo tedy potřeba provést restrikci pomocí vybraných restrikčních endonukleáz Sgf1 a Not1. Průběh reakce je vyznačen v *Tabulce 12* a složení restrikční směsi v *Tabulce 11*.

Složky směsi	Množství v μL , finální koncentrace ()
H ₂ O	15,0
Restrikční pufr	2,0 (1x)
Vektor	1,0 (1 μg)
Sgf1	1,0 (1 U/ μL)
Not1	1,0 (1 U/ μL)
Celkem	20

Tabulka 11: Složení restrikční směsi pro restrikční reakci pro pLenti-C-mGFP s restriktázami Sgf1 a Not1.

Průběh reakce	Reakční teplota
5 hodin	18°C
5 minut	80°C
Zchlazení	4°C

Tabulka 12: Průběh restrikční reakce pro pLenti-C-mGFP s restriktázami Sgf1 a Not1.

4.3.3 Gelová elektroforéza po restrikci pLenti-C-mGFP a vyříznutí rozštěpeného vektoru pLenti-C-mGFP z gelu

Po restrikci bylo potřeba analyzovat takto upravený plazmid pomocí 0,8% agarózového gelu s 1 µg/mL ethidium bromidu. Na takto vytvořeném gelu se vzorky byla provedena gelová elektroforéza v TBE pufru. Fragment odpovídající velikosti našeho produktu byl vyříznut z gelu a izolován pomocí „Microelute Gel Extraction Kit“ od firmy Promega.

4.3.4 Ligace

Vzniklý a přečištěný inzert i plazmid byly ligovány v následující reakci v hmotnostním poměru 1:3 inzertu ku vektoru. Reakce probíhala při 18°C po dobu 20 hodin s použitím ligázy z bakteriofága T4. Výsledný produkt reakce byl zkontrolován na gelové elektroforéze. Následně byly produktem transformovány bakterie *E.coli* DH5α-T1 (viz níže).

Složky směsi	Množství v µL, finální koncentrace ()
H ₂ O	7,35
Ligační pufr	2,0 (1x)
Ligáza T4 (5 U/µL)	1,0 (0,25 U/µL)
Vektor	2,4 (100 ng)
Inzert	7,25 (300 ng)
Celkem	20

Tabulka 13: Složení ligační směsi.

4.3.5 Transformace bakterií DHα – T1 *E. coli*

Bakterie *E. coli* DH5α-T1 od značky Invitrogen byly uloženy v mrazáku při -80°C. Pro transformaci jsme použili 50 µL suspenze bakterií. Po vytvoření ligační reakce (případně rekombinační reakce, viz kapitola 4.4.4) byly bakterie umístěny na led, kde se nechaly krátce 5-7 minut roztát. Následně jsme postupovali podle přiloženého protokolu pro jejich transformaci. Po roztání na ledu byly přidány 2,0 µL vytvořené a promíchané ligační/rekombinační směsi k bakteriím, vše bylo opatrně promícháno a opět ponecháno na ledu dalších 12 minut. Po tomto čase byly bakterie vystaveny teplotnímu šoku přenesením na 30 sekund do vodní lázně s teplotou 42°C. Bezprostředně poté byly bakterie opět přeneseny na led na 2 minuty. K takto transformovaným bakteriím bylo přidáno 250 µL SOC média pokojové teploty a takto připravená směs se inkubovala v třepacím boxu při 37°C na 1 hodinu při 1000 kmitech/min. Takto transformované bakterie byly nakonec po inkubaci v množství 50-100 µL vysety na agarózovou misku s příslušným antibiotikem (pro GLUT9 se jedná o chloramfenikol). Takto připravené misky byly ponechány přes noc v termoboxu při teplotě 37°C. Následující den bylo vybráno 6-10 vyrostlých kolonií z každé misky. Polovina této kolonie byla přeočkována na novou misku a opět inkubována přes noc při 37°C pro pozdější použití. Druhá polovina každé kolonie byla zaočkována do 2 mL tryptózo-fosfátového bujónu (TPB) s příslušným antibiotikem. Takto vytvořená

tekutá půda s bakteriemi byla inkubována přes noc v 37°C v třepacím boxu. Následující den byly narostlé bakterie izolovány pomocí izolačního Maxi či Mini kitu od firmy Promega.

4.3.6 Izolace plazmidu pomocí izolačního kitu, stanovení koncentrace DNA a sekvenace

Narostlé transformované bakterie byly izolovány pomocí „Plasmid Isolation Minikitu“ podle přiloženého protokolu a následně byla stanovena koncentrace DNA. Ke stanovení koncentrace DNA byl využit Spektrofotometr ND-1000. Koncentrace byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 260 nm podle protokolu. Pro sekvenaci byly namíchány reakce podle složení uvedeném v *Tabulce 14* s použitím sekvenačních primerů z *Tabulky 15*. Izolovaný plazmid byl vždy nejprve naředěn na výslednou koncentraci 250 µg/reakci. Takto připravené a označené vzorky na sekvenaci byly odeslány do laboratoře sekvenace při PŘF UK.

Složky směsi	Množství v µL
PCR H ₂ O	6
Sekvenační primer (5,0 µM)	1 (0,625 µM)
Plazmid	1 (200 ng/reakci)
Celkem	8

Tabulka 14: Složení sekvenační reakce.

Získané výsledky jsme porovnali s publikovanou přirozenou (WT) sekvencí GLUT9L a GLUT9S. Klony, které měly správnou sekvenci včetně správné návaznosti na promotor i mGFP značku jsme následně znovu namnožili do 250 mL tekuté půdy (TPB) a izolovali izolačním Maxikitem od firmy Qiagen (Qiagen Isolation Plasmid Maxikit). U vyizolovaného plazmidu byla opět provedena kontrolní sekvenace.

Označení primeru	Sekvence primeru
1R	CGTCCATGCCTTCTTTCCCA
2F	TTCTTGGGAGGAAGCACT
3R	CCACTGCAGAAAGAGGCGAT
4F	GGCTCCTCTCCCATTCATTCA
5R	CTTGATCTCCAGCTTGCCGT
V2F	AGCAGAGCTCGTTAGTGAACC

Tabulka 15: Sekvence použitých sekvenačních primerů GLUT9L a GLUT9S ve vektoru pLenti-C-mGFP.

4.4. Mutageneze

Mutagenační reakce samotná probíhala v několika po sobě jdoucích krocích. Nejprve bylo nutné vytvořit vhodné primery, provést oligonukleotidem řízenou mutagenezi a zkontrolovat tento produkt na gelové elektroforéze. Nakonec tento produkt musel být rekombinován a transformován do bakterií E. coli DH5α-T1. Z těchto bakterií byly plazmidy po namnožení opět izolovány a zaslány na sekvenaci. Jednotlivé kroky jsou blíže popsány v následujících kapitolách.

4.4.1. Příprava mutagenačních primerů

Pro jednotlivé mutace plazmidů obou variant transportéru byly vytvořeny mutagenní primery (viz *Tabulka 16*). Pro mutagenezi byl využit kit Geneart Site Directed Mutagenesis od firmy Invitrogen. Delece byly vytvořeny pro motivy LL (delece 33LL34), LGL (delece 12LGL14) a YIKA (delece 84YIKA87) u izoformy GLUT9L. U prvních 3 variant mutovaných lokalizačních motivů (LGL, LL, YIKA) byla vytvořena delece celého příslušného motivu, u variant GLUT9L V114L a GLUT9S V114L (V85L) byla vytvořena na dané pozici záměna valinu za leucin. U alelické varianty GLUT9L V114L a GLUT9S V114L/V85L byly použity stejné primery.

<u>Název</u>	<u>Primer</u>	<u>Délka</u>
GLUT9L DeI LGL F	AGGAATTCCAAGGAAGGCCTAGTCCCCTC	30 bp
GLUT9L DeI LGL R	GAGGGGAACTAGGCCTTCCTTGAATTCCT	30 bp
GLUT9L DeI LL F	GCCAGGGAGGGCAGAGTGTGACCACC	26 bp
GLUT9L DeI LL R	GGTGGTCACACTCTGCCCTCCCTGGC	26 bp
GLUT9L DeI YIKA F	GAATGCCCCACCCCGATCAAGGCCTTTACAATG	35 bp
GLUT9L DeI YIKA R	CATTGTAAAAGGCCTTGATCGGGGTGGGGGCATTC	35 bp
GLUT9 V114L/V85L F	CTCTGGTCTGTGACTTTGTCCATATTCGCCATC	33 bp
GLUT9 V114/V85L R	GATGGCGAATATGGACAAAGTCACAGACCAGAG	33 bp

Tabulku 16: Primery pro jednotlivé varianty mutovaných plazmidů.

4.4.2. Oligonukleotidem řízená mutageneze (PCR)

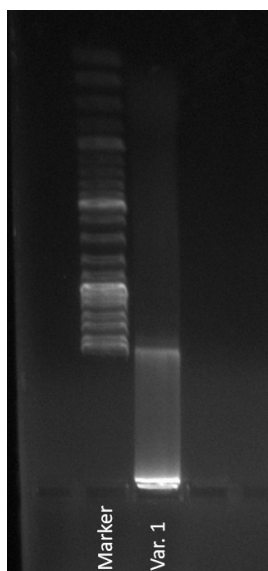
Oligonukleotidem řízená mutageneze (či také mutagenační PCR) byla prováděna pomocí kitu Geneart Site Directed Mutagenesis od firmy Invitrogen a za použití primerů navržených a popsanych v kapitole 4.2.1 se složením reakce uvedeným v *Tabulce 17* a za podmínek reakce v *Tabulce 18*. Forward (F) primer byl přidán již při míchání reakce, zatímco Reverse (R) primer byl přidán až na začátku cyklu s číslem 2. Oba tyto primery byly naředěny na koncentraci 10 μM . Tato PCR reakce byla následně ověřena gelovou elektroforézou.

<u>Složení reakce</u>	<u>Množství v μL, finální koncentrace ()</u>
Ultra DNA Puf (5x)	5,0 (1x)
Enhancer	2,5
Primer F (10 μM)	0,75 (0,4 μM)
Primer R (10 μM)	0,75 (0,4 μM)
Plasmid	0,5 (20 ng)
25x SAM	1,0 (1x)
Methyláza	0,38
Ultra DNA Polymeráza	0,25 (0,08 U/ μL)
PCR H ₂ O	13,87
Celkem	25,0

Tabulka 17: Složení směsi pro Oligonukleotidem řízenou mutagenezi.

Počet opakování	Teplota	Čas jednotlivých kroků
1x	37°C	20 min
1x	98°C	2 minuty
25x	98°C	20 s
	56-59°C	30 s
	68°C	5 min
1x	68°C	8 min
1x	4°C	

Tabulka 18: Program pro Oligonukleotidem řízenou mutagenézi.



Obr.9: Příklad úspěšně provedené mutagenéze kontrolované na 0,8% agarózovovém gelu elektroforézou, zkušební mutagenní PCR pro variantu GLUT9L V144L s vybranou variantou 1 (podmínky +DMSO, teplota nasedání 56°C); použitý marker Generuler 1kb DNA Ladder Ready-to-use.

4.4.2.1. Optimalizace mutagenézí pro jednotlivé varianty

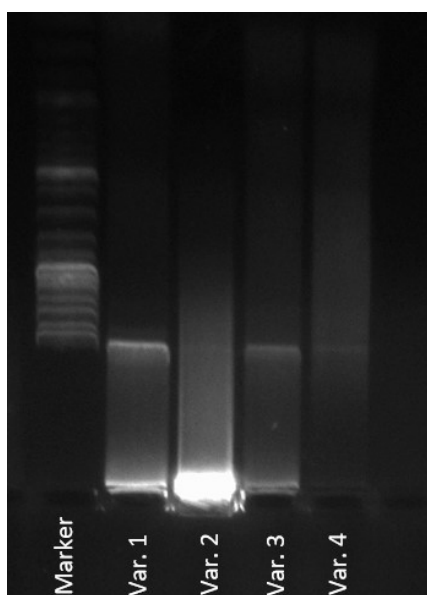
	DMSO	Teplota nasedání
Varianta 1	+	56°C
Varianta 2	+	59°C
Varianta 3	-	56°C
Varianta 4	-	59°C

Tabulka 19: Jednotlivé varianty pro rozdílné podmínky pro optimalizaci mutagenéze a vybrané podmínky pro jednotlivé případy.

Pro jednotlivé varianty mutagenéze (oligonukleotidem řízené PCR reakce) bylo potřeba najít nejvhodnější podmínky reakce. Vyzkoušeny byly 4 možnosti s případným přidáním 0,75 μ L DMSO (3% ve výsledné reakci) do reakce a v různých teplotách nasedání, při nasedání 56°C nebo 59°C. Jednotlivé varianty jsou uvedeny v *Tabulce 19*. Jednotlivé varianty byly analyzovány agarózovou elektroforézou a vybrány ty s nejsilnějším a nejčistším bandem. Vybrané podmínky pro oligonukleotidem řízenou mutagenézi pro jednotlivé alelické a mutované varianty jsou vypsány v *Tabulce 20*.

	Vybraná varianta	Podmínky: +/- DMSO, teplota nasedání
GLUT9L del LL	Varianta 1	+DMSO, 56°C
GLUT9L del LGL	Varianta 2	+DMSO, 59°C
GLUT9L del YIKA	Varianta 2	+DMSO, 59°C
GLUT9L V114L	Varianta 4	+DMSO, 56°C
GLUT9S V114L	Varianta 4	-DMSO, 59°C

Tabulka 20: Vybrané podmínky pro oligonukleotidem řízenou mutagenезi pro jednolitvé mutované a deletované varianty.



Obr.10: Příklad zkušební oligonukleotidem řízené mutagenезe pro variantu GLUT9L V144L analyzováno na 0,8% agarózovém gelu; na gelu je použit Marker (Generuler 1kb DNA Ladder Ready-to-use) a varianty 1-4 podle Tabulky 20; vybrána varianta 1.

4.4.3. Gelová elektroforéza

Pro příslušné vzorky DNA byla vždy provedena gelová agarózová elektroforéza v koncentraci podle velikosti sledovaných vzorků. Nejčastěji byly vzorky analyzovány na 0,8% agarózovém gelu v TBE pufru, do tohoto roztoku byl také přidán ethidium bromid v koncentraci 1µg/mL pro vizualizaci DNA na UV transluminátoru (Obr. 9 a 12).

4.4.4. Rekombinační reakce

Zmnožené plazmidy pomocí PCR reakcí bylo následně potřeba cirkularizovat. K tomu byla využita poslední složka kitu Geneart Site Directed Mutagenesis, tzv. rekombinační reakce ve složení:

Složení směsi	Množství v µL
PCR H ₂ O	10
Vzorek z PCR	4
5x Reaction buffer	4 (1x)
10x Enzymer mix	2 (1x)
Celkem	20

Tabulka 21: Složení směsi pro rekombinační reakci.

Takto smíchaná reakce byla inkubována 10 min v pokojové teplotě a následně byla přidána EDTA o výsledné koncentraci 25 mM pro zastavení reakce. Takto vytvořená reakce byla ihned transformována do bakterií.

4.5. Transientní transfekce buněčné linie HEK293A pomocí PEI

Na jednotlivé buněčné kultury byly vyzkoušeny různé transfekční metody. Nakonec pro transientní transfekci buněčné linie HEK293A byla použita v naší laboratoři zavedená metoda lipofekce pomocí PEI (polyethylenimine). Pro transfekci byla použita lipofekce pomocí PEI v koncentraci 1 mg PEI na 1 mL OPTIMEM. Množství DNA vektoru ku PEI bylo 1,0 µg DNA ku 2,5 µL PEI.

- 1) Nejprve bylo potřeba buňky inkubovat v thermoboxu po dobu 30 min pouze v 300 µL bezsérového média OPTIMEM
- 2) Mezitím byly připraveny 2 roztoky a nechány 10 min inkubovat při pokojové teplotě:
 - a. Roztok 1- DNA vektor + OPTIMEM (1,4 µg DNA vektoru + 28,4 µL OPTIMEM, DNA vektor naředěn v OPTIMEM na výslednou koncentraci 1550 ng na 1 reakci)
 - b. Roztok 2- PEI + OPTIMEM (3,4 µL PEI + 28,5 µL OPTIMEM)
- 3) Odstáté roztoky 1+2 byly smíchány, promíchány obrácením zkumavky a takto připravený výsledný lipofekční roztok byl opět ponechán 10 minut při pokojové teplotě
- 4) Inkubované buňky byly opláchnuty PBS, opět převrstveny médiem OPTIMEM a do každé jamky bylo rovnoměrně přidáno 60 uL smíchaných a odstátých roztoků
- 5) Po 3h kultivaci při 37°C a 5,0% CO₂ byly buňky opět opláchnuty PBS a převrstveny jejich obvyklým kultivačním médiem

4.6 Příprava mikroskopických preparátů

Buněčné kultury a preparáty 2 dny po transfekci mohly být využity k přípravě preparátů pro fluorescenční mikroskopii. Tyto buňky byly nasazeny do 12-jamkové destičky s mikroskopickými sklíčky pokrytými L-Polylysinem o koncentraci 0,01%, Vlastní inkubace sklíček s L-Polylysinem trvala 30 min při 40°C. Takto připravena sklíčka byla 2x omyta ddH₂O a byly na ně nasazeny buňky v množství 0,1x10⁶ buněk na jamku. Po dvou dnech byly buňky transfekovány podle kapitoly 4.5 a po dalších 2 dnech mohly být tyto preparáty dále fixovány. Vzorky byly fixovány v 4,0% paraformaldehydu v PBS (pH=7,4) 8 minut za průběžné kontroly pod invertovaným fluorescenčním mikroskopem. Takto zafixované preparáty byly dokončeny přidáním DAPI v Mowiolu (o koncentraci 0,1 µg/mL) na podložní sklíčko. Takto vytvořené preparáty byly uchovávány při 4°C v chladničce bez přístupu světla.

4.6.1 Příprava mikroskopických preparátů pro kolokalizační pozorování

Pro přípravu mikroskopických preparátů pro kolokalizační pozorování proteinů s časnými endozomy a lysozomy byly buněčné preparáty fixovány stejně jako v předešlé kapitole 4.6. Po fixaci byly tyto vzorky permeabilizovány v 0,1% Tritonu X-100 v 1x PBS po dobu 30 min. Po permeabilizaci byly vzorky 3x při kývání promyty 1x PBS a blokovány 45 min v 2% BSA (bovine serum albumin, hovězí sérový albumin), v 1x PBS. Následně byly vzorky inkubovány přes noc při 4°C ve vlhké komoře v 25 µL naředěné příslušné primární protilátky (viz *Tabulka 22*). Druhý den byly preparáty 5x promyty v 1x PBS a inkubovány 1h ve vlhké komoře při pokojové teplotě s 25 µL naředěné sekundární protilátky. Takto připravené preparáty byly zamontovány do Mowiolu s DAPI na podložní sklíčko a uchovávány v chladničce při 4°C bez přístupu světla.

Název protilátky	Výrobce a původce protilátky	Ředění protilátky
Primární protilátka proti časným endozomům (EEA1)	Invitrogen, králík	1:800
Primární protilátka proti lysozomům (LAMP1)	Invitrogen, myš	1:400
Sekundární protilátka goat anti-rabbit 594 (proti králičí protilátce, původce koza) Alexa Fluor 594	Thermo Fisher, koza	1:1000
Sekundární protilátka „goat anti-mouse“ (proti myší protilátce, původce koza) Alexa Fluor 594	Thermo Fisher, koza	1:1000

Tabulka 22: Použité primární a sekundární protilátky pro detekci časných endozomů a lysozomů pro imunocytochemii; protilátky byly ředěny v 0,5% BSA, 0,025% Tritonu X-100 v 1x PBS.

4.7 Funkční studie s C¹⁴ radioaktivně značeným urátem

Funkční studie s radioaktivně značeným urátem C¹⁴ probíhaly na buněčných kulturách 48h po transfekci podle kapitoly 4.5.1. Pro každou variantu byly transfekovány na jednotlivou funkční studii 4 jamky, 3 pro měření uptake izotopu do cytoplazmy buněk s radioaktivně značeným urátem C¹⁴ a 1 jamka pro měření proteinů Bradfordovou metodou. Pro funkční studie byl použit HBSS pufr, depolarizační HBSS, pufr HBSS pufr bez obsahu glukózy, KRP pufr a „Uptake pufr“. Funkční studie byly prováděny podle optimalizovaného protokolu naší laboratoře. Urát byl naředěn na finální koncentraci 30 µM v reakci.

Nejprve bylo odsáto médium z každé jamky destičky a tyto jamky byly preinkubovány 15 minut v odpovídajícím inkubačním pufru při teplotě 37°C. Po preinkubaci byly buňky inkubovány 20 minut s příslušným inkubačním pufrům s příměsí ¹⁴C radioaktivně značeného urátu ve finální koncentraci 30µM v termostatu při 37°C. Buňky byly následně třikrát opláchnuty ledovým inkubačním pufrům na ledu po dodržení přesně 2 minut mezi jednotlivými oplachy. Nakonec byly buňky lyzovány 3 hodiny pomocí 0,15M NaOH při držení na ledu. Jednotlivé radioaktivně značené vzorky byly přeneseny do řádně označených scintilačních zkumavek, jamky bez radioaktivního urátu byly ale přeneseny do

odlišných zkumavek a drženy na ledu. Do scintilačních zkumavek s lyzáty bylo přidáno 75 μL HCl pro neutralizaci. Byly vytvořeny také 3 referenční zkumavky s 75 μL HCl, 500 μL 0,15 mM NaOH a s 5 μL naředěného urátu v příslušném inkubačním pufru a 1 zkumavka pro měření pozadí pouze s 75 μL HCl a 500 μL 0,15 mM NaOH. Před měřením v Scintilačním počítači PerkinElmer TriCarb 2900 TR bylo ke vzorkům v scintilačních zkumavkách přidáno 3,5 mL scintilačního koktejlu NBCB. Takto připravené vzorky byly 2x vortexovány a analyzovány kapalnou scintilací ve Scintilačním počítači Perkin Elmer-A290001. U každého vzorku byl měřena aktivita radioaktivních rozpadů kapalinovou scintilační metodou po dobu 5 minut s předměřením probíhajícím 1 minutu podle nastaveného protokolu.

4.8 Bradfordova reakce na měření množství proteinů v buněčném lyzátu

Poslední jamka u každé varianty při každé funkční studii sloužila k následnému měření proteinů Bradfordovo metodou. Buňky byly inkubovány zcela shodně jako skupina pro měření uptake, avšak bez radioaktivního urátu, jako buňky v kapitole 4.7 a byly i následně lyzovány pomocí NaOH. Po lyzi byly tyto homogenáty odebrány do zkumavek a buď zamrazeny v -80°C či rovnou použity k Bradfordovu měření proteinů. Pokud byly buněčné lyzáty před měřením zmrazeny, nechaly se nejprve postupně pomalu rozmrazit na ledu. Následně byly 15x sonikovány při amplitudě 60 % na ledu na sonikátoru Hielscher UPH20. Po sonikaci vzorků bylo odebráno 5 μL takto připravených vzorků do 96-jamkové destičky s 250 μL Bradfordova činidla v jamce. Jednotlivé vzorky byly poté opatrně promíchány. Jako pozadí pro měření byla vytvořena jamka s 250 μL Bradfordova činidla a 5 μL NaOH. K odečtu koncentrací proteinů jsme využili kalibrační křivku sestavenou ze známých hodnot koncentrace sérového hovězího albuminu rozpuštěného v 0,15 M NaOH.

4.9 Western blot

Vzorky na Western blot byly připraveny transfekcí buněčné linie HEK293A příslušnými plazmidy v 6-jamkové destičce stejným způsobem jako v kapitole 4.5. Dva dny (48h) po transfekci buněk bylo odsáto médium a buňky byly seškrábnuty škrabkou z celé jamky do 1 mL 1xPBS. Vzorky byly centrifugovány při 150 g po dobu 5 minut. Po centrifugaci byl odsát supernatant, pelety byly resuspendovány a poté 1h na ledu lyzovány v 350 μL SDS s 17,5 μL aprotininu (zásobní koncentrace 0,1 mg/mL, finální koncentrace 4,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Po této době byly lyzáty 25x sonikovány na ledu s 60 % amplitudou na sonikátoru Hielscher UPH20 a nakonec byly smíchány s 37 μL 1 M DDT v 370 μL 2x Laemlyho pufru. Takto připravené lyzované vzorky byly denaturovány 1 hodinu v Thermobloku v 56°C a následně uchovávány v mrazničce v -80°C do doby nanášení na gel. Na samotný Western blot byl připravený gel z 10% dělicího gelu a 5% zaostřovacího gelu viz *Tabulka 23*.

	Dělicí 10% (5mL)	Zaostřovací 5% (5mL)
Destilovaná H ₂ O	1,785	2,62
Akryl amid 30%	1,67	0,83
Tris 8,9 roztok C	1,25	
Roztok D		1,25 (pH=6,9)
SDS roztok B	0,05	0,05
APS roztok G	0,25	0,25

Tabulka 23: Složení dělicího a zaostřovacího roztoku pro akrylamidový SDS gel pro Western blot.

Připravený akrylamidový gel byl usazen do SDS-PAGE elektroforační aparatury, zalit elektrodoým pufrem a do jamek gelu bylo nanášeno 20 µL vzorku. Jako marker byly použity 4 µL „Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder“ od firmy Thermo Fisher. SDS-PAGE elektroforéza byla spuštěna nejprve při 70 V, dokud se vzorky nedostaly na pomezí rozdělovacího a dělicího gelu, poté bylo napětí zvýšeno na 120 V. Po dokončení SDS-PAGE elektroforézy byl akrylamidový gel inkubován 15 minut v blotovacím pufru stejně jako blotovací nitrocelulózová membrána. Těsně před použitím byl blotovací pufr rozředěn methanolem v poměru 20 mL methanolu a 80 mL připraveného blotovacího pufru. Inkubovaná membrána i gel byly zasazeny do blotovací aparatury značky Hoeffer 45 minut při konstantním proudu 100 mA. Po dokončení blotování byla membrána 5x promyta po 5 minutách, nejprve 2x v destilované H₂O a poté 3x v PBST. Membrána byla blokována 1,5h v pokojové teplotě v 5,0% odtučněném mléce v PBST a opět promyta, tentokrát 3x v PBST po dobu 5 minut. Po promytí byla membrána inkubována přes noc při 4°C v primární protilátce. Další den byla membrána 5x promyta v PBST po 5 minutách a inkubována v pokojové teplotě za pomalého kývání 1 hodinu v sekundární protilátce. Samotné protilátky, jejich původ a ředění jsou vypsány v *Tabulce 24*.

Název protilátky	Výrobce a původce protilátky	Ředění protilátky
Primární protilátka proti mGFP	Origene, myš	1:500
Primární protilátka proti β-actinu	Cell signaling, myš	1:1000
Sekundární protilátka proti myší protilátce	Bethyl, králík	1:7000

Tabulka 24: Použité primární a sekundární protilátky pro imunodetekci na membráně, protilátky byly ředěny v 1% mléce v PBST s 0,1% NaN₃.

Proteiny na membráně byly vizualizovány nanesením substrátu „Supersignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate“ od značky Thermofisher po smíchání obou složek, stabilního peroxidu i Luminolu/Enhanceru, v poměru 1:1. Vizualizace proběhla na snímacím přístroji ChemiDoc PM od značky Biorad.

4.10 Statistická analýza

Statistická analýza a výsledné grafy získaných výsledků byly prováděny v programu GraphPad a Microsoft Excel. Jako statistický test byl zvolen nepárový Studentův t-test, jednovýběrový s předpokládaným normálním rozdělením dat. Výsledky byly vyjádřeny jednak v pmol urátu transportovaného do cytoplazmy buněk linie HEK293A využitých pro funkční studii na mg celkového proteinu za minutu v jednotlivých opakováních, tak i jako procentuální změna transportní funkce alelické a mutované variantě proteinu vůči WT variantě proteinu (WT=100,0%) kvůli rozdílným hladinám přenosu urátu mezi jednotlivými opakováními. Pro všechna měření byla stanovena směrodatná odchylka (S.D., standard deviation), která byla vynesena do grafu pomocí chybových úseček. Studentovým t-testem byla vypočtena p hodnota. Tato p hodnota byla označena podle dané hladiny významnosti jako $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$ a $***p \leq 0,001$. V případě procent pak $*=p < 5\%$, $**=p < 1\%$ a $***=p < 0,1\%$. U každé alelické a mutované varianty byla provedena minimálně 3 nezávislá opakování, u porovnávacích experimentů v HBSS pufru bez glukózy, KRP pufru a bezglukózovém pufru bylo provedeno 1 opakování.

5 Výsledky

5.1 Výběr lokalizačních motivů k oligonukleotidem řízené mutagenезi

Pro studium lokalizačních motivů byly vybrány dva dileucinové motivy (33LL34, 12LG14L) nacházející se v rozdílném N-konci dlouhé varianty proteinu GLUT9 jako potencionální motivy zodpovědné za lokalizaci této varianty proteinu na bazolaterální membránu polarizovaných buněk. Protože pro lokalizaci proteinu na příslušnou membránu je často zapotřebí přítomnost více blízkých lokalizačních motivů, byl také vybrán typický tyrosinový motiv YIKA (84YIKA87) nacházející se již mimo odlišný N-konec. Jednotlivé námi vytipované motivy jsou blíže přiblíženy v kapitole 6 v Diskuzi.

```
GLUT9L; 540 AK  MARKQNRNSKELGLVPLTDDTSHAGPPGPGRALLECDHLRSGVPGGRRRKDWSCSLLVASLAGAFGSSFLYGYNLSVVNAPTPYIKAFYNE
GLUT9S; 512 AK  -----MKLSKKDRGEDEESDSAKKKLDWSCSLLVASLAGAFGSSFLYGYNLSVVNAPTPYIKAFYNE
```

Obr.11: Rozdílné N-konce dlouhé (GLUT9L) a krátké (GLUT9S) varianty proteinu GLUT9 a vytipované lokalizační motivy: 12LGL14 (žlutě), 33LL34 (modře), 84YIKA87 (zeleně).

Jak již bylo uvedeno v teoretickém úvodu, tyto potencionální lokalizační motivy jsou motivy kanonické a jsou konzervované i napříč dalšími bližšími i vzdálenějšími živočichy sdílejícími protein GLUT9, což byl další důvod vybrání těchto lokalizačních motivů. Názorně jsou tyto motivy zobrazeny u člověka a dalších vybraných živočichů na Obr.11 a Obr.12. Pro tyto potencionální lokalizační motivy byly vytvořeny mutované varianty kódující sekvence genu GLUT9L s delecemi těchto motivů a dále byly tyto varianty testovány ve funkčních studiích s ¹⁴C radioaktivně značeným urátem, pro potvrzení exprese byly vytvořeny Western bloty a mikroskopické preparáty.

```
Xenopus laevis  MVVQWLLGWIRELSARSLYV-----LHVLVWVPLGILVYSRQNLTF  SLLVASLLSSLGSSMLYGYNLAVVNPSEYIKSFYNVTWNERYGQPLAQSPLLMYSLTV
Bos taurus     -----MGSASLS---H-SNPGPH---ERAHPTVMQGRRRRKDWSC  SLIVASLVGAFGSSFLYGYNLSVVNAPTPYIKAFYNESWERRHGHPIDSDTLTLLWSVTV
Sus scrofa     -----MDSRELSALLMHGLSHRPPP-----EGRRH---R      QIILVSVVGFAGSSFLYGYNLSVVNAPTPYIKAFYNESWERRHGHPIDSDTLTLLWSVTV
Homo sapiens   -----MARKQNRNSKELGLVPLTDDTSHAGPPGPGRALLECDHLRSGVPGGRRRKDWSC  SLLVASLAGAFGSSFLYGYNLSVVNAPTPYIKAFYNESWERRHGHPIDSDTLTLLWSVTV
Pongo abelii   -----MARKQNRNSKELGLVPLTDDTSHAGPPGPGRALLECDHLRSGVPGGRRRKDWSC  SLLVASLAGAFGSSFLYGYNLSVVNAPTPYIKAFYNESWERRHGHPIDSDTLTLLWSVTV
Mus musculus   -----MDSRELALASLMCDTG-----GPGELS-----VGHQQRRTKKWSF  SLVVAALVGFAGSSFLYGYNLSVVNAPTPYIKAFYNGTHYRRHGQPIDPDTLTLWSVTV
Rattus norvegicus -----L-----GTG-----L  TRDSGKNKETFGSSFLYGYNLSVVNAPTPYIKAFYNETHYRRHGQPIDPDTLTLWSVTV
```

Obr.12: Příklady námi vytipovaných lokalizačních motivů proteinu GLUT9L: dileucinový LGL (růžově), dileucinový LL (zeleně) a tyrosinový YIKA (oranžově) u člověka a několika vybraných živočichů *Xenopus laevis* (drápatka vodní), *Bos taurus* (tur domácí), *Sus scrofa* (prase divoké), *Pongo abelii* (orangutan sumaterský), *Mus musculus* (myš domácí) a *Rattus norvegicus* (potkan obecný).

5.2 Funkční studie

Funkční studie v této diplomové práci byly provedeny na buněčné linii HEK293A po transientní transfekci příslušným WT genem pro protein či jeho mutovanou variantou. Funkční studie byly provedeny po 48h po této transientní transfekci podle kapitoly 4.7. V těchto funkčních studiích je zkoumán přenos urátu z buněk ven ve směru efluxu. Jako negativní kontrola byly použity buňky, kde místo plasmidů s konkrétním genem byla přidána dH₂O, a které podléhaly stejnému postupu a podmínkám jako jiné vzorky těchto studií. Pro každou z varianty byla provedena celkem 3 nezávislá

opakování (n=3) v technických triplikátech, vyjma funkčních studií v kapitole 5.8.3 (odlišnosti jsou uvedeny v dané kapitole).

V uvedených tabulkách (*Tabulky 25, 27, 29, 31, 33 a 35*) je vždy uveden název vzorku, číslo opakování, CPM (counts per minute; počet záblesků za minutu) naměřené Scintilačním počítačem, vypočtené DPM (desintegration per minute, rozpady za minutu), množství proteinu změřené Bradfordovou reakcí podle kapitoly 4.8, průměrný uptake urátu danou variantou v průběhu opakování (v pmol/mg.min), směrodatná odchylka (S.D., standard deviation) a výsledek statistického Studentova t-testu. Studentův t-test byl prováděn mezi množinou dat představujících uptake WT proteinem a danou alelickou/mutovanou variantou. DPM, neboli počet rozpadů jader ^{14}C izotopu za dobu 1 minuty, bylo vypočteno zvláště pro každou funkční studii s přihlédnutím k přirozenému radioaktivnímu pozadí. Z referenčních vzorků aktivního urátu známé aktivity byla provedena korekce zhášení. Pro danou koncentraci urátu jsme stanovili, že 1 pmol ^{14}C izotopu odpovídá 129 rozpadům za minutu (DPM). Uptake urátu/kyseliny močové byl vztažen na mg celkových proteinů vzorku za dobu 1 minuty. Vyjádřen je tedy v pmol/mg.min. Pro jednotlivé funkční studie byly vytvořeny grafy zobrazující uptake urátu v pmol/mg.min pro jednotlivá opakování podle zobrazených tabulek. Nevyplněná místa v tabulkách značí vzorky, kdy aktivita v daném vzorku byla na úrovni pozadí a tato data nebyla dále zahrnuta. Dále pro každou variantu byly vytvořeny grafy s procentuální změnou transportní funkce vůči WT variantě proteinu, kde WT je roven 100%. Uvedena jsou zde procenta pro jednotlivá nezávislá opakování a také průměrné změny transportu. Procenta změny transportní funkce variant transportéru byla vypočtena podle rovnice:

$$v = \frac{MOCK - VARIANTA}{MOCK - WT} \times 100[\%]$$

Rovnice označuje změnu transportní funkce transportéru pro jednotlivá opakování vůči WT proteinu (WT=100%), kde jsou uvedeny uptake v pmol/mg.min pro MOCK, variantu i WT.

Funkční studie byly provedeny na alelické variantě GLUT9L V114L, GLUT9S V114L (V85L), po deleci vytipovaných lokalizačních sekvencí LL, LGL a YIKA a nakonec i v rozdílných inkubačních pufrech za stejných podmínek u všech funkčních studií.

5.2.1 Funkční studie alelické varianty V114L/V85L

Pro funkční studie alelické varianty V114L, která u krátké izoformy GLUT9 odpovídá pozici V85L, byla provedena oligonukleotidem řízená mutageneze za účelem záměny valinu za leucin na pozici 114 u dlouhé varianty a téhož valinu za leucin na pozici 85 u krátké varianty. Těmito funkčními studiemi byla otestována změna schopnosti přenosu urátu ve směru efluxu neboli z buněk ven do extracelulárního prostředí na buněčné linii HEK293A vůči divokým (WT) variantám proteinu GLUT9.

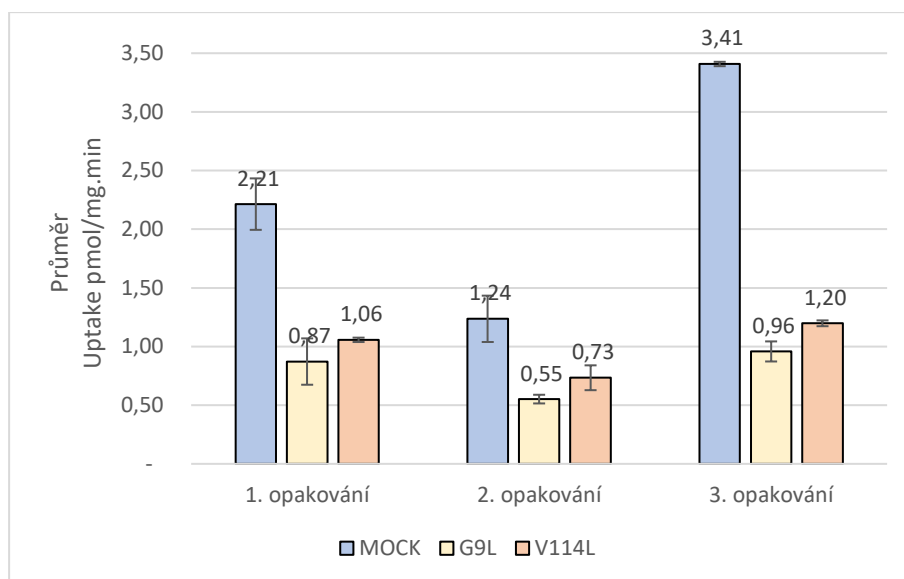
Celkem jsme testovali pět skupin: MOCK (Negativní kontrola/NK, buňky transfekované dH₂O), GLUT9L WT, GLUT9S WT a naše mutované varianty V114L u L (dlouhé) i S (krátké) varianty v prostředí 2 odlišných pufrů: HBSS (v Kapitole 5.8.1.1) a Depolarizačního HBSS (v Kapitole 5.8.1.2). U každé varianty v každém prostředí byla provedena 3 nezávislá opakování.

5.2.1.1 Varianta GLUT9L V114L a GLUT9S V85L/V114L v HBSS pufru

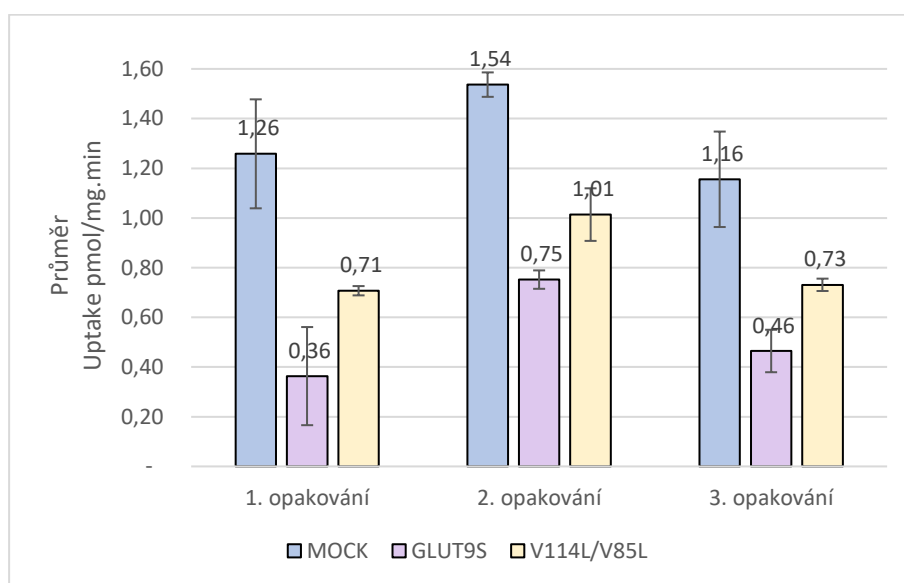
Výsledky pro alelické varianty V114L pro dlouhou i krátkou variantu proteinu GLUT9 v HBSS pufru jsou uvedeny v *Tabulce 25* na další straně. Výsledky jsou zobrazeny na *Grafu 1* pro alelickou variantu GLUT9L V114L dlouhé izoformy a na *Grafu 2* pro alelickou variantu GLUT9S V114L (85L) krátké varianty proteinu. Vzhledem k odlišným absolutním hladinám cytoplazmatické koncentrace urátu v jednotlivých nezávislých opakováních byl pro dokreslení situace vytvořen i graf pro relativní změnu transportní schopnosti urátu uvedený v procentech oproti WT proteinu, kdy hodnotě cytoplazmatické koncentrace při transfekci WT variantou byla přiřazena hodnota 100,0 % (*Graf 3* vytvořený podle *Tabulky 26*).

Varianta GLUT9L V114L v HBSS pufru						
	Počet opakování	CPM	DPM	Množství proteinu (µg/mL)	Uptake (pmol/mg.min)	S.D.
NK	1.	529	1186,4	204	2,2139	0,2193
		581	1308,3			
		460	1024,6			
	2.	1110	1193,4	372,3	1,23598	0,04918
		1165	1254,4			
		1060	1137,9			
	3.	1741	3217,8	382,5	3,4088	0,19208
		1779	3288,8			
		1974	3653,4			
GLUT9L	1.	308	363,4	248,5	0,87179	0,19748
		178	457,2			
		218	808,9			
	2.	601	628,8	401	0,55193	0,00639
		534	554,5			
		522	541,2			
	3.	469	839,5	302	0,9582	0,03933
		382	676,8			
		415	738,5			
GLUT9L V114L	1.	616	1390,3	339	1,05711	0,01864
		413	914,4			
		427	947,2			
	2.	634	665,4	393,5	0,7339	0,105839
		848	902,8			
		649	682,1			
	3.	484	867,5	272	1,19797	0,02486
		461	824,5			
		473	847			
Varianta GLUT9S V114L v HBSS pufru						
	Počet opakování	CPM	DPM	Množství proteinu (µg/mL)	Uptake (pmol/mg.min)	S.D.
NK	1.	617	811,3	244,3	1,25811	0,06247
		637	839,1			
		569	744,6			
	2.	827	1163,4	301	1,53669	0,0849
		918	1294,8			
		815	1146,1			
	3.	908	1052,4	304	1,15561	0,12925
		708	811,9			
		759	873,2			
GLUT9S	1.	330	412,6	416	0,3664	0,07929
		234	279,2			
		283	486,2			
	2.	326	440,2	252,75	0,752	0,06927
		360	489,3			
		403	551,4			
	3.	560	651,9	397	0,4646	0,12025
		456	366,8			
		490	418,6			
GLUT9S V114L	1.	345	433,4	209	0,70717	0,06642
		299	369,5			
		284	348,7			
	2.	446	613,5	263	1,01354	0,11755
		479	661,1			
		577	802,5			
	3.	575	651,9	231	0,7309	0,1136
		338	366,8			
		381	418,6			

Tabulka 25: Výsledky funkčních studií aktivity ¹⁴C značeného urátu pro GLUT9L alelickou variantu V114L a pro GLUT9S alelickou variantu V114L (V85L) v HBSS inkubačním pufru.



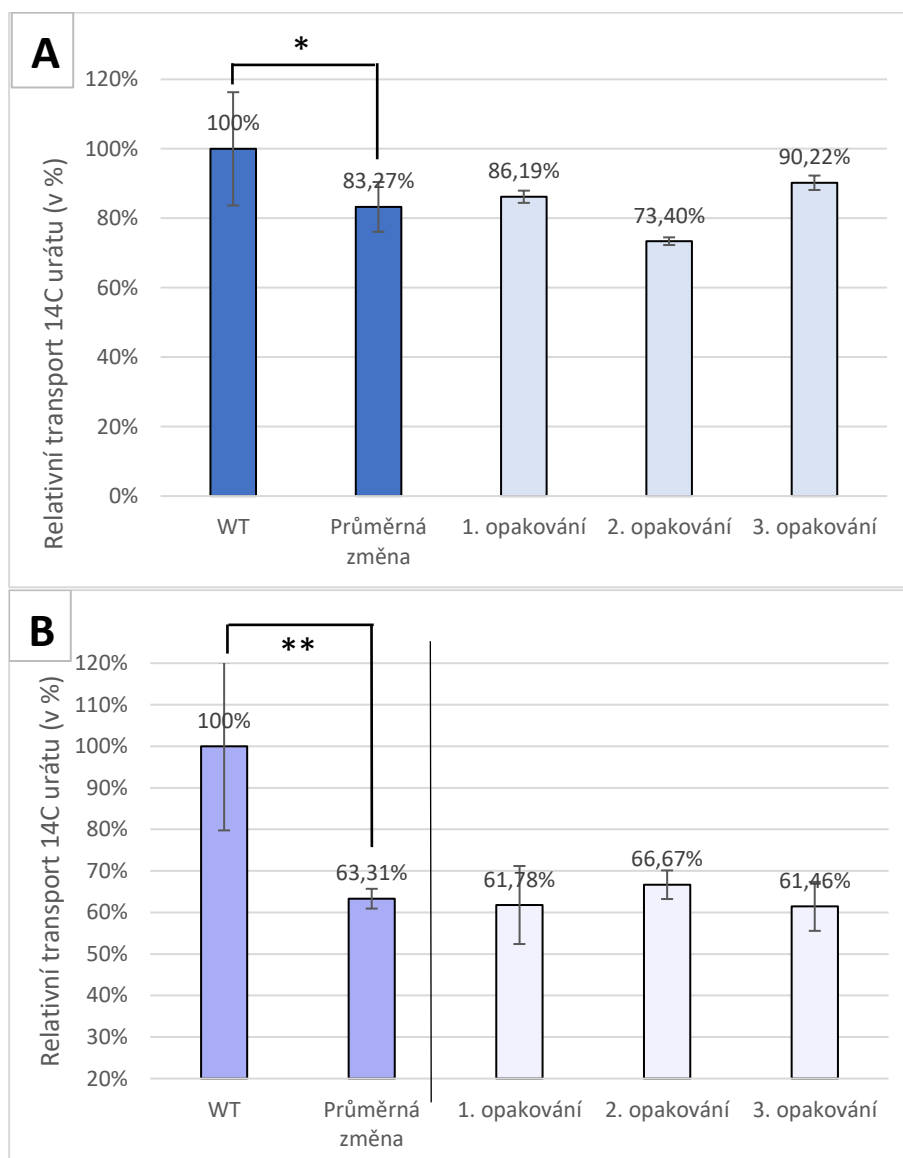
Graf 1: Cytoplazmatická koncentrace urátu v jednotlivých opakování u MOCK, WT (GLUT9L) a alelické varianty GLUT9L V114L; Inkubace 20 min v 30 μ M urátu; jednotky uvedeny v pmol/mg.min; směrodatné odchytky vypočítány z triplikátů v každém opakování; nad každým sloupcem jsou uvedeny průměrné hodnoty uptake.



Graf 2: Cytoplazmatická koncentrace v jednotlivých opakování u MOCK, WT (GLUT9S) a alelické varianty GLUT9S V114L/V85L; Inkubace 20 min v 30 μ M urátu; jednotky uvedeny v pmol/mg.min; směrodatné odchytky vypočítány z triplikátů v každém opakování; nad každým sloupcem jsou uvedeny průměrné hodnoty uptake.

	GLUT9L	Průměrná změna u GLUT9L V114L	První opakování	Druhé opakování	Třetí opakování	Studentův t-test
Procenta	100%	83,27%	86,19%	73,40%	90,22%	* $p=0,0404$ (WT:Průměrná změna)
S.D.	16%	6%	2%	1%	2%	
	GLUT9S	Průměrná změna u GLUT9S V114L	První opakování	Druhé opakování	Třetí opakování	Studentův t-test
Procenta	100%	63,31%	61,78%	66,67%	61,46%	** $p=0,001051$ (WT:Průměrná změna)
S.D.	20%	2%	9%	3%	6%	

Tabulka 26: Relativní hodnoty transportu 14C urátu v procentech pro varianty V114L (V85L) pro GLUT9L i GLUT9S v HBSS pufru, kde WT=100 %; uvedena také průměrná hodnota ze všech opakování a proveden Studentův t-test; uvedeny i jednotlivá opakování a vypočítané směrodatné odchylky.



Graf 3: Relativní procentuální změna uptake urátu v průměru a v jednotlivých nezávislých opakováních oproti WT proteinu (WT=100%) u variant GLUT9L V114L (A) a GLUT9S V114L/V85L (B) v HBSS pufru; uvedena je průměrná změna v % ze všech opakování i údaje pro jednotlivá opakování, $n=3$; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Graf 3 uvádí snížení transportní kapacity urátu v procentech oproti WT. Pokud byla WT varianta proteinu mutována uvedenou alelickou variantou, došlo k signifikantnímu snížení její transportní

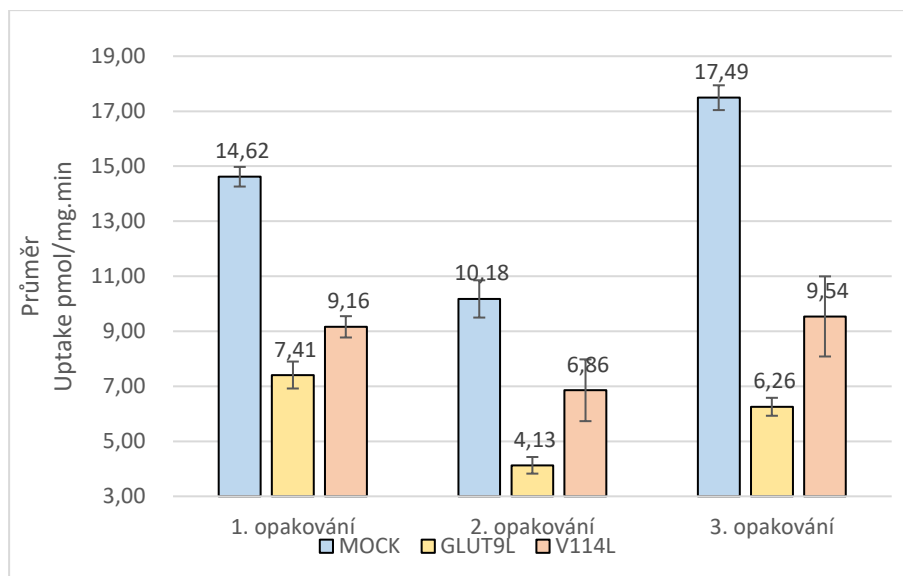
funkce v tomto směru. U alelické varianty V114L u dlouhé izoformy proteinu v průměru došlo o snížení transportní funkce na 83,27 % (resp. o 16,73 %) s *p* hodnotou rovnající se 0,0404 odpovídající označení * oproti WT variantě GLUT9L, kde WT variantě proteinu je přidělena hodnota 100 %. U téže alelické varianty krátké izoformy proteinu GLUT9S došlo ke snížení funkce transportéru na 63,31 % (resp. o 36,69 %) s *p* hodnotou rovnající se 0,001051 s označením ** oproti WT GLUT9S, kde WT je roven 100 %.

5.2.1.2 Varianta GLUT9L V114L a GLUT9S V114L/V85L v HBSS depolarizačním pufru

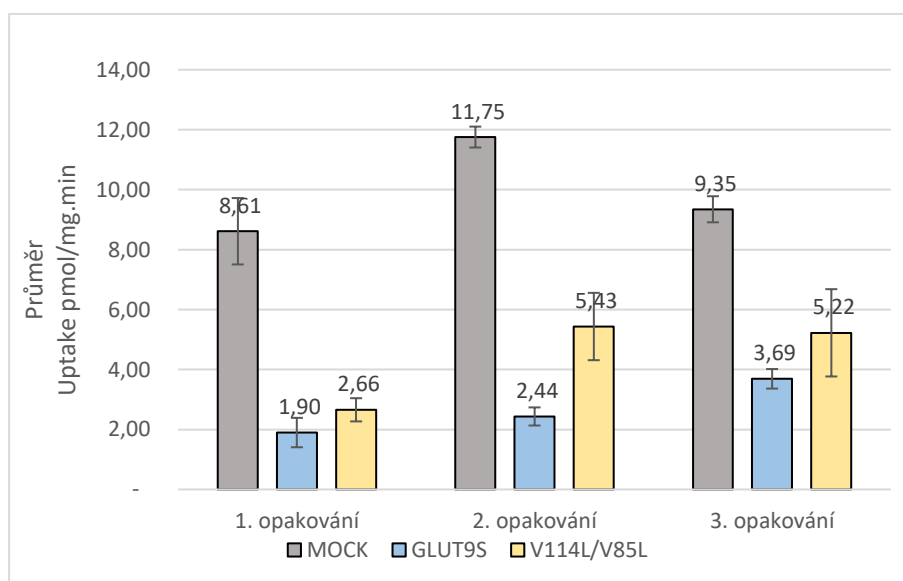
Po provedení funkčních studií v HBSS pufru jsme přistoupili k funkčním studiím téže problematiky v pufru depolarizačním HBSS pufru, který navozuje depolarizaci membrány buněk. Tyto funkční studie v jiném pufru byly provedeny na základě hypotézy, že se jedná o napěťově závislý transportér se zvýšenou funkcí při depolarizaci membrány. Tyto studie byly také provedeny pro porovnání obdobných trendů a výsledků mezi jednotlivými inkubačními pufrů. Kromě výměny pufru probíhaly tyto funkční studie za zcela stejných podmínek: 15 min preinkubace v inkubačním pufru, 20 min inkubace v radioaktivně značeném urátu ve finální koncentraci 30 μ M urátu. Výsledky funkčních studií v depolarizačním inkubačním HBSS pufru jsou uvedeny v *Tabulce 27* a výsledky jednotlivých opakování jsou dále interpretovány v *Grafech 4* a *5*. Také byla vytvořena tabulka a graf v procentech kvůli rozdílným hladinám jednotlivých nezávislých opakování pro dané alelické varianty (*Tabulka 28*, *Graf 6*).

Varianta GLUT9L V114L v HBSS depolarizačním pufru							
	Počet opakování	CPM	DPM	Množství proteinu (µg/mL)	Uptake (pmol/mg.min)	S.D.	
NK	1.	5679	13261,1	358	14,614	0,35678	
		5962	13924,6				
		7660	17905,7				
	2.	1878	8666,3	301	10,1764	0,26315	
		6702	7395,3				
		7073	7806,8				
	3.	10563	19712,3	449	17,4915	0,21162	
		11246	20989,4				
		10982	20495,8				
GLUT9L	1.	1859	4304,7	239,5	7,409817	0,489968	
		2119	4914,3				
		2630	2879,2				
	2.	3026	3318,3	299	4,1276	0,30192	
		3117	3419,3				
		2751	5106,2				
	3.	2441	4526,6	300,5	6,25536	0,32594	
		2702	5014,6				
		3916	9127,5				193,5
1904	4410,2						
2070	4799,4						
GLUT9L V114L	1.	4829	5318	243	6,855905	1,123029	
		3608	3963,8				
		3370	3699,9				
	3.	4983	9279,4	310,5	9,539867	1,456142	
		3482	6472,9				
		3940	7329,3				
	Varianta GLUT9S V114L (V85L) v depolarizačním HBSS pufru						
		Počet opakování	CPM	DPM	Množství proteinu (µg/mL)	Uptake (pmol/mg.min)	S.D.
	NK	1.	5557	7674,1	304	8,61221	1,10666
4299			5926,5				
247			297,3				
2.		9214	13269,4	407,3	11,7543	0,68107	
		7996	11511,3				
		8698	12524,6				
3.		5517	6595,9	289,75	9,345856	0,581719	
		6245	7471,5				
		1001	1344,8				241
666	879,4						
998	1340,6						
GLUT9S	2.	1430	2033,8	297	2,43477	0,20114	
		1215	1723,5				
		2962	3522,8				
	3.	3176	37780,2	370,5	3,69071	0,18288	
		2820	3352,1				
		942	1262,8				219
1364	1849,1						
1057	1422,6						
GLUT9S V114L/V85L	2.	2880	4126,8	261	5,43477	0,6526	
		2267	3241,9				
		650	907,9				
	3.	3957	4719,6	291	5,22465	0,73673	
		3113	3704,5				
		2879	3423				

Tabulka 27: Výsledky funkčních studií aktivity ¹⁴C značeného urátu pro GLUT9L alelickou variantu V114L a pro GLUT9S alelickou variantu V114L (V85L) v inkubačním depolarizačním HBSS pufru.



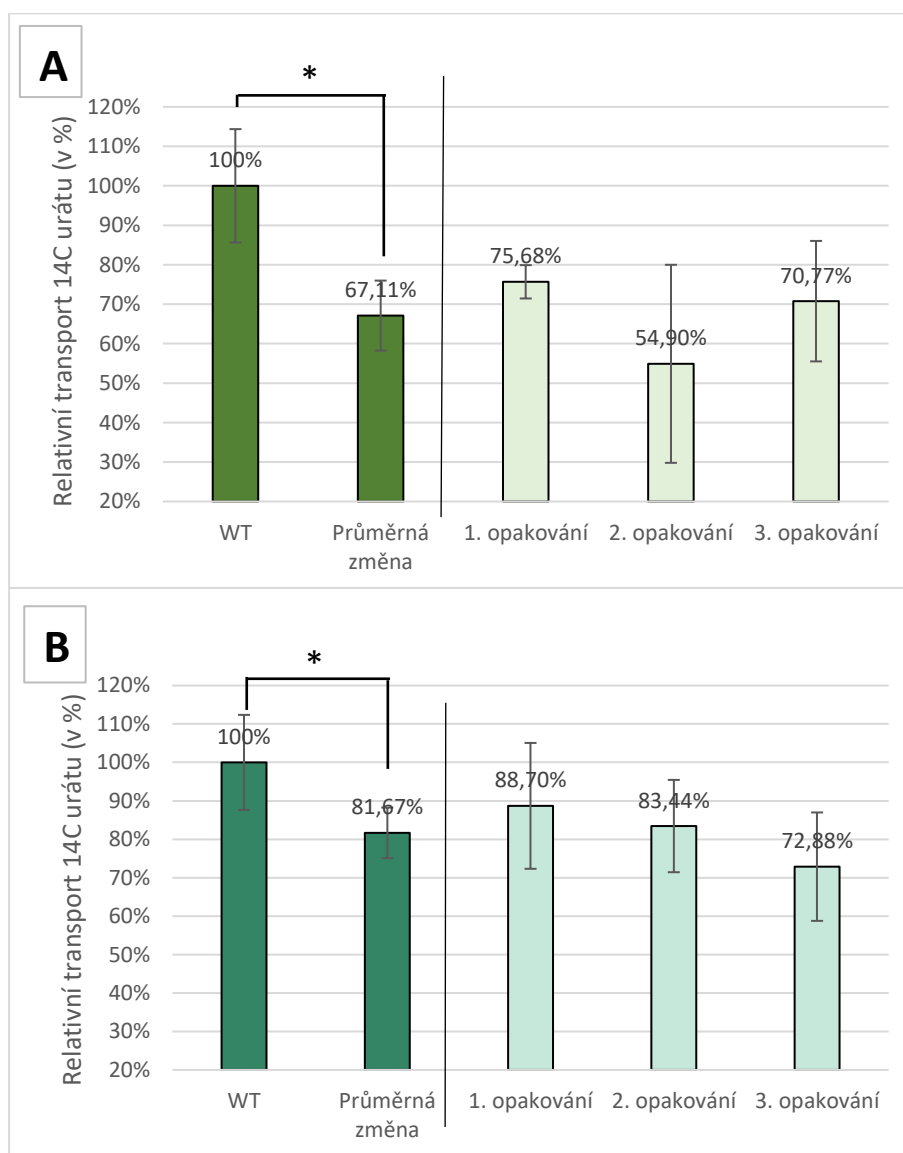
Graf 4: Cytoplazmatická koncentrace urátu v jednotlivých opakování u MOCK, WT (GLUT9L) a alelické varianty GLUT9L V114L v depolarizačním HBSS pufru; inkubace 20 min v 30 μ M urátu; jednotky uvedeny v pmol/mg.min; směrodatné odchylky vypočítány z triplikátů v každém opakování; nad každým sloupcem jsou uvedeny průměrné hodnoty uptake.



Graf 5: Uptake urátu v jednotlivých opakování u MOCK, WT (GLUT9S) a alelické varianty GLUT9S V114L (V85L) v depolarizačním HBSS pufru; inkubace 20 min v 30 μ M urátu; jednotky uvedeny v pmol/mg.min; směrodatné odchylky vypočítány z triplikátů v každém opakování.

	GLUT9L	Průměrná změna u GLUT9L V114L	První opakování	Druhé opakování	Třetí opakování	Studentův t-test
Procenta	100%	67,11%	75,68%	54,90%	70,77%	* $p=0,01725$ (WT:Průměrná změna)
Směrodatná odchylka	14%	9%	4%	25%	15%	
	GLUT9S	Průměrná změna u GLUT9S V114L/V85L	První opakování	Druhé opakování	Třetí opakování	Studentův t-test
Procenta	100%	81,67%	88,70%	83,44%	72,88%	* $p=0,03228$ (WT:Průměrná změna)
Směrodatná odchylka	12%	7%	16%	12%	14%	

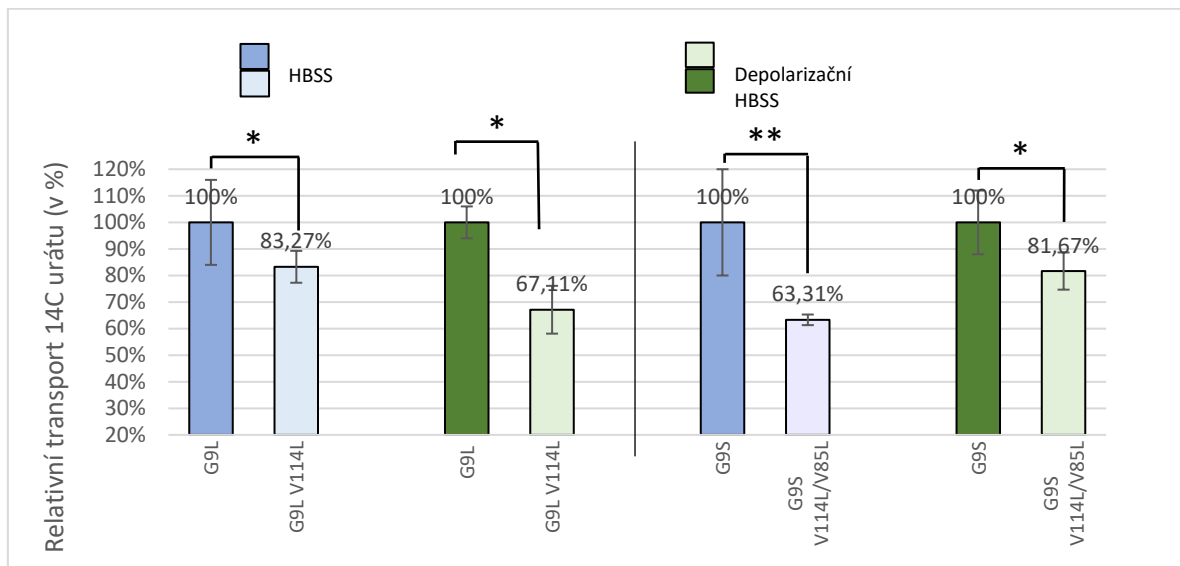
Tabulka 28: Relativní hodnoty transportu 14C urátu v % pro varianty V114L (V85L) pro GLUT9L i GLUT9S v HBSS depolarizačním pufru, kde WT=100 %; uvedena také průměrná změna ze všech opakování a proveden Studentův t.test; uvedeny i jednotlivá opakování a vypočítané směrodatné odchylky.



Graf 6: Relativní procentuální změna uptake urátu v průměru a v jednotlivých nezávislých opakováních oproti WT proteinu (WT=100%) u variant GLUT9L V114L (A) a GLUT9S V114L/V85L (B) v depolarizačním HBSS pufru; uvedena je průměrná změna v % ze všech opakování i údaje pro jednotlivá opakování, $n=3$; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

U alelické varianty GLUT9L V114L v depolarizačním HBSS pufru došlo ke snížení transportní funkce ve směru efluxu dlouhé izofomy transportéru v průměru na 67,11 % (resp. o 32,89 %) s p hodnotou

odpovídající 0,01725 s označením *. U téže alelické varianty u krátké varianty došlo v průměru o snížení transportní funkce na 81,67 % (resp. o 18,33 %) s p hodnotou rovnající se 0,03228 taktéž s označením *. Tato průměrná snížení transportní funkce jsou vztažena oproti divokým (WT) variantám proteinům, kterým je přidělena hodnota 100 %.



Graf 7: Srovnání průměrných změn transportu alelických variant GLUT9L V114L a GLUT9S V114L/V85L v relativním transportu ¹⁴C značeného urátu v %, kde WT=100% v HBSS a HBSS depolarizačním pufru; HBSS pufr značen modře, HBSS depolarizační pufr značen zeleně; směrodatné odchylky, průměrná změna transportu urátu; *= $P < 5\%$, **= $P < 1\%$ a ***= $P < 0,1\%$.

Pro porovnání s výsledky v inkubačním HBSS pufru byly provedeny i funkční studie s ¹⁴C značeným urátem v depolarizačním HBSS pufru, protože GLUT9 samotný je napěťově závislým transportérem. Po depolarizaci membrány buněk dochází k uptaku urátu ve vyšších hladinách (průměrně jsou hodnoty cytoplazmatické koncentrace asi 3,5-krát vyšší), pravděpodobně tak probíhá s vyšší rychlostí transportu oproti experimentům v pufru, který nezpůsobuje depolarizaci membrány. Ač transport probíhá ve vyšších hladinách, pro naši studii byl stále důležitý transport alelických variant proti divokým variantám proteinu. U dlouhé WT izoformy GLUT9L a alelické varianty GLUT9L V114L bylo pozorováno snížení schopnosti transportu ve směru efluxu o 16,73 % v HBSS pufru a o 32,89 % v depolarizačním HBSS pufru. U krátké WT varianty GLUT9S a alelické varianty GLUT9S V114L/V85L bylo pozorováno snížení efluxní funkce alelické varianty v HBSS pufru o 36,69 % a v depolarizačním HBSS pufru o 18,33 %.

5.2.2 Funkční studie vytipovaných lokalizačních sekvencí

V těchto funkčních studiích byl zkoumán vliv delece vytipovaných potencionálních lokalizačních motivů dlouhé izoformy proteinu GLUT9L na změnu přenosu urátu opět ve směru efluxu z buněk ven. Jedná se o dva dileucinové motivy, LL (33LL34) a LGL (12LGL14), nacházející se v odlišném N-konci dlouhé varianty a tyrosinový motiv YIKA (84YIKA87) nacházející se v bezprostřední blízkosti odlišného

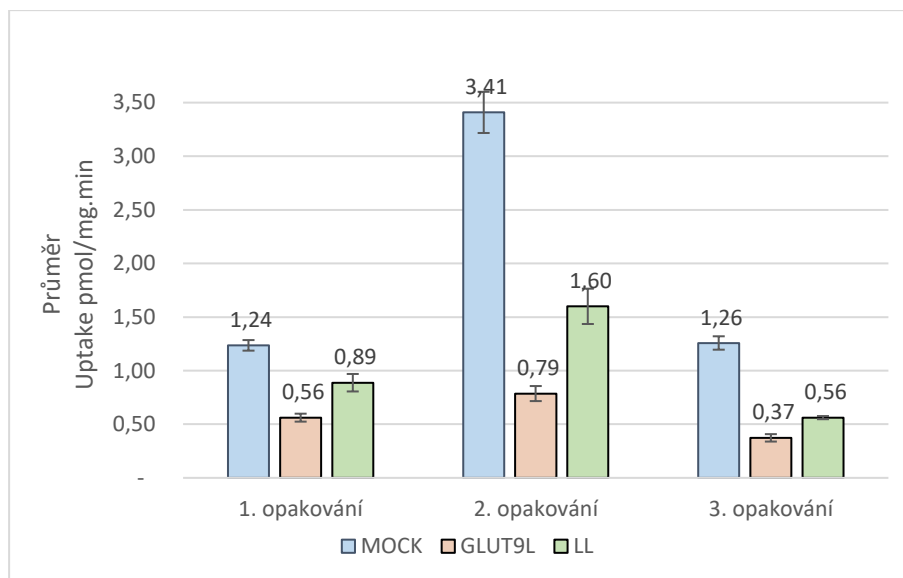
N-konce dlouhé izoformy proteinu. I tyto funkční studie byly provedeny na buněčné linii HEK293A. Pro tyto funkční studie bylo zvoleno 5 různých variant: NK/MOCK, GLUT9L WT, GLUT9L LL, GLUT9L LGL a GLUT9L YIKA v HBSS pufru, kde LL, LGL a YIKA značí deletovanou sekvenci proteinu. Jako negativní kontrola byly použity buňky transfekované dH₂O namísto plazmidu nesoucího kódující sekvenci ve stejném pufru. Podmínky i pro tyto funkční studie byly zcela shodné jako pro funkční studie předešlé. U jednotlivých variant jsou jednotlivé hodnoty vyneseny do *Tabulek 29, 31 a 33* s naměřenými hodnotami CPM, DPM, množstvím proteinu, průměrným uptakem a směrodatnou odchylkou mezi jednotlivými triplikáty daného opakování.

5.2.2.1 Funkční studie varianty GLUT9L LL

První zkoumanou vytipovanou lokalizační sekvencí byl dileucinový motiv LL (33LL34) v rozdílném N-konci dlouhé izoformy proteinu GLUT9. Jednotlivé naměřené a vypočtené hodnoty jsou vyneseny do *Tabulky 29* a relativní hodnoty v procentech pak v *Tabulce 30*. Z uvedených tabulek vycházejí grafy pro jednotlivá opakování (*Graf 8*) a také graf pro relativní transport urátu v procentech (*Graf 9*).

	Počet opakování	CPM	DPM	Množství proteinu (µg/mL)	Uptake (pmol/mg.min)	S.D.
NK	1.	1110	1193,4	372,3	1,23598	0,04918
		1165	1254,4			
		1060	1137,9			
	2.	1741	3217,8	382,5	3,4088	0,19208
		1779	3288,8			
		1974	3653,4			
	3.	617	811,3	244,3	1,25814	0,06247
		637	839,1			
		569	744,6			
GLUT9L	1.	601	628,8	401	0,55193	0,00639
		534	554,5			
		522	541,2			
	2.	469	839,5	368	0,78634	0,03228
		382	676,8			
		415	738,5			
	3.	301	372,3	351	0,37333	0,02971
		247	297,3			
		286	351,5			
GLUT9L LL	1.	638	669,9	334	0,88765	0,08166
		774	820,7			
		773	819,6			
	2.	610	1103,1	241	1,59997	0,1648
		577	1041,4			
		480	860,1			
	3.	443	569,6	392,75	0,56198	0,01468
		460	593,2			
		434	557,1			

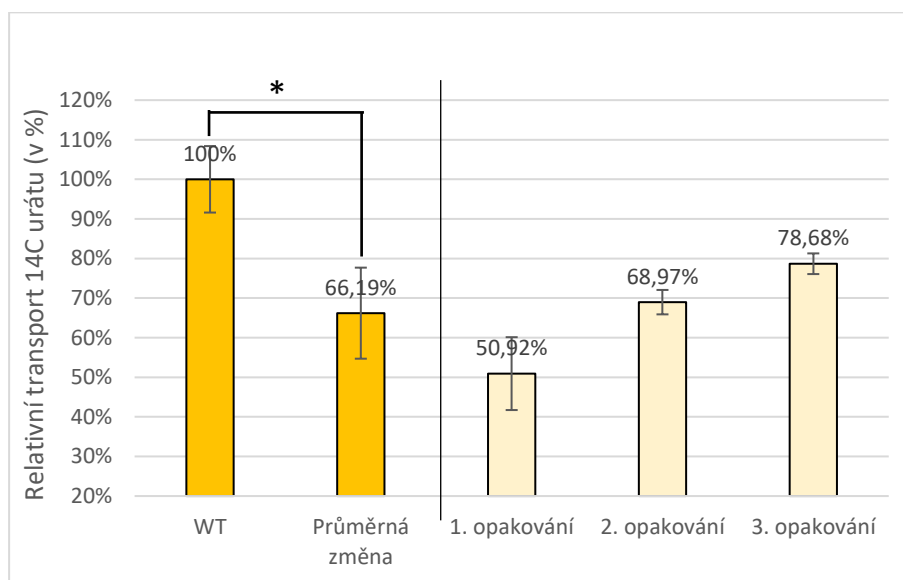
Tabulka 29: Výsledky funkčních studií aktivity ¹⁴C značeného urátu pro GLUT9L pro delecí motivu LL v HBSS inkubačním pufru.



Graf 8: Přenos urátu v jednotlivých opakování pro GLUT9L a pro GLUT9L s deletovaným motivem LL (33LL34); Inkubace 20 min v 30 μ M urátu; jednotky uvedeny v pmol/mg.min; směrodatné odchylky vypočítány z triplikátů v každém opakování.

	GLUT9L	Průměrná změna u GLUT9L LL	První opakování	Druhé opakování	Třetí opakování	Studentův t-test
Procenta	100%	66,19%	50,92%	68,97%	78,68%	$p=0,053284$ (WT:Průměrná změna)
Směrodatná odchylka	8%	12%	9%	3%	3%	

Tabulka 30: Relativní hodnoty transportu 14 C urátu v procentech ve variantě s delecí dileucinového motivu LL (33LL34), kde WT=100%; uvedena také průměrná změna ze všech opakování a proveden Studentův t.test; uvedeny i jednotlivá opakování a vypočítané směrodatné odchylky.



Graf 9: Relativní procentuální změna uptake urátu v průměru a v jednotlivých nezávislých opakováních oproti WT proteinu (WT=100 %) pro GLUT9L s deletovaným motivem LL (33LL34); Uvedena je průměrná změna v % ze všech opakování i údaje pro jednotlivá opakování, $n=3$; * $p \leq 5\%$, ** $p \leq 1\%$, *** $p \leq 0,1\%$.

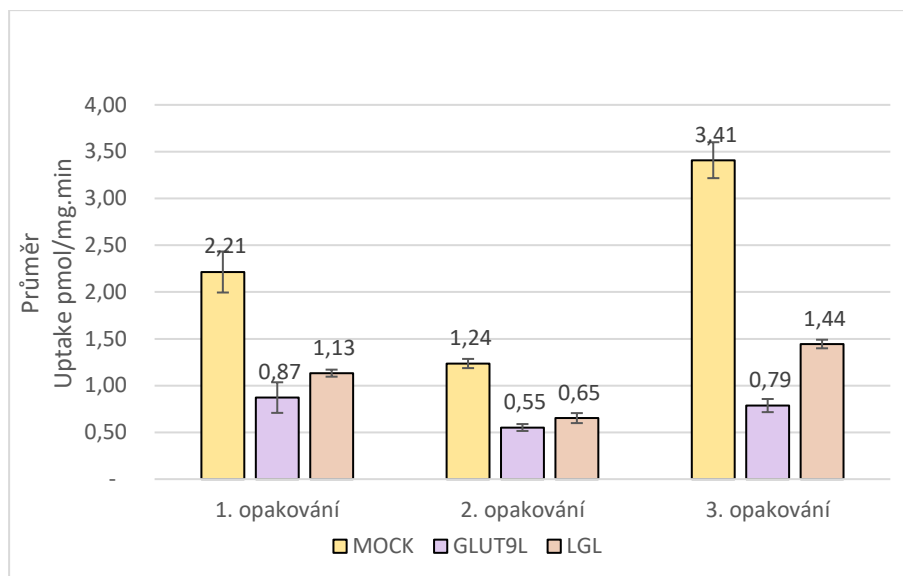
Po mutaci dileucinového motivu LL bylo naměřeno průměrné snížení schopnosti přenosu dlouhé varianty GLUT9L na 67,19 % vůči WT variantě této dlouhé izoformy, respektive ke snížení transportní funkce oproti WT variantě o 33,81 %, proteinu s *p* hodnotou rovnající se 0,053284.

5.2.2.2 Funkční studie varianty GLUT9L LGL

Dalším motivem je méně častý dileucinový motiv LGL (12LGL14), který obsahuje mimo dva leuciny i hydrofobní glycin uprostřed tohoto motivu. I tento vytipovaný motiv se nachází v rozdílném N-konci dlouhé izoformy proteinu GLUT9 na pozici 12-14. Jednotlivé naměřené a vypočtené hodnoty jsou vypsány do *Tabulky 31*, relativní hodnoty v procentech pak v *Tabulce 32*. Z uvedených tabulek vycházejí obdobné grafy jako u předešlého dileucinového motivu a to *Graf 10* pro jednotlivá opakování a také *Graf 11* pro relativní transport urátu v procentech.

	Počet opakování	CPM	DPM	Množství proteinu (µg/mL)	Uptake (pmol/mg.min)	S.D.
NK	1.	529	1186,4	204	2,2139	0,2193
		581	1308,3			
		460	1024,6			
	2.	1110	1193,4	372,3	1,23598	0,04918
		1165	1254,4			
		1060	1137,9			
	3.	1741	3217,8	382,5	3,4088	0,19208
		1779	3288,8			
		1974	3653,4			
GLUT9L	1.	308	668,2	248,5	0,87179	0,19748
		178	363,4			
		218	457,2			
	2.	601	628,8	401	0,55193	0,00639
		534	554,5			
		522	541,2			
	3.	469	839,5	368	0,78634	0,03228
		382	676,8			
		415	738,5			
GLUT9L LGL	1.	385	848,7	302	1,13282	0,03757
		415	919,1			
		406	898			
	2.	455	466,9	309,5	0,65256	0,5347
		548	570,1			
		518	536,8			
	3.	637	1153,6	298	1,44451	0,0459
		599	1082,6			

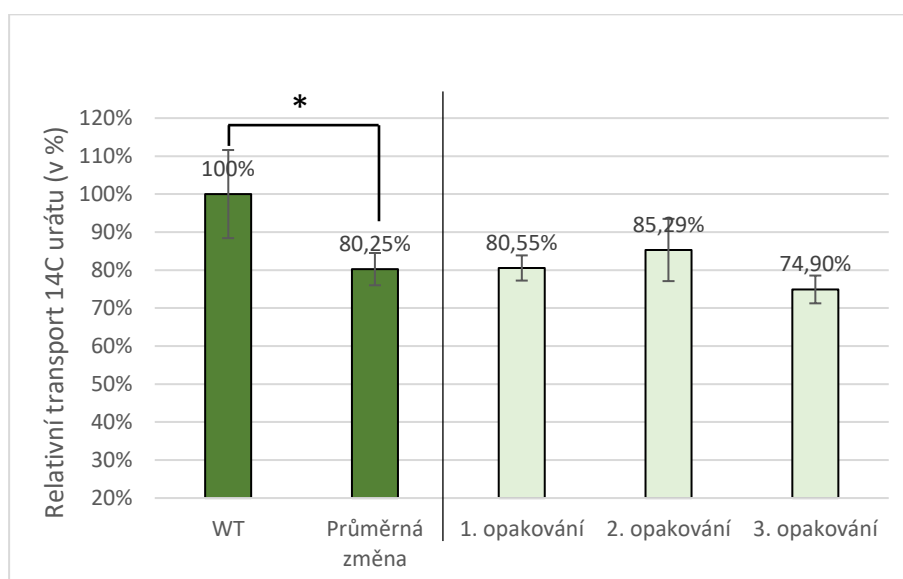
Tabulka 31: Výsledky funkčních studií aktivity ¹⁴C značeného urátu pro GLUT9L pro delecí motivu LGL v HBSS inkubačním pufre.



Graf 10: Přenos urátu v jednotlivých opakování pro GLUT9L a pro GLUT9L s deletovaným motivem LGL (12LGL14); Inkubace 20 min v 30 μ M urátu; jednotky uvedeny v pmol/mg.min; směrodatné odchylky vypočítány z triplikátů v každém opakování.

	GLUT9L	Průměrná změna u GLUT9L LGL	První opakování	Druhé opakování	Třetí opakování	Studentův t.test
Procenta	100%	80,25%	80,55%	85,29%	74,90%	* $p=0,011165$ (WT:Průměrná změna)
Směrodatná odchylka	12%	4%	3%	8%	4%	

Tabulka 32: Relativní hodnoty transportu 14 C urátu v % pro delecí dileucinového motivu LGL, kde WT=100 %; uvedena také průměrná změna ze všech opakování a proveden Studentův t.test; uvedeny i jednotlivá opakování a vypočítané směrodatné odchylky.



Graf 11 : Relativní procentuální změna uptake urátu v průměru a v jednotlivých nezávislých opakování oproti WT proteinu (WT=100 %) pro GLUT9L s deletovaným motivem LGL (12LGL14); uvedena je průměrná změna v % ze všech opakování i údaje pro jednotlivá opakování, $n=3$; * $p \leq 5\%$, ** $p \leq 1\%$, *** $p \leq 0,1\%$.

Po vytvoření mutované varianty s delecí dileucinového motivu LGL bylo v našich experimentech naměřeno průměrné snížení transportní funkce ve směru efluxu na 80,65 % vůči WT variantě

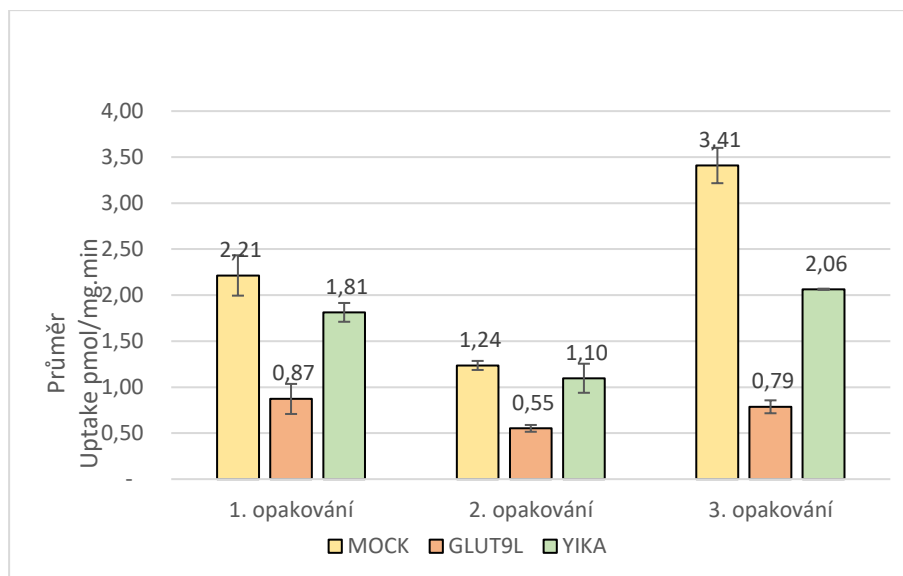
proteinu (resp. snížení transportní funkce o 11,75 %) s *p* hodnotou 0,011165 označenou v *Grafu 11* jako *.

5.2.2.3 Funkční studie varianty GLUT9L YIKA

Jako poslední potencionální lokalizační motiv byla studována delece tyrosinového motivu YIKA (84YIKA87) nacházející se v těsné blízkosti odlišného N-konce dlouhé varianty. Všechny experimenty a opakování probíhaly za shodných podmínek jako u předchozích studií. *Tabulka 33* zobrazuje naměřené a vypočtené hodnoty jednotlivých opakování, které jsou zobrazeny v *Grafu 12*. *Tabulka 34* obsahuje vypočtené relativní hodnoty transportu urátu v procentech. Tyto hodnoty jsou vyneseny do *Grafu 13*.

	Počet opakování	CPM	DPM	Množství proteinu (µg/mL)	Uptake (pmol/mg.min)	S.D.
NK	1.	529	1186,4	204	2,2139	0,2193
		581	1308,3			
		460	1024,6			
	2.	1110	1193,4	372,3	1,2359	0,04918
		1165	1254,4			
		1060	1137,9			
	3.	1741	3217,8	382,5	3,4088	0,19208
		1779	3288,8			
		1974	3653,4			
GLUT9L	1.	308	668,2	248,5	0,87179	0,19748
		178	363,4			
		218	457,2			
	2.	601	628,8	401	0,55193	0,00639
		534	554,5			
		522	541,2			
	3.	469	839,5	368	0,78634	0,03933
		382	676,8			
		415	738,5			
GLUT9L YIKA	1.	569	1280,2	264,75	1,81273	0,12786
		510	1141,8			
		585	1317,7			
	2.	817	865,1	342	1,09661	0,158
		832	885			
		1091	1172,3			
	3.	670	1215,3	226	2,06396	0,00637
		666	1207,8			

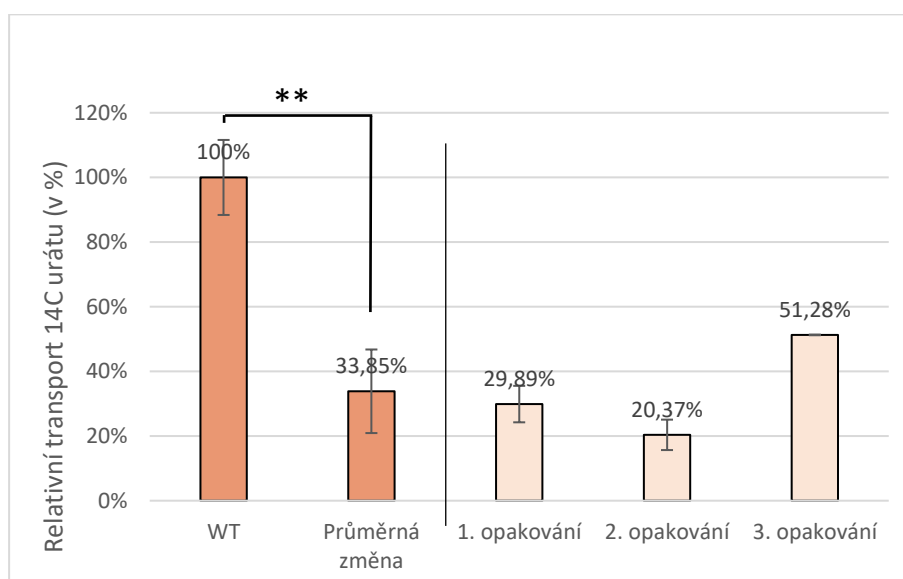
Tabulka 33: Výsledky funkčních studií aktivity ¹⁴C značeného urátu pro GLUT9L pro deleci motivu YIKA v HBSS inkubačním pufu.



Graf 12: Přenos urátu v jednotlivých opakování pro GLUT9L a pro GLUT9 s deletovaným motivem YIKA; inkubace 20 min v 30 μ M urátu; jednotky uvedeny v pmol/mg.min; směrodatné odchylky vypočítány z triplicátů v každém opakování.

	GLUT9L	Průměrná změna u GLUT9L V114L	První opakování	Druhé opakování	Třetí opakování	Studentův t.test
Procenta	100%	33,85%	29,89%	20,37%	51,28%	* $p=0,009278$ (WT:Průměrná změna)
Směrodatná odchylka	12%	13%	6%	5%	0,1%	

Tabulka 34: Relativní hodnoty transportu 14 C urátu v procentech ve variantě s delecí tyrosinového motivu YIKA, kde WT=100 %; uvedena také průměrná změna ze všech opakování a proveden Studentův t.test; uvedeny i jednotlivá opakování a vypočítané směrodatné odchylky.



Graf 13: Relativní procentuální změna uptake urátu v průměru a v jednotlivých nezávislých opakováních oproti WT proteinu (WT=100 %) pro GLUT9L s deletovaným motivem YIKA (84YIKA87); uvedena je průměrná změna v % ze všech opakování i údaje pro jednotlivá opakování, $n=3$; * $p \leq 5\%$, ** $p \leq 1\%$, *** $p \leq 0,1\%$.

Podle naměřených výsledků největší vliv na změnu schopnosti přenášet urát z buněk ven měla delece motivu YIKA (84YIKA87). Podle našich výsledků na modelu buněčné linie HEK293A došlo po

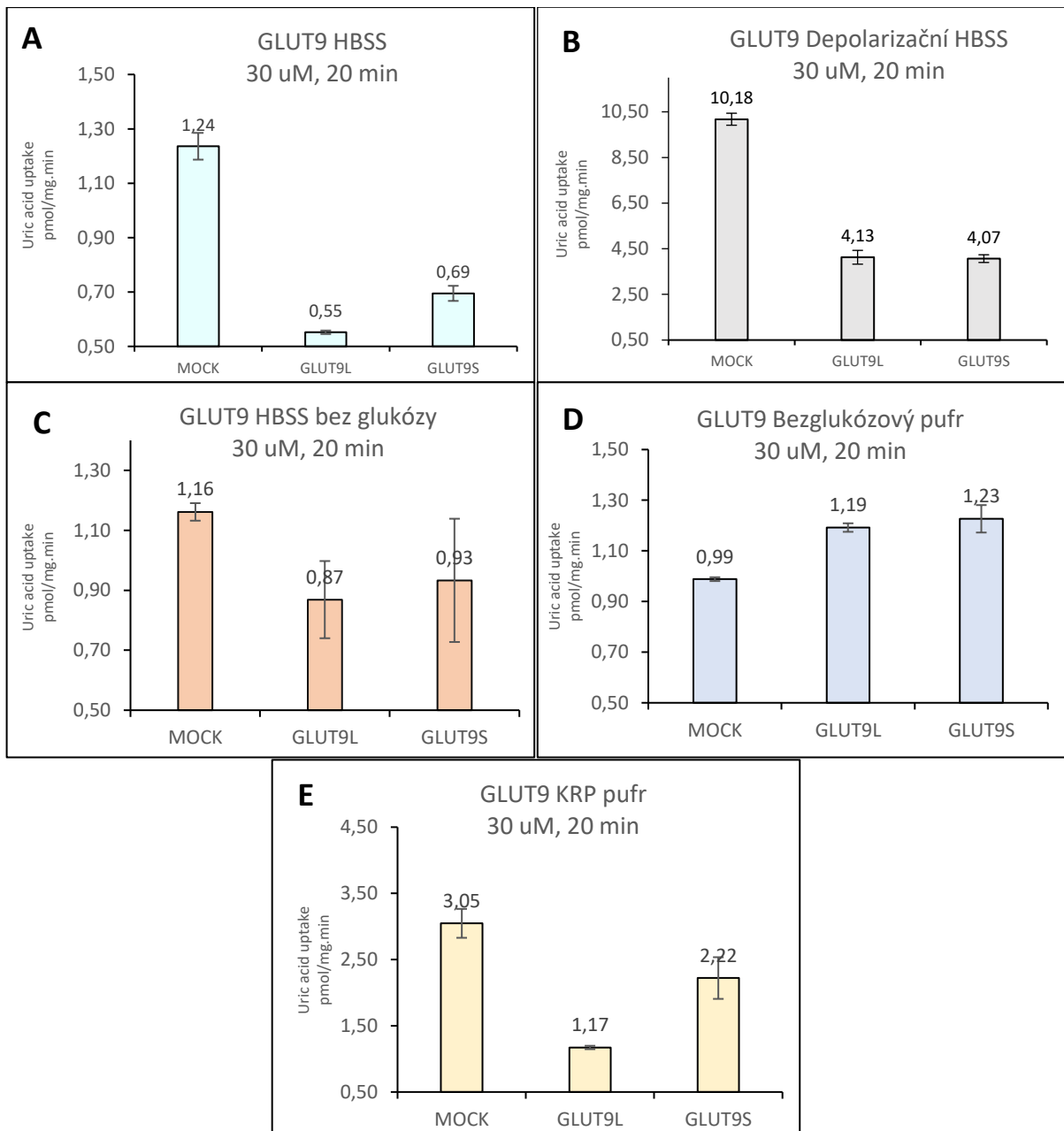
deleci motivu YIKA ke snížení transportní funkce dlouhé varianty proteinu GLUT9 o 66,15 %, respektive na 33,85 % původní funkční schopnosti WT varianty proteinu GLUT9L. *P* hodnota pro toto snížení byla vypočtena na 0,009278 a v *Grafu 13* označena jako **.

5.2.3 Funkční studie WT GLUT9L a GLUT9S v pufru bez přítomnosti glukózy, KRP pufru a bezglukózovém pufru

Funkční studie pro znázornění chování obou izoform proteinu GLUT9 v různých inkubačních pufrách s odlišným složením především přítomností a nepřítomností glukózy byla pro každý z inkubačních pufrů provedena jen jednou ($n=1$). Bylo testováno 5 odlišných inkubačních pufrů: HBSS (ve kterém probíhala i většina předchozích funkčních studií), depolarizační HBSS, HBSS bez glukózy, KRP pufr a bezglukózový pufr. Složení jednotlivých pufrů je uvedeno v kapitole 3.2., výsledky měření jsou uvedeny v *Tabulce 35* a vyneseny do *Grafu 14*.

Použitý inkubační pufr		CPM	DPM	Množství proteinu (µg/mL)	Uptake (pmol/mg.min)	S.D.
HBSS pufr	NK	1110	1193,4	372,3	1,23598	0,04918
		1165	1254,4			
		1060	1137,9			
	GLUT9L	601	628,8	401	0,55193	0,00639
		534	554,5			
		522	541,2			
	GLUT9S	522	596,7	328,5	0,69	0,02776
		572	620,0			
		593	562,3			
HBSS depolarizační pufr	NK	7848	11,0848	301	10,1764	0,26315
		6702	9,4591			
		7073	9,9854			
	GLUT9L	2630	2879,2	4,1276	4,1276	0,30192
		3026	3318,3			
		3117	3419,3			
	GLUT9S	3009	3299,5	4,06837	4,0684	0,16997
		3127	3430,4			
		2827	3097,6			
HBSS pufr bez přítomnosti glukózy	NK	872	1228,4	409,75	1,16139	0,0,2924
		906	1277,4			
		854	1202,4			
	GLUT9L	589	819,9	326	0,86881	0,12876
		579	805,4			
		424	581,7			
	GLUT9S	699	978,6	308,3	0,9331	0,20563
		443	609,1			
		474	653,9			
Bezglukózový pufr	NK	938	1088,9	428	0,98815	0,00751
		955	1108,9			
		946	1098,1			
	GLUT9L	504	566,5	261,33	1,18627	0,00792
		805	928,5			
		824	951,4			
	GLUT9S	833	962,2	298,5	1,22655	0,05417
		861	995,9			
		777	894,8			
KRP pufr	NK	3424	4078,5	385	3,04716	0,2183
		2748	3265,5			
		2385	2828,9			
	GLUT9L	961	1116,1	271	1,17217	0,02563
		704	807,0			
		734	843,1			
	GLUT9S	1955	2311,7	351	2,22096	0,31464
		1478	1738,0			
		769	885,2			

Tabulka 35: Výsledky funkčních studií aktivity ^{14}C značeného urátu pro MOCK, GLUT9L a GLUT9S v jednotlivých inkubačních pufrch.



Graf 14: Cytoplazmatická koncentrace urátu v rozdílných inkubačních pufrch pro MOCK, GLUT9L a GLUT9S; A- HBSS pufr; B- Depolarizační HBSS pufr; C- HBSS pufr bez glukózy; D- KRP pufr; E- Bezglukózový pufr; jednotky jsou uvedeny v pmol/mg.min; směrodatné odchylky vypočítány z triplikátů; nad každým sloupcem jsou uvedeny průměrné hodnoty uptake.

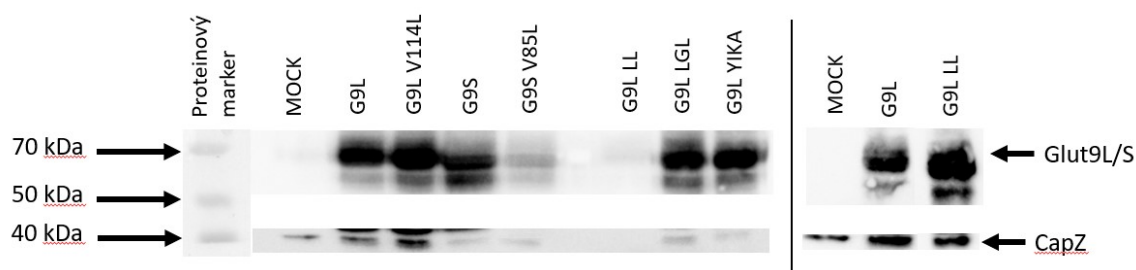
Cytoplazmatická koncentrace urátu oproti kontrole v těchto pufrch byla o 66 % u dlouhé isoformy a o 44 % u krátké isoformy nižší v HBSS pufru (GLUT9L/GLUT9S), o 59,5 % a 60 % nižší (GLUT9L/GLUT9S) v depolarizačním HBSS pufru a o 61,5 % a 27,2 % nižší v KRP pufru než v případě negativních kontrol v těchto pufrch. V HBSS pufru bez glukózy byl pozorován mírný vzrůst transportu oproti negativní netransfekované kontrole u dlouhé varianty proteinu GLUT9L, ale s opět nižší hladinou urátu ve variantě GLUT9S o 29 % nižší než u negativní kontroly. Jedině po inkubaci

buněk v bezglukózovém pufru došlo k uptaku urátu vyššímu u obou izoform proteinu oproti negativní kontrole.

5.3 Western blot

Kontrola přítomnosti a množství transfekovaných proteinů byla mimo jiné zkontrolována pomocí Western blotu: SDS-PAGE proteinové elektroforézy, přenesením na nitrocelulóзовou membránu a jejich snímáním pomocí chemiluminiscence v přístroji ChemiDoc PM od firmy Biorad. Byla provedena kolorimetrická detekce pro zobrazení markeru a chemiluminiscenční detekce pro zobrazení vzorků na membráně.

Jako primární protilátka byla použita protilátka proti tagovací značce na C-konci proteinu mGFP o velikosti 27-30 kDa. Velikost samotného proteinu GLUT9 je pak cca 46 kDa, předpokládaná velikost proteinu s mGFP značkou by tak měla být 73-76 kDa, čemuž odpovídají výsledky zobrazené na výsledných Western blotech. Na Western blotech byl detekován i band o menší molekulové hmotnosti taktéž zobrazený na *Obr.13* odpovídající nejspíše neglykosylované formě proteinu. Na membráně byly detekovány bandy o odpovídající molekulové hmotnosti a jako nanášecí kontrola byl použit CapZ pro β -actin o známé velikosti 43 kDa. *Obr. 13* je rozdělen na 2 části, jelikož při tvorbě několika blotů se nepodařilo mutovanou variantu GLUT9L LL správně přeblotovat na membránu a opakovaně zůstával na akrylamidovém gelu proteinové elektroforézy. Pro tuto variantu byly vytvořeny další Western bloty, jeden z nich je uveden v druhé části *Obr.13*.



Obr.13: Western blot provedený pro MOCK, WT izoformy proteinu (GLUT9L a GLUT9S) a jejich varianty GLUT9L V114L, GLUT9S V85L, GLUT9L LL, GLUT9L LGL a GLUT9L YIKA; nanášeno 15 μ L každého vzorku; jako nanášecí kontrola byl použit CapZ; jako proteinový marker byl použit Spectra multicolor broad range protein marker; detekce monoklonální protilátkou proti mGFP.

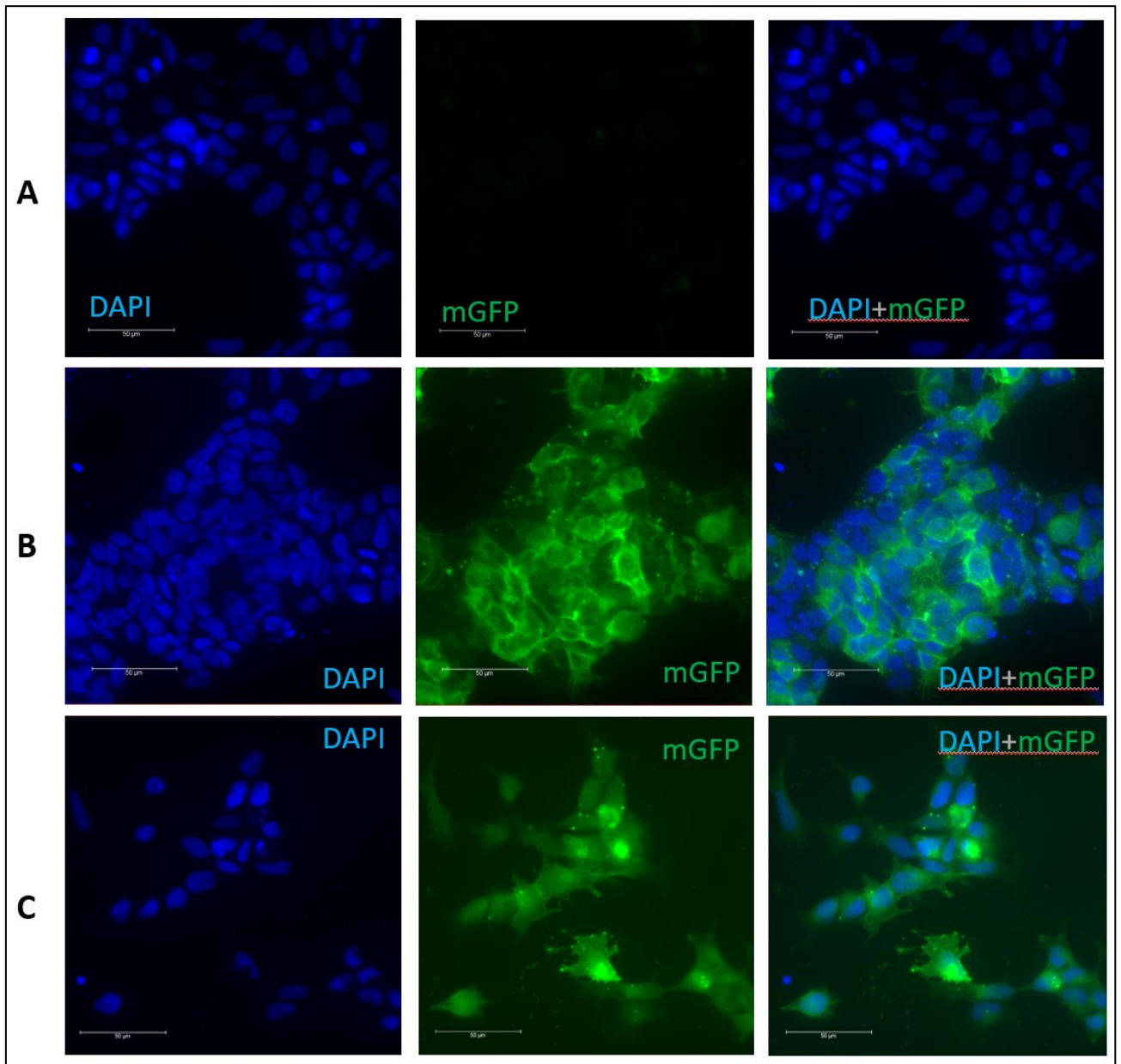
U všech vytvořených variant dané Western bloty potvrzují jejich expresi v buňkách HEK293A. Míra exprese se zdá být obdobná ve WT proteinu a variantách GLUT9L V114L, GLUT9L LL a GLUT9L YIKA. U varianty GLUT9S V85L je tento protein exprimován podle Western blotu v menší míře, méně je ale také exprimován kontrolní CapZ, což značí nejspíše obecně horší kvalitu připravených vzorků, které obsahují nižší celkovou koncentraci proteinu v buňkách či horší kvalitu a počet buněk samotných. Již zmíněná varianty GLUT9L LL na zobrazeném western blotu nebyla opakovaně správně

přeblokována, proto byl vytvořen jiný Western blot s odlišnou pozicí na gelu a následně membráně, kdy už k přeblokování došlo.

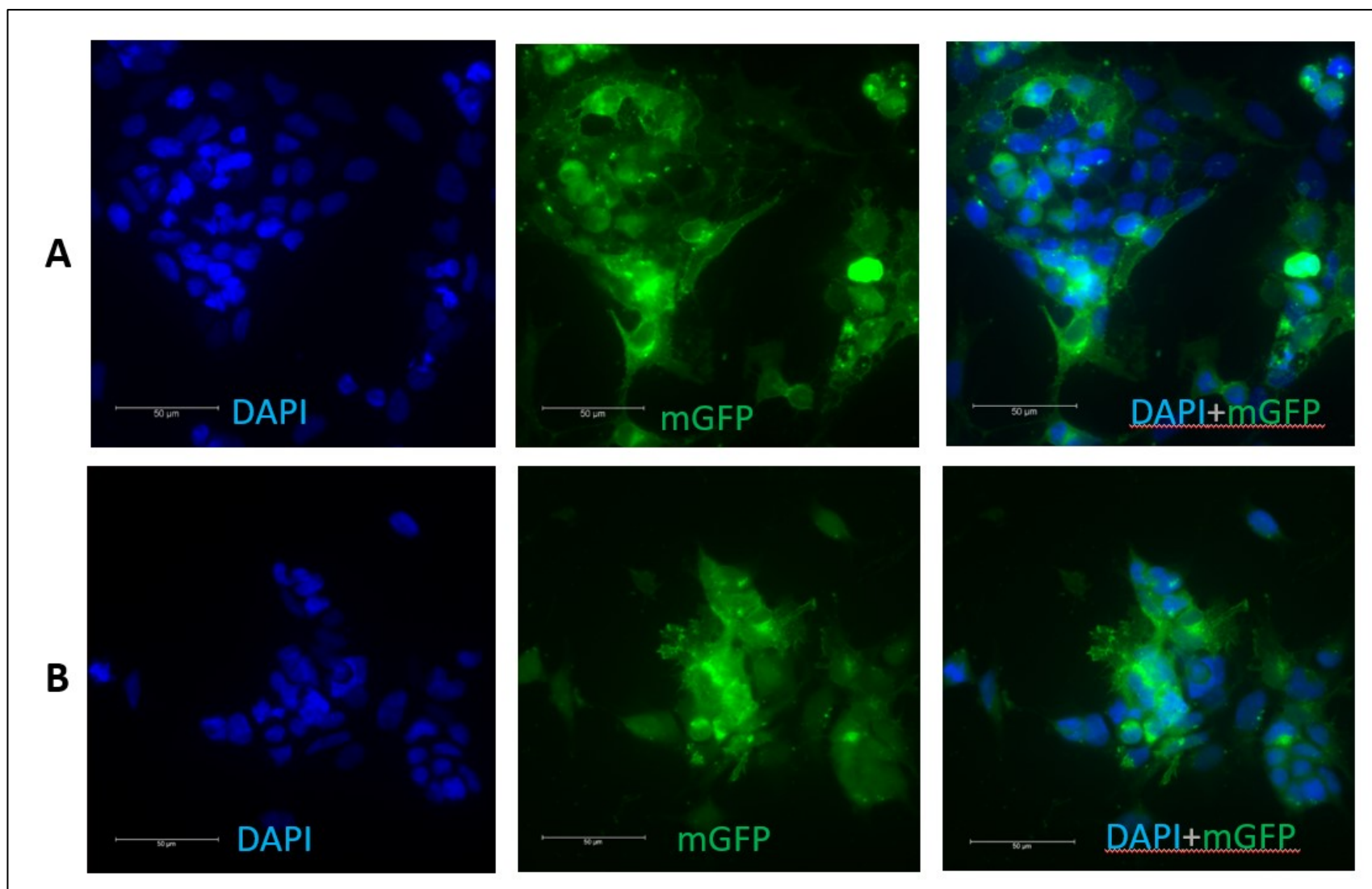
5.4 Fluorescenční mikroskopie

Pro další potvrzení transfekce buněk a exprese WT i mutovaných forem proteinů byly vytvořeny mikroskopické preparáty. Na tyto preparáty byly buňky transientně transfekovány pomocí PEI jednotlivými izoformami a variantami. Na preparátech byla také barvena jádra jednotlivých buněk pomocí DAPI (4',6-diamino-2-fenylindol), zobrazující se na preparátech modře. Jelikož se nám podařilo překlónovat gen pro obě izoformy proteinu GLUT9 do plazmidu s mGFP značkou, byly transfekované buňky lehce rozlišitelné pomocí této zeleně se zobrazující mGFP značky. Negativní kontrola (MOCK) a WT formy proteinu jsou zobrazeny na *Obr.14*, jednotlivé zkoumané varianty pak na *Obr.15-18*.

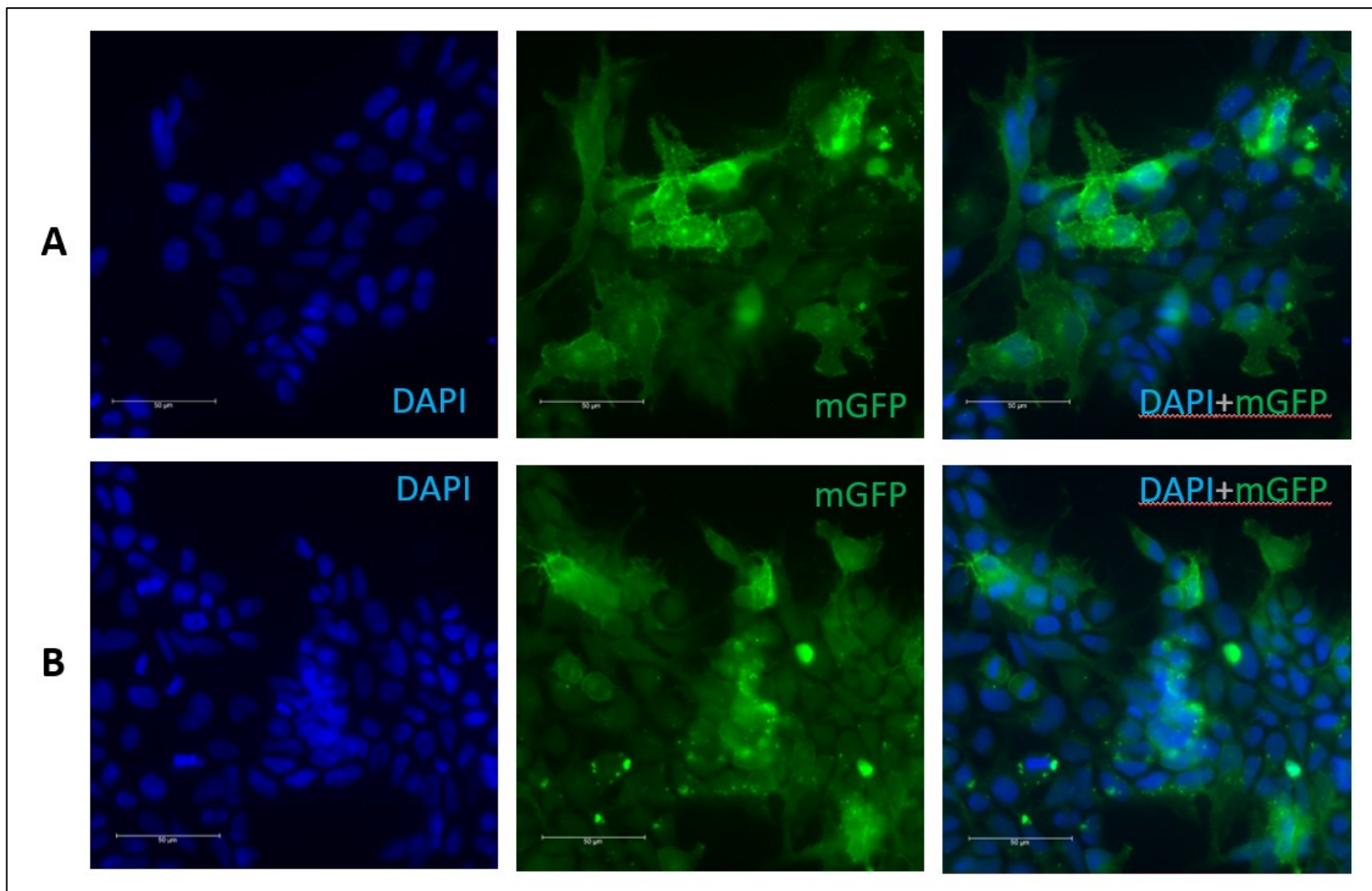
U WT i mutovaných variant se nám těmito mikroskopickými preparáty podařilo potvrdit jejich alespoň částečnou lokalizaci na membráně. U variant s deletovanými vytipovanými lokalizačními motivy se membránový signál zdál být slabší oproti WT variantám proteinů (především pak varianta delece motivu YIKA) a s viditelnějšími shluky signálů v cytoplazmě buněk především u varianty s delecí motivu LL. Proto se postoupilo dál k vytvoření dalších mikroskopických preparátů společně s barvením protilátkami proti markerům časných endozomů a lysozomů uvedeno v Kapitole 5.4.1.



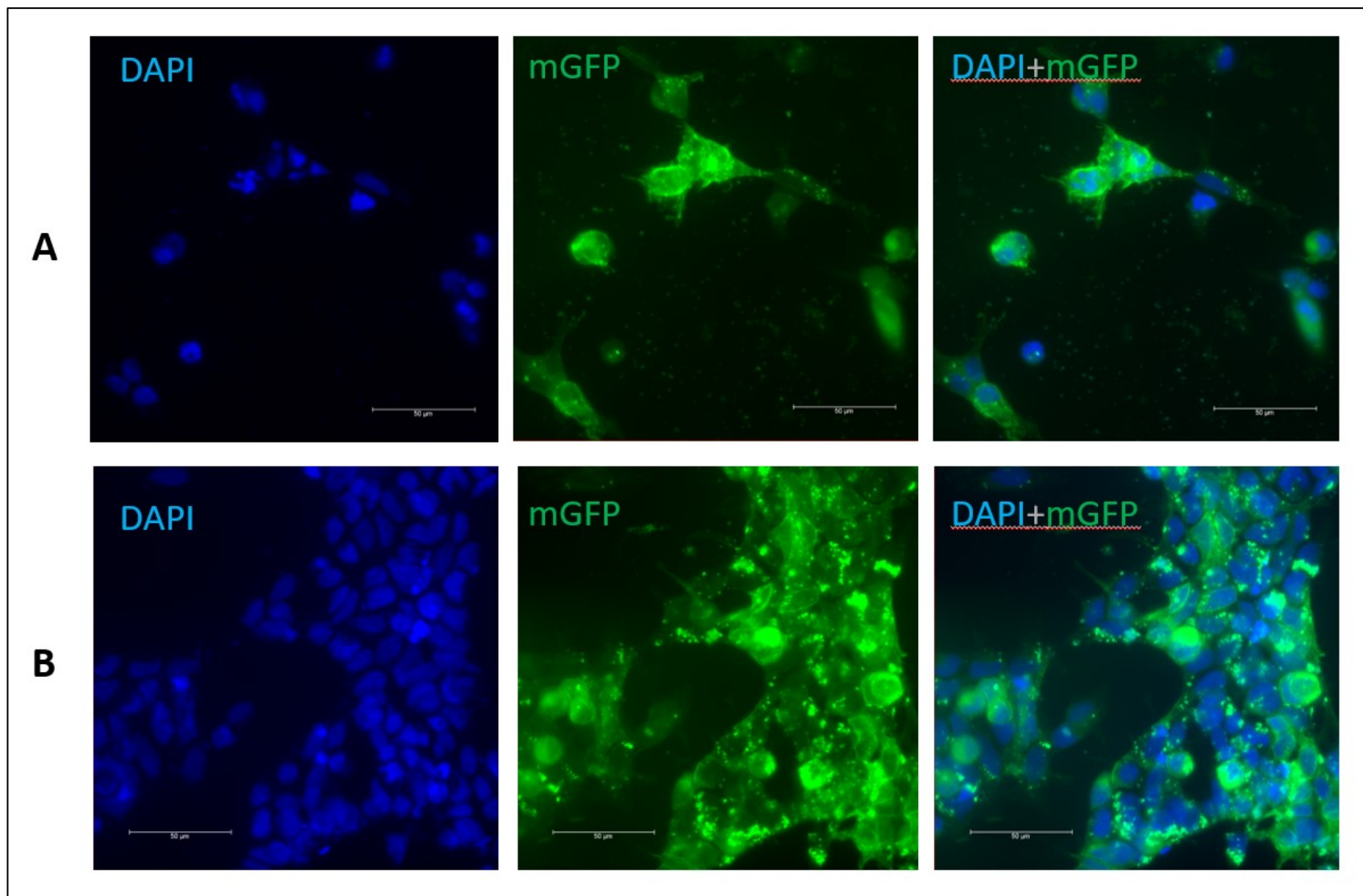
Obr.14: Mikroskopické preparáty 48 h po transientní transfekci pomocí PEI pro NK/MOCK (A), WT GLUT9L (B) a WT GLUT9S (C); jádra buněk jsou značena modře pomocí DAPI, GLUT9 značen zeleně díky mGFP značce proteinu; měřítko značí 50 µm.



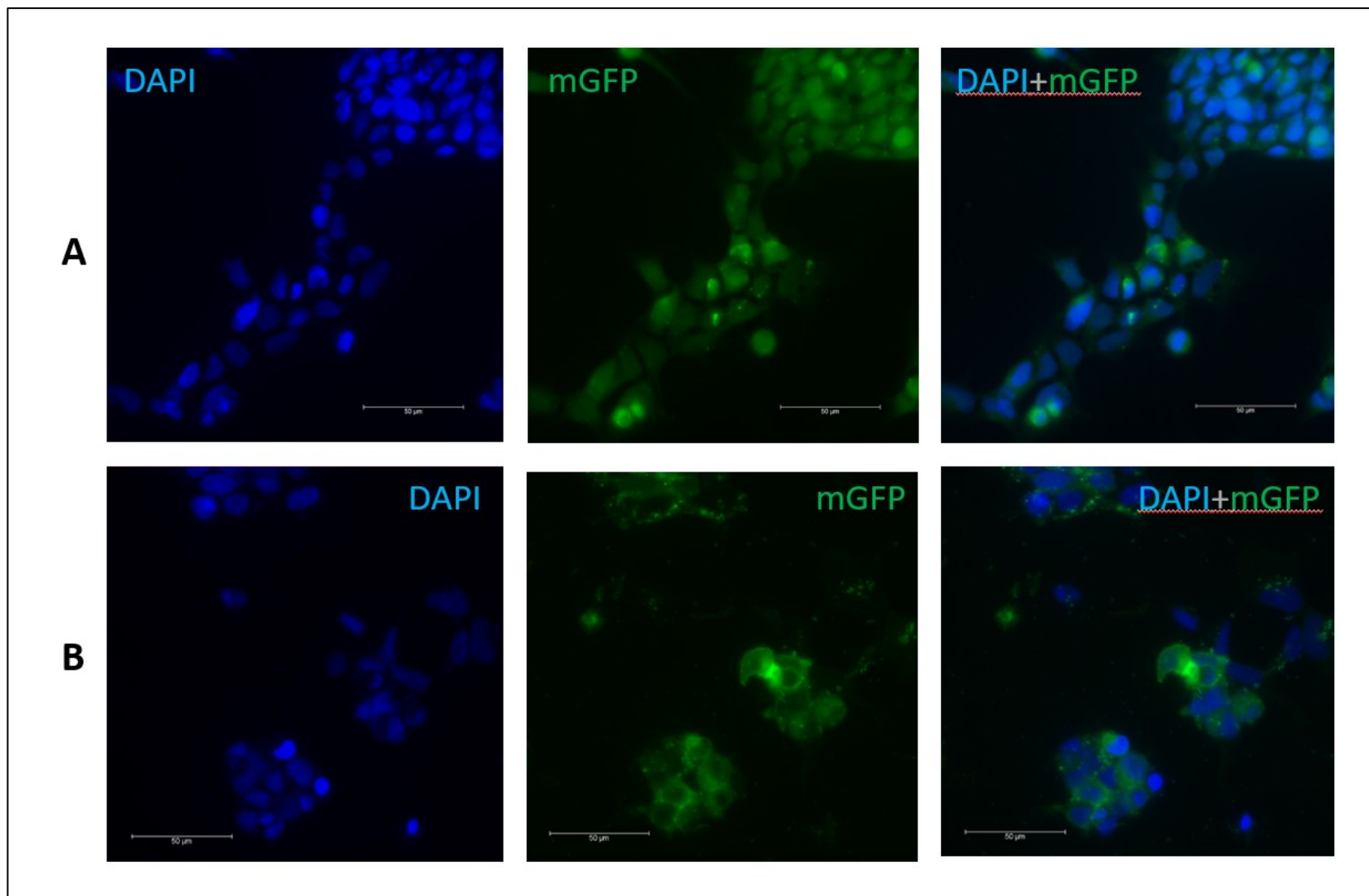
Obr.15: Mikroskopické preparáty 48 h po transientní transfekci pomocí PEI pro GLUT9L V114L (A) a GLUT9S V114L/V85L (B); jádra buněk jsou značena modře pomocí DAPI, GLUT9 značen zeleně díky mGFP značce proteinu; měřítko značí 50 μm.



Obr.16: Mikroskopické preparáty 48 h po transientní transfekci pomocí PEI pro 2 mikroskopické vzorky (A+B) GLUT9L LL; jádra buněk jsou značena modře pomocí DAPI, GLUT9 značen zeleně díky mGFP značce proteinu; měřítko značí 50 μm.



Obr.17: Mikroskopické preparáty 48 h po transientní transfekci pomocí PEI pro 2 mikroskopické vzorky (A+B) GLUT9L LGL; jádra buněk jsou značena modře pomocí DAPI, GLUT9 značen zeleně díky mGFP značce proteinu; měřítko značí 50 μm.

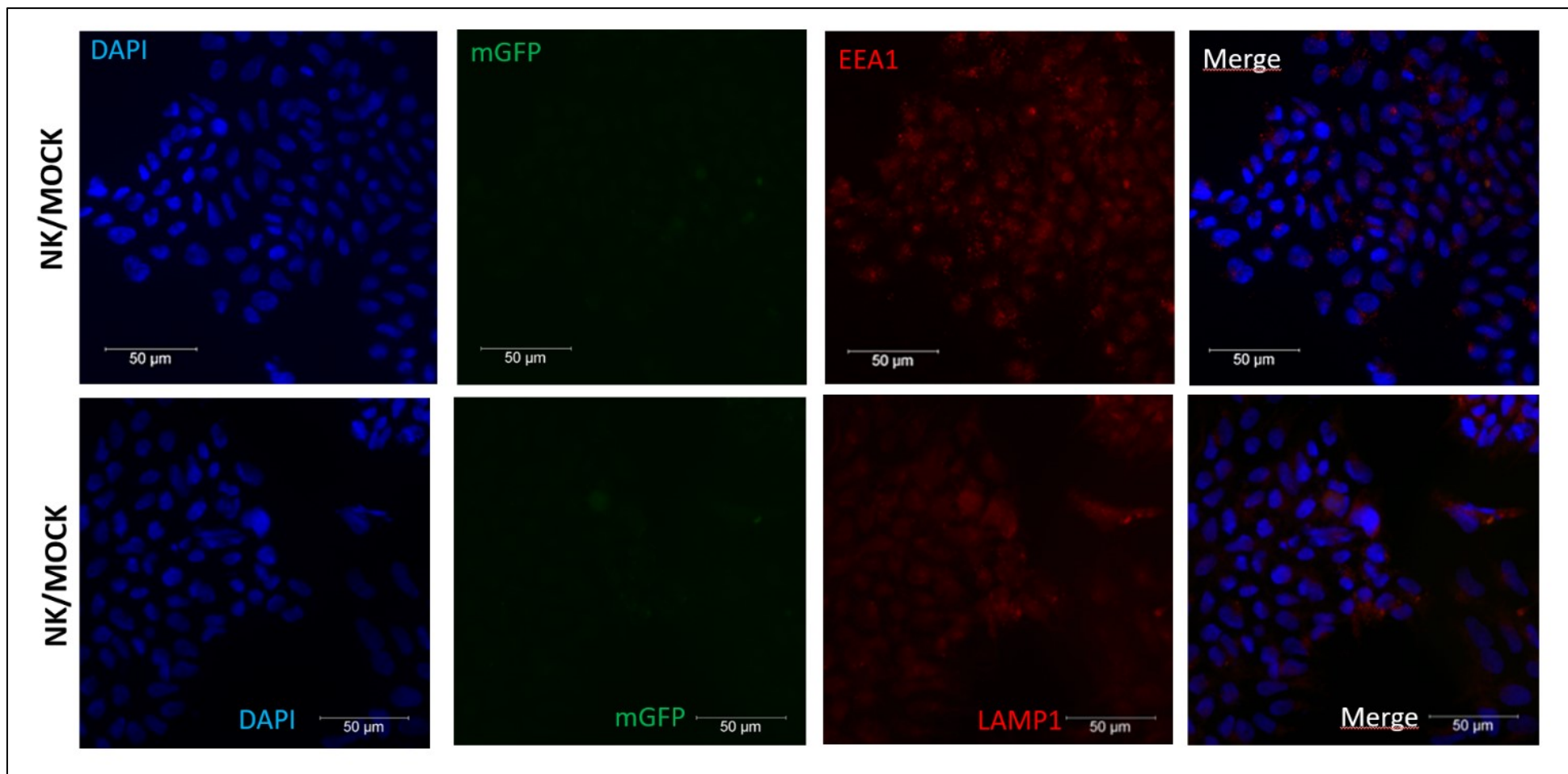


Obr.18: Mikroskopické preparáty 48 h po transientní transfekci pomocí PEI pro 2 mikroskopické vzorky (A+B) GLUT9L Y1KA; jádra buněk jsou značena modře pomocí DAPI, GLUT9 značen zeleně díky mGFP značce proteinu; měřítko značí 50 μm.

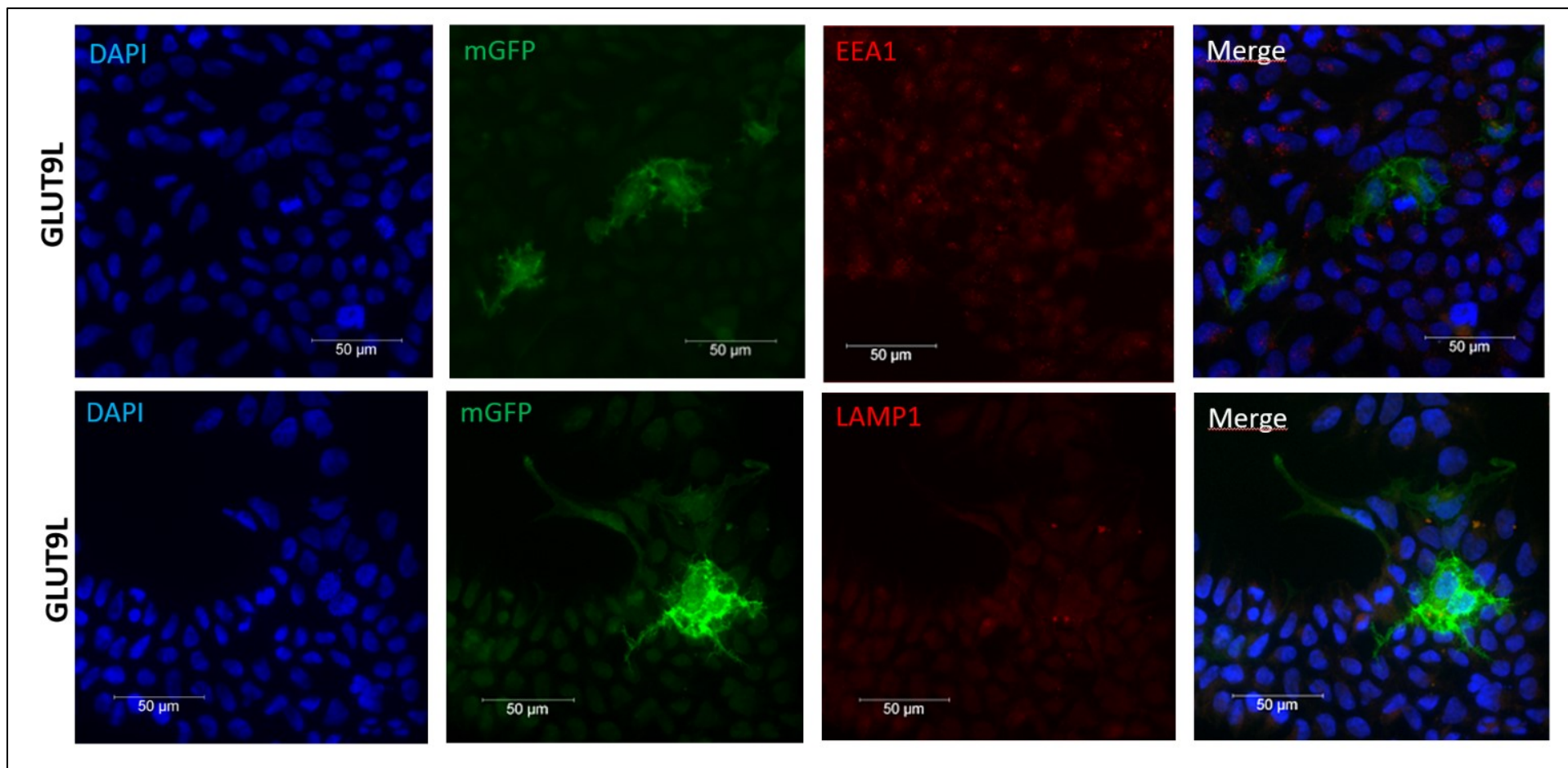
5.4.1 Mikroskopie vytipovaných lokalizačních motivů v kolokalizaci s časnými endozomy a lysozomy

Jak je již zmíněno v předešlé kapitole, u preparátů s deletovanými vytipovanými lokalizačními sekvencemi pro bazolaterální lokalizaci dlouhé varianty proteinu se membránový signál zdál slabší oproti WT variantám na membráně buněk a v cytoplazmě těchto buněk se nacházelo větší množství shluků signálu, což by mohlo svědčit o jejich akumulaci uvnitř cytoplazmy buňky a kolokalizaci například s endozomy a lysozomy při nefunkčnosti jednoho či jednoho z více lokalizačních motivů.

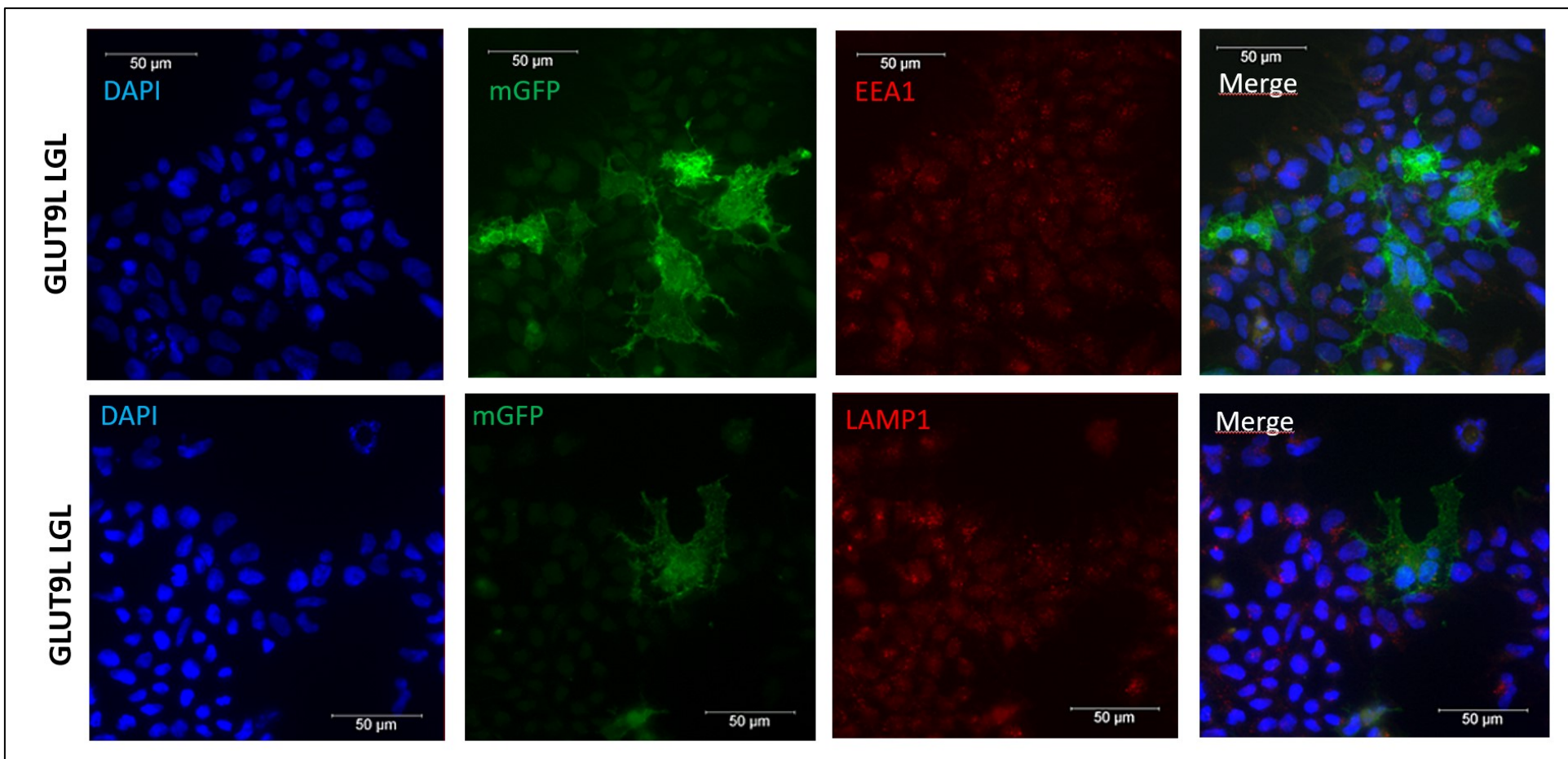
Byly proto vytvořeny nové preparáty s transientně transfekovanými buňkami divokými variantami proteinu a s variantami s deletovanými motivy GLUT9L LL, GLUT9L LGL a GLUT9L YIKA. Tyto preparáty byly dále imunohistochemicky barveny s primárními protilátkami proti markerům časných endozomů (EEA1) a markerům lysozomů (LAMP1). Pro vizualizaci těchto primárních protilátek byly nakonec použity příslušné sekundární protilátky s Alexa Fluor 594, které jsme detekovali červeně. Na následujících fotografiích jsou zobrazeny vytvořené preparáty pro MOCK (*Obr.19*), GLUT9L (*Obr.20*), GLUT9L LGL (*Obr. 21*), GLUT9L LL (*Obr.22*) a GLUT9L YIKA (*Obr.23*). U každé varianty je zde zobrazen preparát s obarvenými jádry pomocí DAPI (modře), mGFP signálem pro GLUT9 (zeleně), markerem časných endozomů či lysozomů (červeně) a jako „Merge“ je označeno spojení jednotlivých kanálů dohromady. Z takto připravených preparátů, i po optimalizaci jednotlivých kroků, nemohla být potvrzena kolokalizace signálu s časnými endozomy nebo lysozomy, což je blíže diskutováno v Kapitole 6.2.



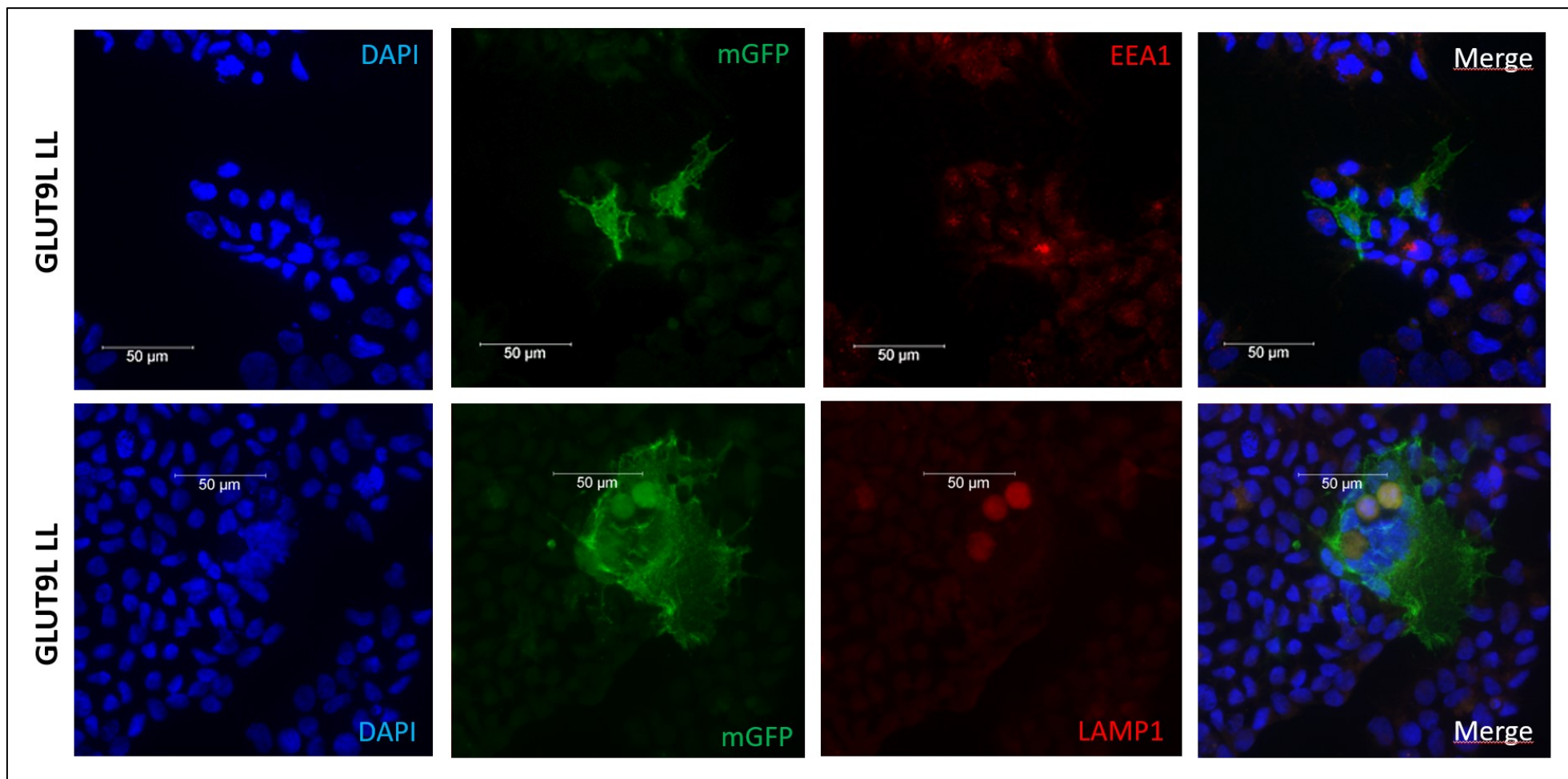
Obr.19: Mikroskopické preparáty fixované 4% formaldehydem 48h po transfekci buněčné linie HEK293A pro NK/MOCK; modře značeno DAPI, GLUT9 značen zeleně díky mGFP značce proteinu, červeně jsou obarveny markery časných endozomů (EEA1) nebo lysozomů (LAMP1); fotografie označena „Merge“ značí spojení jednotlivých kanálů dohromady; měřítko značí 50 µm.



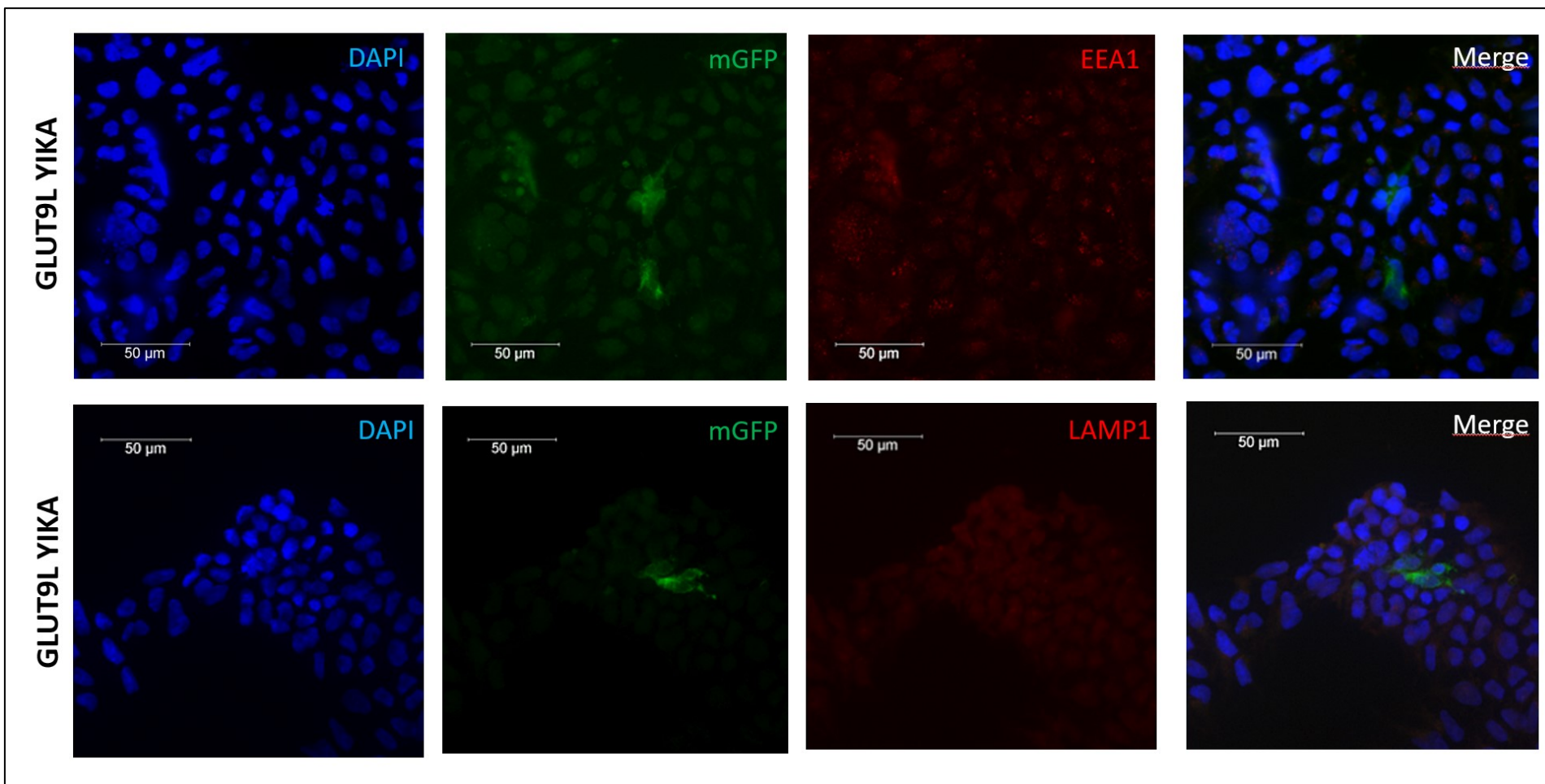
Obr.20: Mikroskopické preparáty fixovány 4% formaldehydem 48h po transfekci buněčné linie HEK293A pro GLUT9L; modře značeno DAPI, GLUT9 značen zeleně díky mGFP značce proteinu, červeně jsou obarveny markery časných endozomů (EEA1) nebo lysozomů (LAMP1); fotografie označena „Merge“ značí spojení jednotlivých kanálů dohromady; měřítko značí 50 μm.



Obr.21: Mikroskopické preparáty fixovány 4% formaldehydem 48h po transfekci buněčné linie HEK293A pro GLUT9L LGL; modře značeno DAPI, GLUT9L značen zeleně díky mGFP značce proteinu, červeně jsou obarveny markery časných endozomů (EEA1) nebo lysozomů (LAMP1); fotografie označena „Merge“ značí spojení jednotlivých kanálů dohromady; měřítko značí 50 µm.



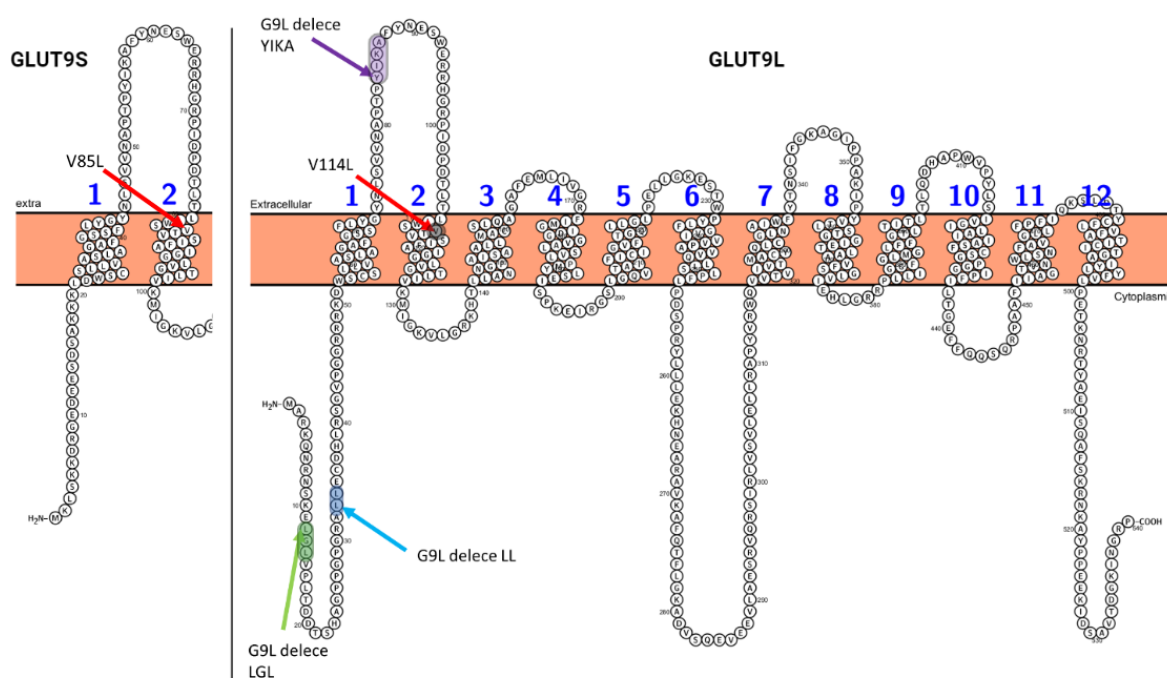
Obr.22: Mikroskopické preparáty fixovány 4% formaldehydem 48h po transfekci buněčné linie HEK293A pro GLUT9L LL; modře značeno DAPI, GLUT9 značen zeleně díky mGFP značce proteinu, červeně jsou obarveny markery časných endozomů (EEA1) nebo lyzozomů (LAMP1); fotografie označena „Merge“ značí spojení jednotlivých kanálů dohromady; měřítko značí 50 μm.



Obr. 23: Mikroskopické preparáty fixovány 4% formaldehydem 48h po transfekci buněčné linie HEK293A pro GLUT9L YIKA; modře značeno DAPI, GLUT9 značen zeleně díky mGFP značce proteinu, červeně jsou obarveny markery časných endozomů (EEA1) nebo lysozomů (LAMP1); fotografie označena „Merge“ značí spojení jednotlivých kanálů dohromady; měřítko značí 50 µm.

6 Diskuze

V této diplomové práci byl analyzován vliv alelické varianty V114L u dlouhé i krátké izoformy (u krátké varianty na pozici V85L) urátového transportéru GLUT9 na přenos urátu a také vliv delece predikovaných lokalizačních sekvencí LL (33LL34), LGL (12LGL14) a YIKA (84YIKA87) tohoto proteinu u dlouhé varianty proteinu GLUT9L. Pozice těchto zkoumaných variant v celé struktuře proteinu je znázorněna na Obr. 24. V neposlední řadě byla testována potencionální změna směru a schopnosti přenosu urátu obou divokých variant tohoto proteinu v inkubačních pufrch s odlišným složením především hexózy D-glukózy a poměrech jednotlivých složek pufrů.



Obr.24: Izofomy proteinu GLUT9 (GLUT9L a GLUT9S) s vyznačenou alelickou variantou V114L/V85L a u GLUT9L vyznačenými deletovanými motivy LL, LGL a YIKA.

Původní gen *SLC2A9* pro protein GLUT9 byl součástí plazmidu pGEM-T-EASY, který byl používán pro předchozí funkční studie v naší laboratoři prováděné v oocytech *Xenopus leavis*, který neobsahuje promotor pro savčí buňky a také neobsahuje fluorescentní značku. Gen *SLC2A9* pro studie v použité lidské buněčné linii HEK293A musel být pro účely této diplomové práce zaklonován do vybraného plazmidu pLenti-C-mGFP, který je fluorescenčně značen pomocí mGFP značky, což výrazně usnadnilo další práci s tímto proteinem, jelikož mohl být již 2 dny po transienční transfekci bezpečně detekován jako zelený fluorescenční signál ve fluorescenčním mikroskopu.

Všechny experimenty této diplomové práce byly prováděny na modelu buněčné linie HEK293A, immortalizované buněčné linie odvozené z embryonálních ledvin člověka. Tato linie byla vybrána podle několika kritérií. Buněčná linie HEK293A je nejčastěji používanou buněčnou linií pro funkční studie s radioaktivně značenými substráty a bylo na nich provedeno i několik funkčních studií přímo s ¹⁴C

radioaktivně značeným urátem obdobně jako v této diplomové práci (Caulfield *et al.*, 2008; Mandal and Mount, 2019; Otani *et al.*, 2020). Jedná se o ustálený buněčný model pro funkční studie, který byl použit i v několika dalších pracích v naší laboratoři. Buňky linie HEK293A jsou poměrně snadno transfekovatelné, i když se jedná o formu přisedlých HEK293A oproti částečně suspenzní kultuře HEK293T. Zkoumaný GLUT9 je u člověka podstatný především kvůli transportu urátu v ledvinách, čemuž organismálně i tkáňově tato buněčná linie také odpovídá. Podle databáze „The human protein atlas“ se v buněčné linii HEK293A GLUT9 nachází ve velmi slabé míře i endogenně, ale to především na úrovni mRNA (Karmali *et al.*, 2010). To ovšem nemusí mít žádný vliv na výsledky funkčních studií, neboť v nich srovnáváme plazmidem netransfekovanou negativní kontrolu (MOCK) a jednotlivé transfekované varianty. Obdobně jako ve studii od Caulfield *et al.* dochází k mnohonásobně rozdílným mírám efluxu, respektive influxu než v kontrolních buňkách i v našich měřeních (Caulfield *et al.*, 2008). Limitací části týkající se vytipovaných lokalizačních motivů může být výběr právě této buněčné linie, jelikož se jedná o buňky nepolarizované, i když v těchto buňkách také probíhá odlišné třídění membránově odlišně lokalizovaných proteinů polarizovaných buněk, zvláště pokud se jedná o buňky embryonální (Müsch *et al.*, 1996; Keller *et al.*, 2001), což je blíže diskutováno v Kapitole 6.2 Nejvhodnějším modelem by byly buňky polarizované ledvinové, kupříkladu buněčná linie MDCK, imortalizovaná buněčná linie získaná z epitelu psa domácího (*Canis lupus familiaris*) plemene kokršpaněla. Jedná se o nejpoužívanější z linií polarizovaných buněk pro výzkum epitelu jako takového, těsných spojů a asymetrického rozložení proteinů na membránách apikálních a bazolaterálních (Cereijido *et al.*, 1978; Gonzalez-Mariscal *et al.*, 1985). Linií MDCK lze využít pro expresi membránových proteinů a studium jejich funkce či lokalizace (Kimura *et al.*, 2014). Mimo obtížný a náročný růst a úpravu této buněčné linie je její velkou nevýhodou i velmi obtížná transfekce. I po vyzkoušení různých transfekčních metod čítajících lipofekci pomocí PEI, elektroporaci v kyvetě, elektroporaci pomocí nástavce za rozdílných podmínek elektrických pulsů a lipofekci látkou Lipofectamin 3000 vše za vyzkoušení různých podmínek transfekce nebylo v našich podmínkách dosaženo uspokojivé míry transfekce těchto buněk, proto bylo od dalších experimentů na této buněčné linii odstoupeno. Dalším důvodem, proč jsme se rozhodli využít linie HEK293A místo epiteliální linie MDCK, je fakt, že linie HEK293A je lidská, čímž jsme se vyhnuli případnému experimentálnímu artefaktu způsobenému exogenní expresí lidského proteinu v psích buňkách.

Většina předchozích funkčních studií pro funkci urátových transportérů i samotného proteinu GLUT9 využívala model oocytů *Xenopus laevis*, do kterých byla mikromanipulací vpravena cDNA pro daný protein i případné mutované varianty proteinu a byla na nich posléze provedena funkční studie s ¹⁴C urátem či jiným substrátem (Baumann *et al.*, 2019). Pokud šlo o studie přenosu urátu směrem do buněk, resp. oocytů byly tyto oocyty v inkubačním pufru s urátem jen inkubovány. Pokud mělo

dojít ke studiím transportéru GLUT9 ve směru přenosu urátu z buněk ven, musela této studii předcházet mikroinjikace i samotného urátu do nitra oocytů (*trans* stimulace) (Witkowska *et al.*, 2012). Na buněčných liniích samotných bylo zatím provedeno mnohem méně studií a jednalo se zatím jen o studie přenosu z okolního prostředí do cytoplazmy (Caulfield *et al.*, 2008; Mandal and Mount, 2019; Otani *et al.*, 2020). Pro funkční studie lidských transportérů se zdají být vhodnějším modelem lidské buněčné linie, které blíže odráží reálné fyziologické prostředí buněk a nejedná se o zcela jiný expresní model jako v případě žabích oocytů. Oocyty jsou inkubovány v termostatech při teplotě odpovídající tělesné teplotě žab, 16-18°C oproti kultivaci lidských HEK293A buněk, které jsou kultivovány v inkubátoru při 37°C v 5,0% CO₂ více odpovídajícím fyziologickému prostředí člověka. V odlišné teplotě a odlišných podmínkách může být změněna i samotná kinetika transportu substrátu a ovlivněna jeho funkce, což je mezi jednotlivými studiemi bohužel těžko porovnatelné, protože jsou prováděny za rozdílných podmínek (Anzai *et al.*, 2008; Caulfield *et al.*, 2008; Witkowska *et al.*, 2012; Baumann *et al.*, 2019). U žabího modelu se také více projevuje rozptyl ve kvalitě oocytů mezi jednotlivými žábami, naopak u buněčné linie jsou buňky rozmrazeny z původní stejné pasáže, ze které jsou prováděna jednotlivá nezávislá opakování, což přispívá k větší reproducibilitě. Jisté artefakty u membrány oocytů a posléze pak funkčních studií mohou vznikat i v místě vpichu mikroinjekce po narušení membrány jehlou. Dalším a kvůli své náročnosti méně používaným modelem pro funkční studie přenosu urátu transportéry jsou invertované váčky vytvořené mnohonásobnou ultracentrifugací z buněk HEK293. Model invertovaných váček není vhodný pro transportéry skupiny SLC, protože se u nich obtížně ovlivňuje intravesikulární iontové složení (Toyoda *et al.*, 2019). Žádný z těchto modelů ale neodráží kooperaci a společné fungování jednotlivých urátových transportérů zároveň a případné nahrazovací a kompenzační mechanismy při snížení funkce některého z transportérů jiným transportérem. Toto by bylo možné realizovat pomocí geneticky modifikovaných myši *s in vivo* vnesenou alelickou variantou či nefunkčním proteinem (Preitner *et al.*, 2009, 2015). Avšak ani takový model neodstraňuje artefakty vzniklé při testování, jelikož myši mají funkční enzym urát oxidázu (Auberson *et al.*, 2018).

Obě izoformy proteinu jsou schopny přenosu urátu ve směru efluxu z buněk do vnějšího prostředí i z vnějšího prostředí dovnitř do buněk (*uptake*) (Witkowska *et al.*, 2012). Dlouhá izoforma proteinu je jediným dosud známým urátovým exportérem bazolaterální membrány epitelálních buněk ledvin, na rozdíl od membrány apikální, kde je identifikováno a popsáno více urátových transportérů přenášejících urát ve směru do buněk i sekretujících z buněk urát zpět do lumen (Caulfield *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2022). V této diplomové práci byl testován přenos urátu z buněk ven ve směru efluxu, což zatím na buněčné linii HEK293 nebylo pro transportér GLUT9 experimentálně ověřeno. Mezi jednotlivými nezávislými opakováními funkčních studií docházelo k naměření absolutních

hodnot rychlosti efluxu v jiných hladinách. Odlišné absolutní hodnoty rychlosti efluxu (pmol/mg.min) mohou odrážet aktuální stav buněk vzhledem k příliš nízkému číslu pasáže po rozmražení, či naopak příliš vysokému číslu pasáže, odlišnou míru transientní transfekce buněk a obecně odlišný stav testovaných buněk mezi jednotlivými opakováními. Testované buňky tak mohou mezi jednotlivými experimenty reagovat odlišně jako to bylo demonstrováno u buněčné linie HEK293 i u jiných buněčných linií (Tae *et al.*, 2004; Milagros *et al.*, 2014; Suk *et al.*, 2015; Bleckmann *et al.*, 2019). Přes lišící se absolutní hodnoty rychlosti transportu ale všechna opakování vykazují podobný trend, což dokládá i nízký rozptyl při procentuálním vyjádření míry efluxu za předpokladu, že eflux divokou variantou je roven 100 procentům.

Na měření celkového proteinu v buňkách byla zvolena Bradfordova metoda blíže popsána v Kapitole 4.8. Absolutní hodnoty transportu jsou tak normalizovány na celkové množství proteinu v jamce, ale nevyjadřují rozptyl účinnosti transfekce buněk jednotlivými variantami. Jako přesnější metoda pro kvantifikaci proteinů v buněčném lyzátu měly sloužit i Western bloty a z nich provedené denzitometrické stanovení celkového proteinu. Jako nanášecí kontrola byl analyzován protein CapZ, který je součástí β -actinu a který by měl být exprimován ve stejné míře ve všech buňkách i v buňkách netransfekovaných. Bohužel i po několika opakování nebyla dosažena konzistentní kvalita western blotů a vzorků pro ně. Největším úskalím byla varianta GLUT9L LL, u které se nedařilo opakovaně správně přebíjet proteinů z gelu na nitrocelulózu membránu. Ostatní vzorky se zdají být v buněčném lyzátu jednotlivých vzorků v obdobné koncentraci, až na variantu V114L/V85L u GLUT9S, kde se zdá být ve všech provedených pokusech množství proteinu GLUT9 i množství nanášecí kontroly CapZ (součást β -actinu) nižší oproti ostatním vzorkům, což mohlo být způsobeno obecně nižším počtem buněk v buněčném lyzátu. Denzitometrické určení množství proteinů v buňkách by mohlo být i v tomto případě vhodnou metodou k určení množství proteinů (Stoops *et al.*, 2016; Zámbo *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2019), která však v našem případě byla znemožněna špatnou kvalitou vytvořených blotů. Tyto western bloty tak slouží pro další potvrzení exprese proteinu u divokých i mutovaných variant proteinu v buňkách vedle mikroskopických preparátů.

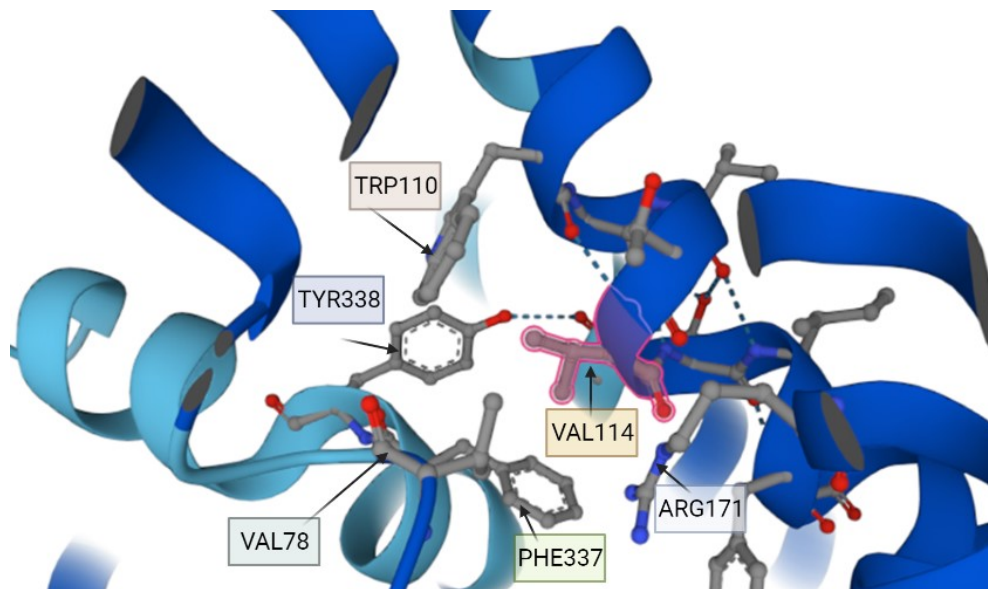
Lokalizace v rámci buněk HEK293A byla stanovena fluorescenční mikroskopií obou izoforem GLUT9, jak pro divoké (WT), tak pro alelické varianty. Na preparátech všech variant byla potvrzena alespoň částečná membránová lokalizace proteinů díky fluorescenčnímu mGFP značení proteinu. Míra transfekce v buněčné linii HEK293A po transientní transfekci pomocí PEI byla vysoká, odhadujeme kolem 70%. Signál se ovšem jevil nejslabší pro deletované varianty LL, LGL a YIKA, což by mohlo vypovídat o vlivu těchto sekvencí na lokalizaci proteinů na membránu. Na preparátech těchto deletovaných variant byla vytvořena i další série mikroskopické analýzy, která je blíže diskutována v kapitole 6.2.

6.1 Alelická varianta V114L u GLUT9L a V85L GLUT9S

Alelické varianty V114L u dlouhé izoformy proteinu a V85L u krátké izoformy proteinu, byly nalezeny v kohortě hypourikemických pacientů spadajících pod Revmatologický ústav 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. U pacientů s touto vzácnou variantou dosud nebyly nalezeny jiné mutace ve známých urátových transportérech vedoucí ke snížení transportní funkce těchto transportérů. Mimo tuto práci nebyla alelická varianta V114L/V85L tohoto proteinu zatím testována. Testování této alelické varianty také vedlo k zavedení a optimalizaci funkčních studií s ^{14}C radioaktivně značeným urátem na modelu buněčné linie HEK293A pro protein GLUT9 v podmínkách naší laboratoře pro další funkční studie popsány dále v této diskuzi.

Tato alelická varianta obou izoform proteinu byla nejprve testována ve standardním inkubačním HBSS pufru, kde bylo naměřeno signifikantní snížení schopnosti transportu ve směru efluxu u obou variant o 16,73 % u GLUT9L a o 32,89 % u GLUT9S oproti divokým variantám proteinu. Jelikož je GLUT9 napětově závislým urátovým transportérem, zvolili jsme jako další postup testování této alelické varianty testování v depolarizačním HBSS pufru, který způsobuje depolarizaci membrány zvýšením koncentrace extracelulárních draselných iontů (Anzai *et al.*, 2008; Bibert *et al.*, 2009). Depolarizací membrány buněk dochází ke stimulaci uptake urátu, vyšší cytoplazmatické koncentraci urátu i vyšší míře přenosu transportérem, což koreluje s testováním tohoto proteinu po depolarizaci membrány i v jiných studiích (Witkowska *et al.*, 2012; Ruiz *et al.*, 2018; Mandal *et al.*, 2021). I u některých dalších urátových transportérů byly pozorovány rozdílné výsledky alelické varianty na přenos urátu při fyziologickém stavu membrány a při její depolarizaci po inkubaci s depolarizačním pufrům se zvýšenou koncentrací draselných iontů (Chiba *et al.*, 2015). V depolarizačním pufru byla potvrzena očekávaná vyšší aktivita transportéru, ale i do samotných netransfekovaných buněk se dostalo větší množství urátu než při inkubaci v HBSS pufru. To bylo v našich podmínkách pozorováno i u dalších funkčních studií v depolarizačním pufru. V literatuře jsme nenašli podklady, které by zdůvodňovaly tento jev, ale domníváme se, že se jedná o stimulaci dalších transportérů v membráně buněk či reakci na změnu potenciálu uvnitř buněk a vyšší pasivní transport záporně nabitého urátu do opačně nabitě cytoplazmy. Signifikantní snížení transportní funkce alelických variant bylo pozorováno taktéž v depolarizačním pufru, kdy transportní funkce alelické varianty V114L dlouhé izoformy proteinu bylo oproti měřením ve standardním HBSS pufru prohloubeno o téměř dvojnásobek původního snížení. V těchto měřeních došlo k průměrnému snížení transportní funkce transportéru o 36,69 % u dlouhé izoformy proteinu. Naopak u krátké izoformy nebylo naměřeno větší snížení transportní funkce po inkubaci v depolarizačním HBSS pufru. Po depolarizaci membrány byla výrazně více ovlivněna alelická forma dlouhé izoformy, GLUT9L V114L. Je možné, že depolarizace membrány způsobená zvýšenou koncentrací extracelulárních draselných iontů má výraznější vliv na

jednu z variant (Mandal *et al.*, 2021). Podle našich měření se zdá, že celkově po depolarizaci membrány buněk dochází k transportu urátu ve vyšší míře, než pokud membrána není polarizovaná, a že depolarizace membrány více ovlivňuje alelickou variantu V114L izoformy GLUT9L, kdy se snížení funkce jeví téměř dvojnásobně výrazněji.



Obr.25: VAL114 v TMD2 proteinu GLUT9L a potencionální aminokyseliny, se kterými by tento valin 114 mohl interagovat: TRP110 (tryptofan 110), TYR338 (tyrosin 338), VAL78 (valin 78), PHE337 (fenylalanin 337), ARG171 (arginin 171); vytvořeno v <https://alphafold.ebi.ac.uk/> (Jumper *et al.*, 2021); upraveno.

U zkoumané alelické varianty dochází na pozici 114 k záměně valinu za leucin (u krátké izoformy proteinu se jedná o záměnu valinu za leucin na pozici 85), který je součástí druhé transmembránové domény proteinu GLUT9. I přes to, že se jedná o tzv. „same sense“ mutaci (mutaci mezi velmi podobnými aminokyselinami), může mít tato záměna velký vliv na finální funkčnost proteinu. Mutace se, podle předpokládané struktury vytvořené v aplikaci Protter (Omasits *et al.*, 2014), nachází v membránové části druhé helixové domény proteinu (TMD2). V oblasti této transmembránové domény byla již ukázána důležitost tryptofanu na pozici 110 (W110), jen o 4 pozice dříve v sekvenci proteinu. Byla zkoumána záměna původního tryptofanu za fenylalanin taktéž s aromatickým kruhem a za alanin. Pokud došlo k výměně za alanin, byla schopnost přenosu urátu ovlivněna významně. Pokud ale došlo k mutaci na fenylalanin taktéž s aromatickým kruhem a jednalo se také o „same-sense“ mutaci jako v případě naší alelické varianty, byl přenos urátu částečně ovlivněn ve směru snížení transportní funkce transportérem (Long *et al.*, 2015). Též threonin na pozici 113 je významnou aminokyselinou transmembránové domény 2, jelikož tvoří vodíkové můstky s aminokyselinami argininem 171 (R171) a glutaminem 74 (N74) dalších domén a napomáhá tak stabilizaci TMD2. Podle predikované terciální struktury proteinu GLUT9 je tato doména součástí samotného translokačního póru transportéru a tak sebemenší změna ve struktuře tohoto póru může mít případný vliv na schopnost přenosu urátu tímto transportérem či stabilizaci druhé

transmembránové domény při narušení vodíkové vazby tvořenou threoninem 113, čemuž přispívají i výsledky dosažené v této diplomové práci (Dinour *et al.*, 2012). Alelické varianty, které byly také nalezeny u hypourikemických pacientů a bylo u nich potvrzeno snížení či úplná ztráta funkce přenosu urátu mohou být rozděleny do dvou skupin podle toho, zda dochází k plné expresi tohoto proteinu a jeho lokalizaci na membránu vzhledem k WT variantě proteinu či nikoliv a jejich samotná exprese je snížena či jsou ve velké míře degradovány před lokalizací na membránu (Ruiz *et al.*, 2018). Testovaná alelická varianta V114L by dle míry exprese byla nejspíše řazena do skupiny, kdy míra exprese proteinu je obdobná jako u divokých variant proteinu, ale samotná funkce transportéru je snížena. Tato skupina alelických variant obsahuje alelické varianty v transmembránových doménách proteinu GLUT9, které jsou podle predikované struktury taktéž součástí translokačního póru pro urát, jako např. TDM4, TMD5 a TMD7. Tato snížení vykazují alelické varianty v aminokyselinách směřující do lumen translokačního póru. To potvrzují i další alelické varianty s potvrzenou sníženou funkcí u hypourikemických pacientů jako je alelická varianta N333S v transmembránové doméně 7 lokalizovaná do lumen póru a testována dokonce v několika studiích se shodnými výsledky (Mancikova *et al.*, 2016; Long *et al.*, 2017; Ruiz *et al.*, 2018), R380W v TMD9 vedoucí k výsledné cytoplazmatické koncentraci obdobné jako u negativní kontroly (Matsuo *et al.*, 2008) a C210F v transmembránové doméně 5 vedoucí také k téměř úplné ztrátě funkce transportéru (Ruiz *et al.*, 2018). V TMD2, kde se nachází i alelická varianta testována v této práci, byla dále identifikována jen jedna alelická varianta u pacientů trpící hyperurikémií, a to záměna threoninu za methionin na pozici 125 (96 u GLUT9S), která signifikantně snižovala schopnost přenosu urátu u obou izoform (Dinour *et al.*, 2012). Podle predikované struktury zobrazené na Obr.25 valin na pozici 114 taktéž směřuje do lumen translokačního póru a přímo interaguje s tyrosinem na pozici 338 nacházející se v TMD7. Obdobná interakce byla již naznačena i v další studii, kdy se jednalo o přímou interakci tryptofanu 89 v TMD2 a isoleucinu 296 v TMD7 (Long *et al.*, 2015). Mimo zmíněných byly identifikovány a testovány desítky dalších jednonukleotidových polymorfismů a inzercí či delecí v místech transmembránových domén i nemembránových smyček u obou variant proteinu GLUT9 nalezených u hypourikemických pacientů v různých populacích (Rhuc *et al.*, 2011; Stiburkova *et al.*, 2011; Ruiz *et al.*, 2018; Yoon *et al.*, 2021).

Alelická varianta V114L, resp. V85L byla nalezena u hypourikemických pacientů, neboli pacientů se sníženou koncentrací kyseliny močové v séru. Z pohledu výsledné koncentrace kyseliny močové/urátu v séru je podstatná správná funkce bazolaterální membrány epitelálních buněk ledvin, což je zajišťováno dlouhou izoformou transportéru GLUT9 (GLUT9L), další efluxové transportéry této membrány zatím nejsou známy. Podle našich výsledků dochází u alelické varianty GLUT9L V114L k signifikantnímu snížení transportní funkce ve směru efluxu z buněk ven do krevního řečiště, což by

vedlo k předpokládanému snížení koncentrace kyseliny močové v séru. U krátké izoformy proteinu je stále diskutována jeho potencionální funkce i jako renálního sekrečního transportéru, což je naznačováno například u psů (Witkowska *et al.*, 2012), u kterých se nachází ortolog lidského proteinu GLUT9 s podobností 87,97 % podle databáze Uniprot (Consortium, 2023). U lidského proteinu tato funkce nebyla zatím potvrzena, i když tuto teorii podporuje již několikrát zmíněná skutečnost, že je i krátká izoforma proteinu schopna přenášet urát i z vnitřního prostředí ven z buněk (Anzai *et al.*, 2008; Caulfield *et al.*, 2008; Matsuo *et al.*, 2008). I u krátké varianty proteinu vedla alelická varianta V114L (V85L) k signifikantnímu snížení transportní funkce ve směru efluxu, což by potencionálně také mohlo vést ke vzniku hypourikémie u pacientů s touto alelickou variantou proteinu. Pro dokreslení celé problematiky navrhujeme ještě testování této alelické varianty krátké izoformy ve směru transportu urátu z vnějšího prostředí do buněk (uptaku), což je potvrzenou funkcí krátké izoformy proteinu na apikální membráně (Witkowska *et al.*, 2012).

6.2 Vytipované lokalizační motivy LL, LGL a YIKA

Jak již bylo v diplomové práci zmíněno, lidský transportér GLUT9 je u člověka přítomen ve dvou izoformách, dlouhé GLUT9L a krátké GLUT9S. Jejich hlavní odlišnost je v celkovém počtu aminokyselin a v rozdílné lokalizaci jednotlivých variant v polarizovaných epiteliálních buňkách ledvin. Kratší varianta GLUT9S se nachází na membráně apikální a delší varianta GLUT9L na membráně bazolaterální (Augustin *et al.*, 2004; Anzai *et al.*, 2008). Z tohoto důvodu se staly tyto izoformy předmětem několika studií, které se snažily nalézt lokalizační motivy a sekvence/sekvence zodpovědné za lokalizaci jedné či druhé varianty na příslušnou membránu (Augustin *et al.*, 2004; Bibee *et al.*, 2013; Kimura *et al.*, 2014). Dle literatury se zdá být mnohem častější řízená lokalizace proteinů na bazolaterální membránu, bylo také objeveno a potvrzeno více lokalizačních motivů vedoucích k lokalizaci proteinu na bazolaterální membránu, nejčastěji kanonické dileucinové a tyrosinové (Hunziker and Fumey, 1994b; Miranda *et al.*, 2001; Subramanian *et al.*, 2009). Transport na membránu apikální je méně prozkoumán a ukazuje se, že k němu může docházet často i bez přítomnosti lokalizačních motivů pro bazolaterální lokalizaci (Scheiffele *et al.*, 1995; Breuza *et al.*, 2002; Potter *et al.*, 2003). Z tohoto důvodu jsme se zaměřili na výzkum potencionálních lokalizačních sekvencí jen u dlouhé varianty proteinu GLUT9L lokalizované na bazolaterální membráně buněk epitelu ledvin.

Jelikož se tyto dvě varianty odlišují odlišnou sekvencí a délkou svého N-konce, obdobně jako v dalších studiích jsme navrhli jako prvotní hypotézu, že se daný lokalizační motiv či jeden z motivů nachází právě v tomto odlišném N-konci dlouhé izoformy a tento N-konec je tak rozhodující pro bazolaterální lokalizaci proteinu (Augustin *et al.*, 2004; Bibee *et al.*, 2013; Kimura *et al.*, 2014). V této části proteinu jsme našli dva dileucinové motivy, LL (33LL34) a LGL (12LGL14). Dileucinové motivy

ovlivňují lokalizaci na membránu i u některých dalších proteinů u rodiny GLUT jako jsou GLUT4, GLUT8 a GLUT12 (Augustin *et al.*, 2004). Dále jsme do našich studií zahrnuli tyrosinový motiv YIKA (84YIKA87) nalézající se již mimo odlišný N-konec protein, ale v jeho blízkosti. Tento tyrosinový motiv byl zařazen, protože se ukazuje, že mnohdy o konečné lokalizaci rozhoduje přítomnost více silných lokalizačních motivů, které se nalézají poblíž (Matter *et al.*, 1992; He *et al.*, 2002). Všechny 3 motivy splňují popis řádných kanonických lokalizačních motivů: nacházejí se v mimomembránových smyčkách, ale v těsné blízkosti membrány, jedná se o skupiny nejčastějších známých kanonických lokalizačních motivů (dileucinové a tyrosinové) a také se nachází i u dalších proteinů této rodiny (Augustin *et al.*, 2004). V některých studiích byla provedena záměna první aminokyseliny vtypovaného motivu či byla provedena delece jen první aminokyseliny vtypovaných motivů. V této práci jsme zvolili deleci celého motivu, která by měla podtrhnout jeho význam pro lokalizaci a funkčnost proteinu. Podle studií od Zhang *et al.* může například delece jen jedné z aminokyselin motivu vést jen k částečnému snížení, i když delece celého motivu vede ke snížení exprese či transportní funkce mnohonásobně většímu (Zhang *et al.*, 2011).

Dileucinový motiv LL (33LL34) byl již mimo tuto práci zkoumán. Ve studii od Bibee *et al.* testovali vliv rozdílného N-konce na bazolaterální lokalizaci tohoto proteinu, kdy mutovali tento dileucinový motiv LL, avšak s negativním účinkem na vliv lokalizace. Dileucinový motiv 33LL34 byl mutován na 33KL34, (byla provedena mutace prvního leucinu motivu na lysin) na rozdíl od této práce, kde byl celý dileucinový motiv deletován obdobně jako v jiných pracích, kde pracovali s celým deletovaným dileucinovým motivem (Goding *et al.*, 2001; Miranda *et al.*, 2001). V dalších experimentech také použili celý rozdílný N-konec delší varianty proteinu GLUT9L a zfúzovali ho s dalšími proteiny rodiny GLUT opět s negativním účinkem na vliv lokalizace proteinu na bazolaterální membránu. Pokud byly vytvořeny chimérické proteiny s tímto odlišným N-koncem z GLUT9L, výsledné proteiny byly lokalizovány na apikální membránu (Bibee *et al.*, 2013). To by mohlo naznačovat, že je zde signál pro apikální lokalizaci či je zapotřebí právě více lokalizačních motivů k bazolaterální lokalizaci. Naše prvotní měření jsou s tímto tvrzením v rozporu, jelikož bylo naměřeno signifikantní snížení transportní funkce po transientní transfekci buněk oproti divoké variantě GLUT9L, i když se jednalo o snížení jen o 33,81 % oproti WT variantě. Tato varianta žádá další testování pro bližší potvrzení funkce tohoto dileucinového motivu.

Navrženou metodiku spočívající v konfokální mikroskopii transfekovaných buněk linie MDCK se nám zprovoznit nepodařilo. Přistoupili jsme tedy k dalšímu způsobu, jak prvotně otestovat důležitost těchto motivů, a to pomocí funkčních studií použitých i v první části této diplomové práce. V jiných pracích využívali systém funkčních studií po mutování potencionálních lokalizačních motivů, i když s radioaktivně ³H značeným biotinem (Subramanian *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011). Tento model

funkčních studií na buněčné linii HEK293A sice zcela nepotvrdí, zda se jedná o mutaci v lokalizačním motivu či jiném motivu nebo místě důležitém pro transport urátu a stabilitu proteinu, ale může sloužit jako prvotní model pro další směr výzkumu. Další podstatnou částí je fluorescenční mikroskopie, která byla i v této diplomové práci provedena na buněčné linii HEK293A. Na základě použití této metodiky je možné pro první přiblížení rozhodnout, zda námi deletované motivy jsou podstatné pro lokalizaci (ale také transportní mechanismus), anebo jejich poškození nemá na funkci či lokalizaci vliv. I v nepolarizovaných buňkách může docházet k odlišnému sbalování polarizovaných proteinů do rozdílných lokalizačních váčků pro proteiny apikální a bazolaterální a toto dělení v závěru ovlivní lokalizaci na membránu těchto proteinů, které může vést k částečnému snížení či úplnému zamezení jejich funkce pro nedostatečné množství proteinu na membráně oproti WT variantám proteinu (Müsch *et al.*, 1996; Yoshimori *et al.*, 1996; Keller *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2011). Podle některých studií po mutaci lokalizačních motivů jsou proteiny částečně či zcela zadrženy v cytoplazmě buněk v endozomech a lysozomech nebo se mohou shlukovat v dosud nepopsaném oddílu poblíž jádra (Tuma *et al.*, 2002; Donoso *et al.*, 2009; Stoops *et al.*, 2016).

Ve funkčních studiích po delecí vytipovaných lokalizačních motivů v této diplomové práci bylo zjištěno signifikantní snížení těchto variant v efluxovém směru přenosu urátu u všech variant oproti divoké formě dlouhé varianty proteinu, GLUT9L. Pro variantu s delecí motivu LL (delece 33LL34) bylo naměřeno průměrné snížení funkce o 33,81 % (tzn. na 66,19% původního WT, kterému byla přidělena hodnota 100 %) oproti WT GLUT9L těsně nad hranicí signifikance (p hodnota rovna 0,053284), varianta s delecí motivu LGL (delece 12LGL14) vedla k průměrnému signifikantnímu snížení funkce o 19,75 % (resp. na 80,25 % oproti WT variantě) a varianta s delecí tyrosinového motivu YIKA (delece 84YIKA87) vedla k průměrnému signifikantnímu snížení 66,15 % (tzn. na 33,85 %) oproti WT formě GLUT9L. Na základě výsledků funkčních studií byla vytvořena i série mikroskopických preparátů k ověření transientní transfekce buněk a membránového rozložení jednotlivých mutovaných variant i WT variant proteinu na membránu. Intenzitou se signál mikroskopických preparátů s deletovanými motivy jevil slabší oproti WT variantám proteinu, a to především u varianty s deletovaným motivem YIKA. Na těchto preparátech pro varianty s deletovanými motivy byly pozorovány i signály nemembránové, kdy byl signál detekován v seskupených klastrech uvnitř buněk, a to i při vytvoření duplikátů jednotlivých variant ve dvou opakování. Nejjasněji byly tyto shluky signálů v buněčné cytoplazmě pozorovány po delecí motivu LGL (12LGL14). Tyto nemembránové signály u variant by mohly svědčit o zachytávání proteinů v endozomech či lysozomech nebo nadměrné recyklaci váčků s poškozenými lokalizačními proteiny v buňce a odpovídat tak naší původní hypotéze obdobně jako v dalších studiích, kdy mutace vytipovaného lokalizačního motivu vedla k úplné či částečné lokalizaci těchto mutovaných proteinů

do endozomů a na membráně buněk byl tak pozorován signál o nižší intenzitě oproti WT (Tuma *et al.*, 2002; Jespersen *et al.*, 2004). Pro bližší upřesnění kolokalizace těchto signálů s dalšími buněčnými kompartmenty byly vytvořeny ještě dvě sady preparátů s protilátkami proti markerům časných endozomů a lysozomů, EEA1 (Christoforidis and McBride, 1999; Das and Pellett, 2011) a LAMP1 (Réne *et al.*, 1996; Meikle *et al.*, 1997; Das and Pellett, 2011). Bohužel nebylo dosaženo odpovídající kvality těchto preparátů ani po opakovaném provedení. I přes testování různých koncentrací protilátek nebylo dosaženo kvalitního signálu, aby bylo možné nastínit kolokalizaci proteinu s mGFP značkou a časných endozomů či lysozomů. V budoucnu by bylo potřeba tyto experimenty opakovat optimalizovat jednotlivé podmínky fluorescenčního barvení buněčných preparátů a analýzu přenést na mikroskop s větším rozlišením a zvětšením. Také navrhuje vytvořit sérii preparátů na polarizovaných buňkách, nejlépe buněčné linii MDCK s vytvořenými mutovanými variantami. Na modelu buněčné linie MDCK lze pozorovat odlišnou lokalizaci proteinů přímo na apikální a bazolaterální membránu díky konfokální mikroskopii. Ve studii od Kimura *et al.* zkoumali tímto způsobem obě izoformy proteinu GLUT9L a poukazují zde na důležitost sekvence N-konce izoformy GLUT9L (Kimura *et al.*, 2014).

Z těchto výsledků bez další studie na polarizovaných buňkách můžeme pouze nastiňovat, že se jedná o motivy důležité pro lokalizaci proteinů na membránu, které vedly k výraznému signifikantnímu snížení transportu urátu po jejich delecí. Námi vytipované motivy se nenalézají uvnitř transmembránových domén tvořících translokační kapsu pro substrát a také důležitých pro stabilitu proteinu v membráně, ale v první nemembránové smyčce u dileucinových motivů a v druhé nemembránové smyčce u tyrosinového motivu, což odpovídá umístění lokalizačních motivů. Pokud se tedy nejedná o lokalizační motivy mohlo by se jednat o delece míst nebo části míst důležitých pro regulaci přenosu urátu do buněk. Pro rozhodnutí, zda mají uvedené motivy vliv na lokalizaci by bylo také nezbytné provést jejich současnou delecí, což by pomohlo rozhodnout, zda se jich na výsledné lokalizaci podílí víc současně.

6.3 Směr transportu urátu u transportéru GLUT9 v odlišných podmínkách extracelulárního prostředí

Zajímavou, nepříliš prozkoumanou a literaturou podloženou problematikou je duální schopnost přenosu urátu transportérem GLUT9, kdy za fyziologických podmínek v těle každá z izoform přenáší urát odlišným směrem (GLUT9S na apikální membráně přenáší urát do buněk, kdežto GLUT9L na bazolaterální membráně přenáší urát z buněk ven do krevního řečiště), i když obě varianty jsou schopny přenášet urát jak ve směru do buněk tak z buněk ven za dodržení stejných podmínek (Anzai *et al.*, 2008; Caulfield *et al.*, 2008; Rhuc *et al.*, 2011). Každá z izoform je vystavena odlišnému extracelulárnímu prostředí, což nasvědčuje tomu, že právě odlišné extracelulární prostředí ovlivňuje

směr přenosu urátu. Každé se zásadně liší například v pH (v proximálním tubulu ledvin je pH cca 6,7-6,8, v krevním řečišti 7,35-7,45) nebo v koncentraci hexóz jako je glukóza (v proximálním tubulu se nachází glukóza ve velmi malé míře či vůbec, na rozdíl od krevního řečiště). Vytipovaných jednotlivých faktorů pro změnu směru přenosu je více, např. vliv koncentrace glukózy (případně fruktózy) v extracelulárním prostředí, vlivu koncentrace glukózy v intracelulárním prostředí, polarizace membrány, pH vnějšího prostředí a obecné složení vnějšího prostředí (Caulfield *et al.*, 2008; Witkowska *et al.*, 2012). Ač se velmi často uvádí, že se jedná o uniportér, jiné studie dokládají, že minimálně ve směru přenosu urátu z buněk ven dochází k výměně extracelulární glukózy za intracelulární urát (Caulfield *et al.*, 2008). Což by se mohlo dít nejen při transportu urátu přes bazolaterální membránu pomocí GLUT9L, ale teoreticky i hypotetickou sekretonickou funkcí kratší varianty na membráně apikální (Caulfield *et al.*, 2008; Witkowska *et al.*, 2012; Hyndman *et al.*, 2016). V této poslední části diplomové práce jsme testovali vliv přítomnosti extracelulární glukózy na přenos urátu v lidské buněčné linii HEK293A, přesněji rozdílné složení inkubačních pufrů z hlediska koncentrace glukózy. Podle výsledků studií protein GLUT9 má vyšší afinitu k urátu než k hexózám, i když je transportu hexóz v nepřítomnosti či velmi nízké koncentraci urátu v malé míře schopný (Anzai *et al.*, 2008; Caulfield *et al.*, 2008). V oocytech funkční studie probíhají v médiu ND-96 či MBM, které neobsahuje glukózu vůbec. V těchto experimentech docházelo k přenosu urátu do buněk, tedy k tzv. „uptaku“ urátu (Vitart *et al.*, 2008; Long *et al.*, 2017). Pokud na modelu žabích oocytů bylo potřeba zkoumat eflux, byl i samotný urát vpraven do oocytů pomocí mikroinjikace (Witkowska *et al.*, 2012).

V našich experimentech jsme primárně používali Hankův solný roztok (HBSS), který obsahuje glukózu a je často používaným pufrům pro navození fyziologického pH a správné osmolality buněk. Obě varianty GLUT9 po použití standardního HBSS pufru přenáší urát ve směru z buněk ven (tzv. eflux). Dalším použitým pufrům byl depolarizační HBSS pufr, který obsahuje vyšší koncentraci draselných iontů navozující depolarizaci membrány. Podle našich výsledků v depolarizačním HBSS pufru obě varianty fungují také jaké efluxové transportéry a transport zde probíhá ve vyšší míře oproti experimentům ve standardním HBSS pufru. Jako další byl vytvořen inkubační HBSS pufr bez přítomnosti glukózy, což vedlo ke snížení efluxové funkce obou izoform a přiblížení se hodnotám úrovně negativní kontroly. Tento pufr byl vytvořen ze standardního HBSS pufru na základě studie, kde se zabývali přítomností extracelulární a intracelulární koncentrace glukózy a fruktózy. Zvýšený eflux probíhal při přítomnosti D-glukózy v extracelulárním prostředí (Witkowska *et al.*, 2012). Na základě další literatury byly zkoušeny i další 2 inkubační pufrů: bezglukózový pufr a Krebsův-Ringerův fosfátový (KRP) pufr.

KRP pufr byl převzatý z uptakeových funkčních studií, kde byly buňky HEK293 stabilně transfekovány a inkubace probíhala v 50 μ M urátu při 37°C po dobu 6 minut, než byla zastavena ochlazením na ledu (Caulfield *et al.*, 2008). Složení KRP pufru a HBSS pufru se liší jen minimálně, změny jsou na úrovni jen jednotek v mM u jednotlivých komponentů a standardní HBSS pufr navíc obsahuje 0,4 mM MgSO_4 , 0,4 mM KH_2PO_4 a 0,3 mM Na_2HPO_4 . Větší rozdíl je jen v koncentraci hydrogenuhličitanu sodného (NaHCO_3), jehož koncentrace v KRB pufru dosahuje 25 mM narozdíl od 4 mM v HBSS pufru. I když se jedná o minimální rozdíl, mohl by to být rozdíl, který by v delším časovém úseku mohl vést ke změně směru přenosu urátu v našem modelu, i když jsme ho za našich stanovených podmínek nepozorovali. Posledním testovaným pufrům byl bezglukózový pufr, který byl testován na základě jeho použití ve studii, kde tento inkubační pufr nazývají přímo jako „uptakový inkubační pufr“ a je používán na uptakeové funkční studie na buněčné linii HEK293T, která je dceřinou odvozenou a upravenou linií z buněk HEK293 a je méně adhezivní než naše používaná buněčná linie HEK293A. Také doba inkubace byla v této studii rozdílná, celková inkubace s pufrům s 20 μ M urátem probíhala při pokojové teplotě po dobu 60 min a také samotný postup uptakeové funkční studie se odlišoval od toho našeho (Mandal and Mount, 2019). V našich podmínkách a na odlišném typu buněčné linie sice inkubace probíhala podstatně kratší čas (20 min), avšak při teplotě 37°C v prostředí termostatu. Podle výsledků v této studii se s průběhem času zvyšoval uptake urátu a výrazněji se začal od negativní kontroly oddalovat až po 30 minutách inkubace za pokojové teploty (Mandal and Mount, 2019). V této studii výsledky funkčních studií nevztahují na počet transfekovaného proteinu ani na počet celkového proteinu buněk, ale na vždy stejný počet buněk, i když k účelům experimentu byly buňky transfekovány jen transientně a míra transfekce se z mnohých důvodů může lišit mezi jednotlivými nezávislými opakováními, jako ukazuje studie zaměřující se na transientní transfekci této buněčné linie (Milagros *et al.*, 2014). V našich podmínkách byl toto jediný inkubační pufr, který vedl alespoň k velmi mírnému uptake urátu do buněk, respektive spíše blokaci transportu. Mírné snížení transportní funkce bylo tedy pozorováno u standardního HBSS pufru bez přidání glukózy a k mírnému uptake či zastavení transportu došlo jen v bezglukózovém pufru v námi určených podmínkách.

Ze získaných měření uptake urátu v různých pufrách jsme nepozorovali jasný trend úplné změny přenosu urátu při zkoušení inkubačních médií s rozdílným složením. Silný eflux byl pozorován po inkubaci v HBSS pufru, v HBSS depolarizačním pufru a bezglukózovém pufru, snížená míra efluxu pak u HBSS pufru bez glukózy. Velmi mírný uptake nebo spíše zastavení transportu urátu do buněk byl pozorován pouze po inkubaci v KRP pufru. Výsledky by tak mohly naznačovat, že přítomnost a nepřítomnost glukózy v extracelulárním prostředí buněk by mohly mít vliv na směr přenosu urátu transportérem GLUT9 pravděpodobně jako jeden z faktorů ovlivňujících tuto problematiku. Dalším

postupem v této problematice by mělo být provedení dalších opakování, naše měření nám neposkytly žádné silné argumenty. Také změna podmínek funkčních studií z hlediska teploty a prodloužení preinkubace v inkubačním pufru bez radioaktivně značeného urátu a následné inkubace v pufru s radioaktivním urátem by mohly mít velký vliv na otočení směru přenosu v inkubačních pufrech neobsahující glukózu. Na základě našich předběžných výsledků se domníváme, že intracelulární urát může být vyměňován za glukózu z vnějšího prostředí. Navržený mechanismus antiportu podporují i již publikované výsledky, které byly získány na modelu oocytů *X. laevis* (Caulfield *et al.*, 2008). Ve studii s použitím bezglukózového pufru, u kterého jediného byla v našich pozorování pozorována výraznější změna, byla provedena inkubace buněk HEK293T v tomto pufru za jiných podmínek a to po dobu 60 min při teplotě 22°C. V našem experimentu ale vlivem teploty 37°C došlo zřejmě ke spotřebování cytoplazmatických zásob volné glukózy, čímž došlo k zániku jejího koncentračního gradientu a v důsledku toho k zastavení transportu urátu v tomto prostředí. Tato problematika se netýká funkčních studií na oocytech *X. laevis*, protože je urát mikroinjikován přímo do cytoplazmy oocytu a eflux zde tak probíhá ve směru gradientu i bez přítomnosti glukózy v inkubačním pufru (Witkowska *et al.*, 2012; Baumann *et al.*, 2019). Domníváme se, že vlivem větší koncentrace volné cytoplazmatické glukózy a pomalejšího metabolismu mají nematurované oocyty *X. laevis* při inkubaci v médiu bez glukózy (ND-96 či MBM) větší koncentrační gradient směrem z cytoplazmy, který antiportem zajišťuje uptake urátu intracelulárním směrem. V dalších experimentech by se nabízelo zaměřit se na změnu vnějšího pH a v neposlední řadě se zaměřit například i na vliv intracelulární koncentrace hexózy na tomto buněčném modelu. Experimenty k ověření vlivu glukózy a odlišných pufrů na směr transportu byly zopakovány pouze jednou. Je tak možné, že neshodnost výsledků s publikovanými studiemi je způsobena experimentálním artefaktem.

7 Závěr

GLUT9 je vysokoafinním transportérem urátu podstatným svou funkcí v lidském těle k udržení homeostázy kyseliny močové v organismu. Transportér GLUT9 je napětově závislý a alternativním sestřihem tvoří dvě izoformy: dlouhou izoformu GLUT9L a krátkou izoformu GLUT9S. Tyto izoformy se liší svou lokalizací na membráně polarizovaných buněk, celkovým množstvím aminokyselin, rozdílnou délkou a sekvencí N-konců a směrem přenosu urátu, i když se oba podílejí na reabsorpci urátu v proximálním tubulu ledvin. Tato diplomová práce byla zaměřena na tento urátový transportér GLUT9 i na jeho izoformy GLUT9L a GLUT9S z více hledisek. Jako model byla využita adherentní buněčná linie HEK293A transientně transfekovaná příslušným WT proteinu či příslušnou alelickou či mutovanou variantou proteinu. V předkládané práci byla vyšetřena alelická varianta V114L, vzešlá ze screeningu kohorty hypourikemických pacientů spadající pod Revmatologický ústav v Praze. Ve funkčních studiích s ^{14}C radioaktivně značeným urátem u obou izoform proteinu vedla tato alelická varianta ke signifikantnímu snížení transportní funkce transportéru ve standardním HBSS pufru a při testování této alelické varianty v depolarizačním HBSS pufru bylo snížení transportní funkce u dlouhé izoformy proteinu ještě prohloubeno. Tato zjištění korelují s výskytem této alelické varianty u hypourikemických pacientů. Dále byly testovány predikované lokalizační motivy bazolaterální lokalizace (LL na pozici 33-34, LGL na pozici 12-14 a YIKA na pozici 84-87) dlouhé izoformy proteinu (GLUT9L) po delecí těchto motivů na vliv transportní funkce taktéž ve funkčních studiích s radioaktivně značeným urátem. Bylo pozorováno výrazné signifikantní snížení transportní funkce transportéru ve směru efluxu u všech deletovaných motivů, především pak u tyrosinového motivu YIKA. V obou částech byla exprese proteinu detekována imunocytochemicky pomocí buněčných preparátů a jejich analýzy fluorescenční mikroskopií a chemiluminiscencí pomocí Western blotů. Tyto předběžné výsledky naznačují, že všechny uvedené motivy mohou mít vliv buď na lokalizaci proteinu na membránu, anebo na mechanismus funkce transportu urátu. U delecí vytipovaných lokalizačních motivů byl u mikroskopických preparátů opakovaně pozorován i signál akumulovaný uvnitř cytoplazmy buněk. Byly proto vytvořeny další preparáty pro potvrzení kolokalizace tohoto signálu s časnými endozomy a lysozomy. V poslední části diplomové práce byl zkoumán směr přenosu urátu divokými variantami transportéru GLUT9 v odlišných inkubačních pufrách: HBSS, depolarizačním HBSS pufru, HBSS pufru bez přidání glukózy, KRP pufru a bezglukózovém pufru. Směr přenosu urátu ve směru efluxu byl pozorován u HBSS pufru, HBSS depolarizačního pufru a KRP pufru, snížení transportu ve směru efluxu bylo pozorováno v HBSS pufru bez přidání glukózy a mírný uptake, resp. zastavení transportu bylo pozorováno v bezglukózovém pufru. Vzhledem k jedinému opakování experimentu a nesouladu s výsledky publikovanými v literatuře se spíše přikláníme k závěru, že jde spíše o experimentální artefakt.

8 Literatura

* Sekundární citace

Ames, B, Cathcart, R, Schwiers, E, and Hochstein, P (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 6858–6862.

Annemans, L, Moeremans, K, Lamotte, M, Garcia Conde, J, Van Den Berg, H, Myint, H, Pieters, R, and Uyttebroeck, A (2003). Incidence, medical resource utilisation and costs of hyperuricemia and tumour lysis syndrome in patients with acute leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma in four European countries. *Leuk Lymphoma* 44, 77–83.

Anzai, N et al. (2004). The Multivalent PDZ Domain-containing Protein PDZK1 Regulates Transport Activity of Renal Urate-Anion Exchanger URAT1 via Its C Terminus. *J Biol Chem* 279, 45942–45950.

Anzai, N et al. (2008). Plasma urate level is directly regulated by a voltage-driven urate efflux transporter URATv1 (SLC2A9) in humans. *J Biol Chem* 283, 26834–26838.

Van Aubel, RAMH, Smeets, PHE, Van Den Heuvel, JJMW, and Russel, FGM (2005). Human organic anion transporter MRP4 (ABCC4) is an efflux pump for the purine end metabolite urate with multiple allosteric substrate binding sites. *Am J Physiol - Ren Physiol* 288, 327–333.

Auberson, M, Stadelmann, S, Stoudmann, C, Seuwen, K, Koesters, R, Thorens, B, and Bonny, O (2018). SLC2A9 (GLUT9) mediates urate reabsorption in the mouse kidney. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 470, 1739–1751.

Augustin, R, Carayannopoulos, MO, Dowd, LO, Phay, JE, Moley, JF, and Moley, KH (2004). Identification and characterization of human glucose transporter-like protein-9 (GLUT9): Alternative splicing alters trafficking. *J Biol Chem* 279, 16229–16236.

Bainbridge, SA, and Roberts, JM (2008). Uric Acid as a Pathogenic Factor in Preeclampsia. *Placenta* 29, 67–72.

Bakhiya, N, Bahn, A, Burckhardt, G, and Wolff, NA (2003). Human organic anion transporter 3 (hOAT3) can operate as an exchanger and mediate secretory urate flux. *Cell Physiol Biochem* 13, 249–256.

Baumann, MU, Lüscher, BP, Surbek, D V., Cléménçon, B, Huang, X, Albrecht, C, Marini, C, and Hediger, MA (2019). Different pharmacological properties of GLUT9a and GLUT9b: Potential implications in preeclampsia. *Cell Physiol Biochem* 53, 508–517.

Beau, I, Groyer-Picard, MT, Le Bivic, A, Vannier, B, Loosfelt, H, Milgrom, E, and Misrahi, M (1998). The basolateral localization signal of the follicle-stimulating hormone receptor. *J Biol Chem* 273, 18610–18616.

Bibee, KP, Augustin, R, Gazit, V, and Moley, KH (2013). The apical sorting signal for human GLUT9b resides in the N-terminus. *Mol Cell Biochem* 376, 163–173.

Bibee, KP, Illsley, NP, and Moley, KH (2011). Asymmetric syncytial expression of GLUT9 splice variants in human term placenta and alterations in diabetic pregnancies. *Reprod Sci* 18, 20–27.

Bibert, S, Hess, SK, Firsov, D, Thorens, B, Geering, K, Horisberger, JD, and Bonny, O (2009). Mouse GLUT9: Evidences for a urate uniporter. *Am J Physiol - Ren Physiol* 297, 612–619.

Bleckmann, M, Schu, M, Endres, M, and Samuels, A (2019). Identifying parameters to improve the reproducibility of transient gene expression in High Five cells. *PLoS One* 14, 1–18.

Breuza, L, Garcia, M, Delgrossi, MH, and Bivic, A Le (2002). Role of the membrane-proximal O-glycosylation site in sorting of the human receptor for neurotrophins to the apical membrane of MDCK cells. *Exp Cell Res* 273, 178–186.

Brown, DA, and Rose, JK (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68, 533–544.

Cachau, R, Shahsavari, S, and Kweon, S (2023). The in-silico evaluation of important GLUT9 residue for uric acid transport based on renal hypouricemia type 2. *Chem Biol Interact* 373, 110378.

Casanova, JE, Apodaca, G, and Mostov, KE (1991). An autonomous signal for basolateral sorting in the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor. *Cell* 66, 65–75.

Caulfield, MJ et al. (2008). SLC2A9 is a high-capacity urate transporter in humans. *PLoS Med* 5, 1509–1523.

Cereijido, M, Robbins, ES, Dolan, WJ, Rotunno, CA, and Sabatini, DD (1978). Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J Cell Biol* 4, 853–882.

Chanat, E, and Huttner, WB (1991). Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the

trans-Golgi network. *J Cell Biol* 115, 1505–1519.

Chen-Xu, M, Yokose, C, Rai, SK, Pillinger, MH, and Choi, HK (2019). Contemporary Prevalence of Gout and Hyperuricemia in the United States and Decadal Trends: The National Health and Nutrition Examination Survey, 2007–2016. *Arthritis Rheumatol* 71, 991–999.

Chiba, T et al. (2015). NPT1/SLC17A1 is a renal urate exporter in humans and its common gain-of-function variant decreases the risk of renal underexcretion gout. *Arthritis Rheumatol* 67, 281–287.

Christoforidis, S, and McBride, HM (1999). The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* 397, 621–625.

Church, WH, and Ward, VL (1994). Uric acid is reduced in the substantia nigra in parkinson's disease: Effect on dopamine oxidation. *Brain Res Bull* 33, 419–425.

Claverie-Martin, F et al. (2018). URAT1 and GLUT9 mutations in Spanish patients with renal hypouricemia. *Clin Chim Acta* 481, 83–89.

Consortium, TU (2023). UniProt : the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res* 51, 523–531.

Das, S, and Pellett, PE (2011). Spatial Relationships between Markers for Secretory and Endosomal Machinery in Human Cytomegalovirus-Infected Cells versus Those in Uninfected Cells. *J Virol* 85, 5864–5879.

Debosch, BJ, Kluth, O, Fujiwara, H, Schürmann, A, and Moley, K (2014). Early-onset metabolic syndrome in mice lacking the intestinal uric acid transporter SLC2A9. *Nat Commun* 5, 1–7.

*Delacour, D, and Jacob, R (2006). Apical protein transport. *Cell Mol Life Sci* 63, 2491–2505.

Deng, D, Xu, C, Sun, P, Wu, J, Yan, C, Hu, M, and Yan, N (2014). Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature* 510, 121–125.

Diamond, HS, and Sharon, E (1974). Evidence for a post-secretory reabsorptive site for uric acid in man. *Adv Exp Med Biol* 41, 745–749.

Dinour, D et al. (2010). Homozygous SLC2A9 mutations cause severe renal hypouricemia. *J Am Soc Nephrol* 21, 64–72.

Dinour, D et al. (2012). Two novel homozygous SLC2A9 mutations cause renal hypouricemia type 2. *Nephrol Dial Transplant* 27, 1035–1041.

Dobson, L, Zeke, A, and Tusnády, GE (2021). PolarProtPred: predicting apical and basolateral localization of transmembrane proteins using putative short linear motifs and deep learning. *Bioinformatics* 37, 4328–4335.

Doege, H, Bocianski, A, Joost, HG, and Schurmann, A (2000). Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes. *Biochem J* 350, 771–776.

Donoso, M, Cancino, J, Lee, J, Van Kerkhof, P, Retamal, C, Bu, G, Gonzalez, A, Cáceres, A, and Marzolo, M-P (2009). Polarized Traffic of LRP1 Involves AP1B and SNX17 Operating on Y-dependent Sorting Motifs in Different Pathways. *Mol Biol Cell* 20, 2673–2683.

Döring, A et al. (2008). SLC2A9 influences uric acid concentrations with pronounced sex-specific effects. *Nat Genet* 40, 430–436.

Ellmore, TM, Suescun, J, Castriotta, RJ, and Schiess, MC (2020). A Study of the Relationship Between Uric Acid and Substantia Nigra Brain Connectivity in Patients With REM Sleep Behavior Disorder and Parkinson's Disease. *Front Neurol* 11, 815.

Enomoto, A et al. (2002). Molecular identification of a renal urate-anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* 417, 447–452.

Farr, GA, Hull, M, Mellman, I, and Caplan, MJ (2009). Membrane proteins follow multiple pathways to the basolateral cell surface in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 186, 269–282.

Goding, JW, Greengrass, V, Sali, A, Dubljevic, V, Lenoir, C, and Trugnan, G (2001). Characterization of a Di-leucine – based Signal in the Cytoplasmic Tail of the Nucleotide-pyrophosphatase NPP1 That Mediates Basolateral Targeting but not. *Mol Biol Cell* 12, 3004–3015.

Gonzalez-Mariscal, L, Chávez de Ramírez, B, and Cerejido, M (1985). Tight junction formation in cultured epithelial cells (MDCK). *J Membr Biol* 86, 113–125.

Hagos, Y, Stein, D, Ugele, B, Burckhardt, G, and Bahn, A (2007). Human Renal Organic Anion Transporter 4

Operates as an Asymmetric Urate Transporter. *Am Soc Nephrol* 18, 430–439.

He, C, Hobert, M, Friend, L, and Carlin, C (2002). The epidermal growth factor receptor juxtamembrane domain has multiple basolateral plasma membrane localization determinants, including a dominant signal with a polyproline core. *J Biol Chem* 277, 38284–38293.

*Hediger, MA, Johnson, RJ, Miyazaki, H, and Endou, H (2005). Molecular physiology of urate transport. *Physiology* 20, 125–133.

Heilker, R, Manning-Krieg, U, Zuber, JF, and Spiess, M (1996). In vitro binding of clathrin adaptors to sorting signals correlates with endocytosis and basolateral sorting. *EMBO J* 15, 2893–2899.

Higashino, T et al. (2020). Dysfunctional missense variant of OAT10/SLC22A13 decreases gout risk and serum uric acid levels. *Ann Rheum Dis* 79, 164–166.

Hospital, M et al. (2014). Common Variant of PDZK1 , Adaptor Protein Gene of Urate Transporters , is Not Associated with Gout. *J Rheumatol* 41, 2330–2331.

Huls, M, Brown, CDA, Windass, AS, Sayer, R, Heuvel, J Van Den, Heemskerk, S, and Russel, FGM (2008). The breast cancer resistance protein transporter ABCG2 is expressed in the human kidney proximal tubule apical membrane. *Int Soc Nephrol* 73, 220–225.

Hunziker, W, and Fumey, C (1994a). A di-leucine motif mediates endocytosis and basolateral sorting of macrophage IgG Fc receptors in MDCK cells. *EMBO J* 13, 2963–2969.

Hunziker, W, and Fumey, C (1994b). A di-leucine motif mediates endocytosis and basolateral sorting of macrophage IgG Fc receptors in MDCK cells. *EMBO J* 13, 2963–2969.

Hurba, O, Mancikova, A, Krylov, V, Pavlikova, M, Pavelka, K, and Stiburková, B (2014). Complex analysis of urate transporters SLC2A9, SLC22A12 and functional characterization of non-synonymous allelic variants of GLUT9 in the Czech population: No evidence of effect on hyperuricemia and gout. *PLoS One* 9, 30.

*Hyndman, D, Liu, S, and Miner, JN (2016). Urate Handling in the Human Body. *Curr Rheumatol Rep* 18, 34.

Itahana, Y, Han, R, Barbier, S, Lei, Z, Rozen, S, and Itahana, K (2014). The uric acid transporter SLC2A9 is a direct target gene of the tumor suppressor p53 contributing to antioxidant defense. *Oncogene* 34, 1799–1810.

Jespersen, T, Rasmussen, HB, Grunnet, M, Jensen, HS, Angelo, K, Dupuis, DS, Vogel, LK, Jorgensen, NK, Klaerke, DA, and Olesen, S (2004). Basolateral localisation of KCNQ1 potassium channels in MDCK cells : molecular identification of an N-terminal targeting motif. *J Cell Biol* 117, 4517–4526.

Jiang, LML, and Hu, Y (2014). A novel homozygous GLUT9 mutation cause recurrent exercise- induced acute renal failure and posterior reversible encephalopathy syndrome. *J Nephrol* 28, 387–392.

Jin, Y, Lin, Z, and Zhang, B (2018). Effects of Chicory on Serum Uric Acid , Renal Function , and GLUT9 Expression in Hyperuricaemic Rats with Renal Injury and In Vitro Verification with Cells. *Evidence-Based Complement Altern Med* 2, 1–11.

Johnson, RJ, and Andrews, P (2010). Fructose, uricase, and the Back-to-Africa hypothesis. *Evol Anthropol* 19, 250–257.

Jumper, J et al. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589.

Jutabha, P, Anzai, N, Kimura, T, Taniguchi, A, Urano, W, Yamanaka, H, Endou, H, and Sakurai, H (2011a). Functional analysis of human sodium-phosphate transporter 4 (NPT4/SLC17A3) polymorphisms. *J Pharmacol Sci* 115, 249–253.

Jutabha, P, Anzai, N, Wempe, MF, Wakui, S, Endou, H, and Sakurai, H (2011b). Apical voltage-driven urate efflux transporter NPT4 in renal proximal tubule. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 30, 1302–1311.

Kaewlin, N, Liangruksa, M, and Laomettachtit, T (2021). Development of a genetically integrated PBPK model for predicting uric acid homeostasis in humans. *Thai J Math* 19, 854–864.

Karmali, RN, Jones, NM, and Levine, AD (2010). Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nature* 28, 12–14.

Kawamura, Y et al. (2021). A proposal for practical diagnosis of renal hypouricemia: Evidenced from genetic studies of nonfunctional variants of urat1/slc22a12 among 30,685 japanese individuals. *Biomedicines* 9, 1–13.

Keebaugh, AC, and Thomas, JW (2010). The evolutionary fate of the genes encoding the purine catabolic enzymes in hominoids, birds, and reptiles. *Mol Biol Evol* 27, 1359–1369.

- Keller, P, Toomre, D, Díaz, E, White, J, and Simons, K (2001). Multicolour imaging of post-Golgi sorting and trafficking in live cells. *Nat Cell Biol* 3, 140–149.
- Kim, ST, and Moley, KH (2007). The Expression of GLUT8, GLUT9a, and GLUT9b in the Mouse Testis and Sperm. *Reprod Sci* 14, 445–455.
- Kim, Y, Kang, J, and Kim, GT (2018). Prevalence of hyperuricemia and its associated factors in the general Korean population: an analysis of a population-based nationally representative sample. *Clin Rheumatol* 37, 2529–2538.
- Kimura, T, Takahashi, M, Yan, K, and Sakurai, H (2014). Expression of SLC2A9 isoforms in the kidney and their localization in polarized epithelial cells. *PLoS One* 9, 1–12.
- Klausner, RD (1992). A Novel Di-Leucine Motif and a Tyrosine-Based Motif Independently Mediate Lysosomal Targeting and Endocytosis of CD3 Chains. *Cell* 69, 1143–1157.
- Koo, BS, Jeong, HJ, Son, CN, Kim, SH, Kim, HJ, Kim, GH, and Jun, JB (2021). Distribution of serum uric acid levels and prevalence of hyper- and hypouricemia in a Korean general population of 172,970. *Korean J Intern Med* 36, 264–272.
- Kratzer, JT, Lanaspa, MA, Murphy, MN, Cicerchi, C, Graves, CL, Tipton, PA, Ortlund, EA, Johnson, RJ, and Gaucher, EA (2014). Evolutionary history and metabolic insights of ancient mammalian uricases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 3763–3768.
- Levinson, DJ, and Sorensen, LB (1980). Renal handling of uric acid in normal and gouty subjects: Evidence for a 4-component system. *Ann Rheum Dis* 39, 173–179.
- Li, L, Li, Y, Luo, J, Jiang, Y, Zhao, Z, Chen, Y, Huang, Q, Zhang, L, Wu, T, and Pang, J (2021). Resveratrol, a novel inhibitor of GLUT9, ameliorates liver and kidney injuries in a d-galactose-induced ageing mouse model: Via the regulation of uric acid metabolism. *Food Funct* 12, 8274–8287.
- Long, W, Panigrahi, R, Panwar, P, Wong, K, O’Neill, D, Chen, XZ, Lemieux, MJ, and Cheeseman, CI (2017). Identification of key residues for urate specific transport in human glucose transporter 9 (hSLC2A9). *Sci Rep* 7, 1–14.
- Long, W, Panwar, P, Witkowska, K, Wong, K, O’Neill, D, Chen, XZ, Lemieux, MJ, and Cheeseman, CI (2015). Critical roles of two hydrophobic residues within human glucose transporter 9 (hSLC2A9) in substrate selectivity and urate transport. *J Biol Chem* 290, 15292–15303.
- Lüscher, BP, Schoeberlein, A, Surbek, D V., and Baumann, MU (2022). Hyperuricemia during Pregnancy Leads to a Preeclampsia-Like Phenotype in Mice. *Cells* 11, 3703.
- Mancikova, A, Krylov, V, Hurba, O, Sebesta, I, Nakamura, M, Ichida, K, and Stiburkova, B (2016). Functional analysis of novel allelic variants in URAT1 and GLUT9 causing renal hypouricemia type 1 and 2. *Clin Exp Nephrol* 20, 578–584.
- Mandal, AK, Leask, MP, Estiverne, C, Choi, HK, Merriman, TR, and Mount, DB (2021). Genetic and Physiological Effects of Insulin on Human Urate Homeostasis. *Front Physiol* 12, 1–17.
- Mandal, AK, and Mount, DB (2019). Interaction Between ITM2B and GLUT9 Links Urate Transport to Neurodegenerative Disorders. *Front Physiol* 10, 1–16.
- Manolescu, AR, Augustin, R, Moley, K, and Cheeseman, C (2007). A highly conserved hydrophobic motif in the exofacial vestibule of fructose transporting SLC2A proteins acts as a critical determinant of their substrate selectivity. *Mol Membr Biol* 24, 455–463.
- Mardones, GA et al. (2013). Structural Basis for the Recognition of Tyrosine-based Sorting Signals by the μ 3A Subunit of the AP-3 Adaptor Complex. *J Biol* 288, 9563–9571.
- *Martillo, MA, Nazzari, L, and Crittenden, DB (2014). The crystallization of monosodium urate. *Curr Rheumatol Rep* 16, 400.
- Matsuo, H et al. (2008). Mutations in Glucose Transporter 9 Gene SLC2A9 Cause Renal Hypouricemia. *Am J Hum Genet* 83, 744–751.
- Matter, K, Hunziker, W, and Mellman, I (1992). Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: The cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. *Cell* 71, 741–753.
- Matter, K, and Mellman, I (1994). Mechanisms of cell polarity: in epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol* 6, 545–554.
- McArdle, PF, Parsa, A, Chang, YPC, Weir, MR, O’Connell, JR, Mitchell, BD, and Shuldiner, AR (2008). Association

of a common nonsynonymous variant in GLUT9 with serum uric acid levels in Old Order Amish. *Arthritis Rheum* 58, 2874–2881.

Meikle, PJ et al. (1997). Diagnosis of lysosomal storage disorders : evaluation of lysosome-associated membrane protein LAMP-1 as a diagnostic marker. *Clin Chem* 43, 1325–1335.

Mellman, I, Yamamoto, E, Whitney, JA, Kim, M, Hunziker, W, and Matter, K (1993). Molecular sorting in polarized and non-polarized cells: Common problems, common solutions. *J Cell Sci* 106, 1–7.

Milagros, MDL, Molinas, B, Beer, C, and Hesse, F (2014). Optimizing the transient transfection process of HEK-293 suspension cells for protein production by nucleotide ratio monitoring. *Cytotechnology* 66, 493–514.

Miranda, KC, Khromykh, T, Christy, P, Le, TL, Gottardi, CJ, Yap, AS, Stow, JL, and Teasdale, RD (2001). A Dileucine Motif Targets E-cadherin to the Basolateral Cell Surface in Madin-Darby Canine Kidney and LLC-PK1 Epithelial Cells. *J Biol Chem* 276, 22565–22572.

Mobasher, A, Dobson, H, Mason, SL, Cullingham, F, Shakibaei, M, Moley, JF, and Moley, KH (2005). Expression of the GLUT1 and GLUT9 facilitative glucose transporters in embryonic chondroblasts and mature chondrocytes in ovine articular cartilage. *Cell Biol Int* 29, 249–260.

Mobasher, A, Neama, G, Bell, S, Richardson, S, and Carter, SD (2002). Human articular chondrocytes express three facilitative glucose transporter isoforms: GLUT1, GLUT3 and GLUT9. *Cell Biol Int* 26, 297–300.

Müsch, A, Xu, H, Shields, D, and Rodriguez-Boulan, E (1996). Transport of vesicular stomatitis virus G protein to the cell surface is signal mediated in polarized and nonpolarized cells. *J Cell Biol* 133, 543–558.

Nakayama, A et al. (2013). A common missense variant of monocarboxylate transporter 9 (MCT9/SLC16A9) gene is associated with renal overload gout, but not with all gout susceptibility. *Hum Cell* 26, 133–136.

Oda, M, Satta, Y, Takenaka, O, and Takahata, N (2002). Loss of urate oxidase activity in hominoids and its evolutionary implications. *Mol Biol Evol* 19, 640–653.

Oka, Y, Tashiro, H, Sirasaki, R, Yamamoto, T, Akiyama, N, Kawasugi, K, Shirafuji, N, and Fujimori, S (2014). Hyperuricemia in hematologic malignancies is caused by an insufficient urinary excretion. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 33, 434–438.

Omasits, U, Ahrens, CH, Mu, S, and Wollscheid, B (2014). Sequence analysis Protter : interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics* 30, 884–886.

Otani, N et al. (2020). Evidence for Urate Uptake Through Monocarboxylate Transporter 9 Expressed in Mammalian Cells and Its Enhancement by Heat Shock. *Circ Reports* 2, 425–432.

Park, JW, Noh, JH, Kim, JM, Lee, HY, Kim, KA, and Park, JY (2022). Gene Dose-Dependent and Additive Effects of ABCG2 rs2231142 and SLC2A9 rs3733591 Genetic Polymorphisms on Serum Uric Acid Levels. *Metabolites* 12, 1192–1205.

Peña-münzenmayer, G, Catalán, M, Cornejo, I, Figueroa, CD, Melvin, JE, Niemeyer, MI, Cid, LP, and Sepúlveda, F V (2005). Basolateral localization of native ClC-2 chloride channels in absorptive intestinal epithelial cells and basolateral sorting encoded by a CBS-2 domain di-leucine motif. *J Cell Sci* 118, 4243–4252.

Potter, BA, Ihrke, G, Bruns, JR, Weixel, KM, and Weisz, OA (2003). Specific N-Glycans Direct Apical Delivery of Transmembrane, but Not Soluble or Glycosylphosphatidylinositol-anchored Forms of Endolyn in Madin-Darby Canine Kidney Cells. *Mol Biol Cell* 14, 5069–5081.

Preitner, F, Bonny, O, Laverrière, A, Rotman, S, Firsov, D, Da Costa, A, Metref, S, and Thorens, B (2009). Glut9 is a major regulator of urate homeostasis and its genetic inactivation induces hyperuricosuria and urate nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 15501–15506.

Preitner, F, Pimentel, A, Metref, S, Berthonneche, C, Sarre, A, Moret, C, Rotman, S, Centeno, G, Firsov, D, and Thorens, B (2015). No development of hypertension in the hyperuricemic liver-Glut9 knockout mouse. *Int Soc Nephrol* 87, 940–947.

Prill, V, Lehmann, L, Von Figura, K, and Peters, C (1993). The cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase contains overlapping but distinct signals for basolateral sorting and rapid internalization in polarized MDCK cells. *EMBO J* 12, 2181–2193.

Ramazina, I, Folli, C, Secchi, A, Berni, R, and Percudani, R (2006). Completing the uric acid degradation pathway through phylogenetic comparison of whole genomes. *Nat Chem Biol* 2, 144–148.

Réne, C, Montes, GS, Hynes, NE, and Chammas, R (1996). The lysosomal-associated membrane protein LAMP-1

is a novel differentiation marker for HC11 mouse mammary epithelial cells. *Differentiation* 61, 113–120.

Rhuc, T et al. (2011). Pathogenic GLUT9 mutations causing renal hypouricemia type 2 (RHUC2). *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 30, 1105–1111.

Rothschild, BM, Tanke, D, and Carpenter, K (1997). Tyrannosaurs suffered from gout. *Nature* 387, 357.

Ruiz, A, Gautschi, I, Schild, L, and Bonny, O (2018). Human mutations in SLC2A9 (Glut9) affect transport capacity for urate. *Front Physiol* 18, 1–13.

Scheiffele, P, Peränen, J, and Simons, K (1995). N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature* 378, 603–605.

Sebesta, I, and Stiburkova, B (2014). Purine disorders with hypouricemia. *Pril (Makedonska Akad Na Nauk i Umet Oddelenie Za Med Nauk* 35, 87–92.

Son, CN, Kim, JM, Kim, SH, Cho, SK, Choi, CB, Sung, YK, Kim, TH, Bae, SC, Yoo, DH, and Jun, JB (2016). Prevalence and possible causes of hypouricemia at a tertiary care hospital. *Korean J Intern Med* 31, 971–976.

Sorensen, LB (1965). Role of the intestinal tract in the elimination of uric acid. *Arthritis Rheum* 8, 694–706.

Stiburkova, B, and Bleyer, AJ (2012). Changes in Serum Urate and Urate Excretion With Age. *Adv Chronic Kidney Dis* 19, 372–376.

Stiburkova, B, Ichida, K, and Sebesta, I (2011). Novel homozygous insertion in SLC2A9 gene caused renal hypouricemia. *Mol Genet Metab* 102, 430–435.

Stiburkova, B, Sebesta, I, Ichida, K, Nakamura, M, Hulkova, H, Krylov, V, Kryspinova, L, and Jahnova, H (2013). Novel allelic variants and evidence for a prevalent mutation in URAT1 causing renal hypouricemia: Biochemical, genetics and functional analysis. *Eur J Hum Genet* 21, 1067–1073.

Stoops, EH, Hull, M, and Caplan, MJ (2016). Newly synthesized and recycling pools of the apical protein gp135 do not occupy the same compartments. *Traffic* 17, 1227–1328.

Subramanian, VS, Marchant, JS, Boulware, MJ, Ma, TY, and Said, HM (2009). Membrane targeting and intracellular trafficking of the human sodium-dependent multivitamin transporter in polarized epithelial cells. *Am J Physiol - Cell Physiol* 296, 663–671.

Suk, D, Choi, Y, Mi, S, Hwan, K, and Woo, J (2015). Different effects of resveratrol on early and late passage mesenchymal stem cells through Beta-catenin regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 467, 1026–1032.

Sweet, DH, Chan, LMS, Walden, R, Yang, XP, Miller, DS, and Pritchard, JB (2003). Organic anion transporter 3 (Slc22a8) is a dicarboxylate exchanger indirectly coupled to the Na⁺ gradient. *Am J Physiol - Ren Physiol* 284, 763–769.

Tae, M, Myung, P, Lee, S, Hyun, S, Gyun, EJ, and Lee, M (2004). Influence of culture passages on growth kinetics and adenovirus vector production for gene therapy in monolayer and suspension cultures of HEK 293 cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 65, 553–558.

Takada, T, Suzuki, H, and Sugiyama, Y (2005). Characterization of polarized expression of point- or deletion-mutated human BCRP/ABCG2 in LLC-PK1 cells. *Pharm Res* 22, 458–464.

Tin, A et al. (2011). Genome-wide association study for serum urate concentrations and gout among African Americans identifies genomic risk loci and a novel URAT1 loss-of-function allele. *Hum Mol Genet* 20, 4056–4068.

Tin, A et al. (2021). Epigenome-wide association study of serum urate reveals insights into urate co-regulation and the SLC2A9 locus. *Nat Commun* 12, 1–18.

Toyoda, Y et al. (2019). Functional Characterization of Clinically-Relevant Rare Variants in ABCG2 Identified in a Gout and Hyperuricemia Cohort. *Cells* 8, 363–381.

Toyoda, Y et al. (2022). OAT10/SLC22A13 Acts as a Renal Urate Re-Absorber: Clinico-Genetic and Functional Analyses With Pharmacological Impacts. *Front Pharmacol* 13, 1–13.

Tuma, PL, Nyasae, LK, and Hubbard, AL (2002). Nonpolarized Cells Selectively Sort Apical Proteins from Cell Surface to a Novel Compartment, but Lack Apical Retention Mechanisms. *Mol Biol Cell* 13, 3400–3415.

Uehara, I, Kimura, T, Tanigaki, S, Fukutomi, T, Sakai, K, Shinohara, Y, Ichida, K, Iwashita, M, and Sakurai, H (2014). Paracellular route is the major urate transport pathway across the blood-placental barrier. *Physiol Rep* 2, 1–10.

- Vitart, V et al. (2008). SLC2A9 is a newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout. *Nat Genet* 40, 437–442.
- Watanabe, S, Kang, DH, Feng, L, Nakagawa, T, Kanellis, J, Lan, H, Mazzali, M, and Johnson, RJ (2002). Uric acid, hominoid evolution, and the pathogenesis of salt-sensitivity. *Hypertension* 40, 355–360.
- Wieland, FT, Gleason, ML, Serafini, TA, and Rothman, JE (1987). The rate of bulk flow from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *Cell* 50, 289–300.
- Witkowska, K, Smith, KM, Yao, SYM, Ng, AML, O’Neill, D, Karpinski, E, Young, JD, and Cheeseman, CI (2012). Human SLC2A9a and SLC2A9b isoforms mediate electrogenic transport of urate with different characteristics in the presence of hexoses. *Am J Physiol - Ren Physiol* 303, 527–539.
- Wu, X, Muzny, DM, Chi Lee, C, and Thomas Caskey, C (1992). Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution. *J Mol Evol* 34, 78–84.
- Xu, G, Bhatnagar, V, Wen, G, Hamilton, BA, Eraly, SA, and Nigam, SK (2005). Analyses of coding region polymorphisms in apical and basolateral human organic anion transporter (OAT) genes. *Kidney Int* 68, 1491–1499.
- *Xu, X, Li, C, Zhou, P, and Jiang, T (2016). Uric acid transporters hiding in the intestine. *Pharm Biol* 54, 3151–3155.
- *Yang, B et al. (2022). New insight into the management of renal excretion and hyperuricemia: Potential therapeutic strategies with natural bioactive compounds. *Front Pharmacol* 13, 1–17.
- Yoon, J, Cachau, R, David, VA, Thompson, M, Jung, W, Jee, SH, Daar, IO, Winkler, CA, and Cho, SK (2021). Characterization of a compound heterozygous SLC2A9 mutation that causes hypouricemia. *Biomedicines* 9, 1–14.
- Yoshimori, T, Keller, P, Roth, MG, and Simons, K (1996). Different biosynthetic transport routes to the plasma membrane in BHK and CHO cells. *J Cell Biol* 133, 247–256.
- Zámbó, B, Móznér, O, Bartos, Z, Török, G, Várady, G, and Telbisz, Á (2019). Cellular expression and function of naturally occurring variants of the human ABCG2 multidrug transporter. *Cell Mol Life Sci* 77, 365–378.
- Zeng, H, Tang, C, Lin, B, Yu, M, Wang, X, Wang, J, Chen, S, and Yu, C (2022). The regulation effect of GLUT9/SLC2A9 on intrahepatic uric acid level and metabolic associated fatty liver disease. *Hepatol Int* 16, 1064–1074.
- Zhang, Q, Wu, J, Pan, Z, and You, G (2011). The role of dileucine in the expression and function of human organic anion transporter 1 (hOAT1). *Int J Biochem Mol Biol* 2, 31–38.
- Zhou, Y, Li, W, and Huang, Y (2022). A low serum uric acid concentration predicts a poor prognosis in adult patients with candidemia. *De Gruyter* 3, 1077–1083.
- Zhou, Z, Dong, Y, Zhou, H, Liu, J, and Zhao, W (2019). MiR-143-3p directly targets GLUT9 to reduce uric acid reabsorption and inflammatory response of renal tubular epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 517, 413–420.
- Zhu, Y, Pandya, BJ, and Choi, HK (2011). Prevalence of gout and hyperuricemia in the US general population: The National Health and Nutrition Examination Survey 2007-2008. *Arthritis Rheum* 63, 3136–3141.
- Zoccolella, S, Tortorella, C, Iaffaldano, P, Direnzo, V, Onghia, MD, Luciannatelli, E, Paolicelli, D, Livrea, P, and Trojano, M (2012). Low Serum Urate Levels Are Associated to Female Gender in Multiple Sclerosis Patients. *PLoS One* 7, 1–5.