

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů
Studijní obor: B-MOBIBO



Václav Růžička

Fosfoinositidy v membránách spojených s RAB1
Phosphoinositides in membranes associated with RAB1

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

Školitelka:

Mgr. Lenka Doubravská, Ph.D.

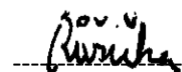
Praha, 2024

Charles University
Faculty of Science

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, 16. 4. 2024



Václav Růžička

Poděkování:

Mé upřímné poděkování patří školitelce Mgr. Lence Doubravské Ph.D. za vstřícný přístup, cenné rady, věnovaný čas a v neposlední řadě za příležitost zapojit se do výzkumného procesu v Laboratoři molekulární genetiky a vývoje, kde mi byla umožněna samostatná a naplňující práce, pod jejím trpělivým a motivujícím vedením.

Abstrakt:

Malé GTPázy z rodiny RAB jsou klíčovými regulátory mnoha buněčných dějů, včetně membránového transportu či autofágie. S řízením membránových pochodů jsou spjaté i fosforylované deriváty fosfatidylinositolu – fosfatidylinositolfosfáty (PIPy). Předmětem našeho zájmu jsou GTPázy RAB1A a RAB1B a jimi řízené procesy časné sekrece proteinů. S těmito ději funkčně souvisí i enzymy regulující jednotlivé fosforylované formy fosfatidylinositolu. To nasvědčuje tomu, že se i tyto lipidy jako takové podílejí na regulaci alespoň některých částí dráhy časné sekrece proteinů. Jejich role v těchto procesech však není doposud komplexněji popsána. V této bakalářské práci jsou proto shrnuty současné poznatky o fosfatidylinositolfosfátech na membránách spojených s RAB1A a RAB1B, což obnáší jejich úlohu na endoplazmatickém retikulu (ER) a jeho exportních místech (ERES), na přechodném kompartmentu mezi ER a Golgiho aparátem (ERGIC) i na Golgiho aparátu samotném. Práce se specificky zaměřuje i na přímé interakce mezi GTPázami RAB1 a PIPy, případně enzymy, které PIPy regulují. Souhrnem lze konstatovat, že fosfatidylinositolfosfáty hrají podstatnou roli v průběhu časné fáze sekrece proteinů.

Klíčová slova:

fosfoinositidy, endoplazmatické retikulum, ERES, ERGIC, Golgiho aparát, RAB1, časná sekrece, autofágie

Abstract:

Small GTPases of the RAB protein family are key regulators of numerous cellular pathways, including membrane trafficking and autophagy. With the control of membrane processes are also associated phosphorylated phosphatidylinositol derivatives, known as phosphatidylinositol phosphates (PIPs). Our focus lies on the RAB1A and RAB1B GTPases and the processes of early protein secretion they regulate. The enzymes that control specific phosphorylated forms of phosphatidylinositol seem to be functionally related to this pathway, indicating that these lipids also regulate at least some aspects of protein secretion. However, the mechanism by which they do so remains unclear. This bachelor thesis therefore summarises the current knowledge of phosphatidylinositol phosphates on RAB1A and RAB1B associated membranes, including their role on the endoplasmic reticulum (ER) and its export sites (ERES), on the intermediate compartment between the ER and the Golgi apparatus (ERGIC), and on the Golgi apparatus itself. This thesis also specifically examines direct interactions between RAB1 GTPases and phosphatidylinositol phosphates or their related enzymes. In summary, it can be concluded that phosphatidylinositol phosphates play a significant role in the early stages of protein secretion.

Keywords:

phosphoinositides, endoplasmic reticulum, ERES, ERGIC, Golgi apparatus, RAB1, early secretion, autophagy

Seznam zkratek:

| | | |
|---------|--|--|
| ACBD3 | acyl-CoA binding domain containing protein 3 | acyl-koenzym A vázající doménu obsahující protein 3 |
| AP | adaptor protein | adaptorový protein |
| ARF | ADP ribosylation factor | ADP ribosylační faktor |
| ARL6IP6 | ADP ribosylation factor like GTPase 6 interacting protein 6 | interagující protein 6 podobný ADP-ribosylačnímu faktoru 6 |
| ATG | autophagy-related protein | autofágii příbuzný protein |
| BFA | brefeldin A | brefeldin A |
| Cas9 | CRISPR-associated protein 9 | CRISPR-asociovaný protein 9 |
| CCPCC | cystein rich motif | motiv bohatý na cystein |
| cDNA | coding DNA | kódující DNA |
| CDP | cytidine diphosphate | cytidin-difosfát |
| CERT | ceramide transfer protein | ceramid-transportní protein |
| CFTR | cystic fibrosis transmembrane conductance regulator | regulátor transmembránové vodivosti u cystické fibrózy |
| COPI | coat protein complex I | komplex plášťových proteinů I |
| COPII | coat protein complex II | komplex plášťových proteinů II |
| CRISPR | clustered regularly interspaced short palindromic repeats | seskupená pravidelná krátká palindromická opakování |
| COS-7 | CV-1 in origin, and carrying the SV40 genetic material | původem CV-1, nesoucí genetický materiál SV40 |
| DAG | diacylglycerol | diacylglycerol |
| DFCP1 | double FYVE-containing protein 1 | protein obsahující dvojitou FYVE doménu 1 |
| DHHC | aspartate-histidine-histidine-cysteine motif | motiv aspartát-histidin-histidin-cystein |
| EFR3B | protein Efr3 homolog isoform B | homolog proteinu Efr3 izoforma B |
| ER | endoplasmic reticulum | endoplazmatické retikulum |
| ERES | endoplasmic reticulum export site | exportní místo endoplazmatického retikula |
| ERGIC | ER-Golgi intermediate compartment | přechodný kompartment mezi ER a GA |
| FAPP | four-phosphate-adaptor protein | 4-fosfát adaptorový protein |
| GA | Golgi apparatus | Golgiho aparát |
| GAP | GTPase-activating protein | GTPázu aktivující protein |
| GBF1 | Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1 | Golgi-specifický faktor resistance k brefeldinu A 1 |
| GDF | GDI-displacement factor | GDI vyvazující faktor |
| GDI | guanine nucleotide dissociation inhibitor | inhibitor disociace guaninového nukleotidu |
| GDP | guanosine diphosphate | guanosindifosfát |
| GEF | guanine nucleotide exchange factor | faktor výměny guaninového nukleotidu |
| GGA | Golgi-localized, gamma adaptin ear-containing, ARF-binding protein | s Golgiho aparátem spojený, gama adaptinové ucho obsahující, ARF vazebný protein |
| GOLPH3 | Golgi phosphoprotein 3 | Golgi-fosfoprotein 3 |
| GPAT | glycerol-3-phosphate acyltransferase | glycerol-3-fosfát acyltransferáza |
| GTP | guanosine triphosphate | guanosintrifosfát |
| GTPáza | guanosinetrisphosphate phosphohydrolase | guanosintrifosfát fosfohydroláza |
| HA | hemagglutinin | hemagglutinin |

| | | |
|-------------------------|--|---|
| HeLa | Henrietta Lacks | Henrieta Lacksová |
| HER | smooth endoplasmic reticulum | hladké endoplazmatické retikulum |
| HPLC | high-performance liquid chromatography | vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| IC | intermediate compartment | přechodný kompartment |
| Inp54p | phosphatidylinositol bisphosphate specific phosphatase | fosfatidylinositolbisfosfát specifická fosfatáza |
| INPP4 | inositol polyphosphate 4-phosphatase | inositolpolyfosfát 4-fosfatáza |
| INPP5 | inositol polyphosphate 5-phosphatase | inositolpolyfosfát 5-fosfatáza |
| INPP5B | inositol polyphosphate 5-phosphatase isoform B | inositol polyfosfát 5-fosfatáza izoforma B |
| INPP5K | inositol polyphosphate 5-phosphatase isoform K | inositol polyfosfát 5-fosfatáza izoforma K |
| IPIP27A | inositol phosphatase interacting protein of 27 kDa isoform A | protein interagující s inositolfosfatázou o velikosti 27 kDa izoforma A |
| KD | knock-down | potlačení |
| KO | knock-out | vyřazení |
| LC3 | microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 | lehký řetězec 3 s mikrotubuly asociovaného proteinu 1A/1B |
| LPA | lysophosphatidic acid | kyselina lysofosfatidová |
| LPAAT | lysophosphatidic acid acyltransferase | acyltransferáza kyseliny lysofosfatidové |
| MAPK | mitogen-activated protein kinase | mitogenem-aktivovaná proteinová kináza |
| MDCKs | Madin-Darby canine kidney cells | psí ledvinové buňky Madin-Darbyho |
| MTM | myotubularin | myotubularin |
| MTMR | myotubularin-related protein | myotubularinům příbuzný protein |
| mTORC1 | mammalian target of rapamycin complex 1 | savčí cíl rapamycinového komplexu 1 |
| NCS | neuronal calcium sensor-1 | neuronální senzor vápníku 1 |
| OCRL1 | oculocerebrorenal Lowe syndrome protein 1 | protein Loweova okulocerebrorenálního syndromu 1 |
| OKM | areas of membrane contacts | oblasti kontaktů membrán |
| ORD | OSBP related domain | OSBP příbuzná doména |
| OSBP | oxysterol-binding protein | oxysterol-vazebný protein |
| PA | phosphatidic acid | fosfatidová kyselina |
| PAT | palmitoyl acyltransferase | palmitát acyltransferáza |
| pclC | pericentrosomal domain of intermediate compartment | pericentrozomální doména přechodného kompartmentu |
| PH doména | plecstrin homology domain | plekstrin-homologní doména |
| PI(3)P | phosphatidylinositol 3-phosphate | fosfatidylinositol-3-fosfát |
| PI(3,4)P ₂ | phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate | fosfatidylinositol-3,4-bisfosfát |
| PI(3,4,5)P ₃ | phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate | fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát |
| PI(3,5)P ₂ | phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate | fosfatidylinositol-3,5-bisfosfát |
| PI(4)P | phosphatidylinositol 4-phosphate | fosfatidylinositol-4-fosfát |
| PI(4,5)P ₂ | phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate | fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát |
| PI(5)P | phosphatidylinositol 5-phosphate | fosfatidylinositol-5-fosfát |
| PI4KII | type II phosphatidylinositol 4-kinases | fosfatidylinositol 4-kinázy typu II |
| PI4KIIA/B | phosphatidylinositol 4-kinase type II isoform A/B | fosfatidylinositol 4-kináza typu II izoforma A/B |
| PI4KIII | type III phosphatidylinositol 4-kinases | fosfatidylinositol 4-kinázy typu III |

| | | |
|------------------|--|---|
| PI4KIII A/B | phosphatidylinositol 4-kinase type III isoform A/B | fosfatidylinositol 4-kináza typu III izoforma A/B |
| PIK3C3 | phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3 | katalytická podjednotka fosfatidylinositol 3-kinázy typu 3 |
| PIK3C3-CI | phosphatidylinositol 3-kinase class III complex I | komplex I fosfatidylinositol 3-kinázy třídy III |
| PIKFYVE | phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase containing FYVE domain | fosfatidylinositol-3-fosfát 5-kináza obsahující FYVE doménu |
| PIP | phosphatidylinositol phosphate | fosfatidylinositolfosfát |
| PIP ₂ | phosphatidylinositol bisphosphate | fosfatidylinositolbisfosfát |
| PIP ₃ | phosphatidylinositol trisphosphate | fosfatidylinositoltrisfosfát |
| PIP4K | phosphatidylinositol 4-phosphate 4-kinase | fosfatidylinositol-4-fosfát 4-kináza |
| PIP5K | phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase | fosfatidylinositol-4-fosfát 5-kináza |
| PIP5K1A | phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type 1 A | fosfatidylinositol-4-fosfát 5-kinázu typu 1 A |
| PIS | phosphatidylinositol synthase | fosfatidylinositol syntáza |
| PITM2 | membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein 2 | s membránou asociovaný protein přenášející fosfatidylinositol 2 |
| PITPNC1 | fosfatidylinositol transfer protein cytoplasmic 1 | cytoplazmatický protein přenášejícím fosfatidylinositol 1 |
| PKD | protein kinase D | protein kináza D |
| PLC | phospholipase C | fosfolipáza C |
| PM | plasmatic membrane | plazmatická membrána |
| PRA1 | prenylated RAB acceptor 1 | akceptor prenylovaných proteinů RAB 1 |
| PtdIns | phosphatidylinositol | fosfatidylinositol |
| PTEN | phosphatase and tensin homologue | fosfatáza a homolog tenzinu |
| RAB | RAS-associated binding proteins | vazebné proteiny spojené s RAS |
| RAC1 | RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1 | substrát botulotoxinu C3 související s proteiny RAS 1 |
| REP | RAB escort protein | RAB eskortní protein |
| RHEB | RAS homolog enriched in brain | homolog Ras obohacený v mozku |
| SAC1 | supressor of actin 1 | supresor aktinu 1 |
| SAM | sterile alpha motif | sterilní α-motiv |
| SAR1 | secretion-associated RAS-related protein 1 | se sekrecí spojovaný protein příbuzný RAS 1 |
| SHIP | SH2 domain containg protein | SH2 doménu obsahující protein |
| siRNA | small interfering RNA | krátká umlčující RNA |
| STING | stimulator of interferon genes | stimulátor interferonových genů |
| SYNJ | synaptojanin | synaptojanin |
| TBC1D20 | Tre2/Bub2/Cdc16 | Tre2/Bub2/Cdc16 |
| TGN | trans-Golgi network | síť trans-Golgi |
| TGN38 | trans-Golgi network integral membrane protein 38 | integralní membránový protein sítě trans-Golgi 38 |
| TIIP | TPTE and PTEN homologous inositol lipid phosphatase | TPTE a PTEN homologní inositol-lipidová fosfatáza |
| TRAPPIII | transport protein particle III | transportní proteinová částice III |
| TTC7B | tetratricopeptide repeat protein 7B | protein 7B s tetratrikopeptidovými repetitivy |

| | | |
|-------|---|---|
| ULK1 | Unc-51-like autophagy-activating kinase 1 | Unc-51 odpovídající autofágii aktivující kináza 1 |
| VAP-A | VAMP-associated protein A | protein asociovaný s VAMP A |
| VSVG | vesicular stomatitis virus protein G | protein G viru vesikulární stomatitidy |
| VTC | vesicular-tubular cluster | vezikulo-tubulární shluk |
| WNT | wingless/int-1 | wingless/int-1 |
| Yptp1 | yeast protein transporter 1 | kvasinkový transportní protein 1 |

Obsah:

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Úvod | 1 |
| 2 | Fosfatidylinositol a fosfoinositidy | 2 |
| 3 | RAB1 a membrány časné sekrece | 4 |
| 3.1 | <i>Rodina proteinů RAB.....</i> | 4 |
| 3.2 | <i>Proteiny RAB1</i> | 4 |
| 3.3 | <i>RAB1 a jejich funkční cyklus.....</i> | 5 |
| 3.4 | <i>RAB1 a jejich výskyt v buňce</i> | 5 |
| 3.5 | <i>Membrány spojené s RAB1.....</i> | 6 |
| 3.5.1 | Endoplazmatické retikulum | 6 |
| 3.5.2 | ERGIC | 6 |
| 3.5.3 | Golgiho aparát | 7 |
| 3.6 | <i>RAB1, časná sekrece a autofágie.....</i> | 7 |
| 3.7 | <i>RAB1 a jejich propojení s PIPy.....</i> | 8 |
| 4 | PIPy v membránách spojených s RAB1..... | 9 |
| 4.1 | <i>Způsoby přímé detekce PIPů.....</i> | 9 |
| 4.2 | <i>Přímá detekce PIPů na ER.....</i> | 10 |
| 4.3 | <i>Proteiny asociované s PIPy na ER a jejich funkční význam</i> | 10 |
| 4.3.1 | SAC1 na ER..... | 10 |
| 4.3.2 | PtdIns 4-kinázy a 3-kinázy na ER..... | 12 |
| 4.3.3 | PIP ₂ a PIP ₃ fosfatázy na ER | 13 |
| 4.4 | <i>Přímá detekce PIPů na ERGIC</i> | 14 |
| 4.5 | <i>Proteiny asociované s PIPy na ERGIC a jejich funkční význam.....</i> | 14 |
| 4.5.1 | PIPy v autofágii na ERGIC..... | 15 |
| 4.5.2 | PIP fosfatázy na ERGIC..... | 15 |
| 4.6 | <i>Přímá detekce PIPů na GA</i> | 16 |
| 4.7 | <i>Proteiny asociované s PIPy na GA a jejich funkční význam</i> | 17 |
| 4.7.1 | PI4KIIIIB..... | 17 |
| 4.7.2 | Další proteiny spojené s PI(4)P na GA..... | 19 |
| 4.7.3 | Proteiny spojené s PIP ₂ a PIP ₃ na GA | 21 |
| 5 | Závěr..... | 23 |
| 6 | Seznam použité literatury | 26 |

1 Úvod

Transport proteinů sekretovaných do extracelulárního prostoru a distribuce funkčně velmi důležitých transmembránových proteinů jsou v buňkách zajišťovány komplexním procesem nazývaným sekreční dráha (Hirschberg *et al.*, 1998). Cesta proteinů, procházejících touto drahou, začíná na membránách endoplazmatického retikula (ER), kde dochází k jejich syntéze. Po řadě kroků, zajišťujících jejich správné sbalení a kontrolu kvality, opouští tyto proteiny endoplazmatické retikulum (*Perkins & Allan, 2021). Z endoplazmatického retikula jsou přepravovány do Golgiho aparátu (GA), kde jsou dále upravovány a tříděny (*Li, Ahat & Wang, 2019). Ze specializovaných exportních míst Golgiho aparátu, nacházejících se na jeho straně, jsou distribuovány právě do míst jejich určení, kde dále mohou plnit své funkce (Wieffer *et al.*, 2013; Anitei *et al.*, 2017).

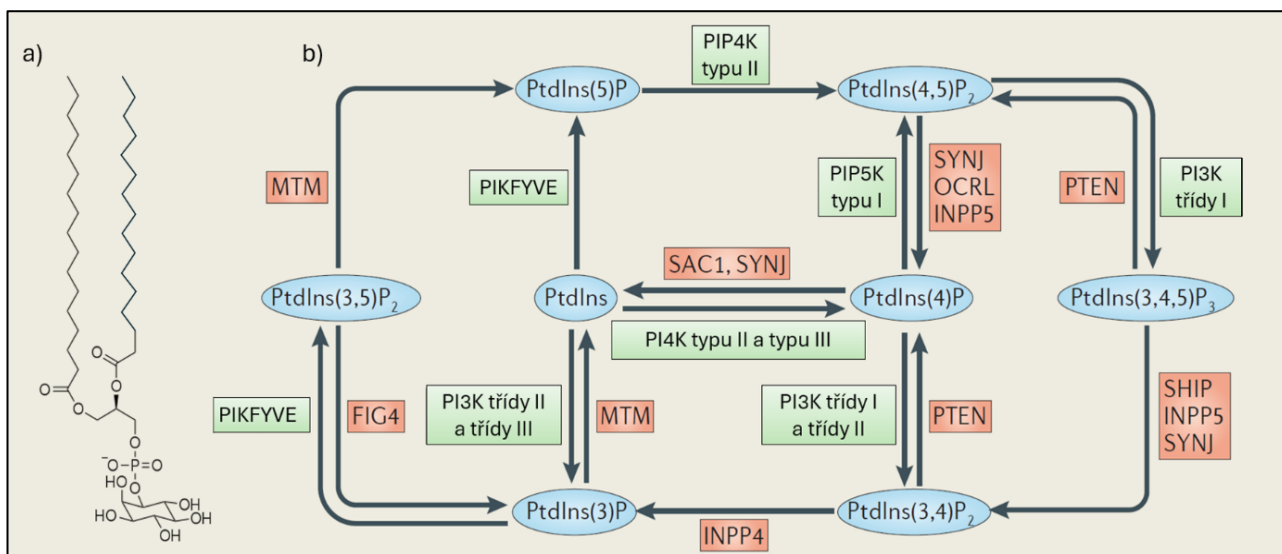
Transport proteinů odehrávající se na rozhraní endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu je nepostradatelnou součástí časné fáze sekreční dráhy. Mezi klíčové regulátory tohoto procesu patří malé GTPázy označované u savců jako RAB1 (vazebné proteiny spojené s RAS 1), či u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jako Ypt1p (kvasinkový protein transportu 1) (Tisdale *et al.*, 1992; Jedd *et al.*, 1995). Tyto molekuly doprovází sekretované proteiny na celé jejich cestě mezi endoplazmatickým retikulem a Golgiho aparátem (Martinez *et al.*, 2016; Shomron *et al.*, 2021) a zajišťují mnoho interakcí s ostatními proteiny podílejícími se na časné sekreci (Monetta *et al.*, 2007; Slavin *et al.*, 2011).

Dalšími dobře popsányými regulátory procesů spojených s remodelací membrán a membránovým transportem jsou fosfoinositidy. Tyto zástupci rodiny fosfolipidů interagují s celou řadou proteinů zapojených v signalizaci a váčkovém transportu (*Jean & Kiger, 2012; Klinkenberg *et al.*, 2014; Chalupska *et al.*, 2019). Jejich role v řízení časné sekrece však není komplexněji popsána. Manipulace s některými proteiny zodpovědnými za regulaci fosfoinositidů však ovlivňují právě časné fáze sekrece (Mochizuki *et al.*, 2013; Klinkenberg *et al.*, 2014; Doubravská *et al.*, 2020). Cílem této práce bude shrnout současné poznatky o fosfoinositidech na membránách asociovaných s GTPázami RAB1, klíčovými řídicími molekulami membránových procesů časné sekrece. Práce se pak bude primárně zaměřovat na lidské, potažmo savčí buňky. Toto shrnutí by mělo nabídnout ucelenější pohled na roli fosfoinositidů v procesech časné sekrece a tím mimo jiné pomoci objasnit, jakým způsobem se do jejich regulace zapojují proteiny funkčně spjaté s fosfoinositidy.

2 Fosfatidylinositol a fosfoinositidy

Fosfatidylinositol (PtdIns) je minoritním zástupcem skupiny glycerolfosfolipidů, molekul úzce spjatých se stavbou biologických membrán. Jako každý člen této skupiny je i PtdIns tvořen trojsytným alkoholem glycerolem, na který jsou esterovými vazbami navázané dvě mastné kyseliny a fosfát. Fosfátová skupina v případě PtdIns váže cyklický alkohol inositol. Tento alkohol disponuje šesti hydroxylovými skupinami, z nichž jedna je využita pro tvorbu esterové vazby s diacylglycerol-3-fosfátem a další tři, na pozicích 3', 4' a 5', mohou být dále fosforylované (obr. č. 1a). To umožňuje vznik sedmi různých izoform fosforylovaného fosfatidylinositolu. Konkrétně tří různých fosfatidylinositolmonofosfátů (PIP), tří fosfatidylinositolbifosfátů (PIP₂) a jednoho fosfatidyltrifosfátu (PIP₃). Pro všech sedm izoform se bude v této práci používat souhrnné označení fosfatidylinositolfosfáty (PIPy) či fosfoinositidy (*Blunsom & Cockcroft, 2020).

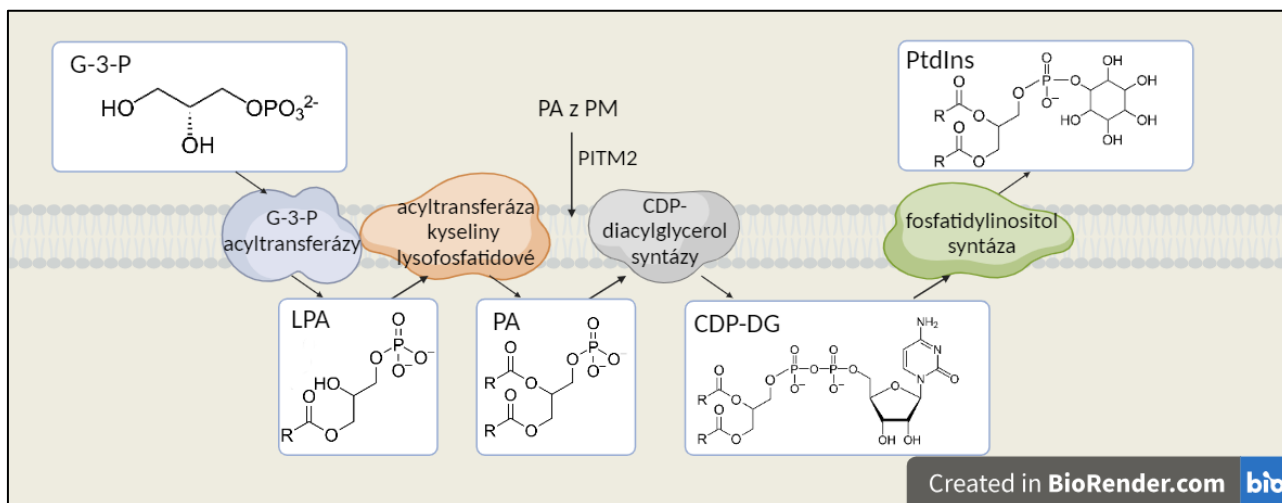
Každý z fosfoinositidů může interagovat s odlišnými proteiny. Přesná lokalizace jednotlivých izoform v membránách je jedním z důležitých mechanismů, které určují, jaké proteiny s danou membránou asociují. Takový systém regulace spojení proteinů s membránou může být i velmi dynamický, protože jednotlivé izoformy mohou v enzymaticky katalyzovaných reakcích přecházet jedna v druhou. Nachází tedy své uplatnění i v rámci nejrůznějších buněčných pochodů, včetně váčkového transportu či autofágie (Godi *et al.*, 2004; Axe *et al.*, 2008; Anitei *et al.*, 2017; Judith *et al.*, 2019).



Obr. č. 1: a) Struktura fosfatidylinositolu, b) Přehled vztahů mezi jednotlivými fosfoinositidy a enzymů podílejících se na jejich přeměnách; v oranžových polích se nachází fosfatázy, v zelených kinázy (s úpravami převzato z *Jean a Kiger, 2012); zkratky: FIG4, faktorem indukovaný gen 4; PtdIns, fosfatidylinositol; P, fosfát; MTM, myotubulariny; PI3K, fosfatidylinositol 3-kináza; PI4K, fosfatidylinositol 4-kináza; PIP4K, fosfatidylinositol-5-fosfát 4-kináza; PIP5K, fosfatidylinositol-4-fosfát 5-kináza; PIKFYVE, fosfatidylinositol-3-fosfát 5-kináza obsahující FYVE doménu; INPP4, inositolpolyfosfát 4-fosfatáza; INPP5, inositolpolyfosfát 5-fosfatáza; OCRL, protein Loweova okulocerebrorenálního syndromu 1; PTEN, fosfatáza a homolog tenzinu; SHIP, SH2 doménu obsahující protein; SAC1, supresor aktinu 1; SYNJ, synaptojanin

Enzymy, které katalyzují přechody mezi jednotlivými izoformami fosfoinositidů, jsou specifické kinázy a fosfatázy. Jejich přehled nabízí obr. č. 1. Dalšími důležitými enzymy ovlivňujícími fosfatidylinositol a jeho fosforylované deriváty jsou fosfolipázy. To jsou hydrolázy schopné štěpit esterové vazby ve struktuře PIPů i jiných glycerolfosfolipidů. PLC (fosfolipázy C), štěpící vazbu mezi glycerolem a fosfátem vázajícím inositolový kruh, jsou zásadními hráči buněčné signalizace. Z molekul PIPů odštěpují solubilní fosforylovaný inositol, který zastává funkci druhého posla, tedy molekuly zprostředkující a zesilující přenos signálu. S membránou pak zůstává asociovaný diacylglycerol (DAG), jenž může mít také své signalizační funkce (Hostetler & Hall 1980; Margolis et al. 1989; Streb et al. 1983). Kromě buněčné signalizace může takové štěpení hrát zásadní roli například při remodelování membrán, které doprovází tvorbu transportních váčků. Odštěpení velké a záporně nabitě skupiny fosforylovaného inositolu může snižovat klenutí membrány (Anitei *et al.*, 2017).

Syntéza PtdIns *de novo* se odehrává na membránách endoplazmatického retikula. Celý proces začíná acylací glycerol-3-fosfátu (G-3-P), která probíhá ve dvou krocích a je zprostředkována G-3-P acyltransferázami a acyltransferázou kyseliny lysofosfatidové. Vzniklá kyselina fosfatidová (PA) je pomocí cytidin-difosfát-diacylglycerol syntáz konvertována na CDP-diacylglycerol (CDP-DG). Fosfatidylinositol syntáza je enzym, který katalyzuje výměnu CDP za inositol, čímž je syntéza PtdIns dokončena (Nakagawa *et al.*, 1989; Lykidis *et al.*, 1997; *Blunsom & Cockcroft, 2020). Dále jsou nově syntetizované molekuly PtdIns modifikovány tak, aby obsahovaly pouze specifické acylové zbytky. Těmi jsou na pozici sn-1 zbytek kyseliny stearové a na pozici sn-2 zbytek kyseliny arachidonové (Yamashita *et al.*, 2003; Imae *et al.*, 2012; *Blunsom & Cockcroft, 2020).



Obr. č. 2: Syntéza PtdIns na membráně endoplazmatického retikula (vlastní tvorba, vychází z *Blunsom & Cockcroft 2020); syntéza probíhá *de novo* z G-3-P, nebo recyklací z PA transportované z plazmatické membrány; zkratky: G-3-P, glycerol-3-fosfát; LPA, kyselina lysofosfatidová; PA, fosfatidová kyselina; CDP-DG, cytidin-difosfát-diacylglycerol; PtdIns, fosfatidylinositol; PITM2, s membránou asociovaný protein přenášející fosfatidylinositol 2; PM, plazmatická membrána

Kromě syntézy *de novo* je PtdIns recyklován z kyseliny fosfatidové, která vzniká štěpením fosfoinositidů na plazmatické membráně (PM) při aktivaci PLC. Na přenosu PA zpět na endoplazmatické retikulum se podílí protein PITM2 (s membránou asociovaný protein přenášející fosfatidylinositol 2). Tento protein vyměňuje v oblastech kontaktu membrán kyselinu fosfatidovou z plazmatické membrány za

fosfatidylinositol z endoplazmatického retikula. Dochází tedy k obnově obsahu PIPů na plazmatické membráně a zároveň je na ER hromaděn modifikovaný produkt štěpení PIPů, ze kterého je znovu syntetizován PtdIns (Kim *et al.*, 2015).

3 RAB1 a membrány časné sekrece

3.1 Rodina proteinů RAB

Proteiny rodiny RAB (vazebných proteinů spojených s RAS) jsou GTPázy, schopné díky post-translační modifikaci cysteinových zbytků, obsažených na C-konci proteinu, přímé asociace s membránami (Touchot, Chardin & Tavitian, 1987). První gen kódující jednoho z členů této rodiny byl identifikován a popsán v publikaci Gallwitz, Donath, & Sander 1983. Konkrétně se jednalo o gen pro Ypt1p, kvasinkový homolog proteinů RAB1A a RAB1B. Kódující DNA (cDNA) savčích homologů byla, spolu s cDNA dalších tří členů rodiny, popsána o několik let později (Touchot, Chardin & Tavitian, 1987). Poté následovaly objevy mnoha dalších členů této proteinové rodiny. Svou činností se tyto proteiny podílejí hlavně na regulaci váčkového transportu v buňkách. S tím je úzce spojená jejich schopnost vázat velké množství molekul zapojených do transportních procesů. Proteiny, které členové rodiny RAB váží a tím je například dostávají do místa jejich činnosti, či je dokonce aktivují, označujeme jako efektory (*Jean & Kiger, 2012).

Schopnost vazby GTP (guanosintrifosfátu) a vlastní GTPázová aktivita, která zprostředkuje rozštěpení GTP na GDP (guanosindifosfát), je pro funkci proteinů rodiny RAB klíčová. V závislosti na vazbě GTP dochází k výrazným konformačním změnám ve struktuře proteinu RAB. Konkrétně jsou vazbou GTP stabilizovány části proteinu, které se nazývají oblasti přepínačů 1 a 2 (SWITCH 1 a 2). Tato změna konformace pak umožňuje i asociaci s efektory. Při rozštěpení GTP na GDP dochází ke zpětnému rozvolnění oblastí přepínačů a ztrátě vazebné afinity alespoň k některým efektorům proteinu (Ostermeier & Brunger, 1999; Sultana *et al.*, 2011).

3.2 Proteiny RAB1

Savčími homology k prvnímu objevenému členu RAB proteinové rodiny, kvasinkovému Ypt1p, jsou RAB1A a RAB1B (o kterých bude někdy souhrnně referováno jako o RAB1). Každý z nich je kódován vlastním genem, u člověka přítomným na druhém, respektive jedenáctém chromozomu (Consortium, 2023). Jejich aminokyselinové sekvence jsou z 92 % identické (Touchot *et al.*, 1989). Oba geny dávají vzniknout pouze jedné funkční sestřihové variantě proteinu a jsou exprimovány tkáňově nespecificky (Consortium, 2023). Důležitost a vzájemná zastupitelnost RAB1A a RAB1B byla testována na buněčné linii MDKC (psí ledvinové buňky Madin-Darbyho) (Homma *et al.*, 2019). Autoři za využití systému CRISPR/Cas9 vytvořili stabilní buněčné linie produkující pouze jeden z proteinů RAB1 (tzv. single knock-out, KO). Dvojitý knock out, kdy by nebyl exprimován žádný z proteinů, se autorům připravit nepodařilo. V single KO liniích autoři při redukci množství (tzv. knock-down, KD) druhé formy proteinu, nezasažené systémem CRISPR/Cas9, pozorovali umírání buněk. Tyto výsledky autoři článku interpretují tak, že proteiny RAB1 jsou nezbytné pro

životaschopnost buněk a zároveň, že jsou obě formy proteinu částečně zastupitelné, protože buňky single KO linií přežívají. Pravděpodobně však nejsou zastupitelné zcela, jelikož v HeLa buňkách dochází k pozorovatelné fragmentaci Golgiho aparátu při KD už jednoho z proteinů RAB1 (Aizawa & Fukuda, 2015). Dále bylo popsáno, že pro vývoj myších embryí je nutná exprese RAB1A. Delece genu pro RAB1A vedla k embryonální letalitě myši v období okolo 11. dne vývoje. V tomto případě tedy také není RAB1B schopen zcela kompenzovat ztrátu RAB1A (Wu, Yang & Chen, 2022).

3.3 RAB1 a jejich funkční cyklus

Obecné schéma funkčního cyklu proteinů z rodiny RAB je následující: Protein je za účasti RAB eskortního proteinu a geranyltransferázy posttranslačně modifikován hydrofobním geranylovým řetězcem. Tím je pak navázán do membrány tak, že samotný protein směřuje směrem do cytozolu. Aktivace membránově vázaného RAB probíhá díky GEF (faktorům výměny guaninového nukleotidu). Ty na protein z rodiny RAB pomáhají navázat GTP, čímž umožní proteinu interagovat alespoň s některými jeho efekty. Navázané GTP je poté štěpeno na GDP nejčastěji za účasti proteinu aktivujícího GTPázu. S komplexem RAB-GDP, vázaným v membráně, interaguje GDI (inhibitor disociace GDP). GDI je protein, který je schopný uvolnit membránově vázaný RAB a to tak, že maskuje jeho nepolární geranylové skupiny. Komplex GDI-RAB-GDP je poté přítomen v cytoplasmě. GDI vyvazující faktor narušuje stabilitu této struktury, čímž se znovu odkrývají geranylové skupiny na proteinu RAB a ten se váže zpět do membrány (*Ali & Seabra, 2005). Toto schéma je platné i pro RAB1. Primárním aktivujícím faktorem (GEF) je proteinový komplex označovaný jako TRAPP III (transportní proteinová částice III) (Harris *et al.*, 2021). GTPázová aktivita RAB1 je podporována molekulou TBC1D20 (Tre2/Bub2/Cdc16), která tedy funguje jako protein aktivující GTPázu (Haas *et al.*, 2007; Sklan *et al.*, 2007). Vazby na RAB1-GDP jsou schopné obě izoformy GDI (GDI-1 i GDI-2) (Meng *et al.*, 2020). Uvolnění RAB1 zpět do membrány, funkci GDI vyvazujícího faktoru, pak zprostředkovává PRA1 (akceptor prenylovaných proteinů RAB 1) (Martincic, Peralta & Ngsee, 1997; Voss *et al.*, 2019).

3.4 RAB1 a jejich výskyt v buňce

RAB1 jsou, jakožto proteiny funkčně rozkročené mezi řízením časné fáze sekreční dráhy a autofagickými procesy, přítomny primárně na organelách s těmito procesy spjatými. Společná dráha sekretovaných proteinů a RAB1 začíná na endoplazmatickém retikulu, konkrétně na jeho exportních místech (ERES) (Martinez *et al.*, 2016; Westrate *et al.*, 2020). Výskyt RAB1 je dobře popsán i na přechodném kompartmentu mezi ER a GA (ERGIC) (Martinez *et al.*, 2016). Anterográdně přepravované proteiny se z ERGIC dostávají do GA, a i zde jsou proteiny RAB1 přítomny (Martinez *et al.*, 2016; Voss *et al.*, 2019). Zmíněné organely, hlavně pak ERGIC a ER, jsou významné i pro proces autofágie (Huang *et al.*, 2011; Ge *et al.*, 2013, 2017). Autofágie (makroautofágie) umožňuje degradaci celých buněčných organel, velkých proteinových agregátů či patogenů, a to jak ve fyziologických podmínkách, tak při stresu způsobeném například hladověním. Celý proces je zprostředkován specifickou organelou, autofagozomem. Ten nejprve obklopí struktury určené k degradaci a poté fúzuje s lytickými kompartmenty buňky, čímž je jeho obsah degradován (*Barz *et al.*,

2021). I na formujících se autofagozomech se RAB1 nacházejí (Zoppino *et al.*, 2010). Mimo to byly RAB1 detekovány na nezralých sekrečních granulech (Neuman *et al.*, 2021), endozomech buněk krysích ledvin (Mukhopadhyay *et al.*, 2011) a váčcích asociovaných s lipidickými rafty vedoucího okraje pohybujících se buněk (Wang *et al.*, 2010).

Vzhledem k tomu, že jakožto regulátory váčkového transportu působí RAB1 primárně na rozhraní ER–ERGIC–GA (Tisdale *et al.*, 1992; Martinez *et al.*, 2016; Shomron *et al.*, 2021), tak pro zbytek práce bude za stěžejní považován výskyt RAB1 právě na těchto organelách. Membrány těchto organel budou popisovány jako “membrány spojené s RAB1“ a bude u nich sledováno, jaké fosfoinositidy obsahují – a to jak v klidovém stavu, tak při procesu autofágie.

3.5 Membrány spojené s RAB1

3.5.1 Endoplazmatické retikulum

ER je membránová struktura přímo navazující na jadernou membránu a tvořící v pericentrozomálním prostoru buňky membránové listy, ze kterých vystupuje směrem k buněčné periferii vysoce dynamická, vzájemně provázaná síť tubulů (Hu *et al.*, 2008). ER je funkčně spojeno se syntézou, úpravami a kontrolou kvality mnoha proteinů a lipidů, autofágií či s regulací homeostázy vápníkových kationtů (Axe *et al.*, 2008; *Perkins & Allan, 2021). Export proteinů z ER je zprostředkován pomocí ERES, vezikulo-tubulárních domén uzpůsobených k třídění sekretovaných proteinů a tvorbě transportních struktur. Ty jsou přímo propojeny s endoplazmatickým retikulem, a to nejčastěji jedním úzkým krčkem, se kterým asociují pláště COPII (komplexů plášťových proteinů II) (Weigel *et al.*, 2021).

3.5.2 ERGIC

Komplexní systém membránových struktur funkčně propojující výstupní místa endoplazmatického retikula a cis stranu Golgiho aparátu bývá v literatuře nazýván přechodným kompartmentem mezi ER a GA (ERGIC), přechodným kompartmentem (IC) či vezikulo-tubulárním shlukem (VTC) (Xu & Hay, 2004; Marie *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2022). Je tvořen velkým množstvím globulárních, tubulárních či globulo-tubulárních útvarů, z nichž některé jsou velmi dynamické a jiné spíše stabilní. Tyto útvary jsou přítomny jak na buněčné periferii, tak v centrozomálním prostoru buňky (Sannerud *et al.*, 2006; Marie *et al.*, 2009). Tvarově rozdílné struktury ERGIC se liší obsahem proteinů s nimi interagujícími. Pro globulární části je typický vyšší obsah COPI (komplexů plášťových proteinů I), naopak membrány tubulárních útvarů asociují s větší preferencí s RAB1 (Sannerud *et al.*, 2006). V přímé asociaci s centrozomem byla popsána část ERGIC, označovaná jako pericentrozomální doména přechodného kompartmentu (pIC). Ta je stabilní strukturou, obohacenou pláští COPI, podílející se na obousměrném transportu mezi cis-GA a periferními částmi ERGIC (Marie *et al.*, 2009). Jejich strukturální integrita je do velké míry zachována i během dělení buněk (Marie *et al.*, 2012).

Diverzita struktur jednotlivých částí ERGIC a jejich dynamiky předestírá, že tento systém je schopný plnit velké množství různých funkcí. Kromě jeho esenciální role ve zprostředkování obousměrného

transportu mezi ERES a GA je dále popsáno několik dalších procesů, na kterých se podílí. Jedná se například o kontrolu kvality sekretovaných proteinů, signalizaci, autofágii či propojování jiných buněčných struktur než pouze ER s GA (*Saraste & Marie, 2018). Přímé propojení endozomálního systému a ERGIC bylo popsáno například při pozorování autofagicky významného proteinu ATG9A (autofágii příbuzného proteinu 9). Přenos tohoto proteinu mezi recyklačními endozomy a ERGIC je zprostředkován i za účasti TRAPPIII, aktivačního faktoru RAB1. Ten na váčcích ještě obsahujících endozomálně specifický RAB11 aktivuje RAB1, čímž dochází k zapojení váčků do systému ERGIC (Lamb *et al.*, 2016). Propojení ERGIC a endozomálního systému pak umožňuje i transport některých proteinů na plazmatickou membránu bez účasti Golgiho aparátu, například nekonvenční transport CFTR (regulátoru transmembránové vodivosti u cystické fibrózy) v podmínkách spojených se stresem na ER (Marie *et al.*, 2009; Piao *et al.*, 2017).

3.5.3 Golgiho aparát

GA je membránový komplex, který hraje ústřední roli při sekreci, třídění a úpravách nově syntetizovaných proteinů (*Li, Ahat & Wang, 2019). Golgiho aparát savců je souborem několika stohů, tvořených více (5-8) vzájemně propojenými cisternami. Jednotlivé stohy jsou mezi sebou laterálně propojené tubulárními strukturami (Rambourg & Clermont, 1986). Celý stoh je polarizovaný. Na cis stranu jsou dopravovány nově syntetizované proteiny, trans cisterna dává vzniknout provázaným tubulárním strukturám nazývaným sítí trans-Golgi (TGN), které jsou specializovanými exportními místy GA (Rambourg & Clermont, 1986; Presley *et al.*, 1997; Anitei *et al.*, 2017; *Li, Ahat & Wang, 2019).

3.6 RAB1, časná sekrece a autofágie

Ačkoliv je známá a dobře popsaná celá řada proteinů a proteinových komplexů podílejících se na transportu z ER do GA, tedy procesu časné sekrece, jejich funkční propojení a přesná podoba transportu je stále předmětem diskuze. Je taktéž důležité podotknout, že transport mezi ER a GA není za každé situace stejný. Liší se například ve vzdálenosti mezi ERES a GA, kdy při transportu mezi periferními ERES a GA je náklad přepravován na větší vzdálenosti než v situacích, kdy jsou ERES těsně asociovány s GA. Dalším podstatným rozdílem může být například velikost přepravované částice. Recentní modely tohoto procesu časné sekrece u savčích buněk jsou většinou jednotné v popisu jejího základního schématu. Proteiny předurčené k transportu do GA jsou koncentrovány v ERES za účasti COPII. Podjednotky COPII jsou s ERES stabilně spojeny, čímž pomáhají udržovat jejich identitu. Z ERES proteiny odchází v transportních strukturách již neobsahujících COPII. Tyto struktury velmi rychle, nejspíš již při jejich vzniku, asociují s pláští COPI. Často jsou pak popisovány jako součást systému ERGIC a zprostředkují, že jsou sekretované proteiny na konci této kaskády doručeny až na cis-GA (Westrate *et al.*, 2020; Shomron *et al.*, 2021; Weigel *et al.*, 2021). Někteří autoři předpokládají, že v situacích, kdy se ERES dostává do těsné blízkosti GA, dochází k přímému přechodnému propojení obou struktur, čímž vzniká tunel uzpůsobený k transportu proteinů mezi oběma organelami (Shomron *et al.*, 2021). RAB1 celý tento proces doprovázejí (Shomron *et al.*, 2021). Jsou nepostradatelné pro uvolnění nákladu z ERES (Westrate *et al.*, 2020), zprostředkovávají asociaci struktur

obsahujících náklad s podjednotkami COPI (Monetta *et al.*, 2007), propojují je s cytoskeletem (Russo *et al.*, 2016) a podílejí se na jejich splývání s GA (Sönnichsen *et al.*, 1998; Weide *et al.*, 2001). Někteří autoři také popisují, že RAB1 dokáže za účasti svých efektorů propojovat struktury obsahující COPII s GA (Allan, Moyer & Balch, 2000). Pohledem recentních modelů by taková funkce mohla být důležitá pro ustanovení přímého přechodného propojení mezi ERES a cis-GA.

I autofagické dráhy jsou úzce provázány s RAB1, zvláště pak časná fáze biogeneze autofagozomů. V savčích buňkách se tento proces odehrává většinou v těsné blízkosti endoplazmatického retikula, konkrétně jeho přechodné oblasti, obohacené o PI(3)P a ATG proteiny, nazývané omegazom (Axe *et al.*, 2008). Tam vzniká fagopór, membránový útvar miskovitého charakteru, který je z různých zdrojů zásobován komponentami membrány. To má za následek jeho dynamické zvětšování a uzavírání do struktury váčku, obalujícího částice, které poté budou degradovány. Uzavřením fagopóru vzniká již maturovaný autofagozom (*Barz *et al.*, 2021). Proteiny zásadní pro tento proces bývají rozděleny do následujících funkčních skupin: komplex ULK1 (Unc-51 odpovídající autofágii aktivující kinázy 1), proteiny zapojené do přenosu lipidů ATG9A a ATG2-ATG18, PIK3C3-CI (komplex I fosfatidylinositol 3-kinázy třídy III) a systémy podobné tomu ubikvitinačnímu, podílející se na lipidaci autofagických proteinů (*Barz *et al.*, 2021)

S některými z nich jsou proteiny RAB1 funkčně spojené. Biogeneze autofagozomu začíná tzv. nukleací membrán, procesem, který dává vzniknout strukturním základům fagopóru. Pro průběh nukleace membrán jsou důležité struktury obsahující ATG9A, kinázový komplex ULK1 a membrána ER (Karanasios *et al.*, 2016). RAB1 se přímo podílejí na přenosu proteinů komplexu ULK1 do blízkosti nukleačních míst na endoplazmatickém retikulu (Webster *et al.*, 2016). Také ovlivňují transport ATG9A pozitivních váčků (Lamb *et al.*, 2016; Kakuta *et al.*, 2017). GTPázy RAB1 jsou tedy jedním z důležitých regulátorů iniciace vývoje autofagozomu. Dále RAB1 napomáhají aktivaci PIK3C3-CI (Tremel *et al.*, 2021). PIK3C3-CI a jím produkováný PI(3)P hraje významnou roli v mnoha událostech doprovázejících tvorbu autofagozomu, včetně právě popsané nukleace membrán (Axe *et al.*, 2008; Ge, Zhang & Schekman, 2014). Dalším dokladem o důležitosti RAB1 v procesu autofágie je pak i jejich provázání s významnou senzorio-regulační rapamycinovou dráhou. Díky ní jsou řízeny některé buněčné pochody v závislosti na hladině živin v buňce (Thomas *et al.*, 2014). RAB1 fungují jako senzory hladiny aminokyselin, které při jejich dostatku pomáhají, za účasti proteinu RHEB (homolog Ras obohacený v mozku), aktivovat mTORC1 (savčí cíl rapamycinového komplexu 1). To může vést k buněčné proliferaci. Proto je zvýšená produkce RAB1 v buňkách spojována i s nádorovými onemocněními (Thomas *et al.*, 2014). Zároveň i mTORC1 funguje jako regulátor činnosti RAB1. Pokud je mTORC1 aktivní, čemuž odpovídá dostatek živin, jsou jím RAB1 fosforylovány. To inhibuje vazbu RAB1 na autofagický komplex ULK1. Tím je pak narušena i iniciace samotné autofágie v podmínkách dostatku živin (Yao *et al.*, 2023).

3.7 RAB1 a jejich propojení s PIPy

Činnost proteinů podílejících se na membránovém transportu v buňkách je v některých případech řízená koordinovanou aktivitou malých GTPáz a fosfoinositidů. Často dochází k vazbě efektoru na místo jeho

činnosti v závislosti na rozpoznání jak konkrétního PIPu, tak specifické malé GTPázy. Mezi oběma skupinami molekul tedy existuje určité funkční propojení (*Jean & Kiger, 2012).

Ani RAB1 nejsou výjimkou. *In vitro* byla detekována jejich schopnost přímo vázat PI(3)P (Mathiowetz *et al.*, 2017). S proteiny podílejícími se na regulaci tohoto fosfoinositidu v buňce jsou RAB1 taktéž asociovány. Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, RAB1 se podílí na aktivaci PIK3C3- Cl , a tím pádem na tvorbě autofagicky specifické podmnožiny PI(3)P (Tremel *et al.*, 2021).

I s degradací PI(3)P jsou RAB1 spojeny, a to skrze několik členů proteinové rodiny myotubularinů. Katalyticky aktivní členové této rodiny jsou fosfatidylinositolfosfát/inositolpolyfosfát 3-fosfatázy. Evolučně konzervovaných je však i několik enzymaticky disfunkčních myotubularinů. Ty mohou heterodimerizovat s aktivními členy rodiny a tím modulovat jejich enzymatické vlastnosti (Zou *et al.*, 2012; *Raess *et al.*, 2017). Přímá vazba byla detekována mezi RAB1 a MTMR6 (myotubularinu příbuzným proteinem 6) (Mochizuki *et al.*, 2013). MTMR6 vykazuje *in vitro* nízkou enzymatickou aktivitu vůči PI(3)P a PI(3,5)P₂. Ta může být zesílena vazbou neaktivního MTMR9. Preferovaným substrátem tohoto komplexu je PI(3,5)P₂, avšak zachována je i slabší enzymatická aktivita vůči PI(3)P. Doubravská *et al.*, 2020 popisují, že při manipulaci s množstvím MTMR9 v buňkách dochází ke změnám umístění RAB1A. Při nadprodukci MTMR9 dochází k posílení vezikulární lokalizace RAB1A. To vše ukazuje na to, že RAB1 je, kromě přímé vazby na PI(3)P, funkčně propojen i s regulací alespoň některých podmnožin tohoto fosfoinositidu v buňkách.

I s fosfatázami metabolizujícími jiné fosfoinositidy je RAB1 asociován. Bylo popsáno, že je schopen vázat dvě vzájemně příbuzné fosfatidylinositolpolyfosfát 5-fosfatázy, OCRL1 (protein Loweova okulocerebrorenálního syndromu 1) a INPP5B (inositolpolyfosfát 5-fosfatáza izoforma B). Pro obě je interakce s proteiny z rodiny RAB zásadní pro transport do místa jejich působení (Hyvola *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2007). Dále je RAB1 spojován s některými aspekty regulace PI(4)P. Dumaresq-Doiron *et al.*, 2010 navrhuje, že RAB1 se podílí na aktivaci PI4KIII A na membránách Golgiho aparátu. Je tedy pravděpodobné, že RAB1 není asociován pouze s PI(3)P, ale že zprostředkovaně ovlivňuje i jiné fosfoinositidy.

4 PIPy v membránách spojených s RAB1

4.1 Způsoby přímé detekce PIPů

Pro pozorování PIPů *in vivo* se využívají fluorescenčně značené sondy. Ty obsahují proteinové domény schopné specifické vazby na jednotlivé fosfoinositidy (Weixel *et al.*, 2005; Hammond, Machner & Balla, 2014). Tyto sondy nám umožňují nahlédnout i do dynamiky procesů funkčně spojených s těmito lipidy (Blumental-Perry *et al.*, 2006). Je však nutné brát v potaz to, že vyvazování fosfoinositidů vazebnou doménou dynamiku pozorovaného procesu může měnit, například ji inhibovat (Ge, Zhang & Schekman, 2014). Další vlastností těchto sond je, že často váží PIPy v kontextu dalších molekul asociovaných s membránami (Godi *et al.*, 2004; Weixel *et al.*, 2005). Proto pak mohou detekovat jen jejich určitou podmnožinu v buňce. Pro pozorování PIPů

přímo v buňkách je možné použít i je vzájemné protilátky. Tento způsob vyžaduje fixaci buněk. Dále jsou s ním spojené určité pochybnosti o specifitě protilátek (Kalasova *et al.*, 2016). Využívá se i biochemických přístupů. Některé z nich jsou založené na použití radioizotopů v kombinaci s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) (Sarkes & Rameh, 2010), jiné pak například na metodách hmotností spektrometrie (Clark *et al.*, 2011; Cheung *et al.*, 2021). Některé postupy založené na hmotnostní spektrometrii umožňují i identifikaci mastných kyselin sledovaných PIPů (Clark *et al.*, 2011). Při využití biochemických metod k popisu složení fosfoinositidů v membránách jednotlivých organel je nutné tyto membrány nejprve izolovat, což může přinášet komplikace. Existuje tedy několik různých přístupů umožňujících detekci a rozlišení jednotlivých izoform fosfoinositidů, každý s unikátními vlastnostmi i limity.

4.2 Přímá detekce PIPů na ER

Přítomnost několika izoform PIPů v membráně ER byla objevena přístupy používajícími specifické sondy. Konkrétně byly takto v oblasti ER detekovány PI(3)P, PI(4)P a PI(4,5)P₂ (Watt *et al.*, 2002; Blumental-Perry *et al.*, 2006; Klinkenberg *et al.*, 2014; B. cun Zhang *et al.*, 2020). Po ošetření pozorovaných buněk mitogeny (např. destičkovým růstovým faktorem) nebo stresory (např. H₂O₂) se na membránu ER vázaly i sondy značící PI(3,4)P₂ a PI(3,4,5)P₃ (Sato *et al.*, 2003; Watt *et al.*, 2004). Za využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) byla zjištěna přítomnost PI(3)P a PI(5)P ve vzorcích tvořených membránami hladkého endoplazmatického retikula (HER) a GA (Sarkes & Rameh, 2010).

4.3 Proteiny asociované s PIPy na ER a jejich funkční význam

Pro pochopení funkčního významu přítomnosti PIPů na membráně ER a objasnění regulace jejich lokalizace je stěžejní prozkoumat i jejich efekторы, kinázy a fosfatázy spojené s ER.

4.3.1 SAC1 na ER

Funkčně významnou fosfatázou fosfoinositidů, asociovanou s endoplazmatickým retikulem, je SAC1 (supresor aktinu 1). Jedná se o integrální membránový protein obsahující C-terminální transmembránovou doménu (Whitters *et al.*, 1993; Nemoto *et al.*, 2000). V kvasince *S. cerevisiae* tento enzym defosforyluje PI(3)P, PI(4)P a s nízkou aktivitou i PI(3,5)P₂. *In vivo* preferovaným substrátem je PI(4)P (Hughes *et al.*, 2000). Savčí SAC1 je exprimována tkáňově nespecificky a lokalizována je obdobně jako její kvasinkový homolog. U lidské SAC1 je její katalytická aktivita, testovaná *in vitro*, omezená pouze na PI(3)P a PI(4)P (Nemoto *et al.*, 2000; Rohde *et al.*, 2003).

SAC1 mění svou lokalizaci mezi ER a GA v závislosti na stavu buňky. Při stresu spojeném s nedostatkem živin se SAC1 přesouvá z ER na GA, kde svou fosfatázovou aktivitou způsobuje depleci PI(4)P a tím inhibuje sekreci z TGN (Faulhammer *et al.*, 2007; Blagoveshchenskaya *et al.*, 2008). U savčích buněk je lokalizace SAC1 závislá i na signalizaci p38 mitogenem-aktivované protein kinázy (MAPK), jejíž aktivita posiluje přítomnost SAC1 na ER. Transport SAC1 mezi endoplazmatickým retikulem a Golgiho aparátem probíhá v závislosti na jejím oligomerizačním stavu. Aktivitou p38 MAPK disociují SAC1 oligomery přítomné na

membráně GA. Rozpadem těchto komplexů je odkryt na SAC1 přítomný vazebný motiv pro podjednotky COPI. Plášť COPI poté zprostředkuje přenos monomerů SAC1 na ER. Naopak oligomery SAC1 asociují s podjednotkami COPII, které regulují transport v opačném směru, tedy z ER do GA (Blagoveshchenskaya *et al.*, 2008).

SAC1 na endoplazmatickém retikulu udržuje nízké koncentrace svých substrátů. Tím v oblastech kontaktů membrán (OKM) vytváří gradient PI(4)P mezi endoplazmatickým retikulem a na PI(4)P bohatšími strukturami plazmatické membrány a Golgiho aparátu (Chung *et al.*, 2015; Moser von Filseck *et al.*, 2015). Tento rozdíl v koncentracích PI(4)P umožňuje nevezikulární přenos lipidů přes OKM a je popisován také jako "fosfoinositidová hnací síla". Pro tuto funkci SAC1 je důležité, že její katalytická aktivita probíhá převážně v *cis*. To znamená, že defosforyluje pouze na membráně, na které je přítomna. Případná trans aktivita, kterou by SAC1 byla schopná enzymaticky působit i na membrány přes OKM, by tvorbu takového gradientu totiž mohla narušovat (Zewe *et al.*, 2018).

Minimální model daného nevezikulárního transportu lipidů přes OKM byl navrhnout a ilustrován na příkladu transportu sterolu na GA. Transport je založen na činnosti tří proteinových komponent a to OSBP (oxysterol-vazebného proteinu), obecného retikulárního receptoru VAP-A (protein asociovaný s VAMP A) a právě SAC1 (Mesmin *et al.*, 2013).

OSBP obsahuje ve své struktuře N-koncovou plekstrin-homologní (PH) doménu a centrální FFAT motiv (dva fenylalaniny v kyselém okolí) (Levine & Munro, 2002; Furuita *et al.*, 2010). PH doména OSBP asociuje s PI(4)P a malou GTPázou ARF1 (ADP ribosylační faktor 1), čímž se váže do membrány GA (Levine & Munro, 2002). FFAT motiv zprostředkovává asociaci OSBP s endoplazmatickým retikulem, konkrétně s VAP-A (Furuita *et al.*, 2010). PH doména spolu s FFAT motivem tedy dovoluje OSBP vázat membrány ER a GA zároveň, čímž dochází k jejich přiblížení. Katalytická OSBP příbuzná doména (ORD), kterou OSBP taktéž obsahuje, poté přenáší lipidy mezi membránami. Vnášení mutací do této domény narušuje vazbu přenášených lipidů a inhibuje jejich transport (Maeda *et al.*, 2013).

Dynamika přenosu sterolu byla popsána ve čtyřech krocích: 1) přiblížení membrán ER a GA, 2) přenos sterolu z ER na GA proti koncentračnímu gradientu, 3) přenos PI(4)P po koncentračním gradientu z GA do ER a 4) defosforylace přeneseného PI(4)P retikulární SAC1 (Mesmin *et al.*, 2013). Principiálně velmi podobnými mechanismy je v savčích i kvasinkových buňkách přenášen fosfatidylserin z ER na PM pomocí proteinů z rodiny OSBP příbuzných proteinů (Chung *et al.*, 2015; Moser von Filseck *et al.*, 2015). Pro transport ceramidu z ER do GA, zprostředkovaný ceramid-transportním proteinem (CERT), je taktéž důležitý rozdíl v koncentracích PI(4)P, avšak v tomto případě nedochází k zpětnému přenosu PI(4)P na ER (Hanada *et al.*, 2003).

SAC1 je tedy fosfatázou, která udržuje na endoplazmatickém retikulu nízké koncentrace monofosforylovaných PIPů. Tím se zapojuje i do nevezikulárního transportu lipidů mezi ER a jinými

organelami (Mesmin *et al.*, 2013; Chung *et al.*, 2015; Moser von Filseck *et al.*, 2015). V případě nedostatku živin v buňce se přemísťuje na Golgiho aparát, kde inhibuje sekreci z TGN (Faulhammer *et al.*, 2007; Blagoveshchenskaya *et al.*, 2008).

4.3.2 *PtdIns 4-kinázy a 3-kinázy na ER*

Dalším enzymem funkčně spojeným s ER a zároveň s PI(4)P je savčí PI4KIII A (fosfatidylinositol 4-kináza IIIA). Přítomnost PI4KIII A na ER byla, za užití fluorescenčně značených protilátek, popsána ve studii Wong *et al.*, 1997. Limitem této práce je, že byla sledována pouze exogenně exprimovaná izoforma 1 (97 kDa). Tato forma proteinu je však pravděpodobně katalyticky neaktivní a její endogenní přítomnost nebyla v testovaných lidských tkáních (a buněčných liniích) prokázána (Szentpetery *et al.*, 2011). Lokalizace fyziologicky relevantní izoformy 2 (230 kDa) je pak spojena hlavně s PM a je zprostředkována její interakcí s dvojicí na PM přítomných proteinů TTC7B a EFR3B (Nakatsu *et al.*, 2012).

Funkční role PI4KIII A je však popsána i na ER, konkrétně při regulaci ERES (Farhan *et al.*, 2008; Klinkenberg *et al.*, 2014). Při redukci množství (KD) PI4KIII A byl snížen počet ERES a zároveň byla inhibována adaptivní odpověď na akutní zvýšení potřeby třídit sekretované proteiny do ERES. Oba tyto efekty KD byly napraveny pomocí bovinní PI4KIII A (Farhan *et al.*, 2008). Význam PI(4)P pro funkci ERES je popsán i v Blumental-Perry *et al.*, 2006. Autoři tohoto článku popisují zpomalení a narušení sekrece proteinu G viru vezikulární stomatitisidy (VSVG) při depleci, respektive vyvazování PI(4)P. Vzhledem k tomu, že aplikací wortmanninu, inhibitoru i fosfatidylinositol 4-kináz typu III (zmíněné PI4KIII A a PI4KIII B) (Meyers & Cantley, 1997; Balla *et al.*, 2005), nedochází k detekovatelné deregulaci PI(4)P na ER, předpokládají autoři článku účast fosfatidylinositol 4-kináz typu II (PI4KII). Důležitost přítomnosti PI(4)P na ERES je popsána i pro transport fyziologického nákladu, N-kadherin- β -kateninového komplexu (Hayashi *et al.*, 2007).

Pro sekreci imunologicky významného proteinu STING (stimulátoru interferonových genů) je stěžejní obohacení jiného PIPu na ERES, a to PI(3)P. V tomto procesu hraje roli PIK3C3 (katalytická podjednotka fosfatidylinositol 3-kinázy typu 3), také známá jako VPS34, jejíž specifickou inhibicí dochází k narušení sekrece proteinu STING (B. cun Zhang *et al.*, 2020). PIK3C3 je z rodiny fosfatidylinositol 3-kináz. *In vivo* tvoří dva komplexy, každý se specifickou lokalizací a rozdílnou regulací. Již zmíněný komplex I, který je aktivován RAB1A, je spojen hlavně s autofágií (kap. 3.5), komplex II se zapojuje do endocytózy (Tremel *et al.*, 2021).

Jako efektor PIPů na ERES je popsán protein P125A (Klinkenberg *et al.*, 2014). Tento protein obsahuje tandem sterilního α -motivu (SAM) a DDHD domény *in vitro* vázající všechny monofosforylované PIPy (Inoue *et al.*, 2012). Funkcí P125A je propojení vnitřní a vnější vrstvy COPII pláště a vyvázání COPII ze SEC16A, molekulárního lešení fungujícího v procesu sestavování struktur COPII. Obě tyto aktivity vedou k funkčnímu ustanovení ERES. Pokud dojde k narušení tandemu SAM/DDHD, či inhibici PI4KIII A přestane P125A plnit své funkce (Klinkenberg *et al.*, 2014).

Fosfoinositidy mohou také hrát roli v klenutí membrány v oblasti ERES. Je popsáno, že anionické fosfolipidy koncentrované v jedné vrstvě membrány, navozují její zakřivení (Hirama *et al.*, 2017). Protein SAR1 (se sekrecí spojovaný protein příbuzný RAS 1), GTPáza stěžejní pro ustanovení ERES, *in vitro* asociuje s vyšší preferencí právě s více klenutými membránami (Hanna *et al.*, 2016). Zároveň studie provedená na kvasince *S. cerevisiae* ukazuje, že ERES jsou lokalizovány hlavně v doménách ER s vysokým klenutím membrán (Okamoto *et al.*, 2012). To vše jasně ukazuje na klíčovou roli některých fosfoinositidů v procesu ustanovování exportních míst endoplazmatického retikula. Zároveň je deplecí některých PIPů v oblasti ERES přímo zasažena sekrece několika, a to i fyziologicky důležitých, proteinů. Jako efektor fosfoinositidů na ERES je doposud popsán pouze protein P125A. Je však pravděpodobné, že v budoucnu zde budou popsány i další efekторы těchto lipidů.

Retikulární PI(3)P, konkrétně jeho podmnožina lokalizovaná v oblasti omegazomů, je dále spojený i s procesem autofágie (Axe *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2011). Omegazom je síť tubulárních útvarů, na kterých se vyskytuje PI(3)P a která propojuje endoplazmatické retikulum s vyvíjejícím se fagopórem. Je tedy platformou alespoň pro část vývoje fagopóru (Uemura *et al.*, 2014). Udržování kontaktu mezi fagopórem a ER může být důležité například pro nevezikulární přenos lipidů na rostoucí fagopór (Maeda, Otomo & Otomo, 2019). S ustanovením omegazomů a s tím spojenou syntézou PI(3)P je funkčně spjatý výše zmíněný komplex PIK3C3-CI (kap. 3.5) (Axe *et al.*, 2008; Karanasios *et al.*, 2013; Tremel *et al.*, 2021). Jak již bylo popsáno, do aktivace tohoto komplexu se zapojuje RAB1A (Tremel *et al.*, 2021). Dalším důležitým aktivátorem PIK3C3-CI je i aktivní komplex ULK1. Jeho podjednotka ATG13A se váže na negativně nabitě fosfolipidy, včetně PI(3)P, čímž dochází k obohacení komplexu ULK1 v oblasti formujících se omegazomů a pozitivnímu zpětnovazebnému posílení aktivace PIK3C3-CI (Karanasios *et al.*, 2013). Zároveň je do míst vzniku omegazomu pomocí ATG9A pozitivních váček doručována i PI4KIIIB či PI4KIIA, které mohou produkcí PI(4)P také napomáhat vazbě ATG13A a tedy za účasti ULK1 podporovat tvorbu PI(3)P na omegazomech (Karanasios *et al.*, 2013; Judith *et al.*, 2019). Utváření omegazomu je tedy dynamický proces, který zapojuje membrány ER, i v závislosti na tvorbě fosfoinositidů, do procesu autofágie.

4.3.3 *PIP₂ a PIP₃ fosfatázy na ER*

S endoplazmatickým retikulem je také spojeno několik fosfatáz, jejichž primárními substráty jsou PIP₂ či PIP₃ (Walker, Downes & Leslie, 2001; Wiradjaja *et al.*, 2001; Gurung *et al.*, 2003). Fosfatáza TPIP (TPTE a PTEN homologní inositol-lipidová fosfatáza) je u člověka tkáňově specifický enzym, exprimovaný v mozku, žaludku a varlatech. Na ER je přítomná izoforma α . Fosfatázová doména TPIP defosforyluje *in vitro* nejúčinněji 3. pozici PI(3,4,5)P₃. Vykazuje však fosfatázovou aktivitu i vůči ostatním na 3. pozici fosforylovaným fosfoinositidům (Walker, Downes & Leslie, 2001).

INPP5K (inositolpolyfosfát 5-fosfatáza K) je savčí protein s 5-fosfatázovou aktivitou vůči PI(4,5)P₂ i PI(3,4,5)P₃ (Ijuin *et al.*, 2000). Je exprimována tkáňově nespecificky a lokalizována u nestimulovaných buněk

v membráně ER (Gurung *et al.*, 2003). Retikulární umístění je zajištěno interakcí s ARL6IP1 (Dong *et al.*, 2018). Při stimulaci buněk epidermálním růstovým faktorem se INPP5K přesouvá na PM (Gurung *et al.*, 2003). Retikulární PI(4,5)P₂ 5-fosfatázou je u kvasinky *S. cerevisiae* Inp54p (PIP₂ specifická fosfatáza). Ta má svou roli i v regulaci sekrece. Mutace narušující fungování Inp54p zvyšuje míru sekrece exogenně exprimovaného reportérového proteinu (bovinního pankreatického trypsinového inhibitoru) do média, ve kterém jsou kvasinky kultivovány (Wiradjaja *et al.*, 2001). Možnou úlohu PIP₂ na regulaci proteinové sekrece popisuje i dříve zmíněná práce Blumental-Perry *et al.*, 2006.

| lokalizace | PIPy | enzymy | funkce |
|---|---|--|--|
| Endoplazmatické retikulum | PI(3)P (B. cun Zhang <i>et al.</i> , 2020) | PIK3C3 (B. cun Zhang <i>et al.</i> , 2020) | sekrece, autofágie (Axe <i>et al.</i> , 2008; Huang <i>et al.</i> , 2011; B. cun Zhang <i>et al.</i> , 2020) |
| | PI(4)P (Blumental-Perry <i>et al.</i> , 2006) | SAC1 (Nemoto <i>et al.</i> , 2000) | transport lipidů (Mesmin <i>et al.</i> , 2013; Chung <i>et al.</i> , 2015; Moser von Filseck <i>et al.</i> , 2015) |
| | | PI4KIIIA (Farhan <i>et al.</i> , 2008; Klinkenberg <i>et al.</i> , 2014) | sekrece (Farhan <i>et al.</i> , 2008; Klinkenberg <i>et al.</i> , 2014) |
| | | PI4 II. typu (Blumental-Perry <i>et al.</i> , 2006) | sekrece (Blumental-Perry <i>et al.</i> , 2006) |
| | PI(5)P (Sarkes & Rameh, 2010) | | |
| | PI(3,4)P ₂ (Watt <i>et al.</i> , 2004) | | |
| | PI(4,5)P ₂ (Watt <i>et al.</i> , 2002) | INPP5K (Gurung <i>et al.</i> , 2003) | |
| | | Inp54p (Wiradjaja <i>et al.</i> , 2001) | sekrece (Wiradjaja <i>et al.</i> , 2001) |
| PI(3,4,5)P ₃ (Sato <i>et al.</i> , 2003) | TPIP (Walker, Downes & Leslie, 2001) | | |

Tab. č. 1: Přehled PIPů a enzymů metabolizujících PIPy na ER

4.4 Přímá detekce PIPů na ERGIC

Hammond *et al.*, 2009 přímo detekovali PI(4)P na ERGIC a to jak za využití protilátky, tak pomocí PH domény FAPP1. Ta *in vitro* specificky váže PI(4)P (Dowler *et al.*, 2000).

4.5 Proteiny asociované s PIPy na ERGIC a jejich funkční význam

Proteinem, jehož vazba na ERGIC je zprostředkována fosfoinositidy, je fosfolipáza A₁ KIAA0725p. Ta je na ERGIC vázána pomocí tandemu domény SAM (obsahující sterilní α motif) a domény DDHD. *In vitro* KIAA0725p váže kromě PI(4)P s menší afinitou i PI(3)P a PI(5)P. Při depleci PI(4)P, a potencionálně i PI(3)P, z ERGIC a GA pomocí rekombinantní SAC1 dochází k přerušení asociace KIAA0725p s ERGIC a k její redistribuci do cytoplazmy (Inoue *et al.*, 2012).

4.5.1 PIPy v autofágii na ERGIC

I samotná fosfatáza SAC1 byla detekována na ERGIC. Kolokalizace mezi SAC1 a ERGIC-53, proteinem typickým pro ERGIC, byla pozorována u COS-7 buněk, které byly vystaveny nedostatku živin (Pahuja *et al.*, 2015). H. Zhang *et al.*, 2020 pak popisují, že pro optimální fungování alespoň některých typů autofágie je důležitá deplece PI(4)P na rozhraní ERGIC/GA zprostředkovaná právě SAC1. Při redukci množství SAC1 (KD) v HeLa buňkách autoři pozorovali zvětšené množství autofagozomů v cytoplazmě, což bylo způsobené inhibicí jejich fúze s lysozomy. Tyto poznatky rozšiřují již představený model činnosti SAC1 mezi endoplazmatickým retikulem a Golgiho aparátem (kap. 4.3.1). Ukazují, že hladověním iniciovaný přesun enzymu z ER na GA není důležitý pouze pro inhibici transportu proteinů z TGN, ale že SAC1 enzymaticky působí i na rozhraní ERGIC/GA, což hraje důležitou roli v procesu autofágie.

In vitro experimenty ukázaly, že na lipidaci proteinu LC3 (lehkého řetězce 3 s mikrotubuly asociovaného proteinu 1A/1B), což je proces, který je zásadní pro biogenezi autofagozomu (Tanida *et al.*, 1999; Kabeya *et al.*, 2000), se nejaktivněji podílí membrány pocházející z ERGIC (Ge *et al.*, 2013). Při pozorování hladovějících buněk ošetřených látkami způsobujícími rozpad ERGIC (H89 a klofibrátem) nebyly detekovány shluky váčků obsahujících LC3, které běžně značí probíhající autofágii. Dále nebyla detekována ani místa bohatá na časná markery biogeneze autofagozomu ATG14A a DFCP1 (protein obsahující dvojitou FYVE doménu 1) (Ge *et al.*, 2013). Srovnatelný efekt na průběh lipidace LC3 mělo použití 3-methyladeninu, inhibitoru produkce PI(3)P (Ge, Zhang & Schekman, 2014). Tato pozorování dohromady poukazují na důležitost PI(3)P a ERGIC v procesu lipidace LC3 a tím pádem i v procesu biogeneze autofagozomu. Ge *et al.*, 2014 poté předpokládají, že PI(3)P, tvořený v závislosti na autofagických signálech, řídí asociaci COPII struktur s ERGIC. Ty pak zprostředkovávají tvorbu váčků, ve kterých probíhá lipidace LC3 a které se podílejí na tvorbě autofagozomu. V pozdější práci Ge *et al.*, 2017 popisují, že celý tento proces provází rozsáhlá přestavba ERES, která umožní asociaci COPII s ERGIC.

4.5.2 PIP fosfatázy na ERGIC

Jak s procesem autofágie, tak s ERGIC je spojeno i několik proteinů z již zmíněné rodiny fosfatidylinositolfosfát/polyfosfát 3-fosfatáz, myotubularinů (kap. 3.6) (Zou *et al.*, 2012; Mochizuki *et al.*, 2013; Allen *et al.*, 2020; Doubravská *et al.*, 2020). Přímo na ERGIC byly detekovány MTMR6, MTMR8 i MTMR9 (Mochizuki *et al.*, 2013; Doubravská *et al.*, 2020).

S autofágií spojený PI(3)P je preferovaným substrátem dimeru aktivní fosfatázy MTMR8 a neaktivního MTMR9. Při zvýšení množství obou těchto proteinů zároveň dochází v buňkách k inhibici autofágie (Zou *et al.*, 2012). Naopak při snížení jejich množství v buňkách je detekována zvýšená autofagická činnost. Stejný efekt má KD i pouze MTMR9 (Zou *et al.*, 2012; Doubravská *et al.*, 2020). Zou *et al.*, 2012 dále popisují, že v hladovějících buňkách dochází k rozpadu komplexu MTMR8/MTMR9. Samotný MTMR8, oddělený od MTMR9, má výrazně nižší fosfatázovou aktivitu vůči PI(3)P. Při zvýšené autofagické činnosti v buňkách je tedy tímto způsobem nejspíš redukována deplece PI(3)P, což umožňuje optimální fungování

procesů biogeneze autofagozomu. Všechny tyto výsledky nasvědčují tomu, že MTMR9 je v komplexu s MTMR8, případně jiným proteinem, negativním regulátorem autofágie.

Katalycky inaktivní MTMR9 je kromě autofágie spojený i s regulací sekrece. Při zvýšení množství proteinu pomocí transfekce bylo pozorováno zpomalení sekrece VSVG (Doubravská *et al.*, 2020). Funkční propojení s regulací sekrece bylo popsáno i u dalšího z s ERGIC asociovaných myotubularinů, u MTMR6. Redukce tohoto proteinu (KD) v normálních krysích ledvinových (NRK) buňkách urychlila sekreci VSVG. Taktéž byla u MTMR6 popsána role v regulaci formování autofagozomu (Mochizuki *et al.*, 2013). Myotubulariny spojené s ERGIC jsou tedy molekulami asociovanými s RAB1, které jsou pravděpodobně funkčně rozkročené mezi procesy sekrece a autofágie.

Poslední fosfatidylinositolpolyfosfát fosfatázou detekovanou na ERGIC je již zmíněna INPP5B (kap. 3.6) (Williams *et al.*, 2007). Preferovaným substrátem tohoto enzymu je PI(4,5)P₂, jeho působením dochází k defosforylaci fosfátu na 4. pozici inositolového kruhu. *In vitro* je u INPP5B detekována 4-fosfatázová aktivita i vůči dalším substrátům, včetně PI(3,4,5)P₃ a solubilního inositolu-3,4,5-trifosfátu (Jefferson & Majerus, 1995; Schmid *et al.*, 2004).

| lokalizace | PIPy | enzymy | Funkce |
|------------|--|--|--|
| ERGIC | PI(3)P ND | *dimer MTMR8/9 (Zou <i>et al.</i> , 2012; Doubravská <i>et al.</i> , 2020) | regulace autofágie (Zou <i>et al.</i> , 2012; Doubravská <i>et al.</i> , 2020) |
| | PI(4)P (Hammond, Schiavo & Irvine, 2009) | SAC1 (Pahuja <i>et al.</i> , 2015) | autofágie (H. Zhang <i>et al.</i> , 2020) |
| | PI(3,5)P ₂ ND | *dimer MTMR6/9 (Zou <i>et al.</i> , 2012; Mochizuki <i>et al.</i> , 2013) | regulace sekrece (Mochizuki <i>et al.</i> , 2013) |
| | PI(4,5)P ₂ ND | INPP5B (Williams <i>et al.</i> , 2007) | |

Tab. č. 2: Přehled PIPů a enzymů metabolizujících PIPy na ERGIC; pozn. ND – PIP nebyl přímo detekován, * u myotubularinů byl uveden pouze protein/komplex s největší enzymatickou aktivitou vůči substrátu

4.6 Přímá detekce PIPů na GA

Použitím rekombinantních sond byly na membráně GA detekovány PI(4)P a PI(4,5)P₂ (Watt *et al.*, 2002; Weixel *et al.*, 2005). Přítomnost PI(4)P na GA byla potvrzena nezávisle několika různými sondami. Některé z nich obsahovaly takové PH domény, které jsou schopné selektivně vázat PI(4)P (Levine & Munro, 1998; Weixel *et al.*, 2005). Použita byla i sonda odvozená z bakteriálního proteinu SidM. Tento protein, který je produkován bakterií *Legionella pneumophila*, obsahuje PI(4)P vazebnou doménu P4M (Hammond, Machner & Balla, 2014). Při stimulaci buněk destičkovým růstovým faktorem byl pomocí sondy přechodně pozorován i PI(3,4,5)P₃ (Sato *et al.*, 2003). Jak bylo již dříve zmíněno (kap. 4.2), biochemickou metodou založenou na vysokoúčinné kapalinové chromatografii, byla zjištěna přítomnost PI(3)P a PI(5)P ve směsi tvořené z membrán hladkého endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu (Sarkes & Rameh, 2010).

4.7 Proteiny asociované s PIPy na GA a jejich funkční význam

Studium efektorů a enzymů metabolizujících PIPy na GA nám umožňuje detailněji nahlédnout na regulaci a funkční význam těchto molekul jak v oblasti GA, tak i v kontextu celé buňky. Za majoritní izoformu spojenou s GA bývá v literatuře označován PI(4)P (*Jean & Kiger, 2012). Produkce PI(4)P na GA je u kvasinky *S. cerevisiae* zprostředkována kinázou Pik1p (Strahl *et al.*, 2005). U savčích buněk jsou v tomto procesu zapojeny jejich všechny čtyři PtdIns 4-kinázy, konkrétně PI4KIII A, PI4KII B (homolog Pik1p), PI4KI I A a PI4KI I B. Každá z těchto kináz má na Golgiho aparátu své funkce (Nakagawa, Goto & Kondo, 1996; Godi *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2003; Wieffer *et al.*, 2013). Alespoň některé z nich nejsou vzájemně zcela zastupitelné a regulují rozdílné podmnožiny PI(4)P na GA (Weixel *et al.*, 2005).

4.7.1 PI4KII B

PI4KII B se primárně nachází na GA, ale v menší míře byl tento enzym pozorován i v jádře nebo cytoplazmě (de Graaf *et al.*, 2002). Regulace vazby PI4KII B na membránu GA je komplexní proces, ve kterém hraje roli množství GA rezidentních proteinů, například ACBD3 (acyl-koenzym A vazací doménu obsahující protein 3), GGA2 (s Golgiho aparátem spojený, gama adaptinové ucho obsahující, ARF vazebný protein 2) či ARF (Godi *et al.*, 1999; Klima *et al.*, 2016; Daboussi *et al.*, 2017; Stalder *et al.*, 2024).

Stalder *et al.*, 2024 představují model, který dává do souvislosti asociaci PI4KII B s Golgiho aparátem a doručování sekrečních struktur na Golgiho aparát. ACBD3, vazebný protein PI4KII B, je dle autorů nejprve přechodně navázán na komplex SNARE proteinů, tvořený mezi příchozími váčky a cis-GA samotným. Tato interakce poté zprostředkuje předání ACBD3 na golginy, konkrétně golgin-45 a giantin. Tím je dosaženo stabilní vazby proteinu ACBD3, a s ním tedy i PI4KII B, na cis cisternu Golgiho aparátu. Membránově vázaná PI4KII B pak lokálně produkuje fosfatidylinositol-4-fosfát (Klima *et al.*, 2016; Stalder *et al.*, 2024). Tento model dodává nový vhled na lokální regulaci PI(4)P v místech splývání anterográdních transportních struktur s GA. Důležitost PI(4)P pro tento proces byla popsána již dříve u kvasinky *S. cerevisiae* (Lorente-Rodríguez & Barlowe, 2011).

GTPáza ARF je dalším proteinem důležitým pro vazbu PI4KII B s membránami Golgiho aparátu. Asociace PI4KII B s membránami obsahujícími aktivovaný ARF byla nejdříve pozorována *in vitro*. Také dalšími experimenty *in vivo* bylo poukázáno na funkční spojení ARF a PI4KII B. Jednalo se o pokusy založené na pozorování disociace PI4KII B z Golgiho aparátu při použití brefeldinu A (BFA), fungitoxinu bránícímu aktivaci ARF (Godi *et al.*, 1999). V pozdější práci Haynes *et al.*, 2005 autoři popisují, že PI4KII B je schopná přímé vazby na ARF, zároveň ji ale charakterizují jako “poněkud neefektivní”. Je však zřejmé, že aktivovaná GTPáza ARF je skrze přímou vazbu, či nějaký svůj efektor, důležitá pro udržení alespoň části celkového množství PI4KII B na Golgiho aparátu.

Přítomnost PI4KII B na TGN je regulována i proteinem GGA2. Mezi PI4KII B a GGA2 byla též detekována přímá vazba. Při depleci GGA2 (KD) dochází k oslabení přítomnosti PI4KII B na TGN (Daboussi *et*

al., 2017). Jelikož je umístění GGA2 na GA řízeno ARF1 a PI(4)P (Wang *et al.*, 2007), je možné, že výše popsany funkční význam ARF na regulaci PI4KIIIB je zprostředkován částečně díky GGA2. Celý tento systém by pak pozitivní zpětnou vazbou obohacoval PI(4)P na TGN.

Asociace PI4KIIIB s Golgiho aparátem je tedy ovlivňována mnoha faktory, které mohou regulovat vazbu PI4KIIIB v různých částech GA. K obohacení PI4KIIIB v určitých oblastech Golgiho aparátu pak může docházet za využití pozitivních zpětnovazebných regulátorů, například GGA2.

Dalším na TGN přítomným efektozem společným jak pro ARF1, tak pro PI4KIIIB, je NCS-1 (neuronální senzor vápníku 1) (Haynes, Thomas & Burgoyne, 2005). NCS-1 je důležitým regulátorem enzymatické aktivity PI4KIIIB (De Barry *et al.*, 2006). U člověka je exprimován pouze v určitých tkáních např. v mozku, plicích a gastrointestinálním traktu (Uhlén *et al.*, 2015). V závislosti na lokální koncentraci vápenatých kationtů se NCS-1 nachází buď v aktivovaném, či inaktivním stavu. Při zvyšujících se hladinách Ca^{2+} přechází NCS-1 do aktivované formy a pozitivně reguluje enzymatickou aktivitu PI4KIIIB (De Barry *et al.*, 2006). Jako antagonisté NCS-1, inhibující činnost PI4KIIIB v závislosti na nízkých koncentracích vápníkových kationtů, jsou popsány kalneurony-1/2 (Mikhaylova *et al.*, 2009). Dalším druhem regulace PI4KIIIB je její fosforylace (Hausser *et al.*, 2005). Na struktuře PI4KIIIB je detekováno hned několik fosforylačních míst (Suer *et al.*, 2001). S fosforylací serinu na pozici 294 zprostředkovanou PKD (protein kinázou D) je pak spojená asociace PI4KIIIB s proteinem z rodiny 14-3-3 (Hausser *et al.*, 2006).

Složitost regulace umístění a aktivity PI4KIIIB na Golgiho aparátu ukazuje na potřebu jemné a přesné kontroly nad jednotlivými podmnožinami PI(4)P na této organelce a tím pádem upozorňuje na důležitost jejich funkčního významu. Zapojení vápníkových kationtů v některých tkáních pak propojuje regulaci PI(4)P na Golgiho aparátu s celou řadou signálních drah (*Bagur & Hajnóczky, 2017).

Další odstavce se budou zabývat funkčním významem PI4KIIIB na Golgiho aparátu. Při transfekci COS-7 buněk katalyticky inaktivní formou PI4KIIIB (D656A) dochází k rozpadu GA (Godi *et al.*, 1999). Další efekt transfekce buněk katalyticky inaktivní formou PI4KIIIB byl pozorován při experimentu sledujícím sekreci VSVG. U takto ošetřených buněk byla pozorována inhibice sekrece proteinu VSVG z GA na PM. Zároveň bylo ukázáno, že tyto buňky, oproti buňkám kontrolním, nemají na TGN přítomny FAPP1 a FAPP2 (4-fosfát adaptorové proteiny 1 a 2). Ty jsou PI(4)P a ARF vazebnými proteiny, jejichž přítomnost na TGN je potřebná pro optimální fungování sekrece z GA na PM (Godi *et al.*, 2004; Lenoir *et al.*, 2010).

Již dříve byla v této části textu zmíněna pozitivní zpětnovazebná regulace mezi PI4KIIIB a GGA2 (Wang *et al.*, 2007; Daboussi *et al.*, 2017). GGA2, jenž je PI4KIIIB ovlivňován, je klatrinový adaptorový protein hrající důležitou roli v transportu mezi GA a endozomy (Zhu *et al.*, 2001). PI4KIIIB se zapojuje také do transportu převážně větších struktur, které GA opouštějí v neobalených pleomorfních útvarech (Valente *et al.*, 2012). PI4KIIIB dále tvoří komplexy s některými proteiny z rodiny RAB, konkrétně s RAB11A, RAB11B a RAB30 (de Graaf *et al.*, 2004; Nakajima *et al.*, 2019). Ustanovení komplexu mezi RAB11 a PI4KIIIB je funkčně

důležité pro zajištění optimální sekrece z GA na buněčný povrch (de Graaf *et al.*, 2004). Chalupska *et al.*, 2019 ve své práci blíže popisují uspořádání takového komplexu. S touto strukturou je také spojena zvýšená aktivace AKT dráhy u některých nádorových onemocnění prsou (Morrow *et al.*, 2014). PI4KIIIB a jí zprostředkovaná produkce PI(4)P je tedy nutná pro udržení strukturní integrity GA a optimální fungování sekrece z Golgiho aparátu, přičemž přímo, či přes produkci PI(4)P ovlivňuje mnoho proteinů zapojených do tohoto procesu.

Vazba mezi RAB30 a PI4KIIIB je důležitá pro průběh autofágie cílené proti některým zástupcům bakterií ze skupiny *Streptococcus*. Nad rámec regulace transportu z GA se PI4KIIIB podílí i na nevezikulárním transportu lipidů ceramidů mezi ER a GA (Tóth *et al.*, 2006). PI4KIIIB je také cílem několika virových proteinů. Látky inhibující enzymatickou aktivitu PI4KIIIB poté mohou zabraňovat některým virovým infekcím (Arita *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012).

4.7.2 Další proteiny spojené s PI(4)P na GA

I druhá z PtdIns 4-kináz III. typu, PI4KIIIA, byla detekována na GA. První takové publikované pozorování vzniklo při transfekci krysí cDNA pro PI4KIIIA do COS-7 buněk (Nakagawa, Goto & Kondo, 1996). K obdobným závěrům došli ve své práci Dumaresq-Doiron *et al.*, 2010. Jak bylo popsáno v kapitole 3.6, tito autoři dále předpokládají, že kinázová aktivita PI4KIIIA na GA je pozitivně regulovaná za účasti RAB1A i RAB1B. PI4KIIIA produkuje PI(4)P na cis cisterně Golgiho aparátu pozitivně ovlivňuje asociaci GBF1 (guanin nukleotidového výměnného faktoru 1 rezistentnímu vůči brefeldinu A spojeného s Golgiho aparátem), proteinu podílejícímu se na sestavování podjednotek COPI a plnícímu funkci GEF pro GTPázu ARF (Deng *et al.*, 2009; Dumaresq-Doiron *et al.*, 2010; Meissner *et al.*, 2018). Činnost ARF, kterou tedy PI4KIIIA napomáhá regulovat, je klíčová pro mnoho funkcí GA. Efekt zablokování aktivace této GTPázy na Golgiho aparát je pozorovatelný při použití BFA. Po ošetření buněk BFA dochází k rozpadu struktury Golgiho aparátu a tím k redistribuci proteinů na něm za normálních podmínek přítomných (Godi *et al.*, 1999; Slavin *et al.*, 2011).

Na produkci PI(4)P na GA se podílejí i obě PtdIns 4-kinázy II. typu (Wang *et al.*, 2003; Wieffer *et al.*, 2013). PI4KIIA i PI4KIIB mohou být kovalentně modifikovány palmitátem. Palmitované formy těchto kináz jsou pak stabilně asociovány s membránami (Barylko *et al.*, 2001, 2009). Modifikace palmitátem je u PI4KIIA nutná pro vazbu kinázy na TGN a je závislá na strukturním motivu bohatém na aminokyselinu cystein (CCPCC) (Barylko *et al.*, 2009). Zprostředkována je primárně činností PATs (palmitát acyl-transferáz) DHHC 3 a 7 a neprobíhá bez lokálního obohacení membránové dvojvrstvy cholesterolem. PI4KIIA se tedy palmitací váže do specifických oblastí membrán bohatých na cholesterol, takzvaných membránových raftů, přítomných na TGN (Lu *et al.*, 2012).

Při zvýšených hladinách kinázy PI4KIIA dochází v β -pankreatických buňkách myši ke zpomalení sekrece inzulínu. Tento efekt je závislý na vyvazování PKD1 (protein kinázy D 1) silně exprimovanou PI4KIIA (Zhang *et al.*, 2018). Na základě experimentů založených na redukci množství PI4KIIA pomocí siRNA bylo

navrhnuo několik dalších funkcí pro tuto kinázu. V práci Y. J. Wang et al., 2003 je popsáno, že při redukcí PI4KIIA (KD) přestává s TGN asociovat klatrinový AP-1 (adaptorový protein 1) a je významně zpomalen export VSVG či hemaglutininu (HA) viru chřipky z TGN. V dalším článku J. Wang et al., 2007 charakterizovali *in vitro* vazbu klatrinových adaptorů GGA1 a GGA2 na PI(4)P a poukázali na částečné odloučení těchto dvou proteinů z TGN při knock-downu PI4KIIA.

Některé z těchto závěrů jsou však v rozporu s výsledky jiných autorů. Například Craige et al., 2008 při KD PI4KIIA v buněčné linii HEK293 nepozorovali významnou redistribuci AP-1 a zároveň detekovali PI4KIIA hlavně v endozomálním systému buněk, kde popsali její interakci s AP-3. Další rozporuplný výsledek předkládá i Wieffer et al., 2013. Dle jejich pozorování jsou dráhy spojené s AP-1 deregulovány manipulacemi s druhou z PtdIns 4-kináz II. typu, PI4KIIB. Ve své práci popisují i přímou vazbu mezi AP-1 a PI4KIIB, nikoliv však mezi AP-1 a PI4KIIA. Přesto je velmi pravděpodobné, že se PI4KIIA částečně podílí na exportu z Golgiho aparátu. Je však možné, že v rozdílných buněčných liniích jsou některé z původně navrhovaných funkcí PI4KIIA zastávány jinými PtdIns 4-kinázami, například právě PI4KIIB.

Zmiňovaná interakce mezi PI4KIIB, jím produkovaným PI(4)P a AP-1 je důležitá pro WNT signalizaci. Embrya ryby *Danio rerio* vykazovala po redukcí celkového množství PI4KIIB vývojové vady spojené s narušením WNT signalizace. Obdobné defekty vykazovala i embrya produkující PI4KIIB s mutovanou kinázovou doménou, neschopnou katalytické aktivity (Wieffer et al., 2013).

Fosfatázou schopnou odstraňovat PI(4)P na GA je SAC1 (Rohde et al., 2003). Ta je popsána blíže v kapitolách 4.3.1 a 4.5. Její enzymatická činnost na GA je spojená primárně s inhibicí sekrece z TGN a s procesem autofágie (Faulhammer et al., 2007; Blagoveshchenskaya et al., 2008; H. Zhang et al., 2020).

Souhrnný vhled do funkčního významu PI(4)P na GA, i za využití enzymatické aktivity SAC1, nabízí Szentpetery et al., 2010. Rekombinantní protein složený ze SAC1, zbavené ER lokalizačního signálu, a TGN38 umožnil autorům pozorovat následky rychlé degradace PI(4)P na celém GA. Tímto zásahem byl zastaven export z GA na PM i do pozdních endozomů a z GA se oddělily klatrinové adaptorové proteiny GGA1 a GGA2. ARF1 a klatrinový adaptorový protein GGA3 nebyly touto manipulací ovlivněny. Také bylo tímto přístupem poukázáno na účast GA asociovaného PI(4)P na obnově PI(4,5)P₂ na plazmatické membráně při aktivaci fosfolipázy C.

PI(4)P tedy ovlivňuje velké množství biologických dějů probíhajících na GA, což dokládá i počet proteinů vyskytujících se na této organelle, spjatých s tímto fosfoinositidem. Mnoho takových proteinů bylo zmíněno již v předchozích odstavcích. Konkrétně se jednalo o klatrinové adaptory AP-1, GGA1 a GGA2, GEF faktor GBF1, regulátory transportu na PM FAPP1 a FAPP2, či proteiny zapojené v nevezikulárním přenosu lipidů CERT a OSBP (Levine & Munro, 1998; Hanada et al., 2003; Godi et al., 2004; Szentpetery, Várnai & Balla, 2010; Meissner et al., 2018). Dalšími, ještě nepředstavenými efektory PI(4)P na Golgiho aparátu, jsou regulátory specifické sekrece arfaptiny 1 a 2 (Cruz-Garcia et al., 2013), pro transport do pozdních endozomů

důležitý IPIP27A (protein interagující s inositolfosfatázou o velikosti 27 kDa izoforma A) (Billcliff *et al.*, 2016), fosfolipáza A KIAA0725p (Inoue *et al.*, 2012), či GOLPH3 (golgi-fosfoprotein 3) (Rahajeng *et al.*, 2019).

GOLPH3 je důležitým faktorem, ovlivňujícím hned několik procesů na Golgiho aparátu. Po navázání na PI(4)P v oblasti TGN indukuje zakřivení membrány a vazbu myosinu 18 A, čímž se zapojuje do procesu přenosu váčků na PM (Rahajeng *et al.*, 2019). Další roli má tento protein v procesu třídění glykosyltransferáz do COPI asociovaných váčků, čímž se podílí na jejich retrogradním transportu (Eckert *et al.*, 2014). U některých maligních nádorových buněk je pak pozorovaná zvýšená hladina sekrece právě v závislosti na GOLPH3 a dalším PI(4)P vazebným proteinu, PIPNC1 (cytoplazmatickém proteinu přenášejícím fosfatidylinositol 1). PIPNC1 po asociaci s PI(4)P zprostředkovává na Golgiho aparátu zvýšenou produkci PI(4)P a tím i větší míru asociace GOLPH3, čímž je export proteinů z GA zvýšen (Halberg *et al.*, 2016).

4.7.3 Proteiny spojené s PIP₂ a PIP₃ na GA

Přítomnost PI(4,5)P₂ byla na GA detekována rekombinantní sondou obsahující PH doménu fosfolipázy C D1 (Watt *et al.*, 2002). Zároveň bylo na základě *in vitro* experimentů ukázáno, že PI(4,5)P₂ je na membránách GA produkován za účasti fosfatidylinositol-4-fosfát 5-kinázy, která je stimulovaná aktivovaným ARF1 (Jones *et al.*, 2000). Anitei *et al.*, 2017 poté detekovali na TGN fosfatidylinositol-4-fosfát 5-kinázu typu 1 A (PIP5K1A). Kromě toho autoři článku nabízejí model jejího fungování při exportu váčků z TGN do endozomální sítě. PIP5K1A, po aktivaci GTPázou RAC1 (substrát botulotoxinu C3 související s proteiny RAS 1), v blízkém okolí pučícího váčku katalyzuje fosforylaci PI(4)P na PI(4,5)P₂. Takto produkovaný PI(4,5)P₂ je štěpen fosfolipázou C za vzniku diacylglycerolu. Tato změna lipidického složení membrány v těsném okolí pučícího váčku způsobuje její remodelaci. Záporně nabitě fosforylované inosity mohou zvyšovat klenutí membrány, jejich odštěpením pak dochází ke snížení pnutí v membráně a jejímu narovnání. To spolu s účastí dalších faktorů podle autorů umožňuje odstřihnutí vznikajícího váčku od membrány TGN.

Fosfatázami s 5-fosfatázovou aktivitou, jejichž primárním substrátem je PI(4,5)P₂, jsou na Golgiho aparátu již dříve v textu popisované OCRL1 a INPP5B (kap. 3.6 a 4.5.1) (Jefferson & Majerus, 1995; Zhang *et al.*, 1995; Hyvola *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2007). Fosfatáza OCRL1, jež je na GA vázána a aktivována za účasti některých proteinů z rodiny RAB (Hyvola *et al.*, 2006), má vazebnou afinitu k terminální doméně těžkého klatrinového řetězce a je pozorovatelná na váčcích fungujících na rozhraní TGN a endozomální sítě (Choudhury *et al.*, 2005). Jak zvýšení, tak snížení množství OCRL1 v buňkách dereguluje transport mezi těmito membránovými systémy. V případě, že je do buněk dodána rekombinantní OCRL1 neobsahující 5-fosfatázovou doménu, je pozorovaný efekt na tento transport silnější (Choudhury *et al.*, 2005). Billcliff *et al.*, 2016 pak popisují, že se OCRL1, skrze asociaci s PI(4)P vazebným proteinem IPIP27A a paksinem 2, přímo podílí na biogenezi váčků fungujících mezi TGN a endozomální sítí. Jelikož jak PIP5K1A, tak OCRL1 regulují transport mezi TGN a endozomy, zdá se, že funkční význam PI(4,5)P₂ na GA je spojený primárně s tímto druhem transportu.

Na GA byl detekován i již zmiňovaný MTMR9 (kap. 3.6 a 4.5.1). Jeho spojení s touto organelou je pozorováno i při rozrušení integrity Golgiho aparátu fungitoxinem BFA. MTMR9 vázaný na GA je po takovém ošetření rozptýlen do obdobných shluků, jako RAB1A, či pro cis-GA typický GM130. Vazební partneři MTMR9 z rodiny myotubularinů, konkrétně MTMR6 a MTMR8, pak s MTMR9 kolokalizují, dá se tedy předpokládat i jejich spojení s membránami Golgiho aparátu (Doubravská *et al.*, 2020).

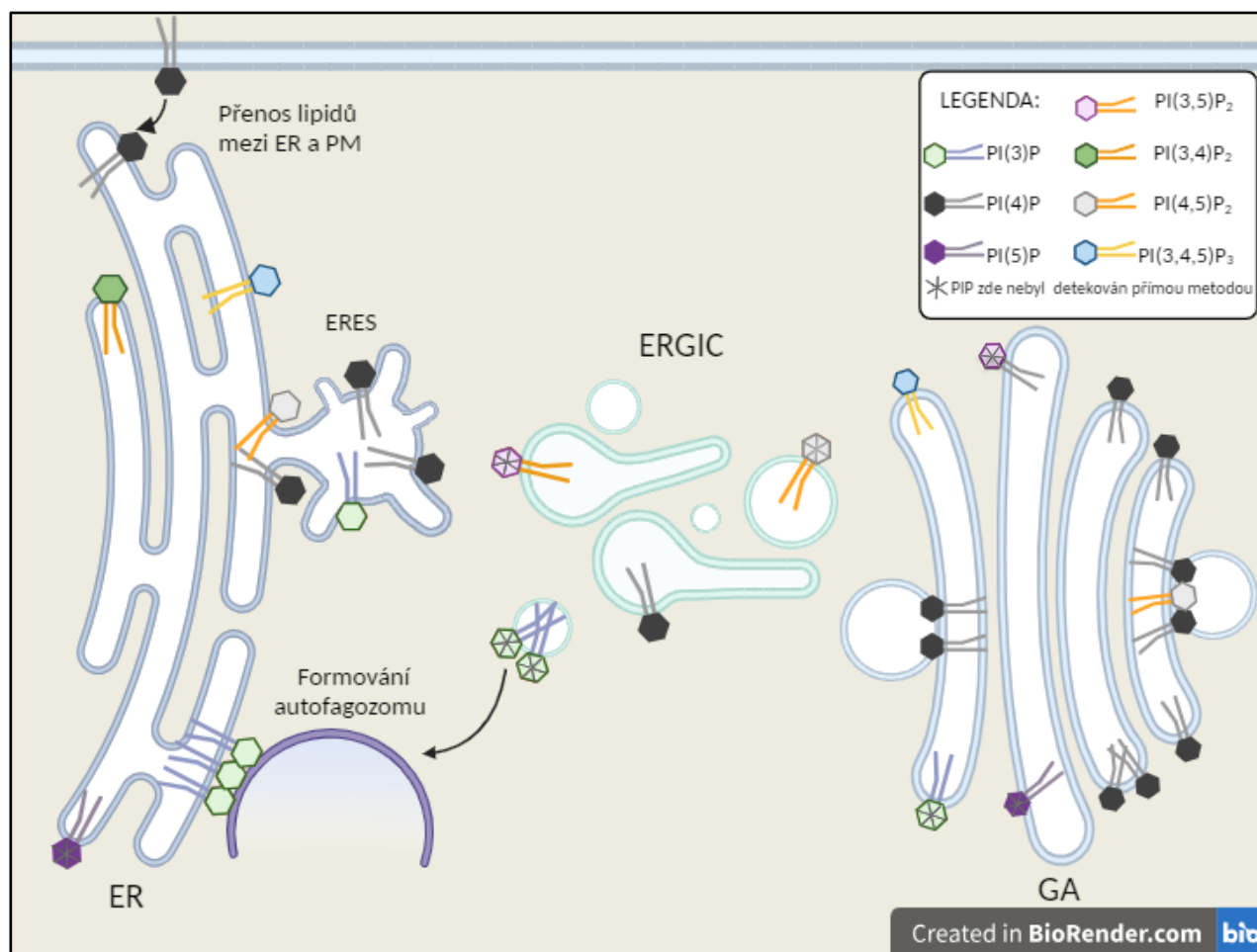
| lokalizace | PIPy | enzymy | Funkce |
|---|--|---|---|
| Golgiho aparát | PI(3)P (Sarkes & Rameh, 2010) | *dimer MTMR8/9 (Zou <i>et al.</i> , 2012; Doubravská <i>et al.</i> , 2020) | |
| | | | inhibice sekrece (Faulhammer <i>et al.</i> , 2007; Blagoveshchenskaya <i>et al.</i> , 2008) |
| | | SAC1 (Rohde <i>et al.</i> , 2003) | |
| | | PIK4IIA (Barylko <i>et al.</i> , 2009) | |
| | PI(4)P (Weixel <i>et al.</i> , 2005; Hammond, Machner & Balla, 2014) | PIK4IIB (Wieffer <i>et al.</i> , 2013) | regulace sekrece (Wieffer <i>et al.</i> , 2013) |
| | | PIK4IIIA (Nakagawa, Goto & Kondo, 1996; Dumaresq-Doiron <i>et al.</i> , 2010) | |
| | | PIK4IIB (de Graaf <i>et al.</i> , 2002) | sekrece, transport lipidů (Godi <i>et al.</i> , 2004; Tóth <i>et al.</i> , 2006) |
| | PI(5)P (Sarkes & Rameh, 2010) | | |
| | PI(3,5)P ₂ ND | *dimer MTMR6/9 (Zou <i>et al.</i> , 2012; Doubravská <i>et al.</i> , 2020) | |
| | | OCRL1 (Hyvola <i>et al.</i> , 2006) | transport na endozomy (Choudhury <i>et al.</i> , 2005; Billcliff <i>et al.</i> , 2016) |
| PI(4,5)P ₂ (Watt <i>et al.</i> , 2002) | INPP5B (Williams <i>et al.</i> , 2007) | | |
| | PIP5K1A (Anitei <i>et al.</i> , 2017) | transport na endozomy (Anitei <i>et al.</i> , 2017) | |
| PI(3,4,5)P ₃ (Sato <i>et al.</i> , 2003) | | | |

Tab. č. 3: Přehled PIPů a enzymů metabolizujících PIPy na GA; pozn. ND – PIP nebyl přímo detekován, * u myotubularinů byl uveden pouze protein/komplex s největší enzymatickou aktivitou vůči substrátu

5 Závěr

Hlavním cílem stanoveným pro tuto bakalářskou práci bylo popsat jaké fosfoinositidy se nachází na membránách spojených s GTPázami RAB1, prozkoumat enzymy podílející se na jejich tvorbě a regulaci a nabídnout přehled efektorů a procesů, které jsou pod jejich kontrolou. Dalším záměrem bylo charakterizovat vztah mezi samotnými GTPázami RAB1 a fosfoinositidy, popřípadě enzymy je regulujícími.

Nejdříve souhrnně o interakcích GTPáz RAB1 s fosfoinositidy a s nimi asociovanými enzymy. Bylo popsáno, že PI(3)P a některé z enzymů spojených s jeho regulací přímo interagují s RAB1 (Mochizuki *et al.*, 2013; Mathiowetz *et al.*, 2017; Tremel *et al.*, 2021). Funkční propojení bylo detekováno i mezi RAB1 a některými dalšími enzymy, regulujícími jiné fosfoinositidy (Hyvola *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2007; Dumaresq-Doiron *et al.*, 2010). Vazba mezi PI(3)P a RAB1 byla doposud publikována pouze v jedné studii (Mathiowetz *et al.*, 2017). Do budoucna by tedy bylo vhodné existenci této vazby ověřit a blíže ji popsat. Například detekovat ve struktuře RAB1 místo, které se na asociaci s fosfoinositidem podílí. Taktéž interakce mezi RAB1 a fosfatidylinositolfosfát/polyfosfát 3-fosfatázami z rodiny myotubularinů by bylo žádoucí blíže prozkoumat a ověřit existenci přímé vazby mezi MTMR6 a RAB1.



Obr. č. 3: Přehled fosfoinositidů na membránách spojených s RAB1 (vlastní tvorba, vychází z tab. č. 1, 2 a 3); křížek značí fosfoinositidy, které nebyly v dané oblasti detekovány přímou metodou; zkratky: PIP, fosfatidylinositolfosfát; ER, endoplazmatické retikulum; ERES, exportní místa endoplazmatického retikula; ERGIC, přechodný kompartment mezi ER a GA; GA, Golgiho aparát; PM, plazmatická membrána

Hlavní cíl této práce, poznatky o tom, jaké fosfoinositidy se vyskytují v jednotlivých membránách spojených s RAB1, je předložen ve formě obrázku č. 3.

Přítomnost fosfoinositidů na membráně endoplazmatického retikula je negativně regulována enzymatickou aktivitou hned několika fosfatáz (Nemoto *et al.*, 2000; Walker, Downes & Leslie, 2001; Wiradjaja *et al.*, 2001; Gurung *et al.*, 2003). Nízká koncentrace PIPů na ER, konkrétně v místech kontaktů s ostatními organelami, je důležitá pro nevezikulární přenos lipidů (Mesmin *et al.*, 2013). Činnost PtdIns kináz na endoplazmatickém retikulu je úzce spjatá se specifickými oblastmi, omegazomy a ERES, podílejícími se na procesech autofágie, respektive exportu proteinů (Blumental-Perry *et al.*, 2006; Axe *et al.*, 2008; Farhan *et al.*, 2008). V těchto místech jsou fosfoinositidy detekovatelné pomocí dostupných sond, jsou zde lokalizované jejich efekторы a je popsána jejich funkční důležitost pro oba zmíněné procesy (Blumental-Perry *et al.*, 2006; Axe *et al.*, 2008; Klinkenberg *et al.*, 2014; B. cun Zhang *et al.*, 2020).

Na ERGIC byl pomocí dostupných sond detekován pouze PI(4)P (Hammond, Schiavo & Irvine, 2009). Přítomnost enzymů metabolizujících i jiné PIPy na jeho membránách však předestírá, že se zde nachází i další fosfoinositidy (Williams *et al.*, 2007; Mochizuki *et al.*, 2013; Ge, Zhang & Schekman, 2014; Doubravská *et al.*, 2020). Jejich přímé prozkoumání bude vyžadovat vyvinutí nových sond. Ty budou muset být buď citlivější, nebo specifičtější pro použití na membránách ERGIC. Detekce doposud neznámých efektorů PIPů na ERGIC by také mohla poskytnout nové informace o těchto lipidech a zároveň by jejich PIP vazebné domény mohly být využity pro navržení nových sond. Detailnější znalost fosfoinositidů na ERGIC umožní nový pohled na regulaci struktur a procesů spojených s tímto membránovým systémem. Taktéž nám může pomoci objasnit, jakým způsobem jsou enzymy metabolizující fosfoinositidy na ERGIC spojeny se sekrecí a autofágií. Při deregulaci těchto enzymů jsou totiž pozorovatelné efekty na oba zmíněné procesy.

Za majoritní formu fosfoinositidů spojenou s Golgiho aparátem bývá označován fosfatidylinositol-4-fosfát (*Jean & Kiger, 2012). U savců jsou s GA asociovány jejich všechny čtyři PtdIns 4-kinázy (Nakagawa, Goto & Kondo, 1996; de Graaf *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003; Wieffer *et al.*, 2013). Řada procesů probíhajících na Golgiho aparátu, včetně přijímání, třídění i exportu sekretovaného nákladu, či udržování strukturální integrity organely, je funkčně spojena právě s PI(4)P a s ním asociovanými kinázami (Godi *et al.*, 1999; Szentpetery, Várnai & Balla, 2010; Lorente-Rodríguez & Barlowe, 2011; Wieffer *et al.*, 2013). Na GA byly také detekovány, spolu s jejich substráty, enzymy metabolizující jiné fosfoinositidy (Hyvola *et al.*, 2006; Anitei *et al.*, 2017; Doubravská *et al.*, 2020). Z nich je nejlépe popsána role pro PI(4,5)P₂ a enzymy s ním spjaté. Ty se podílejí na transportu mezi GA a endozomálním systémem (Hyvola *et al.*, 2006; Anitei *et al.*, 2017).

Poznání fosfoinositidů na rozhraní endoplazmatického retikula, ERGIC a Golgiho aparátu nám tedy umožňuje pochopit řadu molekulárních procesů důležitých pro optimální fungování sekrece. Takové znalosti mohou být využity například pro objasnění vzniku a fungování některých druhů nádorových onemocnění, které jsou charakteristické zvýšenou sekrecí proteinů (Halberg *et al.*, 2016), či neurodegenerativních

onemocnění často spojených s deregulací časné fáze sekrece a ztrátou integrity Golgiho aparátu (Ragagnin *et al.*, 2023). Taktéž nám umožňuje pochopit některé aspekty regulace časné fáze autofágie, procesu zásadního pro udržování homeostázy v buňkách, jehož narušení může taktéž souviset s mnoha patogeneziemi.

6 Seznam použité literatury

* značí přehledové články

Aizawa, M. & Fukuda, M. (2015) 'Small GTPase Rab2B and its specific binding protein golgi associated RAB2B interactor-like 4 (GARI-I4) regulate Golgi morphology', *Journal of Biological Chemistry*, 290(36), pp. 22250–22261. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.669242>.

*Ali, B.R. & Seabra, M.C. (2005) 'Targeting of Rab GTPases to cellular membranes', *Biochemical Society Transactions*, 33(4), pp. 652–656. Available at: <https://doi.org/10.1042/BST0330652>.

Allan, B.B., Moyer, B.D. & Balch, W.E. (2000) 'Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion', *Science*, 289(5478), pp. 444–448. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.289.5478.444>.

Allen, E.A. *et al.* (2020) 'A conserved myotubularin-related phosphatase regulates autophagy by maintaining autophagic flux', *Journal of Cell Biology*, 219(11), p. e201909073. Available at: <https://doi.org/10.1083/JCB.201909073>.

Anitei, M. *et al.* (2017) 'Spatiotemporal control of lipid conversion, actin-based mechanical forces, and curvature sensors during clathrin/AP-1-coated vesicle biogenesis', *Cell Reports*, 20(9), pp. 2087–2099. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.013>.

Arita, M. *et al.* (2011) 'Phosphatidylinositol 4-kinase III beta is a target of enviroxime-like compounds for antipoliiovirus activity', *Journal of Virology*, 85(5), pp. 2364–2372. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.02249-10>.

Axe, E.L. *et al.* (2008) 'Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum', *Journal of Cell Biology*, 182(4), pp. 685–701. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.200803137>.

*Bagur, R. & Hajnóczky, G. (2017) 'Intracellular Ca²⁺ sensing: its role in calcium homeostasis and signaling', *Molecular Cell*, 66(6), pp. 780–788. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.028>.

Balla, A. *et al.* (2005) 'A plasma membrane pool of phosphatidylinositol 4-phosphate is generated by phosphatidylinositol 4-kinase type-III alpha: studies with the PH domains of the oxysterol binding protein and FAPP1', *Molecular Biology of the Cell*, 16(3), pp. 1282–1295. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.E04>.

De Barry, J. *et al.* (2006) 'Functional implication of neuronal calcium sensor-1 and phosphoinositol 4-kinase-β interaction in regulated exocytosis of PC12 cells', *Journal of Biological Chemistry*, 281(26), pp. 18098–18111. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M509842200>.

Barylko, B. *et al.* (2001) 'A novel family of phosphatidylinositol 4-kinases conserved from yeast to humans', *Journal of Biological Chemistry*, 276(11), pp. 7705–7708. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.C000861200>.

Barylko, B. *et al.* (2009) 'Palmitoylation controls the catalytic activity and subcellular distribution of phosphatidylinositol 4-kinase II α ', *Journal of Biological Chemistry*, 284(15), pp. 9994–10003. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M900724200>.

*Barz, S. *et al.* (2021) 'Small but mighty: Atg8s and Rabs in membrane dynamics during autophagy', *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*, 1868(9), p. 119064. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.119064>.

Billcliff, P.G. *et al.* (2016) 'OCRL1 engages with the F-BAR protein pacsin 2 to promote biogenesis of membrane-trafficking intermediates', *Molecular Biology of the Cell*, 27(1), pp. 90–107. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-06-0329>.

Blagoveshchenskaya, A. *et al.* (2008) 'Integration of Golgi trafficking and growth factor signaling by the lipid phosphatase SAC1', *Journal of Cell Biology*, 180(4), pp. 803–812. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.200708109>.

Blumental-Perry, A. *et al.* (2006) 'Phosphatidylinositol 4-phosphate formation at ER exit sites regulates ER export', *Developmental Cell*, 11(5), pp. 671–682. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.09.001>.

*Blunsom, N.J. & Cockcroft, S. (2020) 'Phosphatidylinositol synthesis at the endoplasmic reticulum', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(1), p. 158471. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.05.015>.

Chalupska, D. *et al.* (2019) 'Phosphatidylinositol 4-kinase III β (PI4KB) forms highly flexible heterocomplexes that include ACBD3, 14-3-3, and Rab11 proteins', *Scientific Reports*, 9(1), p. 567. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37158-6>.

Cheung, H.Y.F. *et al.* (2021) 'Targeted phosphoinositides analysis using high-performance ion chromatography-coupled selected reaction monitoring mass spectrometry', *Journal of Proteome Research*, 20(6), pp. 3114–3123. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00017>.

Choudhury, R. *et al.* (2005) 'Lowe syndrome protein OCRL1 interacts with clathrin and regulates protein trafficking between endosomes and the trans-Golgi network', *Molecular Biology of the Cell*, 16(8), pp. 3467–3479. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-02-0120>.

Chung, J. *et al.* (2015) 'PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER–plasma membrane contacts', *Science*, 349(6246), pp. 428–432. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aab1370>.

Clark, J. *et al.* (2011) 'Quantification of PtdInsP3 molecular species in cells and tissues by mass spectrometry', *Nature Methods*, 8(3), pp. 267–272. Available at: <https://doi.org/10.1038/nmeth.1564>.

Consortium, T.U. (2023) 'UniProt: the universal protein knowledgebase in 2023', *Nucleic Acids Research*, 51(D1), pp. D523–D531. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>.

- Craige, B., Salazar, G. & Faundez, V. (2008) 'Phosphatidylinositol-4-kinase type II alpha contains an AP-3-sorting motif and a kinase domain that are both required for endosome traffic', *Molecular Biology of the Cell*, 19(4), pp. 1415–1426. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-12-1239>.
- Cruz-Garcia, D. *et al.* (2013) 'Recruitment of arfaptins to the trans-Golgi network by PI(4)P and their involvement in cargo export', *The EMBO Journal*, 32(12), pp. 1717–1729. Available at: <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.116>.
- Daboussi, L. *et al.* (2017) 'Conserved role for Gga proteins in phosphatidylinositol 4-kinase localization to the trans-Golgi network', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(13), pp. 3433–3438. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1615163114>.
- Deng, Y. *et al.* (2009) 'A COPI coat subunit interacts directly with an early-Golgi localized Arf exchange factor', *EMBO Reports*, 10(1), pp. 58–64. Available at: <https://doi.org/10.1038/embor.2008.221>.
- Dong, R. *et al.* (2018) 'The inositol 5-phosphatase INPP5K participates in the fine control of ER organization', *Journal of Cell Biology*, 217(10), pp. 3577–3592. Available at: <https://doi.org/10.1083/JCB.201802125>.
- Doubravaska, L. *et al.* (2020) 'Human myotubularin-related protein 9 regulates ER-to-Golgi trafficking and modulates WNT3A secretion', *Experimental Cell Research*, 386(1), p. 111709. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.111709>.
- Dowler, S. *et al.* (2000) 'Identification of pleckstrin-homology-domain-containing proteins with novel phosphoinositide-binding specificities', *Biochemical Journal*, 351(1), pp. 19–31. Available at: <https://doi.org/10.1042/bj3510019>.
- Dumaresq-Doiron, K. *et al.* (2010) 'The phosphatidylinositol 4-kinase PI4KIII α is required for the recruitment of GBF1 to Golgi membranes', *Journal of Cell Science*, 123(13), pp. 2273–2280. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.055798>.
- Eckert, E.S.P. *et al.* (2014) 'Golgi phosphoprotein 3 triggers signal-mediated incorporation of glycosyltransferases into coatamer-coated (COPI) vesicles', *Journal of Biological Chemistry*, 289(45), pp. 31319–31329. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.608182>.
- Farhan, H. *et al.* (2008) 'Adaptation of endoplasmic reticulum exit sites to acute and chronic increases in cargo load', *The EMBO Journal*, 27(15), pp. 2043–2054. Available at: <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.136>.
- Faulhammer, F. *et al.* (2007) 'Growth control of Golgi phosphoinositides by reciprocal localization of Sac1 lipid phosphatase and Pik1 4-kinase', *Traffic*, 8(11), pp. 1554–1567. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00632.x>.
- Furuita, K. *et al.* (2010) 'Electrostatic interaction between oxysterol-binding protein and VAMP-associated protein a revealed by NMR and mutagenesis studies', *Journal of Biological Chemistry*, 285(17), pp. 12961–12970. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.082602>.

- Gallwitz, D., Donath, C. & Sander, C. (1983) 'A yeast gene encoding a protein homologous to the human c-ha/bas proto-oncogene product', *Nature*, 306(5944), pp. 704–707. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/306704a0>.
- Ge, L. *et al.* (2013) 'The ER–Golgi intermediate compartment is a key membrane source for the LC3 lipidation step of autophagosome biogenesis', *eLife*, 2, p. e00947. Available at: <https://doi.org/10.7554/elife.00947>.
- Ge, L. *et al.* (2017) 'Remodeling of ER exit sites initiates a membrane supply pathway for autophagosome biogenesis', *EMBO Reports*, 18(9), pp. 1586–1603. Available at: <https://doi.org/10.15252/embr.201744559>.
- Ge, L., Zhang, M. & Schekman, R. (2014) 'Phosphatidylinositol 3-kinase and COPII generate LC3 lipidation vesicles from the ER–Golgi intermediate compartment', *eLife*, 3, p. e04135. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.04135>.
- Godi, A. *et al.* (1999) 'ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase- β and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P₂ on the Golgi complex', *Nature Cell Biology*, 1(5), pp. 280–287. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/12993>.
- Godi, A. *et al.* (2004) 'FAPPS control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P', *Nature Cell Biology*, 6(5), pp. 393–404. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb1119>.
- de Graaf, P. *et al.* (2002) 'Nuclear localization of phosphatidylinositol 4-kinase β ', *Journal of Cell Science*, 115(8), pp. 1769–1775. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.115.8.1769>.
- de Graaf, P. *et al.* (2004) 'Phosphatidylinositol 4-kinase β is critical for functional association of Rab11 with the Golgi complex', *Molecular Biology of the Cell*, 15(4), pp. 2038–2047. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.E03-12-0862>.
- Gurung, R. *et al.* (2003) 'Identification of a novel domain in two mammalian inositol-polyphosphate 5-phosphatases that mediates membrane ruffle localization: The inositol 5-phosphatase SKIP localizes to the endoplasmic reticulum and translocates to membrane ruffles following epidermal growth factor stimulation', *Journal of Biological Chemistry*, 278(13), pp. 11376–11385. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M209991200>.
- Haas, A.K. *et al.* (2007) 'Analysis of GTPase-activating proteins: Rab1 and Rab43 are key Rabs required to maintain a functional Golgi complex in human cells', *Journal of Cell Science*, 120(17), pp. 2997–3010. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.014225>.
- Halberg, N. *et al.* (2016) 'PITPNC1 recruits RAB1B to the Golgi network to drive malignant secretion', *Cancer Cell*, 29(3), pp. 339–353. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.02.013>.
- Hammond, G.R.V., Machner, M.P. & Balla, T. (2014) 'A novel probe for phosphatidylinositol 4-phosphate reveals multiple pools beyond the Golgi', *Journal of Cell Biology*, 205(1), pp. 113–126. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201312072>.

- Hammond, G.R.V., Schiavo, G. & Irvine, R.F. (2009) 'Immunocytochemical techniques reveal multiple, distinct cellular pools of PtdIns4P and PtdIns(4,5)P₂', *Biochemical Journal*, 422(1), pp. 23–35. Available at: <https://doi.org/10.1042/BJ20090428>.
- Hanada, K. *et al.* (2003) 'Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide', *Nature*, 426(6968), pp. 803–809. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature02188>.
- Hanna, M.G. *et al.* (2016) 'Sar1 GTPase activity is regulated by membrane curvature', *Journal of Biological Chemistry*, 291(3), pp. 1014–1027. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.672287>.
- Harris, N.J. *et al.* (2021) 'Biochemical insight into novel Rab-GEF activity of the mammalian TRAPPIII complex', *Journal of Molecular Biology*, 433(18), p. 167145. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167145>.
- Hausser, A. *et al.* (2005) 'Protein kinase D regulates vesicular transport by phosphorylating and activating phosphatidylinositol-4 kinase III β at the Golgi complex', *Nature Cell Biology*, 7(9), pp. 880–886. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb1289>.
- Hausser, A. *et al.* (2006) 'Phospho-specific binding of 14-3-3 proteins to phosphatidylinositol 4-kinase III β protects from dephosphorylation and stabilizes lipid kinase activity', *Journal of Cell Science*, 119(17), pp. 3613–3621. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.03104>.
- Hayashi, T. *et al.* (2007) 'PX-RICS, a novel splicing variant of RICS, is a main isoform expressed during neural development', *Genes to Cells*, 12(8), pp. 929–939. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2007.01101.x>.
- Haynes, L.P., Thomas, G.M.H. & Burgoyne, R.D. (2005) 'Interaction of neuronal calcium sensor-1 and ADP-ribosylation factor 1 allows bidirectional control of phosphatidylinositol 4-kinase β and trans-golgi network-plasma membrane traffic', *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), pp. 6047–6054. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M413090200>.
- Hirama, T. *et al.* (2017) 'Membrane curvature induced by proximity of anionic phospholipids can initiate endocytosis', *Nature Communications*, 8(1), p. 1393. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01554-9>.
- Hirschberg, K. *et al.* (1998) 'Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of Golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells', *Journal of Cell Biology*, 143(6), pp. 1485–1503. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.143.6.1485>.
- Homma, Y. *et al.* (2019) 'Comprehensive knockout analysis of the Rab family GTPases in epithelial cells', *Journal of Cell Biology*, 218(6), pp. 2035–2050. Available at: <https://doi.org/10.1083/JCB.201810134>.
- Hostetler, K.Y. & Hall, L.B. (1980) 'Phospholipase C activity of rat tissues', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 96(1), pp. 388–393. Available at: [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(80\)91227-9](https://doi.org/10.1016/0006-291X(80)91227-9).

Hu, J. *et al.* (2008) 'Membrane proteins of the endoplasmic reticulum induce high-curvature tubules', *Science*, 319(5867), pp. 1247–1250. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1153634>.

Huang, J. *et al.* (2011) 'Antibacterial autophagy occurs at PtdIns(3)P-enriched domains of the endoplasmic reticulum and requires Rab1 GTPase', *Autophagy*, 7(1), pp. 17–26. Available at: <https://doi.org/10.4161/auto.7.1.13840>.

Hughes, W.E. *et al.* (2000) 'SAC1 encodes a regulated lipid phosphoinositide phosphatase, defects in which can be suppressed by the homologous Inp52p and Inp53p phosphatases', *Journal of Biological Chemistry*, 275(2), pp. 801–808. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.275.2.801>.

Hyvola, N. *et al.* (2006) 'Membrane targeting and activation of the Lowe syndrome protein OCRL1 by Rab GTPases', *The EMBO Journal*, 25(16), pp. 3750–3761. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601274>.

Ijuin, T. *et al.* (2000) 'Identification and characterization of a novel inositol polyphosphate 5- phosphatase', *Journal of Biological Chemistry*, 275(15), pp. 10870–10875. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.10870>.

Imae, R. *et al.* (2012) 'LYCAT, a homologue of *C. elegans* acl-8, acl-9, and acl-10, determines the fatty acid composition of phosphatidylinositol in mice', *Journal of lipid research*, 53(3), pp. 335–347. Available at: <https://doi.org/10.1194/jlr.M018655>.

Inoue, H. *et al.* (2012) 'Roles of SAM and DDHD domains in mammalian intracellular phospholipase A 1 KIAA0725p', *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*, 1823(4), pp. 930–939. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.02.002>.

*Jean, S. & Kiger, A.A. (2012) 'Coordination between RAB GTPase and phosphoinositide regulation and functions', *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 13(7), pp. 463–470. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm3379>.

Jedd, G. *et al.* (1995) 'The Ypt1 GTPase is essential for the first two steps of the yeast secretory pathway', *Journal of Cell Biology*, 131(3), pp. 583–590. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.131.3.583>.

Jefferson, A.B. & Majerus, P.W. (1995) 'Properties of type II inositol polyphosphate 5-phosphatase', *Journal of Biological Chemistry*, 270(16), pp. 9370–9377. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.270.16.9370>.

Jones, D.H. *et al.* (2000) 'Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase directly interacts with ADP-ribosylation factor 1 and is responsible for phosphatidylinositol 4,5- bisphosphate synthesis in the Golgi compartment', *Journal of Biological Chemistry*, 275(18), pp. 13962–13966. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.C901019199>.

Judith, D. *et al.* (2019) 'ATG9A shapes the forming autophagosome through Arfaptin 2 and phosphatidylinositol 4-kinase IIIβ', *Journal of Cell Biology*, 218(5), pp. 1634–1652. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201901115>.

- Kabeya, Y. *et al.* (2000) 'LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing', *The EMBO Journal*, 19(21), pp. 5720–5728. Available at: <https://doi.org/10.1093/emboj/19.21.5720>.
- Kakuta, S. *et al.* (2017) 'Small GTPase Rab1B is associated with ATG9A vesicles and regulates autophagosome formation', *FASEB Journal*, 31(9), pp. 3757–3773. Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.201601052R>.
- Kalasova, I. *et al.* (2016) 'Tools for visualization of phosphoinositides in the cell nucleus', *Histochemistry and Cell Biology*, 145(4), pp. 485–496. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1409-8>.
- Karanasios, E. *et al.* (2013) 'Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction', *Journal of Cell Science*, 126(22), pp. 5224–5238. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.132415>.
- Karanasios, E. *et al.* (2016) 'Autophagy initiation by ULK complex assembly on ER tubulovesicular regions marked by ATG9 vesicles', *Nature Communications*, 7(1), p. 12420. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms12420>.
- Kim, Y.J. *et al.* (2015) 'Phosphatidylinositol-phosphatidic acid exchange by Nir2 at ER-PM contact sites maintains phosphoinositide signaling competence', *Developmental cell*, 33(5), pp. 549–561. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.04.028>.
- Klima, M. *et al.* (2016) 'Structural insights and in vitro reconstitution of membrane targeting and activation of human PI4KB by the ACBD3 protein', *Scientific Reports*, 6(1), p. 23641. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep23641>.
- Klinkenberg, D. *et al.* (2014) 'A cascade of ER exit site assembly that is regulated by p125A and lipid signals', *Journal of Cell Science*, 127(8), pp. 1765–1778. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.138784>.
- Lamb, C.A. *et al.* (2016) 'TBC 1D14 regulates autophagy via the TRAPP complex and ATG 9 traffic', *The EMBO Journal*, 35(3), pp. 281–301. Available at: <https://doi.org/10.15252/emboj.201592695>.
- Lenoir, M. *et al.* (2010) 'Structural basis of wedging the Golgi membrane by FAPP pleckstrin homology domains', *EMBO Reports*, 11(4), pp. 279–284. Available at: <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.28>.
- Levine, T.P. & Munro, S. (1998) 'The pleckstrin homology domain of oxysterol-binding protein recognises a determinant specific to Golgi membranes', *Current biology*, 8(13), pp. 729–739. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70296-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70296-9).
- Levine, T.P. & Munro, S. (2002) 'Targeting of Golgi-specific pleckstrin homology domains involves both PtdIns 4-kinase-dependent and-independent components', *Current Biology*, 12(9), pp. 695–704. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00779-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00779-0).
- *Li, J., Ahat, E. & Wang, Y. (2019) 'Golgi structure and function in health, stress, and diseases', *The Golgi Apparatus and Centriole: Functions, Interactions and Role in Disease*, pp. 441–485. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-030-23173-6_19.

- Li, S. *et al.* (2022) 'A new type of ERGIC-ERES membrane contact mediated by TMED9 and SEC12 is required for autophagosome biogenesis', *Cell Research*, 32(2), pp. 119–138. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00563-0>.
- Lorente-Rodríguez, A. & Barlowe, C. (2011) 'Requirement for Golgi-localized PI(4)P in fusion of COPII vesicles with Golgi compartments', *Molecular Biology of the Cell*, 22(2), pp. 216–229. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-04-0317>.
- Lu, D. *et al.* (2012) 'Phosphatidylinositol 4-kinase II α is palmitoylated by Golgi-localized palmitoyltransferases in cholesterol-dependent manner', *Journal of Biological Chemistry*, 287(26), pp. 21856–21865. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.348094>.
- Lykidis, A. *et al.* (1997) 'The role of CDP-diacylglycerol synthetase and phosphatidylinositol synthase activity levels in the regulation of cellular phosphatidylinositol content', *Journal of Biological Chemistry*, 272(52), pp. 33402–33409. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.272.52.33402>.
- Maeda, K. *et al.* (2013) 'Interactome map uncovers phosphatidylserine transport by oxysterol-binding proteins', *Nature*, 501(7466), pp. 257–261. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature12430>.
- Maeda, S., Otomo, C. & Otomo, T. (2019) 'The autophagic membrane tether ATG2A transfers lipids between membranes', *eLife*, 8, p. e45777. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.45777>.
- Margolis, B. *et al.* (1989) 'EGF induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II: a potential mechanism for EGF receptor signaling', *Cell*, 57(7), pp. 1101–1107. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90047-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90047-0).
- Marie, M. *et al.* (2009) 'The function of the intermediate compartment in pre-Golgi trafficking involves its stable connection with the centrosome', *Molecular Biology of the Cell*, 20(20), pp. 4458–4470. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-12-1229>.
- Marie, M. *et al.* (2012) 'Division of the intermediate compartment at the onset of mitosis provides a mechanism for golgi inheritance', *Journal of Cell Science*, 125(22), pp. 5403–5416. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.108100>.
- Martincic, I., Peralta, M.E. & Ngsee, J.K. (1997) 'Isolation and characterization of a dual prenylated Rab and VAMP2 receptor', *Journal of Biological Chemistry*, 272(43), pp. 26991–26998. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.272.43.26991>.
- Martinez, H. *et al.* (2016) 'Spatial-temporal study of Rab1b dynamics and function at the ER-Golgi interface', *PLoS ONE*, 11(8), p. e0160838. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160838>.
- Mathiowetz, A.J. *et al.* (2017) 'An amish founder mutation disrupts a PI(3)P-WHAMM-Arp2/3 complex-driven autophagosomal remodeling pathway', *Molecular Biology of the Cell*, 28(19), pp. 2492–2507. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-01-0022>.

- Meissner, J.M. *et al.* (2018) 'The ARF guanine nucleotide exchange factor GBF1 is targeted to Golgi membranes through a PIP-binding domain', *Journal of Cell Science*, 131(3), p. jcs210245. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.210245>.
- Meng, K. *et al.* (2020) 'Arginine GlcNAcylation of Rab small GTPases by the pathogen *Salmonella Typhimurium*', *Communications Biology*, 3(1), p. 287. Available at: <https://doi.org/10.1038/s42003-020-1005-2>.
- Mesmin, B. *et al.* (2013) 'A four-step cycle driven by PI(4)P hydrolysis directs sterol/PI(4)P exchange by the ER-Golgi Tether OSBP', *Cell*, 155(4), pp. 830–843. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.056>.
- Meyers, R. & Cantley, L.C. (1997) 'Cloning and characterization of a Wortmannin-sensitive human phosphatidylinositol 4-kinase', *Journal of Biological Chemistry*, 272(7), pp. 4384–4390. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.272.7.4384>.
- Mikhaylova, M. *et al.* (2009) 'Calneurons provide a calcium threshold for trans-Golgi network to plasma membrane trafficking', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(22), pp. 9093–9098. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0903001106>.
- Mochizuki, Y. *et al.* (2013) 'Phosphatidylinositol 3-phosphatase myotubularin-related protein 6 (MTMR6) is regulated by small GTPase Rab1B in the early secretory and autophagic pathways', *Journal of Biological Chemistry*, 288(2), pp. 1009–1021. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.395087>.
- Monetta, P. *et al.* (2007) 'Rab1b interacts with GBF1 and modulates both ARF1 dynamics and COPI association', *Molecular Biology of the Cell*, 18(7), pp. 2400–2410. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-11-1005>.
- Morrow, A.A. *et al.* (2014) 'The lipid kinase PI4KIII β is highly expressed in breast tumors and activates Akt in cooperation with Rab11a', *Molecular Cancer Research*, 12(10), pp. 1492–1508. Available at: <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0604>.
- Moser von Filseck, J. *et al.* (2015) 'Phosphatidylserine transport by ORP/Osh proteins is driven by phosphatidylinositol 4-phosphate', *Science*, 349(6246), pp. 432–436. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aab1346>.
- Mukhopadhyay, A. *et al.* (2011) 'Proteomic analysis of endocytic vesicles: Rab1a regulates motility of early endocytic vesicles', *Journal of Cell Science*, 124(5), pp. 765–775. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.079020>.
- Nakagawa, T., Goto, K. & Kondo, H. (1996) 'Cloning, expression, and localization of 230-kDa phosphatidylinositol 4-kinase', *Journal of Biological Chemistry*, 271(20), pp. 12088–12094. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.20.12088>.

- Nakagawa, Y. *et al.* (1989) 'The de novo synthesis of molecular species of phosphatidylinositol from endogenously labeled CDP diacylglycerol in alveolar macrophage microsomes', *Archives of biochemistry and biophysics*, 268(2), pp. 559–566. Available at: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(89\)90323-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(89)90323-8).
- Nakajima, K. *et al.* (2019) 'RAB30 regulates PI4KB (phosphatidylinositol 4-kinase beta)-dependent autophagy against group A Streptococcus', *Autophagy*, 15(3), pp. 466–477. Available at: <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1532260>.
- Nakatsu, F. *et al.* (2012) 'Ptdins4P synthesis by PI4KIII α at the plasma membrane and its impact on plasma membrane identity', *Journal of Cell Biology*, 199(6), pp. 1003–1016. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201206095>.
- Nemoto, Y. *et al.* (2000) 'Functional characterization of a mammalian Sac1 and mutants exhibiting substrate-specific defects in phosphoinositide phosphatase activity', *Journal of Biological Chemistry*, 275(44), pp. 34293–34305. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M003923200>.
- Neuman, S.D. *et al.* (2021) 'A novel function for Rab1 and Rab11 during secretory granule maturation', *Journal of Cell Science*, 134(15), p. jcs259037. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.259037>.
- Okamoto, M. *et al.* (2012) 'High-curvature domains of the ER are important for the organization of ER exit sites in *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Cell Science*, 125(14), pp. 3412–3420. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.100065>.
- Ostermeier, C. & Brunger, A.T. (1999) 'Structural basis of Rab effector specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of Rabphilin-3A', *Cell*, 96(3), pp. 363–374. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80549-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80549-8).
- Pahuja, K.B. *et al.* (2015) 'Phosphoregulatory protein 14-3-3 facilitates SAC1 transport from the endoplasmic reticulum', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(25), pp. 3199–3206. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1509119112>.
- *Perkins, H.T. & Allan, V. (2021) 'Intertwined and finely balanced: endoplasmic reticulum morphology, dynamics, function, and diseases', *Cells*, 10(9), p. 2341. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells10092341>.
- Piao, H. *et al.* (2017) 'Sec16A is critical for both conventional and unconventional secretion of CFTR', *Scientific reports*, 7(1), p. 39887. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep39887>.
- Presley, J.F. *et al.* (1997) 'ER-to-Golgi transport visualized in living cells', *Nature*, 389(6646), pp. 81–85. Available at: <https://doi.org/10.1038/38001>.
- *Raess, M.A. *et al.* (2017) 'WANTED – Dead or alive: Myotubularins, a large disease-associated protein family', *Advances in Biological Regulation*, 63, pp. 49–58. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2016.09.001>.

- Ragagnin, A.M.G. *et al.* (2023) 'ALS/FTD-associated mutation in cyclin F inhibits ER-Golgi trafficking, inducing ER stress, ERAD and Golgi fragmentation', *Scientific Reports*, 13(1), p. 20467. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-46802-9>.
- Rahajeng, J. *et al.* (2019) 'Efficient Golgi forward trafficking requires GOLPH3-driven, PI4P-sepudent membrane curvature', *Developmental Cell*, 50(5), pp. 573-585. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.05.038>.
- Rambourg, A. & Clermont, Y. (1986) 'Tridimensional structure of the Golgi apparatus in type A ganglion cells of the rat', *American Journal of Anatomy*, 176(4), pp. 393-409. Available at: <https://doi.org/10.1002/aja.1001760403>.
- Rohde, H.M. *et al.* (2003) 'The human phosphatidylinositol phosphatase SAC1 interacts with the coatomer I complex', *Journal of Biological Chemistry*, 278(52), pp. 52689-52699. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M307983200>.
- Russo, A.J. *et al.* (2016) 'Rab1 recruits WHAMM during membrane remodeling but limits actin nucleation', *Molecular Biology of the Cell*, 27(6), pp. 967-978. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-07-0508>.
- Sannerud, R. *et al.* (2006) 'Rab1 defines a novel pathway connecting the pre-Golgi intermediate compartment with the cell periphery', *Molecular Biology of the Cell*, 17(4), pp. 1514-1526. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-08-0792>.
- *Saraste, J. & Marie, M. (2018) 'Intermediate compartment (IC): from pre-Golgi vacuoles to a semi-autonomous membrane system', *Histochemistry and Cell Biology*, 150(5), pp. 407-430. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1717-2>.
- Sarkes, D. & Rameh, L.E. (2010) 'A novel HPLC-based approach makes possible the spatial characterization of cellular PtdIns5P and other phosphoinositides', *Biochemical Journal*, 428(3), pp. 375-384. Available at: <https://doi.org/10.1042/BJ20100129>.
- Sato, M. *et al.* (2003) 'Production of PtdInsP3 at endomembranes is triggered by receptor endocytosis', *Nature Cell Biology*, 5(11), pp. 1016-1022. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb1054>.
- Schmid, A.C. *et al.* (2004) 'Type II phosphoinositide 5-phosphatases have unique sensitivities towards fatty acid composition and head group phosphorylation', *FEBS Letters*, 576(1), pp. 9-13. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.08.052>.
- Shomron, O. *et al.* (2021) 'COPII collar defines the boundary between ER and ER exit site and does not coat cargo containers', *Journal of Cell Biology*, 220(6), p. e201907224. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201907224>.
- Sklan, E.H. *et al.* (2007) 'TBC1D20 is a Rab1 GTPase-activating protein that mediates hepatitis C virus replication', *Journal of Biological Chemistry*, 282(50), pp. 36354-36361. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M705221200>.

- Slavin, I. *et al.* (2011) 'Role of Rab1b in COPII dynamics and function', *European Journal of Cell Biology*, 90(4), pp. 301–311. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2010.10.001>.
- Sönnichsen, B. *et al.* (1998) 'A role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes', *Journal of Cell Biology*, 140(5), pp. 1013–1021. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.140.5.1013>.
- Stalder, D. *et al.* (2024) 'Recruitment of PI4KIII β to the Golgi by ACBD3 is dependent on an upstream pathway of a SNARE complex and golgins', *Molecular Biology of the Cell*, 35(2), p. ar20. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.e23-09-0376>.
- Strahl, T. *et al.* (2005) 'Yeast phosphatidylinositol 4-kinase, Pik1, has essential roles at the Golgi and in the nucleus', *Journal of Cell Biology*, 171(6), pp. 967–979. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.200504104>.
- Streb, H. *et al.* (1983) 'Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1, 4, 5-trisphosphate', *Nature*, 306(5938), pp. 67–69. Available at: <https://doi.org/10.1038/306067a0>.
- Suer, S. *et al.* (2001) 'Human phosphatidylinositol 4-kinase isoform PI4K92: Expression of the recombinant enzyme and determination of multiple phosphorylation sites', *European Journal of Biochemistry*, 268(7), pp. 2099–2106. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02089.x>.
- Sultana, A. *et al.* (2011) 'The activation cycle of Rab GTPase Ypt32 reveals structural determinants of effector recruitment and GDI binding', *FEBS Letters*, 585(22), pp. 3520–3527. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.10.013>.
- Szentpetery, Z. *et al.* (2011) 'Genetic and functional studies of phosphatidyl-inositol 4-kinase type III α ', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1811(7), pp. 476–483. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.04.013>.
- Szentpetery, Z., Várnai, P. & Balla, T. (2010) 'Acute manipulation of Golgi phosphoinositides to assess their importance in cellular trafficking and signaling', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(18), pp. 8225–8230. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1000157107>.
- Tanida, I. *et al.* (1999) 'Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy', *Molecular Biology of the Cell*, 10(5), pp. 1367–1379. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.10.5.1367>.
- Thomas, J.D. *et al.* (2014) 'Rab1A is an mTORC1 activator and a colorectal oncogene', *Cancer Cell*, 26(5), pp. 754–769. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.008>.
- Tisdale, E.J. *et al.* (1992) 'GTP-binding mutants of Rab1 and Rab2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex', *Journal of Cell Biology*, 119(4), pp. 749–761. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.119.4.749>.
- Tóth, B. *et al.* (2006) 'Phosphatidylinositol 4-kinase III β regulates the transport of ceramide between the endoplasmic reticulum and Golgi', *Journal of Biological Chemistry*, 281(47), pp. 36369–36377. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M604935200>.

- Touchot, N. *et al.* (1989) *Biochemical properties of the YPT-related Rab1B protein, FEBS letters, 256(1-2)*, pp. 79-84. Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)81722-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)81722-3).
- Touchot, N., Chardin, P. & Tavitian, A. (1987) 'Four additional members of the Ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: Molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library', *Proceedings of the Academy of Sciences of the United States of America, 84(23)*, pp. 8210–8214. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.84.23.8210>.
- Tremel, S. *et al.* (2021) 'Structural basis for VPS34 kinase activation by Rab1 and Rab5 on membranes', *Nature Communications, 12(1)*, p. 1564. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21695-2>.
- Uemura, T. *et al.* (2014) 'A cluster of thin tubular structures mediates transformation of the endoplasmic reticulum to autophagic isolation membrane', *Molecular and Cellular Biology, 34(9)*, pp. 1695–1706. Available at: <https://doi.org/10.1128/mcb.01327-13>.
- Uhlén, M. *et al.* (2015) 'Tissue-based map of the human proteome', *Science, 347(6220)*, p. 1260419. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1260419>.
- Valente, C. *et al.* (2012) 'A 14-3-3 γ 3 dimer-based scaffold bridges CtBP1-S/BARS to PI(4)KIII β 2 to regulate post-Golgi carrier formation', *Nature Cell Biology, 14(4)*, pp. 343–354. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb2445>.
- Voss, S. *et al.* (2019) 'Spatial cycling of rab GTPase, driven by the GTPase cycle, controls Rab's subcellular distribution', *Biochemistry, 58(4)*, pp. 276–285. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00932>.
- Walker, S.M., Downes, C.P. & Leslie, N.R. (2001) 'TPIP: a novel phosphoinositide 3-phosphatase', *Biochemical Journal, 360(2)*, pp. 277–283. Available at: <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3600277>.
- Wang, C. *et al.* (2010) 'Regulation of Integrin β 1 recycling to lipid rafts by Rab1a to promote cell migration', *Journal of Biological Chemistry, 285(38)*, pp. 29398–29405. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.141440>.
- Wang, J. *et al.* (2007) 'PI4P promotes the recruitment of the GGA adaptor proteins to the trans-Golgi network and regulates their recognition of the ubiquitin sorting signal', *Molecular Biology of the Cell, 18(7)*, pp. 2646–2655. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.E06>.
- Wang, Y.J. *et al.* (2003) *Phosphatidylinositol 4-phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi, Cell, 114(3)*, pp. 299–310. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00603-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00603-2).
- Watt, S.A. *et al.* (2002) 'Subcellular localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate using the pleckstrin homology domain of phospholipase C δ 1', *Biochemical Journal, 363(3)*, pp. 657–666. Available at: <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3630657>.

- Watt, S.A. *et al.* (2004) 'Detection of novel intracellular agonist responsive pools of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate using the TAPP1 pleckstrin homology domain in immunoelectron microscopy', *Biochemical Journal*, 377(3), pp. 653–663. Available at: <https://doi.org/10.1042/BJ20031397>.
- Webster, C.P. *et al.* (2016) 'The C9orf72 protein interacts with Rab1a and the ULK 1 complex to regulate initiation of autophagy', *The EMBO Journal*, 35(15), pp. 1656–1676. Available at: <https://doi.org/10.15252/embj.201694401>.
- Weide, T. *et al.* (2001) 'The Golgi matrix protein GM130: a specific interacting partner of the small GTPase Rab1b', *EMBO Reports*, 2(4), pp. 336–341. Available at: <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve065>.
- Weigel, A. V. *et al.* (2021) 'ER-to-Golgi protein delivery through an interwoven, tubular network extending from ER', *Cell*, 184(9), pp. 2412–2429. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.035>.
- Weixel, K.M. *et al.* (2005) 'Distinct Golgi populations of phosphatidylinositol 4-phosphate regulated by phosphatidylinositol 4-kinases', *Journal of Biological Chemistry*, 280(11), pp. 10501–10508. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M414304200>.
- Westrate, L.M. *et al.* (2020) 'Vesicular and uncoated Rab1-dependent cargo carriers facilitate ER to Golgi transport', *Journal of Cell Science*, 133(14), p. jcs239814. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.239814>.
- Whitters, E.A. *et al.* (1993) 'Sac1p is an integral membrane protein that influences the cellular requirement for phospholipid transfer protein function and inositol in yeast', *Journal of Cell Biology*, 122(1), pp. 79–94. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.122.1.79>.
- Wieffer, M. *et al.* (2013) 'PI4K2 β /AP-1-based TGN-endosomal sorting regulates Wnt signaling', *Current Biology*, 23(21), pp. 2185–2190. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.09.017>.
- Williams, C. *et al.* (2007) 'Targeting of the type II inositol polyphosphate 5-phosphatase INPP5B to the early secretory pathway', *Journal of Cell Science*, 120(22), pp. 3941–3951. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.014423>.
- Wiradjaja, F. *et al.* (2001) 'The yeast inositol polyphosphate 5-phosphatase Inp54p localizes to the endoplasmic reticulum via a C-terminal hydrophobic anchoring tail', *Journal of Biological Chemistry*, 276(10), pp. 7643–7653. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M010471200>.
- Wong, K., Meyers, R. & Cantley, L.C. (1997) 'Subcellular locations of phosphatidylinositol 4-kinase isoforms', *Journal of Biological Chemistry*, 272(20), pp. 13236–13241. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.272.20.13236>.
- Wu, Y., Yang, D. & Chen, G.-Y. (2022) 'Targeted disruption of Rab1a causes early embryonic lethality', *International Journal of Molecular Medicine*, 49(4), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2022.5101>.

- Xu, D. & Hay, J.C. (2004) 'Reconstitution of COPII vesicle fusion to generate a pre-Golgi intermediate compartment', *Journal of Cell Biology*, 167(6), pp. 997–1003. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.200408135>.
- Yamashita, A. *et al.* (2003) 'Reverse reaction of lysophosphatidylinositol acyltransferase: Functional reconstitution of coenzyme A-dependent transacylation system', *Journal of Biological Chemistry*, 278(32), pp. 30382–30393. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M303391200>.
- Yang, N. *et al.* (2012) 'Phosphatidylinositol 4-kinase III β is required for severe acute respiratory syndrome coronavirus spike-mediated cell entry', *Journal of Biological Chemistry*, 287(11), pp. 8457–8467. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.312561>.
- Yao, W. *et al.* (2023) 'TOR -mediated Ypt1 phosphorylation regulates autophagy initiation complex assembly', *The EMBO Journal*, 42(19), p. e112814. Available at: <https://doi.org/10.15252/embj.2022112814>.
- Zewe, J.P. *et al.* (2018) 'SAC1 degrades its lipid substrate PtdIns4P in the endoplasmic reticulum to maintain a steep chemical gradient with donor membranes', *eLife*, 7, p. e35588. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.35588.001>.
- Zhang, B. *et al.* (2020) 'STEEP mediates STING ER exit and activation of signaling', *Nature Immunology*, 21(8), pp. 868–879. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0730-5>.
- Zhang, H. *et al.* (2020) 'PtdIns4P restriction by hydrolase SAC1 decides specific fusion of autophagosomes with lysosomes', *Autophagy*, 17(8), pp. 1907-1917. Available at: <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1796321>.
- Zhang, L. *et al.* (2018) 'PI4KIII α regulates insulin secretion and glucose homeostasis via a PKD-dependent pathway', *Biophysics Reports*, 4(1), pp. 25–38. Available at: <https://doi.org/10.1007/s41048-018-0049-z>.
- Zhang, X. *et al.* (1995) 'The protein deficient in Lowe syndrome is a phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 5-phosphatase', *Medical Sciences*, 92(11), pp. 4853–4856. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.92.11.4853>.
- Zhu, Y. *et al.* (2001) 'Binding of GGA2 to the lysosomal enzyme sorting motif of the mannose 6-phosphate receptor', *Science*, 292(5522), pp. 1716–1718. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1060896>.
- Zoppino, F.C.M. *et al.* (2010) 'Autophagosome formation depends on the small GTPase Rab1 and functional ER exit sites', *Traffic*, 11(9), pp. 1246–1261. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01086.x>.
- Zou, J. *et al.* (2012) 'Myotubularin-related protein (MTMR) 9 determines the enzymatic activity, substrate specificity, and role in autophagy of MTMR8', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(24), pp. 9539–9544. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1207021109>.