

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program:

Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor:

Speciální chemicko-biologické obory



Ondřej Pácalt

WASH komplex a jeho interakční partneři v lidské patologii

WASH complex and its interactome in human pathology

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Lenka Libusová, PhD.

Praha, 2016

Prohlášení

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

V Praze, 15.8.2016

.....

Děkuji RNDr. Lence Libusové, PhD. za cenné připomínky, nesčetné rady a odborný dohled při psaní této bakalářské práce. Chtěl bych také poděkovat Mgr. Vojtěchu Dostálovi za projevení velkého zájmu o toto téma, který vedl často k velmi inspirujícím diskuzím. Velmi také děkuji mým rodičům, kteří mě během psaní této práce, stejně tak jako během mého dosavadního studia, vždy podporovali.

Osnova

Abstrakt	1
1. Seznam použitých zkratk.....	2
2. Úvod	4
2. 1. Aktinový cytoskelet	5
2. 2. Rodina proteinů WASp	6
2. 2. 1. Nový člen WASp rodiny WASH1	7
2. 2. 2. WASH komplex a jeho struktura	7
2. 2. 3. Lokalizace WASH komplexu v buňce	8
2. 2. 4. WASH komplex jako hlavní NPF na endozomální membráně	8
2. 2. 5. WASH komplex a autofágie	10
2. 2. 6. Interakční partneři WASH komplexu	10
2. 2. 6. 1. Struktura a funkce retromeru	11
2. 2. 6. 2. Struktura a funkce CCC komplexu.....	12
3. Patologie spojené s WASH komplexem a jeho vybranými interakčními partnery	13
3. 1. Dědičná spastická paraplegie, její klinické příznaky a patofyziologie	13
3. 1. 1. Strumpellin v dědičné spastické paraplegii	13
3. 1. 2. Způsob vzniku HSP u pacientů s mutantním strumpellinem.....	14
3. 1. 3. Zhodnocení poznatků o HSP způsobené mutovaným strumpellinem.....	17
3. 2. Dědičná Parkinsonova nemoc, její klinické příznaky a patofyziologie	17
3. 2. 1. WASH komplex a retromer v PD	18
3. 2. 2. Alternativní možnosti vzniku dědičné PD způsobené mutací Vps35	20
3. 3. Lehká intelektuální porucha	20
3. 3. 1. Klinické příznaky a patofyziologie LID.....	21
3. 3. 2. Vznik X-LID s doprovodnými příznaky u pacientů s mutacemi v CCDC22.....	22
3. 3. 3. Vznik X-LID bez doprovodných příznaků u pacientů s mutacemi v CCDC22 ..	23
3. 3. 4. Vzniku ARID u pacientů s mutací ve SWIP	23
3. 3. 5. Zhodnocení poznatků o LID způsobené mutacemi v CCDC22 nebo SWIP.....	24
3. 4. Další patologie asociované s WASH komplexem – Alzheimerova nemoc	24
4. Závěr	25
5. Použitá literatura	27

Abstrakt

Správná doprava nákladu na místo určení je nezbytná pro efektivní fungování eukaryotických buněk. Mnoho molekul je v rámci buňky přesouváno pomocí váčkového transportu. Narušením tohoto transportu vzniká řada závažných patologií. Třídění a recyklace nákladu je nepostradatelnou součástí váčkového transportu a umožňuje zefektivnit následnou dopravu nákladu po buňce. WASH komplex společně se svými interakčními partnery má zásadní vliv na regulaci větvených aktinových vláken. Pokud tyto děje probíhají na membráně endozómů, projeví se následně i na třídění, recyklaci a dopravě nákladu po buňce. Mutace WASH komplexu a jeho interakčních partnerů vedou ke vzniku patologií jako je dědičná spastická paraplegie, Parkinsonova nemoc, či lehká intelektuální porucha. I přes množství poznatků nejsou mechanismy vzniku těchto patologií zatím známy. Výzkum v této oblasti může vést k odкрыtí základních molekulárních mechanismů stojících za komplexitou váčkového transportu, recyklací a tříděním nákladu a následně i k lepším možnostem léčby postižených pacientů.

Klíčová slova: WASH komplex, NPF, recyklace/třídění nákladu, váčkový transport

Abstract

Efficient transport of cargo to its correct destination is required for the proper functioning of eukaryotic cells. Vesicular trafficking is one of the important means of intracellular transport. Impairment of this process often leads to serious pathologies. Sorting and recycling is the crucial part of vesicular trafficking as it enhances its efficiency. The WASH complex has a key role in the regulation of branched actin patches formation. If this occurs on the membrane of endosomes, then it affects sorting, recycling and cargo trafficking. Mutations in the WASH complex or its interacting partners cause diseases such as hereditary spastic paraplegia, Parkinson disease or light intellectual disability. Despite certain advance in the understanding of above-mentioned pathologies, mechanism of the pathogenesis is still elusive. Research in this field can reveal basic molecular mechanisms responsible for the complexity of cargo sorting, recycling and trafficking and thus provide better opportunities for treatment of affected individuals.

Key words: WASH complex, NPF, cargo recycling/sorting, vesicular trafficking

1. Seznam použitých zkratk

AD	Alzheimerova nemoc	<u>A</u> lzheimer <u>D</u> isease
ARID	Autosomálně recesivní intelektuální porucha	<u>A</u> utosomal <u>r</u> ecessive <u>i</u> ntellectual <u>d</u> isability
ARP2/3 komplex	Komplex proteinů příbuzných aktinu 2 a 3	<u>A</u> ctin <u>R</u> elated <u>P</u> rotein <u>2/3</u> complex
ATP7A	ATPáza transportující měďnaté ionty Alfa	<u>A</u> TPase Copper Transporting <u>A</u> lpha
ATG9A	Protein spojený s autofágií 9A	<u>A</u> utophagy related <u>9A</u>
β 2AR	β 2 - adrenergní receptor	β - <u>2</u> Adrenergic <u>R</u> eceptor
Bar	Doména Bin-amphyphisin-rvs	Bin-amphyphisin-rvs domain
BMP	Kosterní morfogenetický protein	<u>B</u> one <u>M</u> orphogenetic <u>P</u> rotein
C16orf62	Otevřený čtecí rámeček 62 na chromozómu 16	<u>C</u> hromosome <u>16</u> <u>O</u> pen <u>R</u> eading <u>F</u> rame <u>62</u>
CapZ α/β	Čepičkovací protein svalových Z linií α/β	<u>C</u> apping <u>a</u> ctin protein of muscle <u>Z</u> -line <u>α/β</u>
CCDC	Coiled coil doména obsahující protein	<u>C</u> oiled <u>C</u> oiled <u>D</u> omain <u>C</u> ontaining protein
CCC komplex	Komplex proteinů COMMD, CCDC22, CCDC93 a C16orf62	Complex of proteins <u>C</u> OMMD, <u>C</u> CDC22, <u>C</u> CDC93 and C16orf62
CIMPR	Kation nezávislý manóza-6-fosfátový receptor	<u>C</u> ation <u>I</u> ndependent <u>M</u> anosa-6- <u>P</u> hosphate <u>R</u> eceptor
CMT	Charcotův-Marieův-Toothův syndrom	<u>C</u> harcot- <u>M</u> arie- <u>T</u> ooth disease
CNS	Centrální nervová soustava	<u>C</u> entral <u>N</u> ervous <u>S</u> ystem
COMMD	Protein metabolismu mědi obsahující Murr1 doménu	<u>C</u> opper <u>M</u> etabolism <u>M</u> urr1 <u>D</u> omain containing protein
CSC	Náklad selektující komplex	<u>C</u> argo <u>S</u> elective <u>C</u> omplex
FAM21	Protein z rodiny se sekvenční homologií 21	<u>F</u> amily with sequence homology <u>21</u> protein
FKBP15	Protein 15 vážící FK506	<u>F</u> K506 <u>B</u> inding <u>P</u> rotein <u>15</u>
GA	Golgiho aparát	<u>G</u> olgi <u>A</u> pparatus
GFP	Zelený fluorescenční protein	<u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein
HSP	Dědičná spastická paraplegie	<u>H</u> ereditary <u>S</u> pastic <u>P</u> araplegia
JMY	Spoj zprostředkovávající a regulační protein	<u>J</u> unction- <u>M</u> ediating and <u>R</u> egulatory protein
LDL	Lipoprotein s malou hustotou	<u>L</u> ow <u>D</u> ensity <u>L</u> ipoprotein
LDLR	Receptor lipoproteinů s malou hustotou	<u>L</u> ow <u>D</u> ensity <u>L</u> ipoprotein <u>R</u> eceptor
LID	Lehká intelektuální porucha	<u>L</u> ight <u>I</u> ntellectual <u>D</u> isability
mRNA	mediátorová RNA	<u>m</u> essenger <u>R</u> NA

MPP ⁺	1-metyl-4-fenylpyridinium	1- <u>M</u> ethyl-4- <u>P</u> henyl <u>P</u> yrudinium
NF-KB	Jaderný faktor K B	<u>N</u> uclear <u>F</u> actor <u>K</u> <u>B</u>
NPFs	Faktory zahajující polymeraci aktinu	<u>N</u> ucleation <u>P</u> romoting <u>F</u> actors
N-WASP	Neurální WASP	<u>N</u> eural <u>W</u> ASP
PD	Parkinsonova nemoc	<u>P</u> arkinson <u>D</u> isease
PtdIns3P	Fosfatidylinositol-3-fosfát	<u>P</u> hosphatidyl <u>I</u> nositol- <u>3</u> - <u>P</u> hosphate
Rab	Rasu příbuzný protein v mozku	<u>R</u> as-related in <u>b</u> rain
RME-8	Protein potřebný pro receptorem zprostředkovanou endocytózu 8	<u>R</u> equired For Receptor- <u>M</u> ediated <u>E</u> ndocytosis <u>8</u>
RSS	Ritscher-Schinzelův syndrom	<u>R</u> itscher- <u>S</u> chinzel <u>S</u> yndrome
SCAR	Supresor cAMP receptoru	<u>S</u> uppressor of <u>c</u> AMP <u>R</u> eceptor
siRNA	Malá interferující RNA	<u>s</u> mall <u>i</u> nterfering <u>R</u> NA
SNARE	Receptor solubilního NSF přichycujícího proteinu	<u>S</u> oluble <u>N</u> SF <u>A</u> ttachment protein <u>R</u> eceptor
Snx	Sorting nexin protein	<u>S</u> orting <u>n</u> exin
SWIP	Strumpellin a WASH1 interagující protein	<u>S</u> trumpellin and <u>W</u> ASH1 <u>I</u> nteracting <u>P</u> rotein
TBR	Tubulin vázající region	<u>T</u> ubulin- <u>B</u> inding <u>R</u> egion
TGN	Trans Golgi network	<u>T</u> rans <u>G</u> olgi <u>N</u> etwork
Tf	Transferin	<u>T</u> ransferin
TfR	Transferinový receptor	<u>T</u> ransferin receptor
TRIM27	Protein 27 obsahující tripartitní motiv	<u>T</u> ripartite <u>M</u> otif containing 27
VCP	Valosin obsahující protein	<u>C</u> alosin <u>C</u> ontaining <u>P</u> rotein
Vps 26 / 29 / 35	Vakuolární protein asociovaný s tříděním proteinů 26 / 29 / 35	<u>V</u> acuolar protein <u>s</u> orting-associated protein <u>26 / 29 / 35</u>
WASP/WASp	Protein Wiskott-Aldrichova syndromu	<u>W</u> iskott- <u>A</u> ldrich <u>S</u> yndrome <u>P</u> rotein
WASH	Homolog WASP a SCAR	<u>W</u> ASP and <u>S</u> CAR <u>H</u> omolog
WAVE	Homolog WASP a Verpolin	<u>W</u> ASP and <u>V</u> erpolin homolog
WCA	WH2 doména, spojovací a kyselý region	<u>W</u> H2 domain, <u>C</u> onector and <u>A</u> cidic region
WHAMM	Homolog WASP asociovaný s aktinem, membránami a mikrotubuly	<u>W</u> ASP <u>H</u> omolog associated with <u>A</u> ctin, <u>M</u> embranes and <u>M</u> icrotubules
WHD 1/2	WASH homologní doména 1/2	<u>W</u> ASH <u>H</u> omology <u>D</u> omain <u>1/2</u>
Wt	Divoká forma	<u>W</u> ild-type
X-LID	X-vázaná lehká intelektuální porucha	<u>X</u> -linked <u>L</u> ight <u>I</u> ntellectual <u>D</u> isability
YFP	Žlutý fluorescenční protein	<u>Y</u> ellow <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein

2. Úvod

Eukaryotické buňky se vyznačují velkým množstvím navzájem oddělených membránových kompartmentů. Specifické prostředí, které je v těchto kompartmentech udržováno, umožňuje především průběh konkrétních biochemických reakcí. Aby tyto děje probíhaly správně, je zapotřebí náležitě koordinovat jak váčkový transport, tak třídění nákladu, který je do těchto kompartmentů dopravován. Právě malé membránové váčky zajišťují přepravu nákladů, proteinů a nejrůznějších metabolitů mezi jednotlivými membránovými kompartmenty. Váček vzniká pučením z membrány. Tomuto procesu mohou napomáhat jak obalové proteiny, tak proteiny způsobující lokální zakřivení membrány, ale i některé složky cytoskeletu. Během pučení je váček plněn nákladem a to díky celé řadě receptorů a adaptorových proteinů, které umožňují selektivní zakotvení nákladu v pučícím váčku. Poté, co dojde k odštěpení, je váček dopravován po buňce pomocí molekulárních motorů, které putují s tímto váčkem po cytoskeletálních vláknech k cílové destinaci. Samotný váček si nese adresu v podobě specifických malých GTPáz z rodiny Rab (z angl. Ras Associated in Brain), proteinů zajišťující ukotvení ke konkrétní membráně (v angl. tzv. tethering), či SNARE proteinů (z angl. Soluble NSF Attachment protein Receptor). Tyto proteiny dohromady umožňují navázání kontaktu a následnou fúzi s cílovou membránou či membránovým kompartmentem (Bonifacino and Glick, 2004; Stenmark, 2009). Samotný cytoskelet ve váčkovém transportu nehraje pouze roli kabelů, po kterých jsou váčky dopravovány, ale zásadním způsobem se podílí na remodelaci membrán a dějích spojených s tříděním a recyklací nákladu (Anitei and Hoflack, 2011).

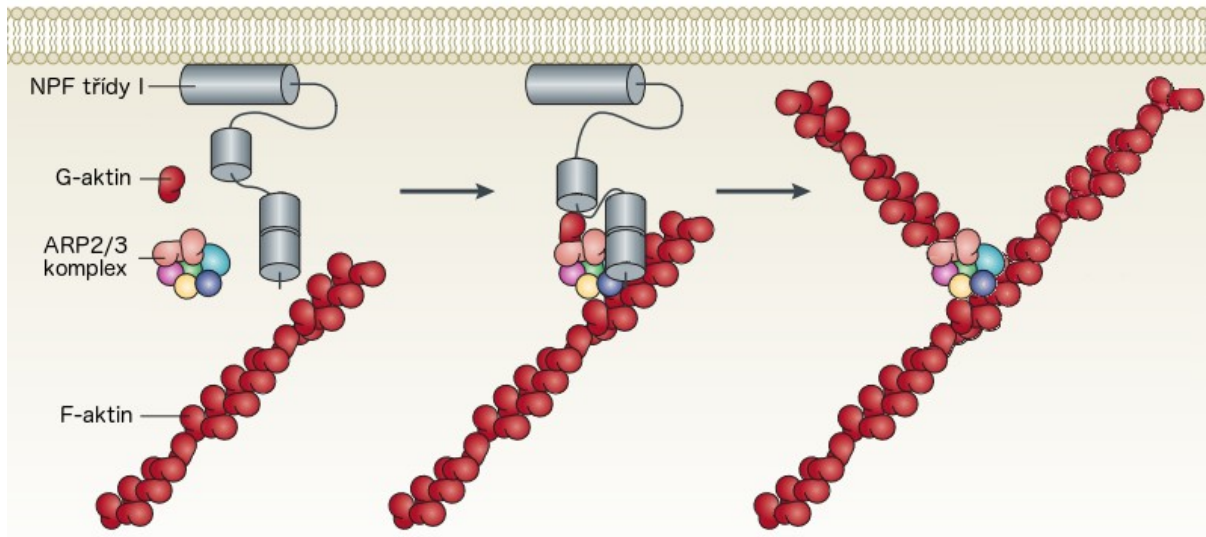
Pro patřičnou funkci membránových kompartmentů, celé buňky i organismu je zapotřebí správně fungující váčkový transport. Není divu, že často i při zdánlivě nepatrném narušení proteinů, podílejících se na váčkovém transportu, dochází u lidí ke vzniku závažných patologií. Pokud jde o poškození transportovaného nákladu, vznikají často patologie právě jeho špatnou dopravou, degradací nebo naopak akumulací tohoto nákladu. V momentě, kdy je poškozen některý z obecných prvků váčkového transportu (viz výše), dochází častěji ke vzniku komplexních či vývojových poškození (De Matteis and Luini, 2011). Seznam patologií vzniklých v důsledku porušení váčkového transportu je velice dlouhý. Pro ilustraci lze uvést například Charcotův-Marieův-Toothův syndrom (CMT), který je způsoben mimo jiné i mutací v proteinu dynamin 2, zajišťujícím odštěpení váčků, či svalovou dystrofií, která může být zapříčiněna mutací v obalovém proteinu caveolin 3 (De Matteis and Luini, 2011).

V první části práce se budu zabývat váčkovým transportem, především pak rolí WASH komplexu (Wiskott-Aldrich syndrome and SCAR Homolog). Ten se podílí na regulaci dynamiky aktinového cytoskeletu obklopujícího endozomální membránu, a zprostředkovaně se tak účastní procesů třídění a recyklace nákladu v endocytické dráze. Druhá část práce bude zaměřena na shrnutí poznatků o patologiích, které vznikají porušením třídící/recyklační mašinerie asociované s WASH komplexem.

2. 1. Aktinový cytoskelet

Aktin je přibližně 42kDa velký globulární protein, který se uvnitř eukaryotických buněk vyskytuje ve dvou stavech - jako G-aktin monomerní formě a jako F-aktin, kdy mnoho monomerů aktinu tvoří dohromady vlákna. Mezi G-aktinem a F-aktinem funguje dynamická rovnováha, která umožňuje polymeraci a depolymeraci aktinové sítě. Aktin se díky tomu podílí na celé řadě buněčných dějů. Mezi tyto děje patří například tvorba aktinového prstence umožňujícího cytokinezi, pohyb celé buňky dosažený díky polymerizaci aktinu v přední části buňky nebo doprava váčků a organel po aktinových vláknech na různé místa buňky (Pollard *et al.*, 2009).

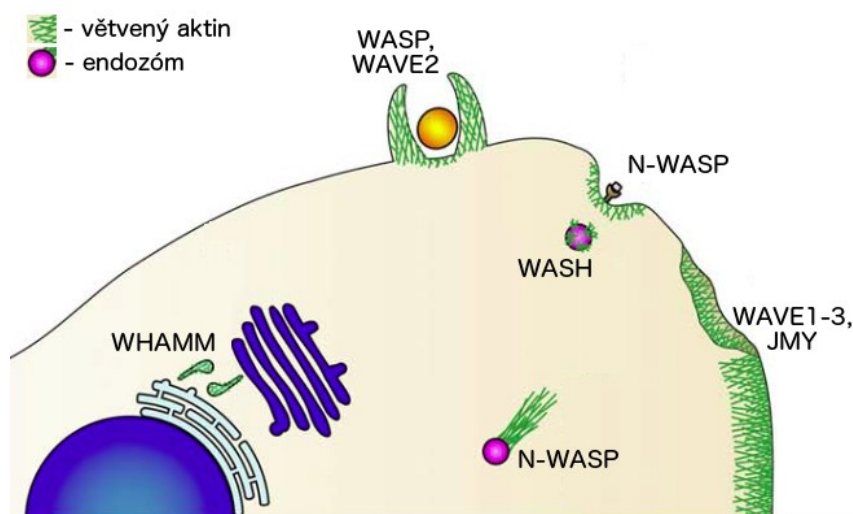
V buňkách se vyskytují nevětvená nebo větvená aktinová vlákna. Jedním z regulačních faktorů, které se podílí na tvorbě větvených aktinových vláken, je komplex proteinů příbuzných aktinu 2 a 3, tzv. ARP2/3 komplex (z angl. Actin Related Protein 2/3 complex). Tento komplex se váže na již existující aktinové vlákno a poskytuje na boční straně tohoto vlákna možnost polymerace vlákna nového. Větvení aktinových vláken má vliv na mnoho fyziologických procesů v buňce a proto musí být aktivita ARP2/3 komplexu regulována. ARP2/3 komplex má sám o sobě schopnost polymerizovat aktin jen minimální. Ke zvýšení této schopnosti je zapotřebí, aby byl ARP2/3 komplex aktivován jedním z faktorů zahajující polymerizaci (NPFs, z angl. Nucleation Promoting Factors). NPF se dělí do dvou skupin – třída I a II. Zástupci těchto dvou tříd se mezi sebou odlišují strukturou a úlohou v regulaci aktinového cytoskeletu. Aktivaci ARP2/3 komplexu mají na starosti především NPF I. třídy. Společně NPF I. třídy, ARP2/3 komplex a aktinové monomery umožňují tvorbu větvení na již stávajícím aktinovém vlákně (**Obr. 1**)(Rottner *et al.*, 2010). Velkou část NPF I. třídy tvoří rodina proteinů Wiskott-Aldrichova syndromu (WASp, z angl. Wiskott-Aldrich Sndrome protein) (Pollard, 2007; Campellone and Welch, 2010).



Obr. 1: NPF I. třídy váže aktin i ARP2/3 komplex. Ten je touto vazbou aktivován, nasedá z boku již hotového aktinového vlákna a umožňuje polymeraci G-aktinu v F-aktin. To vede ke vzniku větvení na stávajícím aktinovém vlákně. Větvená aktinová vlákna se poté podílejí na remodelaci membrány. Upraveno dle (Campellone and Welch, 2010).

2. 2. Rodina proteinů WASp

Proteiny rodiny WASp mají zásadní dopad na regulaci aktinového cytoskeletu, což zprostředkovaně ovlivňuje celou plejádu buněčných dějů (**Obr. 2**). Podle struktury lze členy rodiny WASp rozdělit na tři podskupiny - příbuzné WAVE, příbuzné WASP a příbuzné WASH1. WASH1 patří mezi nedávno objevené členy rodiny WASp. Byl popsán již v roce 2007 (Linardopoulou *et al.*, 2007), ale jeho funkce byla odhalena až o dva roky později (Derivery *et al.*, 2009; Gomez and Billadeau, 2009).



Obr. 2: Subcelulární lokalizace jednotlivých členů rodiny WASp a jejich funkce v regulaci aktinového cytoskeletu napříč buňkou. Upraveno dle (Rottner *et al.*, 2010).

2. 2. 1. Nový člen WASp rodiny WASH1

Protein WASH1 má několik evolučně konzervovaných domén (**Obr. 3**). Od N-konce proteinu WASH1 lze rozpoznat WASH homologní doménu (WAHD1), za kterou směrem k C-konci následuje tubulin vázající doména (TBR; z angl. Tubulin Binding Region) a region bohatý na prolin (P). Na úplném C-konci má WASH1, stejně jako ostatní NPF z rodiny WASp, WCA doménu (z angl. WH2 domain, Connecter and Acidic region)(Linardopoulou *et al.*, 2007; Campellone and Welch, 2010). Právě pomocí WCA domény dochází k aktivaci ARP2/3 komplexu a následnému vzniku větvených aktinových vláken (Campellone and Welch, 2010). WASH1 je kódován genem, který během evoluce člověka prodělal 6 duplikací. Kompletní produkt je u lidí nicméně kódován pouze na alele umístěné v subtelomerické oblasti kratšího raménka chromozómu 9 (Linardopoulou *et al.*, 2007). WASH1 je velmi evolučně konzervovaným členem rodiny WASp. Lze jej nalézt jak v mnohobuněčných organismech, tak i v organismech jednobuněčných, jako je *Dictyostelium* nebo *Entamoeba*, nikoliv však v kvasinkách (Linardopoulou *et al.*, 2007). U rostlin nelze tvrzení o přítomnosti, či nepřítomnosti WASH1 zobecňovat. Modelový zástupce rostlin *Arabidopsis thaliana* WASH1 postrádá, avšak existuje celá řada rostlin, které homolog WASH1 obsahují. U nižších rostlin lze homolog WASH1 najít například u zelené řasy *Ostreococcus*, z vyšších rostlin obsahujících homolog WASH1 lze uvést například čirok (*Sorghum*)(Insall and Veltman, 2010). Pro myš a zřejmě tedy i pro člověka jde o gen esenciální (Gomez *et al.*, 2012; Xia *et al.*, 2013), který má stabilní expresi ve většině tkání dospělého organismu. Vysoká úroveň exprese pak byla nalezena v krevních buňkách a některých oblastech mozku (Linardopoulou *et al.*, 2007; Derivery *et al.*, 2009).

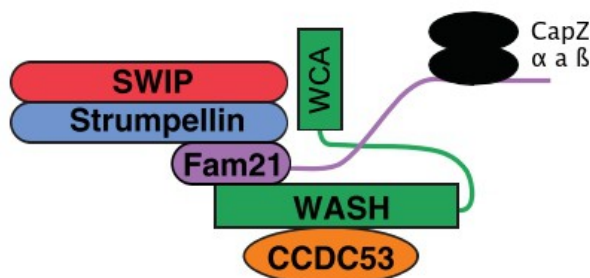


Obr. 3: Domény proteinu WASH1. Upraveno dle (Campellone and Welch, 2010).

2. 2. 2. WASH komplex a jeho struktura

Protein WASH1 neaktivuje ARP2/3 komplex sám, nýbrž společně s dalšími proteiny. Pomocí tandemové afinitní purifikace WASH1 proteinu se podařilo izolovat proteiny, které s WASH1 tvoří dohromady WASH komplex. WASH komplex se skládá z 5 podjednotek (**Obr. 4**) – WASH1, FAM21, Strumpellin, SWIP a CCDC53 (z angl. FAM21 – Family with sequence homology 21, SWIP – Strumpellin and WASH1 Interacting Protein, CCDC53 – Coiled Coil Domain Containing protein 53). Někdy se za součást WASH komplexu považují i

čepičkovací proteiny 1 a 2 (CapZ α a β) (Derivery *et al.*, 2009; Jia *et al.*, 2010). Jedním z důležitých poznatků, který podtrhuje fungování těchto proteinů v komplexu, je, že deplece jedné podjednotky ve většině případů způsobí téměř kompletní degradaci podjednotek ostatních. Jednotlivé podjednotky jsou stabilní teprve poté, co se váží ve WASH komplexu (Jia *et al.*, 2010).



Obr. 4: Schématická struktura WASH komplexu, vyobrazení vazeb jednotlivých členů. Upraveno dle (Jia *et al.*, 2010).

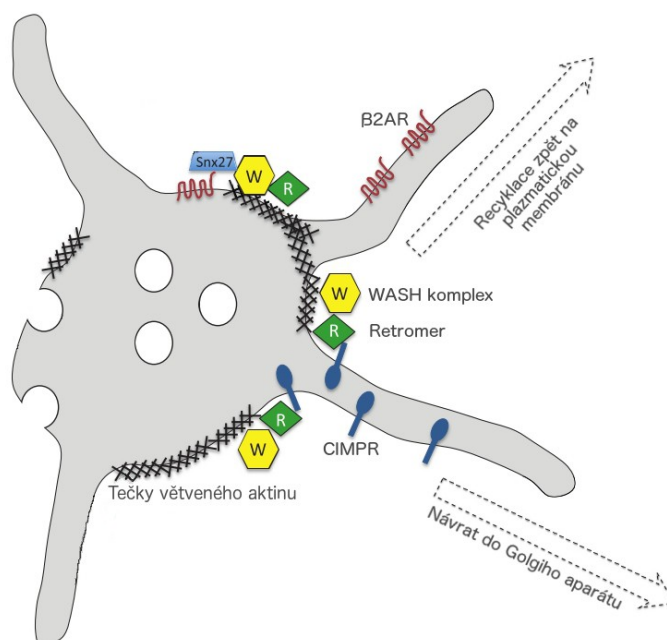
2. 2. 3. Lokalizace WASH komplexu v buňce

WASH komplex byl poprvé pozorován po overexpresi WASH1 v oblasti filopodií na plazmatické membráně v asociaci s aktinem (Linardopoulou *et al.*, 2007). Podle pozdějších prací se však WASH komplex vyskytuje na plazmatické membráně pouze v případě overexprese a nejedná se tedy o fyziologickou situaci. Tyto práce ukazují, že za normálních podmínek se WASH komplex vyskytuje uvnitř buněk na endozómech a kolokalizuje s tečkami větveného aktinu (z angl. actin patches). Díky společné vizualizaci proteinu WASH1 a markerů používaných k rozlišení subpopulací endozómů se zjistilo, že se WASH komplex vyskytuje především na membránách časných a recyklačních endozómů, méně pak na membránách pozdních endozómů (Derivery *et al.*, 2009; Gomez and Billadeau, 2009). Derivery a kol., na rozdíl od Gomez a kol., také uvádějí, že WASH komplex se v menší míře vyskytuje i na membráně lyzozómů (Derivery *et al.*, 2009; Gomez and Billadeau, 2009). Po depleci proteinu WASH1, a tedy výrazném narušení celého komplexu, dochází ke zhroucení endozomální a lyzozomální sítě v buňce. Endozómy lze poté pozorovat v perinukleární oblasti (Gomez *et al.*, 2012).

2. 2. 4. WASH komplex jako hlavní NPF na endozomální membráně

WASH komplex se podílí na třídění a recyklaci mnohých typů nákladu z endozómů do TGN nebo na plazmatickou membránu. Deplece WASH komplexu má vliv například na množství kation nezávislého manóza-6-fosfátového receptoru (CIMPR), který je poté, co dopraví

hydrolázu do endozómu, recyklován zpět do TGN (Gomez and Billadeau, 2009). Náklad recyklující pomocí WASH komplexu z endozómu na plazmatickou membránu je například $\alpha 5\beta 1$ integrin (Zech *et al.*, 2011) nebo $\beta 2$ -adrenergní receptor ($\beta 2AR$)(Puthenveedu *et al.*, 2010; Temkin *et al.*, 2011). V *Dictyostelium discoideum* je WASH komplex zodpovědný za recyklaci vakuolární ATPázy z lyzozómů zpět do endozómů a má tedy zásadní vliv na acidifikaci těchto organel (Carnell *et al.*, 2011). Jakým způsobem se WASH komplex podílí na transportu těchto nákladů? Bylo prokázáno, že WASH komplex je hlavním NPF na membráně endozómů. Zde aktivuje ARP2/3 komplex a ten následně na organelách vytváří tečky větveného aktinu. Funkce těchto větvených aktinových teček není zatím úplně zřejmá, ale účastní se společně s WASH komplexem procesů vedoucích ke vzniku a posléze odškrcení membránových tubulů z endozómů (**Obr. 5**). Po oddělení se z těchto tubulů stávají váčky (Derivery *et al.*, 2009; Gomez and Billadeau, 2009). Membránové tubuly tedy tvoří intermediát mezi váčky směřujícími k cílové destinaci a endozómem. Tubuly musí obsahovat mašinérii umožňující zachycení a nabohacení nákladu. Bylo zjištěno, že WASH komplex kolokalizuje s retromerem, proteinovým komplexem, který mimo jiné zprostředkovává třídění a recyklaci nákladu (**Obr. 5**)(Gomez and Billadeau, 2009; Seaman, 2012). Později byla prokázána i přímá interakce mezi podjednotkou WASH komplexu FAM21 a retromerem (Harbour *et al.*, 2010).



Obr. 5: Schéma WASH komplexu na membráně endozómu, kde umožňuje tvorbu teček větveného aktinu. Ty napomáhají vzniku membránových tubulů, které jsou intermediátem mezi recyklačním endozómem a odděleným váčkem směřujícím do cílové destinace. Upraveno dle (Seaman *et al.*, 2013).

2. 2. 5. WASH komplex a autofágie

WASH komplex se podílí nejen na výše uvedené tvorbě membránových tubulů pro třídění a recyklaci nákladu, ale účastní se i procesu autofágie. Na toto téma je dostupných několik prací, které prezentují na první pohled odlišné závěry. Jedna z těchto prací ukazuje, že v HeLa buňkách dochází po depleci WASH1 ke snížené tvorbě autofagozómů (Zavodszky *et al.*, 2014). Autoři další práce, tentokrát provedené v *D. discoideum*, ovšem po knockoutu WASH1 nepozorují žádné změny v tvorbě autofagozómů (King *et al.*, 2013). Obě tyto práce hodnotí pozorované efekty jako výsledek funkce WASH komplexu. Nicméně je zde i další práce, která uvádí, že po knockoutu WASH1 v myších fibroblastech dochází ke zvýšené tvorbě autofagozómů (Xia *et al.*, 2013). Dále ukazují, že WASH1 interaguje s proteinem Beclin 1. WASH1 zamezuje tomu, aby byl Beclin 1 ubikvitinován a aktivoval kinázu Vps34, která se podílí na procesech při zahájení autofágie. Xia a kol. přikládají výše uvedené pouze WASH1 proteinu, nikoliv celému WASH komplexu (Xia *et al.*, 2013). Je zřejmé, že WASH1 a tedy i WASH komplex hrají určitou, ač zatím ne zcela jasnou, roli v autofágii.

2. 2. 6. Interakční partneři WASH komplexu

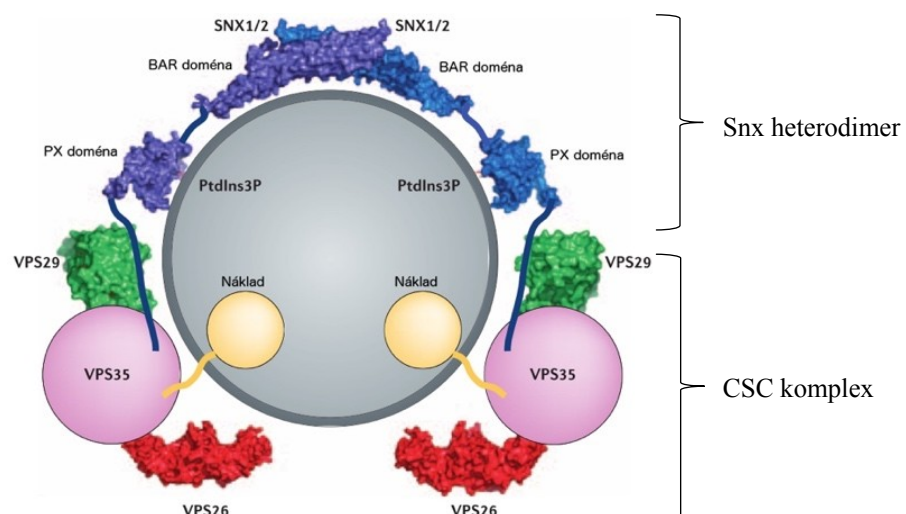
WASH komplex spolupracuje a interaguje s celou řadou dalších proteinů (**Tab. 1**). Zdá se, že největší podíl na tvorbě těchto interakcí má podjednotka FAM21, a to díky své dlouhé nestrukturované C-terminální doméně, neboť na tuto část FAM21 se váže řada proteinů (Derivery *et al.*, 2009; Jia *et al.*, 2010).

Podjednotka WASH komp.	Interakční partner	Funkce interakčního partnera	Citace
WASH1	TRIM 27	E3 ubikvitin ligáza – aktivace WASH komplexu	(Hao <i>et al.</i> , 2013)
	Beclin 1	regulace vzniku autofagozómů	(Xia <i>et al.</i> , 2013)
FAM21	CCDC93/22	tvoří CCC komplex (viz níže)	(Harbour <i>et al.</i> , 2012; Phillips-Krawczak <i>et al.</i> , 2015)
	CapZ α a β	regulace dynamiky aktinových vláken	(Derivery <i>et al.</i> , 2009)
	FKBP15	nejasná funkce	(Viklund <i>et al.</i> , 2009)
	RME-8	regulace vzniku membránových tubulů	(Freeman <i>et al.</i> , 2014)
	Snx27	podílí se s WASH komplexem na recyklaci nákladu zpět na plazmatickou membránu	(Steinberg <i>et al.</i> , 2013)
	Vps35/26	tvoří retromer (viz níže)	(Harbour <i>et al.</i> , 2010)

Tab. 1: Přehled vybraných interakčních partnerů WASH komplexu. Vysvětlení názvů/zkratek proteinů je s ohledem na přehlednost tabulky uvedeno pouze v seznamu zkratek.

2. 2. 6. 1. Struktura a funkce retromerů

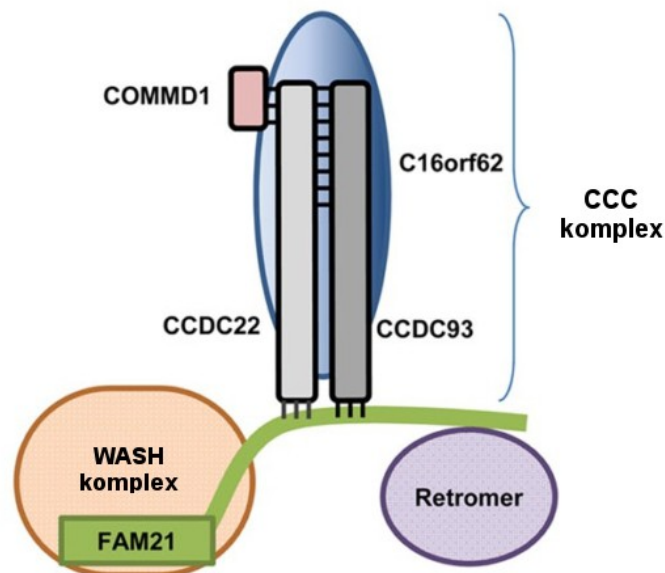
Retromer je jedním z významných interakčních partnerů WASH komplexu. Jedná se o velice evolučně konzervovaný proteinový komplex, který se u savců skládá ze dvou menších podkomplexů. Prvním je CSC (z angl. Cargo Selective Complex) sestávající se z proteinů Vps35, Vps29 a Vps26 a druhým je Snx heterodimer (z angl. Sorting nexin) skládající se z proteinů Snx1 a Snx5/6 nebo z Snx2 a Snx5/6 (Seaman, 2012). Přivázání retromerů k membráně zprostředkovávají jak Snx proteiny pomocí své Phox homologní (PX) domény, která umožňuje vazbu proteinu k fosfatidylinositol-3-fosfátu (PtdIns3P), tak interakce mezi CSC a v membráně vázanou malou GTPázou Rab7a. Retromer je rekrutován na membránu zrajících endozómů, jejichž znakem je společná přítomnost malých GTPáz Rab5 a Rab7a (Rojas *et al.*, 2008; Seaman, 2012). Snx tvořící heterodimer patří do podrodiny Snx-Bar proteinů, které mají Bin-Amphyphisin-Rvs (Bar) doménu. Tato doména umožňuje dimerizaci Snx proteinů, vazbu na zakřivené membrány a zároveň zřejmě k tvorbě tohoto zakřivení i napomáhá (Peter *et al.*, 2004). Bar domény jsou dalším faktorem, který se společně s WASH komplexem podílí na tvorbě již zmíněných membránových tubulů vycházejících z endozómů. V těchto tubulech dochází díky CSC k selektivnímu vychytání určitých typů nákladů (**Obr. 6**). Jak již bylo řečeno, tyto tubuly slouží jako intermediát mezi endozómem a menšími váčky, které dopravují náklad na konkrétní místa v buňce. Po oddělení tubulu od zbytku endozómu jsou vzniklé váčky dopraveny k cílové destinaci pomocí mikrotubulárního cytoskeletu (Seaman, 2012). Podle některých studií retromer na jedné straně ovlivňuje třídění nákladu, na druhé straně zakotvuje WASH komplex k endozomální membráně vazbou podjednotky WASH komplexu FAM21 (Harbour *et al.*, 2012; Jia *et al.*, 2012)



Obr. 6: Průřez membránovým tubulem a struktura retromerů při vychytávání nákladu. Upraveno dle (Bonifacino and Rojas, 2006).

2. 2. 6. 2. Struktura a funkce CCC komplexu

Dalším důležitým interakčním partnerem WASH komplexu je CCC komplex (Phillips-Krawczak *et al.*, 2015). Ten se skládá z proteinů CCDC22, CCDC93 (z angl. Coiled Coil Domain Containing protein), COMMD1 (z angl. Copper Metabolism MURR1 Domain-containing protein 1) a C16orf62 (z angl. Chromosome 16 Open Reading Frame 62)(Obr. 7). S WASH komplexem je CCC komplex asociován díky přímé vazbě CCDC93 na C-koncovou část FAM21. V současnosti není zřejmé, zda se na této vazbě podílí přímo i CCDC22 (Phillips-Krawczak *et al.*, 2015). Společně s WASH komplexem reguluje CCC komplex třídění a transport některých nákladů v buňce, např. transportéru měďnatých iontů ATP7A (z angl. ATPase Copper Transporting Alpha), LDL receptoru (z angl. Low Density Lipoprotein) nebo Notch2 (Li *et al.*, 2015; Phillips-Krawczak *et al.*, 2015; Bartuzi *et al.*, 2016). Bylo zjištěno, že CCDC22 může v savčích buňkách vázat proteiny COMMD1-10 (Starokadomskyy *et al.*, 2013). Není jasné, zdali CCDC22 dokáže vázat vždy pouze jeden nebo více COMMD proteinů zároveň. Různé COMMD proteiny mají schopnost se vázat mezi sebou navzájem. To by mohlo napovídat, že v buňce je možný výskyt více druhů CCC komplexů, které se pak mohou podílet na různých buněčných dějích včetně regulace dopravy velké škály nákladu (Li *et al.*, 2015; Phillips-Krawczak *et al.*, 2015; Bartuzi *et al.*, 2016).



Obr. 7: Schématická struktura CCC komplexu a jeho vazba s WASH komplexem. Upraveno dle (Phillips-Krawczak *et al.*, 2015).

3. Patologie spojené s WASH komplexem a jeho vybranými interakčními partnery

Vzhledem k významu WASH komplexu pro řadu buněčných dějů lze očekávat v případě jeho mutace či porušení vznik patologií. Mutace ve dvou podjednotkách WASH komplexu jsou spojeny s dědičnými onemocněními. Jde o několik mutací ve strumpellinu, které způsobují dědičnou spastickou paraplegii, a jednu mutaci ve SWIP, která vede k autosomálně recesivní lehké intelektuální poruše (Valdmanis *et al.*, 2007; Ropers *et al.*, 2011). K podobně závažnému patologickému projevu vedou i některé mutace interakčních partnerů WASH komplexu. Mutace v proteinu CCDC22, podjednotce CCC komplexu, způsobuje X-vázanou lehkou intelektuální poruchu (Voineagu *et al.*, 2012). Mutace ve Vps35, podjednotce retromeru, je spojena s Parkinsonovou nemocí (Vilarino-Guell *et al.*, 2011; Zimprich *et al.*, 2011). Na výše zmíněné lidské patologie a jejich spojitost s WASH komplexem či jeho interakčními partnery se zaměřují další části této bakalářské práce.

3. 1. Dědičná spastická paraplegie, její klinické příznaky a patofyziologie

Dědičné spastické paraplegie (HSP z angl. Hereditary Spastic Paraplegia) tvoří heterogenní skupinu genetických neurodegenerativních onemocnění, které mají vliv především na motoriku dolních končetin postiženého. Dnes je již známo více než 50 loků, které jsou asociovány s HSP. Většinou se jedná pouze o mutaci v jediném genu. Z toho plyne, že příčin vzniku HSP je velmi mnoho. Podle toho, zdali se postižený lokus nachází na autozómech nebo pohlavních chromozómech, a podle toho jak se tyto mutace projevují, může mít HSP dědičnost jak autosomálně dominantní, recesivní, tak i recesivní vázanou na X chromozóm. Mezi hlavní klinické příznaky HSP patří spasticita (tuhost) a slabost dolních končetin, problémy močové soustavy či lehká porucha poznávacích funkcí. Často se jedná o progresivní problémy. O komplikovanou HSP se jedná v případě dalších doprovodných příznaků, mezi které lze řadit demenci, ataxii, epilepsii, ztrátu zraku, či jiné. Z patofyziologického hlediska dochází u HSP především k degeneraci dlouhých axonů v kortikospinálním traktu. Ve většině případů však nejde o úplný úhyn neuronů, ale pouze o zničení či odumření axonu neuronu (Salinas *et al.*, 2008; Blackstone *et al.*, 2011).

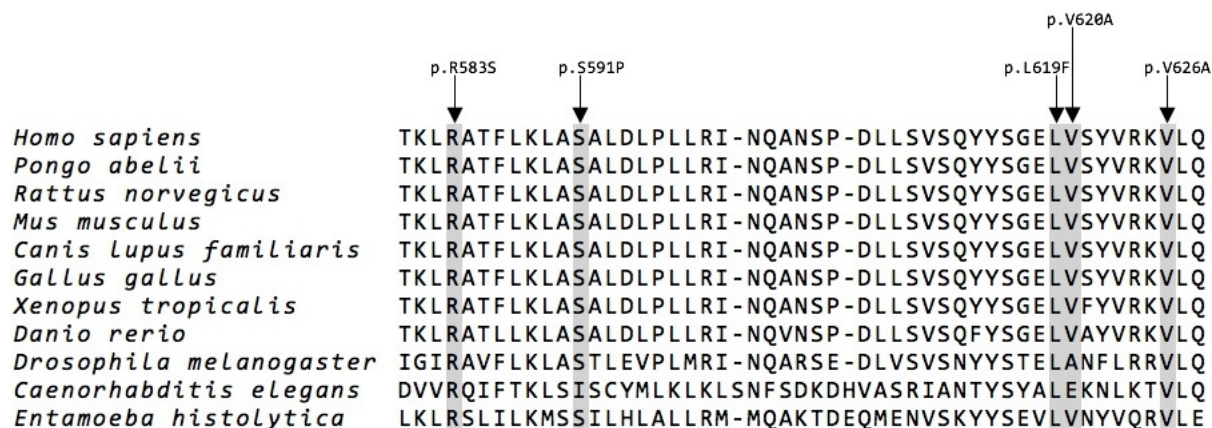
3. 1. 1. Strumpellin v dědičné spastické paraplegii

Gen pro strumpellin leží v lidském genomu na delším raménku chromozómu 8. Určité bodové mutace ve strumpellinu způsobují HSP (**Tab. 2**) s autosomálně dominantní dědičností (Salinas *et al.*, 2008; Fink, 2013). Velice často jde o záměnu vysoce evolučně konzervované

aminokyseliny. To vypovídá o důležitosti těchto aminokyselin v rámci proteinu. Každá ze zde uvedených mutací způsobuje HSP sama o sobě. Pokud se tyto mutace vyznačí do sekvence strumpellinu, lze vyznačit segment o délce 50 bází, ve kterém se vyskytuje 5 z 8 bodových mutací strumpellinu způsobujících HSP. To by mohlo ukazovat na důležitost tohoto úseku v HSP patofyziologii (**Obr. 8**). Nejčastěji je výsledným projevem těchto mutací autosomálně dominantní nekomplikovaná HSP s pozdním nástupem (Valdmanis *et al.*, 2007; de Bot *et al.*, 2013; Jahic *et al.*, 2014). Jahic a kol. diskutuje možnost, že spojitost mezi vznikem HSP a mutacemi I226T a N471D není dostatečně doložena. Autoři argumentují tím, že pro objevení mutací I226T a N471D byly použity pouze malé rodiny s komplexnějším fenotypem. Navíc predikce patogenity těchto mutací pomocí PolyPhen2 je také nízká (Jahic *et al.*, 2014).

Mutace	I226T	N471D	R583S	S591P	L619F	V620A	V626F	G696A
Citace	(Bettencourt <i>et al.</i> , 2013)	(Valdmanis <i>et al.</i> , 2007)	(Ishiura <i>et al.</i> , 2014)	(Wang Xianling <i>et al.</i> , 2014)	(Valdmanis <i>et al.</i> , 2007)	(Jahic <i>et al.</i> , 2014)	(Valdmanis <i>et al.</i> , 2007)	(de Bot <i>et al.</i> , 2013)

Tab. 2: Bodové mutace strumpellinu způsobující HSP



Obr. 8: Evoluční konzervovanost strumpellinu mezi aminokyselinami 580 a 630, s vyznačením mutací způsobujících HSP u člověka v tomto úseku. Vytvořeno pomocí databáze UniProt (Bateman *et al.*, 2015).

3. 1. 2. Způsob vzniku HSP u pacientů s mutantním strumpellinem

Způsob vzniku HSP u pacientů s mutovaným strumpellinem není doposud znám. Z hlediska narušení buněčné fyziologie lze HSP dělit do několika skupin. HSP způsobená mutací strumpellinu je řazena do skupiny, která má spojitost s porušením váčkového transportu (Blackstone *et al.*, 2011). Dosavadní výzkum poukazuje na několik možných důsledků

mutovaného strumpellinu, ze kterých lze usuzovat na příčiny vzniku HSP u pacientů s těmito mutacemi.

Autoři jedné z prací nepřímo ukazují na kultuře kortikálních neuronů, že v axonech těchto buněk je na časných endozómech podle očekávání přítomen jak WASH komplex, tak retromer (Freeman *et al.*, 2013). Dále také v HeLa buňkách pomocí co-imunoprecipitace WASH1 dokumentují, že exprimované mutantní formy strumpellinu (V626F, L619F a N471D) se stále začleňují do WASH komplexu stejně jako nemutovaný strumpellin. Navíc mutace V626F, L619F a N471D ve strumpellinu nezamezují asociaci WASH komplexu s retromerem (Freeman *et al.*, 2013). Jedním z nákladů, který prochází endocytickou dráhou je i transferin (Tf). Tf je za normálních okolností internalizován pomocí transferinového receptoru (TfR), který je posléze recyklován zpět na plazmatickou membránu. Pomocí průtokové cytometrie se dá změřit jaké množství fluorescenčně značeného Tf je za daných podmínek uvolněno do okolí buněk v důsledku recyklace TfR. V případě knockoutu WASH1 Freeman a kol. pozorují defekt v uvolňování transferinu a tedy defekt v recyklaci TfR. Nicméně mutantní strumpellin (V626F, L619F a N471D) podobný vliv na recyklaci TfR nemá. Tyto výsledky je třeba interpretovat opatrně, neboť není jasné, zda se WASH komplex skutečně podílí na recyklaci TfR. Existují práce, které spojitost mezi dopravou TfR a WASH komplexu pozorují (Derivery *et al.*, 2009; Freeman *et al.*, 2013), ale jsou i práce, které tvrdí opak (Duleh and Welch, 2010).

Několik proteinů, jejichž mutace ústí v HSP, se podílí na regulaci BMP signalizace (z angl. Bone Morphogenetic Protein). Za všechny lze uvést spastin či atlastin-1. Z tohoto důvodu se často uvádí BMP signalizace jako možný jednotící motiv HSP (Wang *et al.*, 2007; Tsang *et al.*, 2009; Blackstone *et al.*, 2011). BMP signalizace má vliv na růst a regeneraci axonů stejně tak jako na celou řadu dějů během vývoje jedince (Liu and Niswander, 2005; Matsuura *et al.*, 2008). Mezi interakční partnery strumpellinu patří i protein spartin (Zhao and Hedera, 2015), který se podílí například na transportu epidermálního růstového receptoru (Bakowska *et al.*, 2007). Samotný spartin byl ale také prokázán jako protein inhibující právě BMP signalizaci (Wang *et al.*, 2007; Tsang *et al.*, 2009). Mutace ve spartinu způsobuje taktéž HSP (Patel *et al.*, 2002). Strumpellin a spartin se zřejmě účastní společné dráhy v buňce, která v případě narušení ústí v HSP (Zhao and Hedera, 2015). Bylo by zajímavé zjistit, zdali již zmíněná oblast strumpellinu mezi aminokyselinami 580 a 630 nehraje ve vazbě a funkci těchto dvou proteinů důležitou roli.

Freeman a kol. poukazují v souvislosti s BMP signalizací na to, že Korolchuk a kol. po odstranění Vps35, interakčního partnera WASH komplexu, v *D. melanogaster* pozorují u motorických neuronů abnormální větvení axonálních výběžků. Stejný fenotyp, který se ustanoví po navýšení BMP signalizace (Freeman *et al.*, 2013; Korolchuk *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). Defekt ve větvení axonů pozoruje i Valdmanis a kol. v experimentech s expresí mutantního strumpellinu v *Danio rerio* (Valdmanis *et al.*, 2007). Po knockoutu strumpellinu v *D. rerio* dojde v motorických neuronech k abnormálnímu větvení axonů. Po obnovení exprese injekcí mRNA lidského strumpellinu dochází i k obnovení divokého fenotypu - abnormální větvení axonu zmizí. Po injekci mRNA mutantních forem (V626F, L619F) lidského strumpellinu k takovému obnovení divokého fenotypu nedojde. Injekcí mRNA mutantních forem strumpellinu do nemutovaných jedinců *D. rerio* není žádný mutantní fenotyp pozorován (Valdmanis *et al.*, 2007). Otázkou je, jaký jiný fenotyp, než změnu v morfologii axonu, lze při narušení motorických neuronů očekávat a pozorovat. Pouhou analýzou těchto dat nelze tvrdit nic bližšího o spojitosti mezi BMP signalizací a strumpellinem či celým WASH komplexem.

Autoři další práce vytvořili díky strategii cre/loxP myš s jedinou alelou strumpellinu. Strumpellin produkovaný z jedné alely je podle jejich výsledků dostatečný pro udržení funkce WASH komplexu v buňkách. Podle Jahic a kol. jsou mutace ve strumpellinu způsobující HSP tzv. ziskové (z angl. gain-of-function). Vznikající HSP tedy není vyvolána nedostatkem správně fungujícího strumpellinu, ale jeho novým abnormálním působením v buňce (Jahic *et al.*, 2015). Jedním z dalších interakčních partnerů strumpellinu je VCP (z angl. Valosis Containing Protein). VCP se účastní například přesunu proteinů odkázaných k degradaci z endoplasmatického retikula do proteazómů, či dějů vedoucích k sestavení jaderné membrány na konci mitózy (Wang *et al.*, 2004). Nedávno byla mutace ve VCP taktéž asociována s komplikovanou HSP (De Bot *et al.*, 2012). Je možné, že VCP se společně se strumpellinem účastní drah, jejichž narušení ústí v HSP. Mutace strumpellinu N471D interakci s VCP nenarušuje (Clemen *et al.*, 2010) Autoři nicméně nevěnovali pozornost dalším mutacím ve strumpellinu, které také stojí za vznikem HSP. Je prokázáno, že mutantní VCP se podílí na tvorbě agregátů v myopatiích (Hübbers *et al.*, 2007). Část těchto agregátů je tvořena i strumpellinem (Clemen *et al.*, 2010). Nicméně agregáty jsou pozorovány ve svalové tkáni a nikoliv v nervové, kde mutace strumpellinu ústí v HSP. Další otázkou je, zdali strumpellin s VCP interaguje závisle, či nezávisle na svém působení ve WASH komplexu.

3. 1. 3. Zhodnocení poznatků o HSP způsobené mutovaným strumpellinem

Z provedených experimentů jasně nevyplývá konkrétní důvod vzniku HSP u pacientů s mutantním strumpellinem. Zatím není prokázána spojitost mezi mutantním strumpellinem a narušením funkce WASH komplexu. I přesto Freeman a kol. v diskuzi své práce poukazují na to, že patologické příznaky by mohly být vyvolány haploinsuficiencí strumpellinu (Freeman *et al.*, 2013). U postižených pacientů je vedle mutované alely ještě druhá, nepoškozená alela strumpellinu. Část WASH komplexu v buňce by měla tedy fungovat normálně. To však stačí k udržení fyziologických funkcí pouze v buňkách s běžnou morfologií, nikoliv v neuronech kortikospinálního traktu, buňkách s extrémně dlouhými axony, kde jsou velké nároky na správnou funkci váčkového transportu (Freeman *et al.*, 2013). Jednou z možností je porušení BMP signalizace v důsledku narušení funkce WASH komplexu. Existují pouze dvě slabé spojitosti mezi BMP signalizací, strumpellinem a WASH komplexem, které se opírají o interakci WASH komplexu s Vps35 a interakci strumpellinu se spartinem (Korolchuk *et al.*, 2007; Freeman *et al.*, 2013; Zhao and Hedera, 2015). Veškeré zatím provedené pokusy je nutné konfrontovat s tím, že pacienti s mutací ve strumpellinu mají HSP s pozdním nástupem. Do doby nástupu onemocnění nemají většinou žádné příznaky a zdá se tedy, že ontogenetický vývoj, při kterém hraje BMP signalizace roli především, není poškozen. Další menší komplikací pro tuto hypotézu je to, že autoři práce, která ukazuje interakci strumpellinu a spartinu tvrdí, že tato interakce je ustanovena mimo WASH komplex (Zhao and Hedera, 2015). Vzhledem k tomu, že narušením většiny podjednotek WASH komplexu dochází k degradaci ostatních členů komplexu (Jia *et al.*, 2010) by bylo dobré tvrzení o samostatně fungujícím strumpellinu ověřit. Žádná další práce na toto téma však dosud nebyla publikována. Možnost, že mutantní strumpellin naruší dráhu, které se účastní strumpellin a VCP se zatím jeví méně pravděpodobná. Bez konkrétních experimentů, mířících na prokázání patofyziologického působení mutantního strumpellinu v interakci s VCP, nelze z tohoto hlediska usuzovat na nic bližšího.

3. 2. Dědičná Parkinsonova nemoc, její klinické příznaky a patofyziologie

Parkinsonova nemoc (PD) může být buďto idiopatická (bez jasné souvislosti s určitým genem) nebo dědičná (zapříčiněna konkrétní mutací). Dědičná PD se vyvíjí u pacientů, kteří nesou aminokyselinovou záměnu D620N v retromerové podjednotce Vps35 (Vilarino-Guell *et al.*, 2011; Zimprich *et al.*, 2011). Existují i některé další mutace Vps35 asociované s PD jejich spojitost však s PD není plně prokázána. I mutace D620N nevykazuje úplnou

penetranci (Kumar *et al.*, 2012). Jde o poměrně vzácnou příčinu vzniku PD. Tato mutace způsobuje u pacientů pouze 0,1 % ze všech případů PD. Avšak jedná se zřejmě o druhou nejčastější příčinu v rámci dědičné PD (Kumar *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2013). Projevem mutace D620N je dědičná autosomálně dominantní PD (Vilarino-Guell *et al.*, 2011; Zimprich *et al.*, 2011).

PD patří mezi progresivní neurodegenerativní onemocnění, které postihují nejčastěji starší lidi nad 65 let. Dřívější nástup tohoto onemocnění však není výjimkou. V průběhu tohoto onemocnění se postupně rozvíjejí jak pohybové poruchy, tak i poruchy nepohybové. Mezi pohybové poruchy lze řadit klidový třes, zpomalení pohybů, problémy s rovnováhou a jiné. Z poruch, které nepostihují pohyby pacienta, lze uvést demenci, ztrátu hlasu (hypofonii), halucinace, poruchy spánku a jiné (Davie, 2008; Perrett *et al.*, 2015). Hlavním patofyziologickým projevem PD na histologické úrovni je ztráta dopaminergních neuronů v substantia nigra. V případě PD dochází v tělech neuronů často k akumulaci nedegradovaných neuronálních proteinů, jako je například α -synuclein, a následné tvorbě inkluzí tzv. Lewyho tělísek. Ty mají zřejmě zásadní vliv i na odumírání dopaminergních neuronů v substantia nigra. Poškození v substantia nigra poté ústí v klinické příznaky (Davie, 2008; Sathiyamoorthy *et al.*, 2014; Perrett *et al.*, 2015). V kontextu PD patofyziologie také nelze opomenout časté narušení mitochondriálních funkcí, zvýšený oxidativní stres či defektní autofágii (Lynch-day *et al.*, 2015). V této práci se budu věnovat především mutaci D620N v retromerové podjednotce Vps35 v souvislosti s WASH komplexem.

3. 2. 1. WASH komplex a retromer v PD

WASH komplex se podílí na tvorbě membránových tubulů pro retromerem zprostředkované třídění nákladů v endozómu. Jakým způsobem se podílí tato mutace D620N ve Vps35 na vzniku PD není jasné. Podle některých studií zamezuje tato mutace ukotvení WASH komplexu k membráně endozómu, protože v nejrozšířenějším modelu právě Vps35 zprostředkovává přidržení WASH komplexu na endozomální membráně. Tím zabraňuje správné recyklaci a třídění nákladu procházejícího endocytickou drahou (McGough *et al.*, 2014; Zavodszky *et al.*, 2014). Z dostupných prací se dá usuzovat na dva hlavní mechanismy, které by mohly v kontextu interakce WASH komplex – retromer v případě mutace D620N vést ke vzniku PD a jsou uvedeny níže.

McGough a kol. ukazují *in vitro* pomocí isotermální titrační kalorimetrie narušení vazby mezi podjednotkou WASH komplexu FAM21 a mutantním Vps35 D620N. WASH komplex a retromer zajišťují za normálních podmínek recyklaci již zmíněného proteinu CIMPR. V RPE1 buňkách s mutací D620N je recyklace CIMPR porušena (McGough *et al.*, 2014). Nicméně Zavodszky a kol. tento defekt v HeLa buňkách nepozorují a stejně tak ani Tsika a kol. v kultuře primárních lidských fibroblastů (Tsika *et al.*, 2014; Zavodszky *et al.*, 2014b). CIMPR dopravuje za normálních okolností do pozdních endozómů i proteázu Cathepsin D, která zde pak vykonává svoji funkci a degraduje proteiny. V momentě, kdy je porušena recyklace CIMPR, je sníženo i množství proteázy, které je dopravováno pomocí CIMPR do pozdních endozómů (King *et al.*, 2013; Follett *et al.*, 2014). Výsledkem je nejspíše špatná degradace řady proteinů, mezi které patří i α -synuclein (Follett *et al.*, 2014). Jak již bylo zmíněno výše, α -synuclein v případě špatné degradace vytváří agregáty podílející se na tvorbě Lewyho tělísek, které jsou, hlavním patofyziologickým znakem a zřejmě i příčinou PD. Je nutné zmínit, že autoři jedné práce, která ukazuje defektní dopravu proteázy Cathepsin D v případě Vps35 D620N tvrdí v závěru bez uveřejněných dat, že nepozorují rozdíl ve vazbě WASH komplexu a retromeru (Follett *et al.*, 2014). Je však zajímavé, že jejich výsledky ukazují jak v případě buněk A431 exprimujících Vps35 D620N, tak v případě fibroblastů izolovaných z pacientů s touto mutací, více perinukleárně umístěné endozómy, typický fenotyp jako po depleci WASH1 z buňky (Gomez *et al.*, 2012). To by naopak napovídalo, že v případě Vps35 D620N skutečně dochází k narušení rekrutování WASH komplexu k membráně endozómu.

Zavodszky a kol. stejně jako McGough a kol. pozorují, že přítomnost mutace D620N ve Vps35 narušuje po expresi v HeLa buňkách vazbu mezi WASH komplexem a retromerem. Místo porušené dopravy CIMPR pozorují defekt v tvorbě autofagozómů. Pomocí overexprese C koncové části FAM21, přes kterou se WASH komplex váže s retromerem v nemutovaných HeLa buňkách, jsou schopni získat stejný fenotyp jako u stejných buněk exprimujících mutantní Vps35, které mají defektní tvorbu autofagozómů (Zavodszky *et al.*, 2014). Tím ukazují, že porušení vazby mezi WASH komplexem a retromerem ústí v narušení autofágie. Dále také ukazují, že tato mutace vede ke špatné dopravě proteinu ATG9A (z angl. Autophagy related 9A), který se za normálních okolností podílí na autofágii (Zavodszky *et al.*, 2014). V autofagozómech dochází k odstraňování řady těžko degradovatelných buněčných produktů, mezi nimi i agregátů α -synucleinu (Webb *et al.*, 2003). Při narušení

tvorby autofagozómů lze tedy očekávat, že dojde k navýšení množství agregátů α -synucleinu v buňce a posléze i jeho neurotoxickému působení.

3. 2. 2. Alternativní možnosti vzniku dědičné PD způsobené mutací Vps35

Studie Zavodszky a kol. a McGough a kol. se shodují v tom, že v případě mutace D620N v retromerové podjednotce Vps35 je porušena vazba WASH komplexu s retromerem, což může vést k akumulaci agregátů α -synucleinu (Zavodszky *et al.*, 2014) a tedy nejspíše i tvorbě Lewyho tělísek v dopaminergních neuronech v substantia nigra. Nicméně Tsika a kol. nepozorují po expresi D620N Vps35 v myším mozku rozdíl v celkové distribuci α -synucleinu v substantia nigra (Tsika *et al.*, 2014). McGough a kol. navíc uvažují v závěru své práce o snížené aktivitě proteinů, které se vážou k WASH komplexu a retromeru. Jednalo by se například o proteiny RME-8, či FKBP15 (McGough *et al.*, 2014). Mutantní forma RME-8 je navíc také asociována s PD (Vilariño-Güell *et al.*, 2014). Důvod vzniku PD u pacientů s mutantním Vps35 může ležet i jinde, protože některé práce ukazují, že mutace D620N ve Vps35 způsobující PD mají zásadní dopad na procesy spojené s mitochondriemi (Bi *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015). Jedna z těchto prací ukazuje, že mutace D620N má vliv na dynamiku mitochondriální sítě (Wang *et al.*, 2015). Další práce ukazuje, že buňky s mutací D620N mají oproti wt zvýšenou citlivost proti toxickému působení inhibitoru mitochondriálního komplexu I (MPP⁺), dochází tak ke ztrátě neuroprotektivního účinku Vps35 (Bi *et al.*, 2013). Naopak Tsika a kol. pozorují jak po overexpresi nemutovaného, tak i D620N Vps35 v kultuře kortikálních neuronů i v myším mozku zvýšenou úmrtnost neuronů (Tsika *et al.*, 2014).

Otázkou tedy zůstává, která z výše uvedených možností je zásadní pro vznik PD u pacientů s mutací D620N v retromerové podjednotce Vps35 a co přesně způsobuje úhyn dopaminergních neuronů v substantia nigra.

3. 3. Lehká intelektuální porucha

Mutace v podjednotce WASH komplexu a jeho interakčním partneru je dáována do souvislosti i s dalším onemocněním. Jedná se o lehkou intelektuální poruchu (LID, z angl. Light Intellectual Disability), která je způsobována mutací v podjednotce WASH komplexu SWIP a také mutací v podjednotce CCC komplexu CCDC22 (**Tab. 3**). LID patří mezi velice heterogenní skupinu genetických poruch. Jedná se o variantu mentální retardace. U pacientů

se vyskytují celkem 2 druhy LID, bez doprovodných příznaků, nebo s nimi. X-vázaná lehká intelektuální porucha (X-LID) způsobená mutacemi v CCDC22 se vyskytuje s i bez doprovodných příznaků (Voineagu *et al.*, 2012; Starokadomskyy *et al.*, 2013; Kolanczyk *et al.*, 2014). Vzhledem k nedostatku prací a poznatků na variantu X-LID bez doprovodných příznaků způsobenou mutacemi v CCDC22 se však v této práci budu věnovat variantě, která se těmito příznaky vyznačuje. Dvě bodové mutace v CCDC22, nezávisle na sobě, způsobují X-LID s doprovodnými příznaky (Voineagu *et al.*, 2012; Starokadomskyy *et al.*, 2013). Autosomálně recesivní intelektuální porucha (ARID, z angl. Autosomal recessive intellectual disability), způsobená bodovou mutací ve SWIP, je verzí LID bez doprovodných příznaků (Ropers *et al.*, 2011). Dle publikací jde většinou o záměny ve velmi evolučně konzervovaných aminokyselinách (Ropers *et al.*, 2011; Kolanczyk *et al.*, 2014).

Protein	Mutace	Patologie	Citace
CCDC22	T17A, Y557C	X-LID s doprovodnými příznaky	(Voineagu <i>et al.</i> , 2012; Kolanczyk <i>et al.</i> , 2014)
	T30A, R128Q, E239K, R321W	X-LID bez doprovodných příznaků	(Starokadomskyy <i>et al.</i> , 2013)
SWIP	P1019R	ARID s doprovodnými příznaky	(Ropers <i>et al.</i> , 2011)

Tab. 3: Mutace ve WASH komplexu a jeho interakčních partnerech způsobující LID

3. 3. 1. Klinické příznaky a patofyziologie LID

Obecně shrnout klinické příznaky LID, kromě sníženého IQ, by bylo vzhledem k variabilitě ve vzniku a v projevu onemocnění velmi náročné. Z tohoto důvodu uvedu pouze klinické a patofyziologické příznaky pacientů, kteří mají X-LID nebo ARID způsobenou mutací v CCDC22 a SWIP. Mezi klinické příznaky pacientů s ARID patří malý vzrůst, výrazné opoždění psychomotorického vývoje, poruchy v učení a řeči (Ropers *et al.*, 2011). Mezi klinické příznaky pacientů s X-LID s doprovodnými příznaky patří poruchy srdce, jako jsou defekt septa komor a síní, či dextrokardie a poruchy kosterní soustavy, mezi které lze řadit syndaktylii či skoliózu. Příznaky zahrnují i narušení CNS, mezi které lze zahrnout například hypoplázii mozečku ale i zpomalení psychomotorického vývoje a poruchy řeči (Voineagu *et al.*, 2012; Kolanczyk *et al.*, 2014). Pacienti s mutací v CCDC22 trpí hypercholesterémií (Bartuzi *et al.*, 2016), zvýšeným množstvím sérových měďnatých iontů a sérového ceruloplazminu (Phillips-Krawczak *et al.*, 2015), plazmatické bílkoviny, která váže atomy

mědi. Ceruloplazmin navíc zabraňuje oxidativnímu poškození tím, že napomáhá oxidaci železnatých iontů na železité (Hellman and Gitlin, 2002).

3. 3. 2. Vznik X-LID s doprovodnými příznaky u pacientů s mutacemi v CCDC22

Pacienti nesoucí jednu ze dvou mutací v genu CCDC22 způsobující X-LID s doprovodnými příznaky (**Tab. 3**) mají identické klinické příznaky (Kolanczyk *et al.*, 2014). Mechanismus vzniku patologie bude pravděpodobně také stejný. Recentní práce ukazují na několik možných důvodů vzniku této patologie. Mutace T17A snižuje množství mRNA tohoto genu v buňkách postiženého jedince. Voineagu a kol. uvažují, že tato mutace má vliv na blízké 5' sestřihové místo a zároveň narušuje pozitivní zpětnovazebnou smyčku nutnou pro efektivní transkripci (Voineagu *et al.*, 2012). Jak již bylo uvedeno výše, CCDC22 je členem CCC komplexu, který se společně s WASH komplexem podílí na dopravě a třídění některých nákladů. Mutace T17A narušuje interakci mezi CCDC22 a COMMD1 v rámci CCC komplexu a má tak zásadní dopad na jeho stabilitu (Starokadomskyy *et al.*, 2013; Phillips-Krawczak *et al.*, 2015). Přitom je známo, že porušení CCC komplexu knockoutem COMMD1 vede k defektu v dopravě LDLR (z angl. Low Density Lipoprotein Receptor) v myších embryonálních fibroblastech. LDLR za normálních okolností umožňuje buňkám internalizaci LDL partikulí obsahujících cholesterol (Jeon and Blacklow, 2005). Dohromady by tyto dva fakty mohly vysvětlit hypercholesterémii postižených pacientů (Bartuzi *et al.*, 2016). Pomocí fibroblastů izolovaných z pacientů s mutací T17A se podařilo ukázat, že tato mutace, stejně jako knockdown COMMD1, narušuje dopravu ATP7A v odpovědi na změnu měďnatých iontů v prostředí. Za normálních okolností, při nízké hladině mědi v buňkách, je udržován ATP7A v TGN. Po navýšení hladiny mědi v buňkách dochází k dopravě ATP7A na plazmatickou membránu. Zde funguje jako transportér (ATPáza P.typu) přenášející měďnaté ionty ven z buňky (Wang *et al.*, 2011). Ač pacienti s X-LID nemají příznaky toxického působení mědi na organismus, prohloubením těchto poznatků by mohla být vysvětlena jejich zvýšená hladina sérového ceruloplazminu a sérových měďnatých iontů (Phillips-Krawczak *et al.*, 2015). Narušení CCC komplexu umlčením CCDC93 nebo C16orf62 vedlo ke sníženému množství Notch2 v plasmatické membráně buněk HeLa (Li *et al.*, 2015). Notch2 je důležitým hráčem v Notch signalizaci, která je zásadní během vývoje jedince. Zatím tedy zůstává nezodpovězeno, který z pozorovaných defektů je příčinou LID u pacientů s mutací T17A. V případě mutace Y557C byla snížená exprese CCDC22 zjištěna pouze pomocí western blotu (Kolanczyk *et al.*, 2014). Zůstává tedy otázkou, jde-li v tomto případě o snížení transkripce,

translace, či sníženou stabilitu proteinu a jeho degradaci. Bylo by dobré v některé z dalších prací zjistit, jaký vliv má tato mutace na fungování a stabilitu CCC komplexu.

3. 3. 3. Vznik X-LID bez doprovodných příznaků u pacientů s mutacemi v CCDC22

Bodových mutací v CCDC22, které způsobují X-LID bez doprovodných příznaků je několik, nicméně poznatků je k nim velice málo. Existuje pouze jediná práce, která tyto mutace popsala a většině z nich není ani zde věnována dostatečně velká pozornost (Starokadomskyy *et al.*, 2013). Autoři v práci uvádějí, že po overexpresi CCDC22 s aminokyselinovou záměnou R128Q či R321W dochází oproti divokému typu k redistribuci tohoto proteinu uvnitř buňky (Starokadomskyy *et al.*, 2013). O této redistribuci však lze vznést pochybnost. Rozdíl v distribuci mezi mutovaným a nemutovaným CCDC22 s YFP (z angl. Yellow Fluorescent Protein) značkou vidět sice na jednom obrázku je, ale na jiném místě té samé práce autoři prezentují v případě overexprese CCDC22 s připojeným GFP (z angl. Green Fluorescent Protein) značně rozdílný fenotyp. Do jaké míry je toto způsobeno nešťastnou volbou prezentovaných obrázků nebo jde o špatně interpretovaná data, zůstává nejasné.

3. 3. 4. Vzniku ARID u pacientů s mutací ve SWIP

Doposud není známo, proč bodová mutace SWIP P1019R způsobuje autosomálně recesivní lehkou intelektuální poruchu (ARID). Na dané téma je pouze jedna práce, která mutaci pomocí homozygotního mapování a sekvenace odhalila (Ropers *et al.*, 2011). Autoři této práce také vytvořili lymfoblastoidní buněčnou linii, která pocházela z postižených jedinců. Na této buněčné linii ukazují, že mutace P1019R ve SWIP zapříčinila snížené množství nejen tohoto proteinu ale i snížené množství WASH1 a strumpellinu. Z toho tedy usuzují, že mutace narušuje stabilitu WASH komplexu a snižuje tak i jeho množství v buňce (Ropers *et al.*, 2011). Z předchozích prací zabývajících se WASH komplexem je známo, že po depleci SWIP dochází k degradaci ostatních podjednotek (Jia *et al.*, 2010). Je tedy možné, že tato mutace narušuje stabilitu WASH komplexu. Výsledkem by poté bylo snížené množství funkčního WASH komplexu (Ropers *et al.*, 2011). Na druhou stranu částečná funkčnost WASH komplexu i s mutantním SWIP musí být zachována, protože myši zbavené WASH komplexu knockoutem WASH1 podjednotky nejsou životaschopné (Gomez *et al.*, 2012). Jak již bylo zmíněno dříve, WASH komplex hraje důležitou roli v endozomálním transportu a zprostředkovaně přes své interakční partnery má též vliv i na autofáгии (King *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2013; Zavodszky *et al.*, 2014) a řadu signalizačních drah důležitých pro správný vývoj

jedinice (viz výše). Mezi tyto signalizační dráhy patří například i Notch signalizace (Li *et al.*, 2015). Lze si představit, že i jemné narušení WASH komplexu pak vede ke vzniku patologie. Přesný mechanismus vzniku ARID u pacientů s mutací P1019R ve SWIP zůstává zatím neodhalen.

3. 3. 5. Zhodnocení poznatků o LID způsobené mutacemi v CCDC22 nebo SWIP

Zajímavým poznatkem je značný překryv klinických/patofyziologických příznaků mezi pacienty s X-LID způsobenou mutací v CCDC22 a Ritscher-Shinzelovým syndromem (RSS), který je za normálních okolností také projevem jedné mutace ve WASH komplexu, konkrétně v podjednotce strumpellinu. Pomocí western blotu bylo zjištěno, že mutace způsobující RSS navíc snižuje množství strumpellinu v buňkách pacientů průměrně o 60 % (Elliott *et al.*, 2013; Kolanczyk *et al.*, 2014). Jak je tedy vidět mutace P1019R ve SWIP a mutace T17A a Y557C v CCDC22 mají za důsledek vznik stejné, či velice podobné patologie. To odpovídá současnému modelu spolupráce WASH komplexu s CCC komplexem. Zdá se tedy, že tyto patologie vznikají jako důsledek narušení třídící mašinerie asociované s WASH komplexem. Nakonec je nutné zmínit, že CCDC22 a COMMD proteiny se zřejmě nezávisle na fungování v CCC komplexu podílejí i na regulaci NF-KB signalizace (Starokadomskyy *et al.*, 2013). Je tedy možné, že zásadní příčina LID u pacientů s mutacemi v CCDC22 leží i mimo WASH komplex asociovaný CCC komplex. To nicméně neulehčuje vysvětlení patogeneze ARID u pacientů s mutací P1019R ve SWIP.

3. 4. Další patologie asociované s WASH komplexem – Alzheimerova nemoc

Mutace v podjednotce WASH komplexu SWIP jsou u některých pacientů asociovány s Alzheimerovou nemocí (AD, z angl. Alzheimer disease). Byla nalezena celá řada jednonukleotidových záměn v proximální části genu pro SWIP, které mají statisticky signifikantní spojitost se vznikem AD (Vardarajan *et al.*, 2012). Avšak vzhledem k malému počtu prací na toto téma nelze zatím činit jednoznačné závěry. Zajímavé je, že velmi mnoho poznatků na AD je spojeno s retromerem, který je v této patologii poměrně často deregulován. Úroveň exprese retromerových podjednotek Vps35 a Vps26 je například výrazně snížena v hipokampu pacientů s AD (Small and Petsko, 2015; Li *et al.*, 2016). Zatím nebyl publikován jediný článek, který by napovídal na možný mechanismus vzniku AD u pacientů s jednou z některých bodových mutací ve SWIP.

4. Závěr

WASH komplex hraje společně se svými interakčními partnery nezastupitelnou roli v regulaci aktinového cytoskeletu na endozomální membráně, což má posléze dopad na dopravu, třídění a recyklaci nákladu procházejícího endocytickou drahou. Je logické, že mutace v jeho podjednotkách, či asociovaných interakčních partnerech ústí v celou řadu patologií. Tyto patologie postihují především CNS, což ukazuje na důležitost WASH komplexu pro tuto tkáň. Zajímavé je, že tři patologie - HSP, AD a PD jsou progresivní neurodegenerativní onemocnění, které mají nástup až v pozdějším věku. Znamená to, že ontogenetický vývoj u těchto pacientů není poškozen a že patofyziologický projev mutací, které stojí za těmito onemocněními, má kumulativní účinek. Naopak dvě patologie – LID a RSS se projevují komplexním poškozením již po narození. Lze tedy tvrdit, že zde je narušení funkce WASH komplexu a jeho interakčních partnerů natolik vážné, že není umožněn normální vývoj CNS.

Mechanismus vzniku HSP způsobené jednou z mutací ve strumpellinu, není znám. Ačkoliv bylo publikováno několik prací na toto téma, stále není jasné, proč degenerují s přibývajícím věkem pacientů výhradně axony neuronů kortikospinalního traktu. Je třeba zjistit, zda jde pouze o důsledek vysokých nároků kladených na intracelulární transport v souvislosti s extrémně dlouhými axony, či projev mutace v konkrétním buněčném typu. Bylo by dobré detailně prostudovat interakci mezi strumpellinem a spartinem, či VCP. To, že mutace v každém z těchto tří proteinů může způsobovat HSP nebude zřejmě náhoda.

Ani příčina PD způsobené mutací v retromerové podjednotce Vps35, interakčním partneru WASH komplexu, není známa. Jsou zde náznaky mechanismů, které mohou dát vzniknout některému z příznaků PD, jako je třeba tvorba agregátu α -synucleinu. To ovšem neodpovídá na zásadní otázku, proč dochází k úhynu především dopaminergních neuronů v substantia nigra stárnoucích pacientů. Je zde také velká šance, že hlavní příčina leží jinde než na rozmezí WASH komplexu a retromeru. Retromer je daleko lépe prozkoumán než WASH komplex a z tohoto důvodu je k dispozici více hypotéz o vzniku PD v případě mutace Vps35. Rozebrat tyto hypotézy z jiného hlediska než interakce WASH komplexu s Vps35 však nebylo účelem této práce, ač by to bylo velmi zajímavé.

Stejně jako u HSP a PD ani v případě LID není příčina vzniku této patologie u pacientů s mutacemi ve SWIP a CCDC22 známa. WASH komplex hraje nezastupitelnou roli

v embryogenezi jedince. I přes nespornou závažnost patologického stavu pacientů s LID je však pozorovaný fenotyp mírnější než by se dalo čekat u poškození esenciálního genu. Hlavní funkce WASH komplexu (endozomální NPF) je tedy porušena buďto jen částečně anebo vůbec. Je možné, že je narušena jiná, dosud nepopsaná funkce WASH komplexu.

Funkce jednotlivých podjednotek WASH komplexu i celé řady jeho interakčních partnerů jsou velmi málo popsány. Kromě WASH1, FAM21 a Vps35 je poznatků o dané podjednotce či interakčním partnerovi poskrovnu. Zdá se nepravděpodobné, že by pozorované a zároveň takto rozdílné patologie mohly být pouze projevem narušení WASH komplexu jako endozomálního NPF, na což se řada provedených prací zaměřila. Pozorované fenotypy u postižených pacientů by pravděpodobně byly v takovém případě velice podobné. Dá se tedy očekávat, že WASH komplex společně s jeho interakčními partnery má, jak už bylo zmíněno o odstavci výše, i další zatím málo charakterizované nebo vůbec nepopsané funkce. Narušení těchto zatím neznámých funkcí by mohlo být skutečným důvodem vzniku některých ze zde uvedených patologií.

Velmi užitečné by z tohoto hlediska mohlo být vytvoření knock-in zvířecích modelů pro dané mutace. Každá z patologií klade poměrně specifické nároky na model, ve kterém jsou experimenty prováděny. Například u HSP lze spekulovat o vhodnosti myšího modelu vzhledem k velkému rozdílu v délce axonů neuronů kortikospinálního traktu člověka a myši. V případě LID a RSS, zřejmě velice komplexních patologií, lze vznést pochybnost o vhodnosti tkáňových kultur. V případě strumpellinu je velká část mutací způsobující HSP v regionu neidentifikované domény. Zde se tedy nabízí prostor pro další výzkum. Získání nových poznatků o WASH komplexu a jeho interakčních partnerech je jedním z předpokladů pro úspěšnou léčbu zde uvedených patologií.

5. Použitá literatura

- Anitei, M., and Hoflack, B. (2011). Bridging membrane and cytoskeleton dynamics in the secretory and endocytic pathways. *Nat. Cell Biol.* *14*, 11–19.
- Bakowska, J. C., Jupille, H., Fatheddin, P., Puertollano, R., and Blackstone, C. (2007). Troyer Syndrome Protein Spartin Is Mono-Ubiquitinated and Functions in EGF Receptor Trafficking. *Mol. Biol. Cell* *18*, 1683–1692.
- Bartuzi, P. *et al.* (2016). CCC- and WASH-mediated endosomal sorting of LDLR is required for normal clearance of circulating LDL. *Nat. Commun.* *7*, 10961.
- Bateman, A. *et al.* (2015). UniProt: A hub for protein information. *Nucleic Acids Res.* *43*, D204–D212.
- Bettencourt, C., Morris, H. R., Singleton, A. B., Hardy, J., and Houlden, H. (2013). Exome sequencing expands the mutational spectrum of SPG8 in a family with spasticity responsive to l-DOPA treatment. *J. Neurol.* *260*, 2414–2416.
- Bi, F., Li, F., Huang, C., and Zhou, H. (2013). Pathogenic mutation in VPS35 impairs its protection against MPP⁺ cytotoxicity. *Int. J. Biol. Sci.* *9*, 149–155.
- Blackstone, C., Kane, C. J. O., Reid, E., O’Kane, C. J., and Reid, E. (2011). Hereditary spastic paraplegias: membrane traffic and the motor pathway. *Nat. Rev. Neurosci.* *12*, 31–42.
- Bonifacino, J. S., and Glick, B. S. (2004). The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. *Cell* *116*, 153–166.
- Bonifacino, J. S., and Rojas, R. (2006). Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 568–579.
- de Bot, S. T., Schelhaas, H. J., Kamsteeg, E. J., and Van De Warrenburg, B. P. C. (2012). Hereditary spastic paraplegia caused by a mutation in the VCP gene. *Brain* *135*.
- de Bot, S. T., Vermeer, S., Buijsman, W., Heister, A., Voorendt, M., Verrrips, A., Scheffer, H., Kremer, H. P. H., van de Warrenburg, B. P. C., and Kamsteeg, E.-J. (2013). Pure adult-onset spastic paraplegia caused by a novel mutation in the KIAA0196 (SPG8) gene. *J. Neurol.* *260*, 1765–1769.
- Campellone, K. G., and Welch, M. D. (2010). A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 237–251.
- Carnell, M., Zech, T., Calaminus, S. D., Ura, S., Hagedorn, M., Johnston, S. A., May, R. C., Soldati, T., Machesky, L. M., and Insall, R. H. (2011). Actin polymerization driven by WASH causes V-ATPase retrieval and vesicle neutralization before exocytosis. *J. Cell Biol.* *193*, 831–839.
- Clemen, C. S. *et al.* (2010). Strumpellin is a novel valosin-containing protein binding partner linking hereditary spastic paraplegia to protein aggregation diseases. *Brain* *133*, 2920–2941.
- Davie, C. A. (2008). A review of Parkinson’s disease. *Br. Med. Bull.* *86*, 109–127.
- Deng, H., Gao, K., and Jankovic, J. (2013). The VPS35 gene and Parkinson’s disease. *Mov. Disord.* *28*, 569–575.
- Derivery, E., Sousa, C., Gautier, J. J., Lombard, B., Loew, D., and Gautreau, A. (2009). The Arp2/3 activator WASH controls the fission of endosomes through a large multiprotein complex. *Dev. Cell* *17*, 712–723.

- Duleh, S. N., and Welch, M. D. (2010). WASH and the Arp2/3 complex regulate endosome shape and trafficking. *Cytoskeleton* *67*, 193–206.
- Elliott, A. M., Simard, L. R., Coghlan, G., Chudley, A. E., Chodirker, B. N., Greenberg, C. R., Burch, T., Ly, V., Hatch, G. M., and Zelinski, T. (2013). A novel mutation in KIAA0196: identification of a gene involved in Ritscher-Schinzel/3C syndrome in a First Nations cohort. *J. Med. Genet.* *50*, 819–822.
- Fink, J. K. (2013). Hereditary spastic paraplegia: Clinico-pathologic features and emerging molecular mechanisms. *Acta Neuropathol.* *126*, 307–328.
- Follett, J. *et al.* (2014). The Vps35 D620N mutation linked to Parkinson’s disease disrupts the cargo sorting function of retromer. *Traffic* *15*, 230–244.
- Freeman, C. L., Hesketh, G., and Seaman, M. N. J. (2014). RME-8 coordinates the activity of the WASH complex with the function of the retromer SNX dimer to control endosomal tubulation. *J. Cell Sci.* *127*, 2053–2070.
- Freeman, C., Seaman, M. N. J., and Reid, E. (2013). The hereditary spastic paraplegia protein strumpellin: characterisation in neurons and of the effect of disease mutations on WASH complex assembly and function. *Biochim. Biophys. Acta* *1832*, 160–173.
- Gomez, T. S., and Billadeau, D. D. (2009). A FAM21-containing WASH complex regulates retromer-dependent sorting. *Dev. Cell* *17*, 699–711.
- Gomez, T. S., Gorman, J. a., Artal-Martinez de Narvajias, a., Koenig, a. O., and Billadeau, D. D. (2012). Trafficking defects in WASH-knockout fibroblasts originate from collapsed endosomal and lysosomal networks. *Mol. Biol. Cell* *23*, 3215–3228.
- Hao, Y. H., Doyle, J. M., Ramanathan, S., Gomez, T. S., Jia, D., Xu, M., Chen, Z. J., Billadeau, D. D., Rosen, M. K., and Potts, P. R. (2013). Regulation of WASH-dependent actin polymerization and protein trafficking by ubiquitination. *Cell* *152*, 1051–1064.
- Harbour, M. E., Breusegem, S. Y. a, Antrobus, R., Freeman, C., Reid, E., and Seaman, M. N. J. (2010). The cargo-selective retromer complex is a recruiting hub for protein complexes that regulate endosomal tubule dynamics. *J. Cell Sci.* *123*, 3703–3717.
- Harbour, M. E., Breusegem, S. Y., and Seaman, M. N. J. (2012). Recruitment of the endosomal WASH complex is mediated by the extended “tail” of Fam21 binding to the retromer protein Vps35. *Biochem. J.* *442*, 209–220.
- Hellman, N. E., and Gitlin, J. D. (2002). Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* *22*, 439–458.
- Hübbers, C. U. *et al.* (2007). Pathological consequences of VCP mutations on human striated muscle. *Brain* *130*, 381–393.
- Insall, R. H., and Veltman, D. M. (2010). WASP Family Proteins: Their Evolution and Its Physiological Implications. *Mol. Biol. Cell* *21*, 4325–4337.
- Ishiura, H. *et al.* (2014). Molecular epidemiology and clinical spectrum of hereditary spastic paraplegia in the Japanese population based on comprehensive mutational analyses. *J. Hum. Genet.* *59*, 163–172.
- Jahic, A. *et al.* (2015). The spectrum of KIAA0196 variants, and characterization of a murine knockout: implications for the mutational mechanism in hereditary spastic paraplegia type SPG8. *Orphanet J. Rare Dis.* *10*, 147.

- Jahic, A., Kreuz, F., Zacher, P., Fiedler, J., Bier, A., Reif, S., Rieger, M., Kruger, S., Beetz, C., and Plaschke, J. (2014). A novel strumpellin mutation and potential pitfalls in the molecular diagnosis of hereditary spastic paraplegia type SPG8. *J. Neurol. Sci.* *347*, 372–374.
- Jeon, H., and Blacklow, S. C. (2005). Structure and Physiologic Function of the Low-Density Lipoprotein Receptor. *Annu. Rev. Biochem.* *74*, 535–562.
- Jia, D., Gomez, T. S., Billadeau, D. D., and Rosen, M. K. (2012). Multiple repeat elements within the FAM21 tail link the WASH actin regulatory complex to the retromer. *Mol. Biol. Cell* *23*, 2352–2361.
- Jia, D., Gomez, T. S., Metlagel, Z., Umetani, J., Otwinowski, Z., Rosen, M. K., and Billadeau, D. D. (2010). WASH and WAVE actin regulators of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) family are controlled by analogous structurally related complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 10442–10447.
- King, J. S., Gueho, A., Hagedorn, M., Gopaldass, N., Leuba, F., Soldati, T., and Insall, R. H. (2013). WASH is required for lysosomal recycling and efficient autophagic and phagocytic digestion. *Mol. Biol. Cell* *24*, 2714–2726.
- Kolanczyk, M. *et al.* (2014). Missense variant in CCDC22 causes X-linked recessive intellectual disability with features of Ritscher-Schinzel/3C syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.*, 1–6.
- Korolchuk, V. I., Schütz, M. M., Gómez-Llorente, C., Rocha, J., Lansu, N. R., Collins, S. M., Wairkar, Y. P., Robinson, I. M., and O’Kane, C. J. (2007). Drosophila Vps35 function is necessary for normal endocytic trafficking and actin cytoskeleton organisation. *J. Cell Sci.* *120*, 4367–4376.
- Kumar, K. R. *et al.* (2012). Frequency of the D620N mutation in VPS35 in Parkinson disease. *Arch. Neurol.* *69*, 1360–1364.
- Li, C., Shah, S. Z. A., Zhao, D., and Yang, L. (2016). Role of the Retromer Complex in Neurodegenerative Diseases. *Front. Aging Neurosci.* *8*, 42.
- Li, H. *et al.* (2015). Endosomal sorting of Notch receptors through COMMD9-dependent pathways modulates Notch signaling. *J. Cell Biol.* *211*, 605–617.
- Linardopoulou, E. V, Parghi, S. S., Friedman, C., Osborn, G. E., Parkhurst, S. M., and Trask, B. J. (2007). Human subtelomeric WASH genes encode a new subclass of the WASP family. *PLoS Genet.* *3*, e237.
- Liu, A., and Niswander, L. A. (2005). Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat. Rev. Neurosci.* *6*, 945–954.
- Lynch-day, M. A., Mao, K., Wang, K., Zhao, M., and Klionsky, D. J. (2015). The Role of Autophagy in Parkinson’s Disease. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1–14.
- Matsuura, I., Taniguchi, J., Hata, K., Saeki, N., and Yamashita, T. (2008). BMP inhibition enhances axonal growth and functional recovery after spinal cord injury. *J. Neurochem.* *105*, 1471–1479.
- De Matteis, M. A., and Luini, A. (2011). Mendelian disorders of membrane trafficking. *N. Engl. J. Med.* *365*, 927–938.
- McGough, I. J. *et al.* (2014). Retromer Binding to FAM21 and the WASH Complex Is Perturbed by the Parkinson Disease-Linked VPS35(D620N) Mutation. *Curr. Biol.* *24*, 1670–1676.

- Patel, H., Cross, H., Proukakis, C., Hershberger, R., Bork, P., Ciccarelli, F. D., Patton, M. A., McKusick, V. A., and Crosby, A. H. (2002). SPG20 is mutated in Troyer syndrome, an hereditary spastic paraplegia. *Nat. Genet.* *31*, 347–348.
- Perrett, R. M., Alexopoulou, Z., and Tofaris, G. K. (2015). The endosomal pathway in Parkinson's disease. *Mol. Cell. Neurosci.* *66*, 21–28.
- Peter, B. J., Kurten, R. C., Eddington, a D., Chowdhury, P., Smith, R. D., Davidson, a D., and Shank, B. B. (2004). BAR Domains as Sensors of Membrane Curvature: The Amphiphysin BAR Structure. *Science.* *303*, 495–499.
- Phillips-Krawczak, C. A. *et al.* (2015). COMMD1 is linked to the WASH complex and regulates endosomal trafficking of the copper transporter ATP7A. *Mol. Biol. Cell* *26*, 91–103.
- Pollard, T. D. (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* *36*, 451–477.
- Pollard, T. D. *et al.* (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* *326*, 1208–1212.
- Puthenveedu, M. A., Lauffer, B., Temkin, P., Vistein, R., Carlton, P., Thorn, K., Taunton, J., Weiner, O. D., Parton, R. G., and Mark Von Zastrow (2010). Sequence-dependent sorting of recycling proteins by actin-stabilized endosomal microdomains. *Cell* *143*, 761–773.
- Rojas, R., van Vlijmen, T., Mardones, G. A., Prabhu, Y., Rojas, A. L., Mohammed, S., Heck, A. J. R., Raposo, G., van der Sluijs, P., and Bonifacino, J. S. (2008). Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *J. Cell Biol.* *183*, 513–526.
- Ropers, F. *et al.* (2011). Identification of a novel candidate gene for non-syndromic autosomal recessive intellectual disability: the WASH complex member SWIP. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 2585–2590.
- Rottner, K., Hanisch, J., and Campellone, K. G. (2010). WASH, WHAMM and JMY: Regulation of Arp2/3 complex and beyond. *Trends Cell Biol.* *20*, 650–661.
- Salinas, S., Proukakis, C., Crosby, A., and Warner, T. T. (2008). Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms. *Lancet Neurol.* *7*, 1127–1138.
- Sathiyamoorthy, S., Tan, X., and Tan, E. K. (2014). Lewy Body in Parkinson's Disease: Causes or Scars of Neurodegeneration? *Austin J. Clin. Neurol.* *1*, 1–4.
- Seaman, M. N. J. (2012). The retromer complex - endosomal protein recycling and beyond. *J. Cell Sci.* *125*, 4693–4702.
- Seaman, M. N. J., Gautreau, A., and Billadeau, D. D. (2013). Retromer-mediated endosomal protein sorting: all WASHed up! *Trends Cell Biol.* *23*, 522–528.
- Small, S. A., and Petsko, G. A. (2015). Retromer in Alzheimer disease, Parkinson disease and other neurological disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* *16*, 126–132.
- Starokadomskyy, P. *et al.* (2013). CCDC22 deficiency in humans blunts activation of proinflammatory NF- κ B signaling. *J. Clin. Invest.* *123*, 2244–2256.
- Steinberg, F., Gallon, M., Winfield, M., Thomas, E. C., Bell, A. J., Heesom, K. J., Tavaré, J. M., and Cullen, P. J. (2013). A global analysis of SNX27-retromer assembly and cargo specificity reveals a function in glucose and metal ion transport. *Nat. Cell Biol.* *15*, 461–471.
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 513–525.

- Temkin, P., Lauffer, B., Jäger, S., Cimermancic, P., Krogan, N. J., and von Zastrow, M. (2011). SNX27 mediates retromer tubule entry and endosome-to-plasma membrane trafficking of signalling receptors. *Nat. Cell Biol.* *13*, 715–721.
- Tsang, H. T. H., Edwards, T. L., Wang, X., Connell, J. W., Davies, R. J., Durrington, H. J., O’kane, C. J., Luzio, J. P., and Reid, E. (2009). The hereditary spastic paraplegia proteins NIPA1, spastin and spartin are inhibitors of mammalian BMP signalling. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 3805–3821.
- Tsika, E. *et al.* (2014). Parkinson’s disease-linked mutations in VPS35 induce dopaminergic neurodegeneration. *Hum. Mol. Genet.* *23*, 4621–4638.
- Valdmanis, P. N. *et al.* (2007). Mutations in the KIAA0196 gene at the SPG8 locus cause hereditary spastic paraplegia. *Am. J. Hum. Genet.* *80*, 152–161.
- Vardarajan, B. N., Bruesegem, S. Y., Harbour, M. E., Inzelberg, R., Friedland, R., St George-Hyslop, P., Seaman, M. N. J., and Farrer, L. A. (2012). Identification of Alzheimer disease-associated variants in genes that regulate retromer function. *Neurobiol. Aging* *33*, 2231.e15–e2231.e30.
- Viklund, I. M. *et al.* (2009). WAFL, a new protein involved in regulation of early endocytic transport at the intersection of actin and microtubule dynamics. *Exp. Cell Res.* *315*, 1040–1052.
- Vilariño-Guell, C. *et al.* (2011). VPS35 mutations in parkinson disease. *Am. J. Hum. Genet.* *89*, 162–167.
- Vilariño-Güell, C. *et al.* (2014). DNAJC13 mutations in Parkinson disease. *Hum. Mol. Genet.* *23*, 1794–1801.
- Voineagu, I. *et al.* (2012). CCDC22: a novel candidate gene for syndromic X-linked intellectual disability. *Mol. Psychiatry* *17*, 4–7.
- Wang Xianling, Yang Yanhui, Wang Xiangbo, Li Cunjiang, and Jia Jianping (2014). A novel KIAA0196 (SPG8) mutation in a Chinese family with spastic paraplegia. *Chin. Med. J. (Engl.)* *127*, 1987–1989.
- Wang, Q., Song, C., and Li, C. C. H. (2004). Molecular perspectives on p97-VCP: Progress in understanding its structure and diverse biological functions. *J. Struct. Biol.* *146*, 44–57.
- Wang, W., Wang, X., Fujioka, H., Hoppel, C., Whone, A. L., Caldwell, M. A., Cullen, P. J., Liu, J., and Zhu, X. (2015). Parkinson’s disease-associated mutant VPS35 causes mitochondrial dysfunction by recycling DLP1 complexes. *Nat. Med.* *22*, 54–63.
- Wang, X., Shaw, W. R., Tsang, H. T. H., Reid, E., Kane, C. J. O., and O’Kane, C. J. (2007). *Drosophila* spichthyin inhibits BMP signaling and regulates synaptic growth and axonal microtubules. *Nat. Neurosci.* *10*, 177–185.
- Wang, Y., Hodgkinson, V., Zhu, S., Weisman, A. G., and Petris, J. M. (2011). Advances in the Understanding of Mammalian Copper Transporters. *Am. Soc. Nutr.* *2*, 129–137.
- Webb, J. L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J. N., and Rubinsztein, D. C. (2003). α -synuclein Is Degraded by Both Autophagy and the Proteasome. *J. Biol. Chem.* *278*, 25009–25013.
- Xia, P. *et al.* (2013). WASH inhibits autophagy through suppression of Beclin 1 ubiquitination. *EMBO J.* *32*, 2685–2696.

Zavodszky, E., Seaman, M. N., Moreau, K., Jimenez-Sanchez, M., Breusegem, S. Y., Harbour, M. E., and Rubinsztein, D. C. (2014). Mutation in VPS35 associated with Parkinson's disease impairs WASH complex association and inhibits autophagy. *Nat. Commun.* 5, 3828.

Zech, T., Calaminus, S. D. J., Caswell, P., Spence, H. J., Carnell, M., Insall, R. H., Norman, J., and Machesky, L. M. (2011). The Arp2/3 activator WASH regulates $\alpha 5\beta 1$ -integrin-mediated invasive migration. *J. Cell Sci.* 124, 3753-3759.

Zhao, J., and Hedera, P. (2015). Strumpellin and Spartin , Hereditary Spastic Paraplegia Proteins , are Binding Partners. *J. Exp. Neurosci.* 9, 15–25.

Zimprich, A. *et al.* (2011). A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease. *Am. J. Hum. Genet.* 89, 168–175.