

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:
Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor:
Speciální biologicko-chemické obory



Tomáš Hájek

Úloha fosfoinositidů v makropinocytóze
The role of phosphoinositides in macropinocytosis

Bakalářská práce

Školitelka: Mgr. Lenka Doubravská, Ph.D.

Praha, 2023

Poděkování:

Tímto bych rád poděkoval své školitelce Mgr. Lenka Doubravská, Ph.D. za vstřícnost, věnovaný čas, trpělivost a cenné rady. Dále děkuji svým blízkým za podporu nejen při psaní této bakalářské práce.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracoval samostatně na základě uvedené literatury a konzultací se svou školitelkou. Rovněž prohlašuji, že jsem uvedl veškeré použité informační zdroje. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 2. května 2023

Podpis

Abstrakt

Makropinocytóza je neselektivní na aktinu závislý typ endocytózy. Je důležitá pro normální fyziologii některých buněčných typů. Využívají ji ale i intracelulárními paraziti, kteří se takto internalizují do hostitelských buněk a rovněž hraje roli v nutričním příjmu některých nádorových buněk.

Během makropinocytózy vzniká samoorganizovaná membránová subdoména oddělená difúzní bariérou nazývaná makropinocytární pohárek. Polymerace aktinu řízená RAC1 proteinem je nezbytná pro tvorbu membránových výběžku na periferii pohárku, kde je přítomen úzký prstenec aktin nukleačních faktorů. Naproti tomu na bázi pohárku dochází k disociaci aktinu díky RAS-řízené tvorbě fosfatidylinositoltrisfosfátů (PIP3). Při uzavírání pohárku je nutné sekvenční odbourání PIP3 až na fosfatidylinositol a získání endozomální identity nově vzniklého váčku. Během časných fází maturace makropinocytózy dochází k jeho tubulaci, díky čemuž váček zmenšuje svůj průměr a stabilizuje se. V pozdních fázích může makropinocytární váček splývat s lysozomem, čímž se do této degradační organely dostane internalizovaný materiál.

Během celého procesu jsou součástí membrány konkrétní typy fosfatidylinositolů, které umožňují přenášení signálů a zajišťují identitu membrán. Tyto fosfolipidy řídí celou makropinocytózu a regulují metabolismus buňky.

Klíčová slova: Makropinocytóza, příjem tekutiny, endocytóza, fosfatidylinositoly, nádorové buňky, aktinový cytoskelet, monomerní GTPázy, RAS a RAC1

Abstract

Macropinocytosis is non-selective actin-dependent type of endocytosis. It is important for the normal physiology of some cell types. However, it is used by intracellular parasites which internalise themselves into host cells in this way and also play a role in the nutritional supply in some type of cancer cells.

During macropinocytosis a self-organized subdomain of plasma membrane is separated by a diffusion barrier named macropinocytic cup. RAC1-driven actin polymerization is required for membrane protrusion at the cup periphery, where a narrow ring of the actin nucleating factors is present. In contrast, actin dissociation occurs at the base of the cup due to RAS-controlled formation of phosphatidylinositol trisphosphates (PIP3). During cup closure sequential breakdown of PIP3 to phosphatidylinositol and acquisition of the endosomal identity of the newly formed vesicle is necessary. As a result of tubulation in the early stages of macropinosome maturation the vesicle decreases in diameter and stabilizes. At late stages the macropinocytic vesicle may fuse with the lysosome, allowing internalized material to enter this degradative organelle.

Throughout the process specific types of phosphatidylinositols are part of the membrane providing signal transduction and membrane identity. These phospholipids control the entire macropinocytosis and regulate the metabolism of the cell.

Key words: Macropinocytosis, fluid-phase uptake, endocytosis, phosphatidylinositols, cancer cells, actin cytoskeleton, monomeric GTPase, RAS and RAC1

Seznam použitých zkratek

Akt/PKB	Protein kináza B	Protein kinase B
ALS2	Alsin2	Alsin2
AMPK	5' adenosinmonofosfátem (AMP) aktivovaná protein kináza	5' adenosinmonophosphate(AMP)- activated protein kinase
AP	Adaptorový protein	Adaptor protein
APC	Antigen prezentující buňky	Antigen presenting cells
ARF6	ADP-ribosylační faktor 6	ADP-ribosylation factor 6
ARL13b	ADP-ribosylačnímu faktoru podobný protein 13b	ADP-ribosylation factor-like protein 13b
ARP2/3	S aktinem související protein 2/3	Actin related protein 2/3
BAR	Bin/Amfifysin/Rvs	Bin/Amphiphysin/Rvs
BMP	Kostní morfogenní faktor	Bone morfogenic factor
CaSR	Extracelulární vápník vazebný receptor	Calcium sensing receptor
CDC42	Homolog proteinu 42 kontroly buněčného dělení	Cell division control protein 42 homolog
CPM	Cytoplazmatická membrána	Cytoplasmatic membrane
CRAC	Cytosolický regulátor adenylát cyklázy	Cytosolic regulator of adenyl cyclase
CtBP1/BARS	C-konec vazebný protein-1/ brefeldinA- ADP ribosylovaný substrát	C-terminal binding protein 1/brefeldinA- ADP rybosylated substrate
DAG	Diacylglycerol	Diacylglycerol
DGK	Diacylglycerol kináza	Diacylglycerol kinase
EGF	Epidermální růstový faktor	Epidermal growth factor
EIPA	5-[N-ethyl-N-isopropyl] amilorid	5-[N-ethyl-N-isopropyl] amilorid
ESCRT	Endozomální třídící komplex nezbytný pro transport	Endosomal sorting complex required for transport
FYVE	FAB1, YOTB, Vac1, EEA1	FAB1, YOTB, Vac1, EEA1
GAP	GTPázu aktivující protein	GTPase -activating protein
GEF	Guanin nukleotid vyměňující faktor	Guanine nucleotide exchange factor
GTPáza	Guanosintrisfosfát fosfohydroláza	Guanosinetrisphosphate phosphohydrolase
HSPC300	Protein hematopoetických kmenových/progenitorových buněk 300	Haematopoietic stem/progenitor cell protein 300

INPP4A	Inositol-3,4-bisfosfát-4-Fosfatáza typu IA	Type I A inositol-3,4-bisphosphate 4-phosphatase
INPP5b	Inositol-1,4,5-trisfosfát 5-fosfatáza typu II	Type II inositol-1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase
IP3	Inositoltrisfosfát	Inositol trisphosphate
IqgC	IQGAP-příbuzný protein	IQGAP-related protein
JIP	Protein interagující s Jun kinázou	Jun kinase-interacting protein
LAMP1	S lysozomem asociovaný membránový glykoprotein 1	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1
LDL	Nízkodenzitní lipoprotein	Low-density lipoprotein
LIMK	LIM kináza	LIM kinase
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex	Major histocompatibility complex
MTMR	Myotubularinu příbuzný protein	Myotubularin-related protein
MVB	Multivezikulární tělísko	Multivesicular body
mTORC1	Mechanistický cíl rapamycinového komplexu 1	Mechanistic target of rapamycin complex 1
NF1	Neurofibromin1	Neurofibromin1
NHE	sodno-protonový antiportér	Sodium-proton exchanger
N-WASP	Neuralní Wiskott-Aldrich syndrom protein	Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein
OCRL	Protein Loweho okulocerebrorenálního syndromu	Lowe oculocerebrorenal syndrome protein
PA	Kyselina fosfatidová	Phosphatidic acids
PAK1	p21-aktivovaná kináza	p21-activated kinase
PH	Homolog pleckstrinu	Pleckstrin homology
PI(3)P	Fosfatidylinositol-3-fosfát	Phosphatidylinositol-3-phosphate
PI(3,4)P ₂	Fosfatidylinositol-3,4-bisfosfát	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate
PI(3,5)P ₂	Fosfatidylinositol-3,5-bisfosfát	Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate
PI(4)P	Fosfatidylinositol-4-fosfát	Phosphatidylinositol-4-phosphate
PI(4,5)P ₂	Fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PI(5)P	Fosfatidylinositol-5-fosfát	Phosphatidylinositol-5-phosphate
PI3K	Fosfatidylinositol-3-kináza	Phosphatidylinositol 3-kinase
PI3KC2α	Fosfatidylinositol-4-fosfát 3-kináza třídy C2α	Class 2α phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase

PI4KII α	Fosfatidylinositol 4-kináza typu II α	Type II α phosphatidylinositol 4-kinase
PIKfyve	Fosfatidylinositol-3-fosfát 5-kináza	Phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase
PIP3	Fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate
PIPKI	Fosfatidylinositol-4-fosfát 5-kináza	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase
PIPs	Fosfatidylinositolfosfáty	Phosphatidylinositol phosphates
PKC	Protein kináza C	Protein kinase C
PLC	Fosfolipáza C	Phospholipase C
PLD	Fosfolipáza D	Phospholipase D
PMA	Forbol 12-myristát 13-acetát	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PTEN	Fosfatáza homologická tenzinu	Phosphatase and tensin homolog
PX	Phox homolog	Phox homology
RAC1	Ras-příbuzný substrát 1 C3 botulotoxinu	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RAS	Virus potkaního sarkomu	Rat sarcoma virus
RGBARG	Protein obsahující RCC1, RhoGEF, BAR a RasGAP domény	RCC1, RhoGEF, BAR a RasGAP-containing protein
RHO	Homolog Ras	Ras homology
rM-CSF	Makrofág-kolonie stimulující faktor	Macrophage colony-stimulating factor
SDC4	Syndekan-4	Syndecan-4
SEPT2	Septin typu 2	Septin type 2
SHH1	Slingshot homolog 1 protein fosfatáza	Protein phosphatase Slingshot homolog 1
SHIP	Inositol polyfosfát 5-fosfatáza obsahující Src homologickou 2 (SH2) doménu	Src homology 2 (SH2) domain containing inositol polyphosphate 5-phosphatase
SNX	Třídící nexin	Sorting nexin
STAM1	Signál transdukující adaptorová molekula 1	Signal transducing adaptor molecule 1
TAPP1	Tandemový protein obsahující PH doménu 1	Tandem PH-domain-containing protein 1
TGN	Trans-Golgi síť	Trans Golgi network
TIAM1	T-lymfom invazi a metastázi indukující protein 1	T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1
TRPML1	Kationtový kanál přechodného receptorového potenciál, Mukolipin1	Transient receptor potential cation channel, mucolipin 1
TSC1/TSC2	Tuberin-hamartin komplex, protein tuberózní sklerózy 1/2	Tuberin-hamartin complex, Tuberous sclerosis protein 1/2 complex

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Makropinocytóza – odlišný typ endocytózy	1
1.2	Srovnání makropinocytózy a fagocytózy	1
2	Makropinocytóza na buněčné úrovni	2
2.1	Bezobratlé organismy využívající makropinocytózu	2
2.2	Makropinocytóza u savčích buněk	2
2.2.1	Buňky imunitního systému – myeloidní linie	2
2.2.2	Konstitutivní makropinocytóza	3
2.2.3	Buňky imunitního systému – lymfoidní linie	3
2.2.4	Makropinocytóza v buňkách dalších tkání	4
2.3	Makropinocytóza rakovinných buněk	4
2.3.1	Faktory ovlivňující makropinocytózu u nádorových buněk	4
2.3.2	Extracelulární proteiny jako zdroj energie pro transformované buňky	5
2.3.3	Makropinocytóza a protinádorová terapie	5
3	Fosfatidylinositoly	6
3.1	Fosfatidylinositoly jako signální lipidy	6
3.2	PI(4)P a PI(4,5)P ₂	7
3.3	PI(3,4)P ₂ , PI(3)P a PI(3,5)P ₂	7
3.4	PIP3 a role fosfatidylinositolů ve fagocytóze	8
3.5	Monomerní GTPázy a RAB5 jako příklad	9
4	Formování makropinocytózy	10
4.1	Konstitutivní <i>versus</i> indukovaná makropinocytóza	10
4.2	Morfologické fáze makropinocytózy	10
4.3	Počáteční fáze formování a membránové zvlnění	11
4.3.1	Vznik membránového zvlnění	11
4.3.2	Role PI(4,5)P ₂ a RAC1 v membránovém zvlnění	11
4.3.3	Role malých GTPáz během makropinocytózy	12
4.3.4	CDC42 a PI(4,5)P ₂ aktivují polymeraci aktinových vláken	14
4.3.5	Role RAS GTPáz během makropinocytózy	14
4.4	Makropinocytární pohárek	15
4.4.1	RAS GAP organizují velikost a tvar makropinocytárního pohárku	15
4.4.2	Prstence nukleárních faktorů v periferii makropinocytárního pohárku	15
4.4.3	Myosiny v makropinocytóze	16
4.4.4	Formin G reguluje aktin na bázi makropinocytárního pohárku	17

4.4.5	PI(4,5)P ₂ a jeho efektorové molekuly během makropinocytózy	18
4.4.6	Proteinkináza C a její role v makropinocytóze	18
4.4.7	Diacylglycerol kináza a kyselina fosfatidová v makropinocytárním pohárku.....	19
4.4.8	AKT je důležitým aktivátorem mTORC1	20
4.5	Uzavírání makropinocytárního pohárku.....	20
4.5.1	Sekvenční defosforylace fosfatidylinositolů.....	20
4.5.2	Inaktivace RAC1 umožňuje uzavírání makropinocytárního pohárku	21
4.5.3	PAK1 umožňuje zakřivení membrány.....	22
5	Maturace makropinocytosomu.....	23
5.1	Cytoskelet během maturace	23
5.1.1	Únik z aktinového pláště	23
5.1.2	Mikrotubulární cytoskelet	24
5.2	Časné fáze maturace makropinocytosomu.....	24
5.2.1	RAB5 a jeho konverze.....	24
5.2.2	PI(3)P a jeho efekторы – třídící nexiny	24
5.2.3	Tubulace, proces fragmentace makropinocytosomů.....	26
5.3	Pozdější fáze makropinocytózy	26
5.3.1	PI(3,5)P ₂ a jejich efekторы	26
5.3.2	Markery pozdního makropinocytosomu	27
6	Závěr.....	28
7	Použitá literatura.....	29

1 Úvod

1.1 Makropinocytóza – odlišný typ endocytózy

V buňkách dochází k neustálému příjmu látek z vnějšího prostředí. Takovému procesu se říká endocytóza. Typů endocytóz probíhá v buňce několik a tyto děje se mezi sebou liší v celé řadě kritérií. Makropinocytóza je jedním z typů endocytóz, přičemž dochází k nespecifickému na aktinu závislému příjmu velkého množství materiálu [1]. Tento materiál se uzavírá do váčků, makropinocytosomů, které mají v průměru $1,6 \pm 0,3 \mu\text{m}$ u *Dyctiostelia* [1] a $0,5\text{-}5 \mu\text{m}$ u savčích makrofágů [2]. Velikostně se tak významně liší makropinocytosomy od váčků vzniklých klathrinem dependentní endocytózou, které typicky mají $50\text{-}200 \text{ nm}$ v průměru a nepřesahují velikost 500 nm [3]. Klathrin dependentní endocytóza často bývá společně s kalveolin dependentní a klathrin/kalveolin nezávislou endocytózou souhrnně označována jako mikropinocytóza [4]. Typy těchto váčků mají velice podobné průměry a nedosahují rozměrů jako váčky vzniklé makropinocytózou [3,4]. Klathrin dependentní endocytóza je receptorem zprostředkovaná a je závislá na velké řadě adaptorových molekul, jako je klathrin a dynamin. Makropinocytóza je na dynaminu a klathrinu nezávislá a využívá jiné mechanismy pro uzavření membrány do váčků [5]. Váčky vzniklé makropinocytózou se rovněž od klathrin dependentních odlišují tím, že nesplývají s časným endozomem, ale tvoří oddělenou populaci váčků [6]. Stejně tak nebylo pozorováno, že by byl obsah makropinocytárních váčků doručován do pozdních endozomů, naopak bylo potvrzeno vzájemné splývání makropinocytosomů do větších váčků [6].

1.2 Srovnání makropinocytózy a fagocytózy

Makropinocytóza sdílí některé podobnosti s fagocytózou. Během fagocytózy byla rovněž pozorována závislost na přestavbě aktinového cytoskeletu a míra efektivity fagocytózy byla stejně jako u makropinocytózy závislá na faktorech, které aktinový cytoskelet remodelují [1,7]. Nicméně fagocytóza je závislá na receptorech a obvykle během ní dochází k obalení internalizovaného tělesa/částice buněčnou membránou. Bylo pozorováno, že během fagocytózy postupně rostou interakce založené na vazbě receptor-ligand mezi fagocytující buňkou a povrchem přijímané částice [8]. Příkladem může být fagocytóza makrofágů pomocí povrchových receptorů FcR, které rozpoznávají opsonizované částice, například bakterie mající ke svým povrchovým antigenům vázané imunoglobuliny. Oproti tomu makropinocytóza může probíhat konstitutivně, či v důsledku působení růstových faktorů a je tedy nespecifická a neselektivní vůči internalizovanému materiálu. Z tohoto důvodu se makropinocytóza někdy označuje jako buněčné pití, či příjem tekutiny („fluid-phase uptake“). Dalším společným znakem těchto dvou typů endocytóz může být nezbytná přítomnost fosfatidylinositoltrisfosfátu (PIP3) pro úspěšný vznik makropinocytosomu i fagozomu, jak bude popsáno dále.

2 Makropinocytóza na buněčné úrovni

2.1 Bezobratlé organismy využívající makropinocytózu

Makropinocytóza se odehrává u celé řady organismů a buněčných typů. Můžeme ji pozorovat nejen v savčích buňkách a buňkách obratlovců, ale i u bezobratlých živočichů. Příkladem může být háďátko *Caenorhabditis elegans*, jehož buňky coelomocyty vykazují nespecifický příjem tekutiny z pseudocoelomu [9]. U *Drosophily* byla pozorována faktory indukovaná makropinocytóza ovlivňující internalizaci a degradaci receptoru pro růstový faktor BMP (kostní morfogenetický protein) na presynaptické membráně, což reguluje synaptický vývoj při nervosvalovém spojení [10]. Dále byla zkoumána závislost vstupu patogena *Spiroplasma eriocheiris* do Schneider 2 buněk *Drosophily* [11]. To ovšem není ojedinělý případ, kdy by patogen vstupoval do hostitelských buněk makropinocytózou. Celá řada parazitických intracelulárních patogenů, jako bakterie a viry vstupují do buněk různých hostitelů tímto způsobem. Příkladem může být vstup viru SARS-CoV-2 do eukaryotických hostitelských buněk, přičemž přidáním inhibitoru makropinocytózy dochází k potlačení internalizace tohoto patogena [12]. Vstup do hostitelských buněk makropinocytózou byl pozorován i u bakterie *Chlamydia trachomatis* [13]. U eukaryotických organismů lze makropinocytózu pozorovat i mimo skupinu Metazoa, například u volně žijícího ameboidního modelu *Dictyostelium discoideum* [1], či parazitického prvoka *Entamoeba histolice* [14]. Pozoruhodné je, že tento buněčný proces nebyl dosud pozorován u některých významných modelových organismů, jako je kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, či houba *Aspergillus nidulans* [15].

2.2 Makropinocytóza u savčích buněk

2.2.1 Buňky imunitního systému – myeloidní linie

V savčím těle je velké množství buněčných typů majících různou morfologii a fyziologii. Makropinocytózu lze pozorovat u celé řady z nich, přičemž u různých buněčných typů umožňuje rozdílné funkce. Makropinocytóza má veliký význam u buněk myeloidní linie, které zajišťují vrozenou imunitu. Důležitým modelem makropinocytózy u savců jsou makrofágy. Přidáním inhibitorů fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K), wortmanninu či LY294002, dochází u těchto buněk k potlačení makropinocytózy ve větší míře, než byla inhibována mikropinocytóza, což poukazuje na důležitost PI3K v tomto procesu [16]. Naopak, v přítomnosti růstových faktorů, jako je M-CSF (makrofág-kolonie stimulující faktor), dochází k vazbě těchto faktorů na receptory v cytoplazmatické membráně makrofágů, čímž je makropinocytóza stimulována [17]. Podobné výsledky byly pozorovány u indukce prostřednictvím aktivátoru makrofágů PMA (forbol 12-myristát 13-acetát), které ovšem vedou k závěru, že jejich receptor je intracelulární [17]. V těchto buňkách se makropinocytóza podílí na příjmu exogenních antigenů, které mohou být následně prezentovány skrze MHC I (hlavní histokompatibilní komplex I) [18]. Makropinocytóza byla pozorována rovněž u dendritických buněk, které jsou stejně jako makrofágy antigen prezentující buňky („Antigen Presenting Cells“, APC). U obou

těchto buněk byl pozorován příjem autoantigenů kolagenu typu II prostřednictvím makropinocytózy za účelem jeho prezentace na nově syntetizované MHC II [19]. Při inhibici makropinocytózy amiloridem (EIPA (5-[N-ethyl-N-isopropyl] amilorid)) dochází u těchto buněk k výraznému snížení antigení prezentace [19,20]. Z těchto pozorování lze odvodit důležitost makropinocytózy při prezentaci exogenních antigenů na MHC II, ale i na MHC I v procesu zkřížené prezentace („cross-presentation“), díky čemuž mohou tyto buňky aktivovat pomocné i cytotoxické T-lymfocyty.

2.2.2 Konstitutivní makropinocytóza

Makropinocytóza u antigen prezentujících buněk je často výrazná v přítomnosti růstových faktorů, které tento proces posilují. Nicméně u makrofágů i dendritických buněk byla pozorována konstitutivní makropinocytóza. Konstitutivní makropinocytóza je závislá na přítomnosti extracelulárního vápníku, jenž stimuluje CaSR (extracelulární vápník vazebný receptor). Naproti tomu růstovými faktory stimulovaná makropinocytóza je vápníkově nezávislá [21]. CaSR byl pozorován aktivní pouze v protizánětlivých makrofázích, naopak cytokiny a chemokiny indukovaly makropinocytózu u prozánětlivých makrofágů [22]. Konstitutivní makropinocytóza byla pozorována i u mikroglíí, makrofágů nervové tkáně, které pomocí ní nespecificky a nezávisle na receptorech internalizují deposity amyloidů- β v extracelulárním prostředí, jejichž hromadění je znakem Alzheimerovy choroby [23]. Konstitutivní makropinocytóza i PMA stimulovaná makropinocytóza je v neposlední řadě klíčová pro příjem nízkodenzitních lipoproteinů (LDL) i oxidovaných LDL částic [24,25]. Hromaděním těchto lipoproteinů se v makrofázích hromadí cholesterol, což může způsobovat jejich přeměnu na pěnové buňky („foam cells“), které se podílejí na tvorbě aterosklerózy [24,25]. Formování pěnových buněk z buněčné linie myších makrofágů RAW264,7 bylo potlačeno v přítomnosti PI3K inhibitoru LY294002 [24].

2.2.3 Buňky imunitního systému – lymfoidní linie

Aktivní makropinocytózu lze pozorovat i u buněk lymfoidní linie. Zejména se jedná o B-lymfocyty, které rovněž patří mezi antigen prezentující buňky. Výzkum na lidské B-lymfoblastové buněčné linii prokázal, že je v těchto buňkách pouze snížená míra nespecifického příjmu tekutiny. Nicméně při změně podmínek, jako je přítomnost PMA či infekce bakteriemi rodu *Mycobacterium* a *Salmonella*, dochází k významnému vzrůstu míry nespecifického příjmu a indukci makropinocytózy [26]. Internalizace těchto bakterií je potlačena v přítomnosti inhibitorů makropinocytózy, jako je amilorid či wortmannin [26]. Pomocné i cytotoxické T-lymfocyty jsou rovněž schopné makropinocytózy. Ta je nezbytná pro jejich efektivní růst, je však nutná předchozí stimulace a aktivace přes CD3/CD28 ko-receptory [27]. Makropinocytóza u T-lymfocytů se liší tím, že je na rozdíl od klasické nezávislá na RAS (odvozené od Virus potkaního sarkomu) proteinu [27].

2.2.4 Makropinocytóza v buňkách dalších tkání

Makropinocytóza se odehrává pouze u buněk imunitního systému. Lze ji za fyziologických podmínek pozorovat v různých tkáních, kde zajišťuje některé z důležitých funkcí. Makropinocytóze mechanismem podobná endocytóza se odehrává v růstovém kuželu axonu během vývoje nervu. Bylo zde pozorováno membránové zvlnění a konstitutivní příjem závislý na PI3K a RAC1 (Ras-příbuzném substrátu 1 C3 botulotoxinu) proteinu. Tento proces by se mohl podílet na vývoji růstového kužele, nicméně je potřeba dalšího výzkumu role membránových zvlnění a jeho vztahu v tomto ontogenetickém procesu [28,29]. Makropinocytóza je důležitá i během fetálního vývoje savčího organismu. Byla pozorována závislost monojaderných trofoblastů na makropinocytóze, která těmto buňkám umožňuje diferenciovat v mnohojaderný syncytiotrofoblast nezbytný pro výměnu látek mezi matkou a plodem [30]. Aminokyselinová deprivace, či inhibice mTOR1 komplexu (mechanistického cíle rapamycinového komplexu 1) signalizující nízký přísun aminokyselin, vede k zvýšené míře makropinocytózy a syncytializace u buněk trofoblastu [30].

2.3 Makropinocytóza rakovinných buněk

2.3.1 Faktory ovlivňující makropinocytózu u nádorových buněk

U rakovinných buněk může rovněž docházet ke konstitutivní makropinocytóze. Ta však vzniká v důsledku mutace některých genů, které ovlivňují makropinocytózu. Příkladem může být mutace některé monomerní (malé) guanosintrisfosfát fosfohydrolázy (GTPázy) z RAS proteinové rodiny, která vede ke stále aktivní formě tohoto enzymu. Konkrétně se může jednat o transformaci K-Ras izoformy, která u krysích rakovinných fibroblastů specificky spouští konstitutivní makropinocytózu [31]. Nicméně RAS GTPázy nejsou jedinou skupinou faktorů, jejichž mutací dochází k indukci makropinocytózy. U buněk rakoviny prostaty dochází k výraznému posílení míry makropinocytózy tím, že mají deficienci PTEN (fosfatázy homologické tenzinu) a stále aktivní AMPK (5' adenosin-monofosfátem aktivovanou kinázu) [32]. Bylo pozorováno, že inhibicí komplexu mTOR došlo ke zvýšení míry zpracovávání extracelulárních proteinů jako zdroje energie a tím i přežití a růstu nádorových buněk v prostředí s nutriční deprivací [33]. Podle této studie mTORC v aktivní formě stimuluje anabolismus aminokyselin uvnitř buňky a inhibuje příjem a degradaci extracelulárních proteinů [33]. Příkladem negativního regulátoru mTORC1 může být TRPML1 (kationtový kanál přechodného receptorového potenciálu, mukolipin1). Tento kanál je klíčový pro inhibici nejen mTORC1, ale i MAPK signalizace [34]. TRPML1 pozitivně ovlivňuje makropinocytózu a jeho exprese je zvýšena v buňkách melanomu ve srovnání s melanocyty [34]. V recentní studii byla popsána fosfolipidy transportující flipáza ATP9A jako faktor, který prostřednictvím makropinocytózy řídí růst hepatocelulárního nádoru [35].

2.3.2 Extracelulární proteiny jako zdroj energie pro transformované buňky

V prostředí nádoru jsou podmínky, ve kterých musí buňky využívat jako zdroj energie a stavebních bloků alternativní cesty, například v důsledku hypoxie, nepřítomnosti glukózy a volných aminokyselin [36]. Takovou alternativní cestou může být makropinocytóza zajišťující nespecifický příjem albuminu a jeho degradaci na aminokyseliny, které pak mohou sloužit k syntéze buňkám potřebných proteinů [36]. Buňky exprimující onkogenní RAS či jiné faktory tak mohou využívat makropinocytózu jako neustálý zdroj aminokyselin vzniklých degradací sérového albuminu, což podporuje proliferaci těchto buněk [37]. Nádorové buňky, například buňky rakoviny prostaty, jsou dále schopné využívat makropinocytózu k příjmu nekrotického debris přítomného v místě nádoru, což může být rovněž důležité jako příjem aminokyselin a podpora anabolismu při nutriční deprivaci [32]. Příjem nekrotického debris byl pozorován i při studii buněk rakoviny prsu [38]. Nekrotické debris je oproti apoptotickým tělíškům dostatečně malé, aby mohlo být prostřednictvím makropinocytózy přijímáno. Také bylo zjištěno, že se jedná o vhodnější zdroj aminokyselin než albumin, jelikož je v albuminu specifické zastoupení jednotlivých aminokyselin. Kdežto přísun komplexnějších nekrotických zbytků je pro globální biosyntézu proteinů nádorové buňky vhodnější [38]. Makropinocytóza nekrotických zbytků zprostředkovává buňkám nádoru také příjem cukrů a dalších energeticky bohatých molekul jako zdroje energie a metabolických prekurzorů [38].

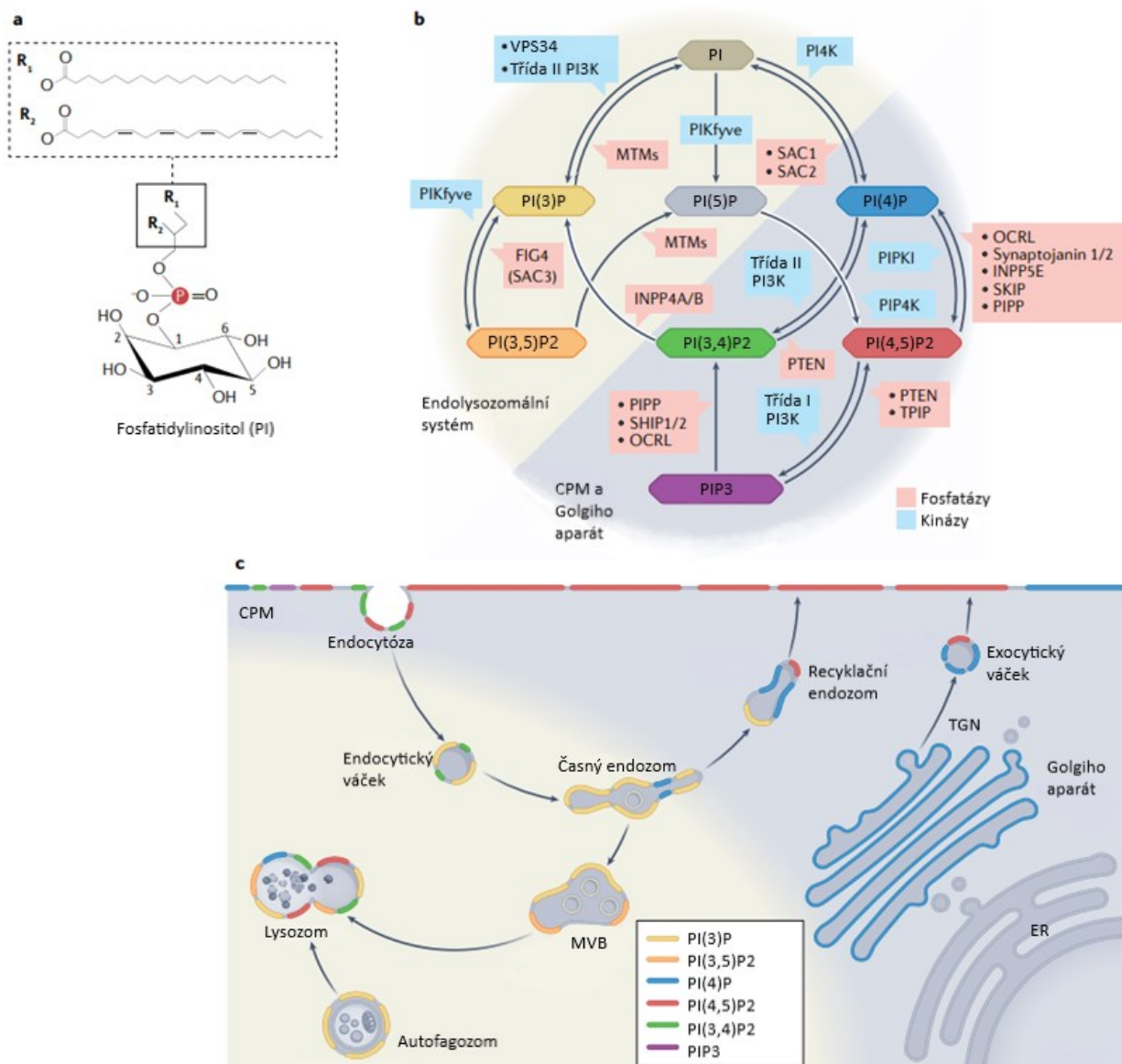
2.3.3 Makropinocytóza a protinádorová terapie

Schopnost nádorových buněk provádět makropinocytózu má význam i pro protinádorovou terapii. Byla pozorována rezistence *in vitro* i *in vivo* některých tříd nádorů majících aktivní makropinocytózu vůči tradičním protinádorovým léčbám, jako je chemoterapie a dokonce byla u některých rakovinných buněk makropinocytóza léčbou indukována [38]. Destrukci nádorových buněk a vznikem nekrotického debris tak paradoxně lze stimulovat růst nádorů s aktivní makropinocytózou [38]. Vhodnou kombinací léčby rakoviny prostřednictvím radiace či chemoterapie a použitím inhibitorů makropinocytózy by bylo možné zamezit vzniku rezistencí [38]. Potlačením makropinocytózy inhibicí PI3K lze snížit růst nádorů a navodit tím jejich regresi [37]. Rovněž i použitím EIPA inhibitoru na myší hepatocelulární karcinom dochází k výraznému snížení proliferace a růstu těchto buněk [35]. Blokátory mTORC užívané v nádorové terapii mají nedostatečnou účinnost, jelikož jejich působením vzrůstá příjem extracelulárních proteinů [33]. Ty jsou poté využity jako alternativní zdroje energie, čímž se podporuje růst nádoru. Mnohem efektivnější by mohla být kombinovaná terapie mTORC blokátorů s inhibitory potlačující příjem či degradaci internalizovaných extracelulárních proteinů [33]. V novější studii bylo pozorováno, že je pro růst nádoru i iniciaci makropinocytózy nezbytný transmembránový glykoprotein Syndekan-4 (SDC4), přičemž u nádorových buněk pankreatu (PAN1) s deletovaným SDC4 dochází k výraznému snížení makropinocytózy a regresi nádoru [39].

3 Fosfatidylinositoly

3.1 Fosfatidylinositoly jako signální lipidy

Fosfatidylinositoly (PI) jsou skupinou amfifilních molekul patřící mezi glycerolfosfolipidy, jejichž polární část tvoří kromě fosfátu inositol, cyklohexan mající na každém uhlíku vázanou hydroxylovou skupinu. Fosfatidylinositoly se jako signální molekuly nachází zpravidla na cytoplazmaticky orientovaných listech membránové dvojvrstvy. Klíčová pro jejich funkci jako signalizační molekuly je jejich schopnost fosforylace. Nejčastěji je fosforylovaná hydroxylová skupina na uhlíku 3, 4 a 5, v důsledku čehož vznikají různé typy fosfatidylinositolfosfátů (PIPs). Fosforylace jsou katalyzovány enzymy zvanými kinázami. Antagonisticky k nim působí fosfatázy, které naopak fosfát odštěpují. Existuje celá řada různých kináz a fosfatáz, přičemž každá provádí fosforylaci či defosforylaci na jedné hydroxylové skupině. V membránách různých buněčných kompartmentů lze nalézt odlišné zastoupení PIPs, které dává membráně identitu. Enzymaticky v sebe jednotlivé formy fosfatidylinositolů mohou přecházet, což je klíčové pro transport membrán mezi kompartmenty a pro stimulaci dalších efektorových molekul.



Obr.1: a) Fosfatidylinositol v nefosforylované formě. b) Konverze fosfatidylinositolfosfátů a enzymy, které tyto přeměny v buňkách katalyzují. Rovněž jsou zde fosfatidylinositoly rozděleny podle toho, v jakých membránách převažují na PIPs endolysosomálního systému (žlutý půlkruh) či PIPs cytoplazmatické membrány a Golgiho aparátu (šedý půlkruh). c) Schématické znázornění výskytu jednotlivých typů PIP do membrán kompartmentů eukaryotické buňky. Převzato [40] a upraveno.

3.2 PI(4)P a PI(4,5)P₂

Fosfatidylinositol-4-fosfát (PI(4)P) a fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PI(4,5)P₂) jsou zastoupeny ve vnitřní vrstvě cytoplazmatické membrány (CPM). PI(4)P může v buňkách sloužit jako prekurzor pro syntézu PI(4,5)P₂ při jeho spotřebě, nicméně většina PI(4)P na cytoplazmatické membráně není nezbytná pro tvorbu PI(4,5)P₂ [41]. Bylo zjištěno, že hlavní role PI(4)P je udržování charakteru vnitřní vrstvy CPM prostřednictvím svých záporně nabitých skupin [41]. PI(4,5)P₂ stejně jako PI(4)P udržuje polyaniontový charakter membrány, ale díky interakcím se svými efektory zastává různé funkce a podílí se na celé řadě různých typů endocytóz, například klathrinem zprostředkované endocytóze. Bylo popsáno, že ztrátou PI(4,5)P₂ v cytoplazmatické membráně dochází i ke ztrátě komponent podílejících se na vzniku klathrinového obalu z povrchu takové membrány [42]. Při vzniku klathrinového váčku dochází v iniciálních fázích endocytózy k vazbě adaptorových komplexů AP k receptorům v membráně. AP2 oligomerní komplex obsahuje mimo jiné podjednotku μ 2-adaptin, která prokazatelně interaguje s PI(4,5)P₂, čímž může AP2 komplex stabilizovat a správně orientovat [43]. Dalším příkladem molekuly vážící se na PI(4,5)P₂ může být dynamin, který je klíčovým enzymem pro odštěpení klathrinového váčku od původní membrány. Jedná se o GTPázu obsahující PH (pleckstrin homologickou) doménu vážící PI(4,5)P₂. Mutace této domény způsobuje zhoršení skládání dynaminu v místě endocytózy, nedochází však ke zhoršenému cílení dynaminu do membrány [44]. Dynamin tedy shlukuje PI(4,5)P₂, což může ovlivňovat protahování krčku budoucího veziklu směrem do cytoplazmy [44]. Sílou pro tento pohyb by mohla být aktinová polymerace, jelikož proteiny klíčové pro polymeraci aktinu, jako je nukleační faktor N-WASP (Neuralní Wiskott-Aldrich syndrom protein), jsou také závislé na přítomnosti PI(4,5)P₂ [42]. To naznačuje, že PI(4,5)P₂ nemá vliv pouze na endocytózu, ale může hrát i důležitou roli pro polymeraci aktinu v periférii buněk [42].

PI(4)P se dále nachází v Golgiho aparátu a je důležitý pro sekretorickou dráhu [45]. Blokadí fosfatidylinositol 4-kinázy typu II α (PI4KII α) syntetizující PI(4)P v membráně Golgi dochází k potlačení vazby adaptorových komplexů AP1 [45]. AP1 váže přímo PI(4)P, čímž řídí tvorbu váčků v trans-Golgi síti (TGN) [45].

3.3 PI(3,4)P₂, PI(3)P a PI(3,5)P₂

Dalším typem PIPs je fosfatidylinositol-3,4-bisfosfát (PI(3,4)P₂), který se hromadí při klathrinem zprostředkované endocytóze v membráně budoucího váčku, kde je lokálně syntetizován PI3KC2 α

(fosfatidylinositol-fosfát 3-kinázou typu 2 α) [46]. Při maturaci klatrinového váčku je nezbytná konverze PI(4,5)P₂ na PI(3,4)P₂ součinností PI(4,5)P₂-fosfatáz a PI3KC2 α [47]. Byla pozorována vysoká afinita třídícího nexinu 9 (SNX9) k PI(3,4)P₂, který je nezbytný v pozdějších fázích maturace váčku [47]. PI(3,4)P₂ je poté hydrolyzován INPP4A (inositol-3,4-bisfosfát-4-Fosfatázou typu IA) a slouží tak jako prekurzor pro vznik PI(3)P [46]. Podobně jako ostatní fosfatidylinositoly, PI(3)P má své efektorové proteiny, které se na něj váží prostřednictvím domén. PI(3)P vazebnou doménou může být FYVE (FAB1, YOTB, Vac1, EEA1) doména [48,49]. PI(3)P je důležitý pro formování endolysozomálního systému buněk, například pro identitu časného endozomu a multivezikulárního tělíska (MVB), kde se tento PIP hromadí a významně se podílí na transportu membrán [48]. Příkladem proteinu, který nese FYVE doménu je HRS protein. Díky této doméně je kooperativně s další přídatnou doménou efektivně lokalizován do časných endozomů [50]. Tento protein je společně se STAM1 (signál transdukující adaptorovou molekulou 1) součástí ESCRT-0 (endozomálního třídícího komplexu nezbytného pro transport-0), který je klíčový pro přechod časného endozomu do multivezikulárního tělíska. HRS je nejen důležitý pro rozpoznávání PI(3)P, ale je schopen také inhibovat degradaci STAM1 podjednotky, což je nezbytné pro akumulaci ubiquitovaných proteinů v endozomu, tvorbu ESCRT komplexu a degradaci proteinů [51].

Podobně jako PI(3)P, PI(3,5)P₂ se nachází v endolysozomálním systému buněk, ale tentokrát se jedná zejména o pozdní endozom a lysozom [52]. Na PI(3,5)P₂ je závislá například dynamika aktinového skeletu pozdního endozomu. Na PI(3,5)P₂ se v těchto kompartmentech váže kortaktin, který interaguje stejným vazebným místem se samotným aktinem, čímž dochází ke kompetici a disociaci kortaktinu od větvených aktinových vláken poblíž membrány [53]. V důsledku toho dochází k změnám ve větveném aktinovém cytoskeletu, což je děj důležitý pro maturaci a funkci endozomů [53].

3.4 PIP3 a role fosfatidylinositolů ve fagocytóze

Fosfatidylinositoltrifosfát (PIP3), přesněji fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát (PI(3,4,5)P₃) je jedním z fosfatidylinositolů nezbytných pro správný průběh makropinocytózy. Pro jejich vznik je nezbytná PI3-kináza, která fosforyluje PI(4,5)P₂ na PIP3 a jejíž inhibicí wortmanninem nebo LY294002 nedochází k uzavření makropinocytárních pohárků [16]. Wortmannin i LY294002 slouží rovněž jako inhibitory Fc receptorem zprostředkované fagocytózy [54,55]. V přítomnosti těchto inhibitorů nedochází k potlačení Fc receptorem řízené polymerace aktinu, ale neprobíhá plná extenze pseudopodií nezbytná pro uzavření fagocytárního pohárku [54]. PIP3 domény byly pozorovány krátce po kontaktu s opsonizovanou částicí a jejich koncentrace v membráně během vývoje fagocytárního pohárku postupně rostla [55]. Po uzavření pohárku ovšem koncentrace PIP3 v membráně fagozomu rapidně klesla [55]. Některé PH domény, které váží PI(4,5)P₂ a PI(3,4)P₂ s nižší afinitou, jsou schopné vázat i PIP3 s mnohem vyšší afinitou než oba typy PIP2 [56]. Příkladem takového proteinu může být protein

kináza B (PKB/AKT), která rozeznává zejména PIP3 a umožňuje přenos signálu na další efektorové molekuly, čímž se v tomto případě formuje fagocytární pohárek [55]. Kromě PIP3 lze ve fagocytárním pohárku pozorovat i $PI(3,4)P_2$, který vzniká hydrolýzou PIP3. $PI(3,4)P_2$ má v membránách pohárků podobnou celkovou kinetiku jako PIP3 [57]. Nadměrnou expresí SHIP1 (inositol polyfosfát 5-fosfatázy 1 obsahující Src homologickou 2 (SH2) doménu) a PTEN fosfatázy, které defosforylují PIP3 na $PI(4,5)P_2$, dochází v obou případech k inhibici fagocytózy [57]. Oproti tomu, deficiencie PTEN a hromaděním PIP3 způsobuje stimulaci makropinocytózy [32].

Ve fagozomálním váčku se postupně hromadí $PI(3)P$, který zde vzniká zejména *de novo* působením PI3K třídy III (VPS34), což je nezbytné pro fagozomální maturaci a jeho fúzi s pozdním endozomem či lysozomem [58]. Naopak, PI3K třídy I je nezbytná v počátečních fázích fagocytózy, kde umožňuje tvorbu PIP3 [58]. Ten je ovšem v průběhu procesu postupně defosforylován 5-fosfatázami a vzniklý $PI(3,4)P_2$ je dále fosforylován INPP4A na $PI(3)P$ [59]. INPP4A působí jako negativní regulátor fagocytózy a její inhibicí se zvyšuje míra fagocytózy [59]. Nicméně $PI(3)P$ vzniklé touto cestou, působením PI3K typu I při vývoji pohárku, nejsou nezbytné pro následnou maturaci fagozomu [58].

3.5 Monomerní GTPázy a RAB5 jako příklad

Mezi fosfatidylinositol interagující proteiny patří monomerní GTPázy. Pro identitu membrán a jejich transport jsou důležité malé GTPázy skupiny RAB. Správné fungování endolysozomálního systému je závislé na aktivitě RAB5 a její ztráta pod prahovou hodnotu způsobuje redukcí těchto kompartmentů a blokaci endocytózy [60]. Malé GTPázy v aktivní formě mění konformaci a váží se do cílové membrány prostřednictvím hydrofobních interakcí. U RAB5 se konkrétně jedná o geranyl-geranyl isoprenoidovou kotvu poblíž C-konce proteinu [61]. Nábor RAB5 je pozitivně ovlivňován přítomností $PI(3)P$ v dané membráně [62]. Aktivní RAB5 v membráně poté umožňuje rekrutaci a aktivaci kinázy VPS34 [63]. Jak bylo zmíněno výše, VPS34 je PI3K třídy III syntetizující $PI(3)P$ *de novo* v endocytovaných váčcích. Díky tomu vzniká pozitivní zpětná smyčka mezi RAB5 a $PI(3)P$, které se hromadí v membráně váčku a umožňují membráně získat endozomální identitu. Rab5 byla pozorována u křeččích fibroblastů v membráně váčků vzniklých klathrin-dependentní endocytózou a umožňuje jejich fúzi s časným endozomem [64]. Nicméně Rab5 mutanti této buněčné linie mají sníženou schopnost nejen klathrinem zprostředkované endocytózy, ale i endocytózy zprostředkovávající nespecifický příjem tekutin [64]. Malé GTPázy musí být aktivovány a deaktivovány, k čemuž jsou využívány další proteiny. Guanin nukleotid vyměňující faktory (GEFs) umožňují výměnu GDP za GTP a tím GTPázu aktivují, naopak GTPázu deaktivující proteiny (GAPs) zefektivňují hydrolýzu GTP a GTPázu deaktivují. Kupříkladu $PI(3)P$ lipidy samy o sobě nestačí k aktivaci RAB5 během makropinocytózy a je zde potřeba GEF zvaný ALS2 (Alsin2), který je rekrutován do membrány v raných fázích formování makropinocytózy [65].

4 Formování makropinocytosomu

4.1 Konstitutivní *versus* indukovaná makropinocytóza

Morfogeneze makropinocytosomů je u většiny savčích buněk spuštěna vazbou růstových faktorů na jejich receptory, nicméně není těmito růstovými faktory řízena a jedná se tak o samoorganizované struktury [66]. Takovými růstovými faktory může být rM-CSF u makrofágů [16], nebo EGF (epidermální růstový faktor) u epidermoidní linie A431 [67]. Na rozdíl od konstitutivní makropinocytózy je faktory indukovaná makropinocytóza nezávislá na extracelulárním vápníku [21]. Při konstitutivní makropinocytóze extracelulární Ca^{2+} stimuluje vápník senzitivní receptor (CaSR), heterotrimerní G-protein spouštějící signální kaskádu vedoucí k formování makropinocytárního váčku [21]. G podjednotka tohoto trimerního proteinu aktivuje PI3K, která generuje PIP3 a vede k aktivaci malých GTPáz RAC1 a CDC42 (homolog proteinu 42 kontroly buněčného dělení) [21]. Ty jsou rovněž nezbytné pro formování makropinocytosomu indukovaného růstovými faktory, jak bude popsáno dále. CaSR aktivita tak umožňuje konstitutivně generovat PIP3 přes stimulaci PI3K a neustále tím indukovat makropinocytózu [22]. Tato zjištění dobře demonstrují společné i odlišné znaky faktory indukované i konstitutivní makropinocytózy.

4.2 Morfologické fáze makropinocytózy

Formování makropinocytosomu může a nemusí vycházet z membránového zvlnění („membrane ruffle“). Tato zvlnění nejsou příliš rozsáhlá a nemusí vždy vyústit k tvorbě makropinocytárního váčku. Přidáním makropinocytózu stimulačního faktoru lze pozorovat nejen zvýšenou tvorbu makropinocytosomů, ale i vyšší velikost a aktivitu membránového zvlnění tvořící širší pláty, které se prohlubují směrem k jádru [2]. Tento proces se nazývá uzavření zvlnění („ruffle closure“), ve kterém dochází k vzniku miskovité domény na cytoplazmatické membráně [66], jež se nazývají makropinocytární pohárky („macropinocytic cups“). Pohárky se mohou rovněž uzavírat („cup closure“), čímž dochází k odštěpení membrány pohárku od cytoplazmatické membrány a vzniká makropinocytární váček s internalizovaným extracelulárním materiálem. Nejenže kruhový pohárek umožňuje přiblížení membrán pro výsledné uzavření váčku, ale umožňuje tvorbu bariéry pro laterální difúzi. Bylo pozorováno, že v pohárcích je mnohem nižší difúze, a tím vyšší aktivita faktorů podílejících se na formování makropinocytosomu, než bylo v ploché membráně [68]. V membráně makropinocytárního pohárku tak pravděpodobně molekuly difundují volně, ale neprocházejí mimo pohárek přes jeho laterální stěnu zvanou cirkulární zvlnění („circular ruffles“) [68]. Bez této bariéry by se mohly počáteční signální molekuly rozptýlit do okolí tak, že by nebyla dostatečná koncentrace signálů pro aktivaci pozdějších signálních molekul [68]. Příkladem může být RAC1 protein a fosfatidylinositoltrifosfát (PIP3), k jejichž kumulaci dochází zejména po uzavření membránového zvlnění v nascentním makropinocytárním pohárku [66]. Tyto faktory se hromadí v membráně pohárku,

kteřá tvořív oddělenou doménu od okolní membrány, čímž dochází k amplifikaci signálů nezbytných pro formování, maturaci a následně i uzavření pohárku do makropinocytozomu [66].

Pro typ membránového zvlnění s cirkulární podobou rovněž bývá označení cirkulární dorzální zvlnění, které vystihuje jejich typickou buněčnou lokalizaci. Nicméně zvlnění, které může vyústovat v makropinocytozu nemusí být pouze cirkulární a na dorzální straně buněk. Jsou popsány i jiné formy, které nemají typický miskovitý tvar. Jedná se o takzvané planární, lamelopodia připomínající zvlnění, jenž se u savčích buněk vytvářív v jiných oblastech buňky [69]. Tyto dvě morfologicky odlišné zvlnění dále nebudou odlišovány, jelikož obě sdílív téměř stejné signální molekuly a o funkčních rozdílech obou forem není příliš známo [69].

4.3 Počáteční fáze formování a membránové zvlnění

4.3.1 Vznik membránového zvlnění

U *Dyctiostelia* vzniká většina makropinocytárních pohárků odštěpením z již existujícího pohárku. Ten se může rozdělit na dva či více menších pohárků, nebo může odštěpit pouze malou část v podobě membránového zvlnění [70]. PI3-kináza má roli v pozdějších fázích formování makropinocytozomu a je pravděpodobně klíčová pro uzavření pohárku do váčku. Její inhibicí se potlačuje tvorba makropinocytozomu, nikoliv ale tvorba cirkulárních zvlnění a polymerace aktinu [16,67]. Naopak v přítomnosti cytochalasinu D, který inhibuje aktinovou polymerizaci dochází k rapidnímu snížení cirkulárního zvlnění [16]. Jak bylo uvedeno výše, PI3K fosforyluje fosfatidylinositoly v pozici 3 a izoforma využívající jako substrát PI(4,5)P₂ generuje PIP3. Právě tato konverze byla pozorována při formování makropinocytozomu u A431 buněk stimulovanými EGF [67]. U makrofágů stimulovaných M-CSF se hladina PIP3 dramaticky zvedne po uzavření membránového zvlnění a předchází uzavřením pohárku [66]. Stejně jako PIP3 se i RAC1 malá GTPáza v aktivní formě lokalizuje zejména do membrány cirkulárních zvlnění [66]. Nicméně PI3K aktivita není nezbytná pro aktivaci RAC1 [66]. Vrcholové koncentrace obou těchto kruciálních faktorů, RAC1 i PIP3, lze tedy pozorovat až po uzavření membránového zvlnění v membráně makropinocytárního pohárku. Jaké faktory ovšem umožňují tento přechod a stojí tak na začátku celé makropinocytózy?

4.3.2 Role PI(4,5)P₂ a RAC1 v membránovém zvlnění

V membránovém zvlnění byla pozorována více jak dvojnásobná koncentrace PI(4,5)P₂ než v ploché membráně [67]. Tato zvýšená hladina PI(4,5)P₂ dále roste i v membráně makropinocytárního pohárku až do jeho uzavření [67]. V průběhu ovšem dochází k lokálním poklesům koncentrace těchto lipidů, což koreluje s hromaděním PIP3 v membráně pohárku [67]. Enzymaticky jsou PI(4,5)P₂ mimo jiné syntetizovány PIPKI (fosfatidylinositol-4-fosfát 5-kinázami), kupřívkladu rekrutace PIPKI α izoformy byla pozorována ve fagocytárním pohárku [71]. Některé izoformy PIPKI by se mohly podílet na prvotní akumulaci PI(4,5)P₂ v membráně, čímž by se mohlo indukovat membránové vlnění. Role PIPKI α i jejich

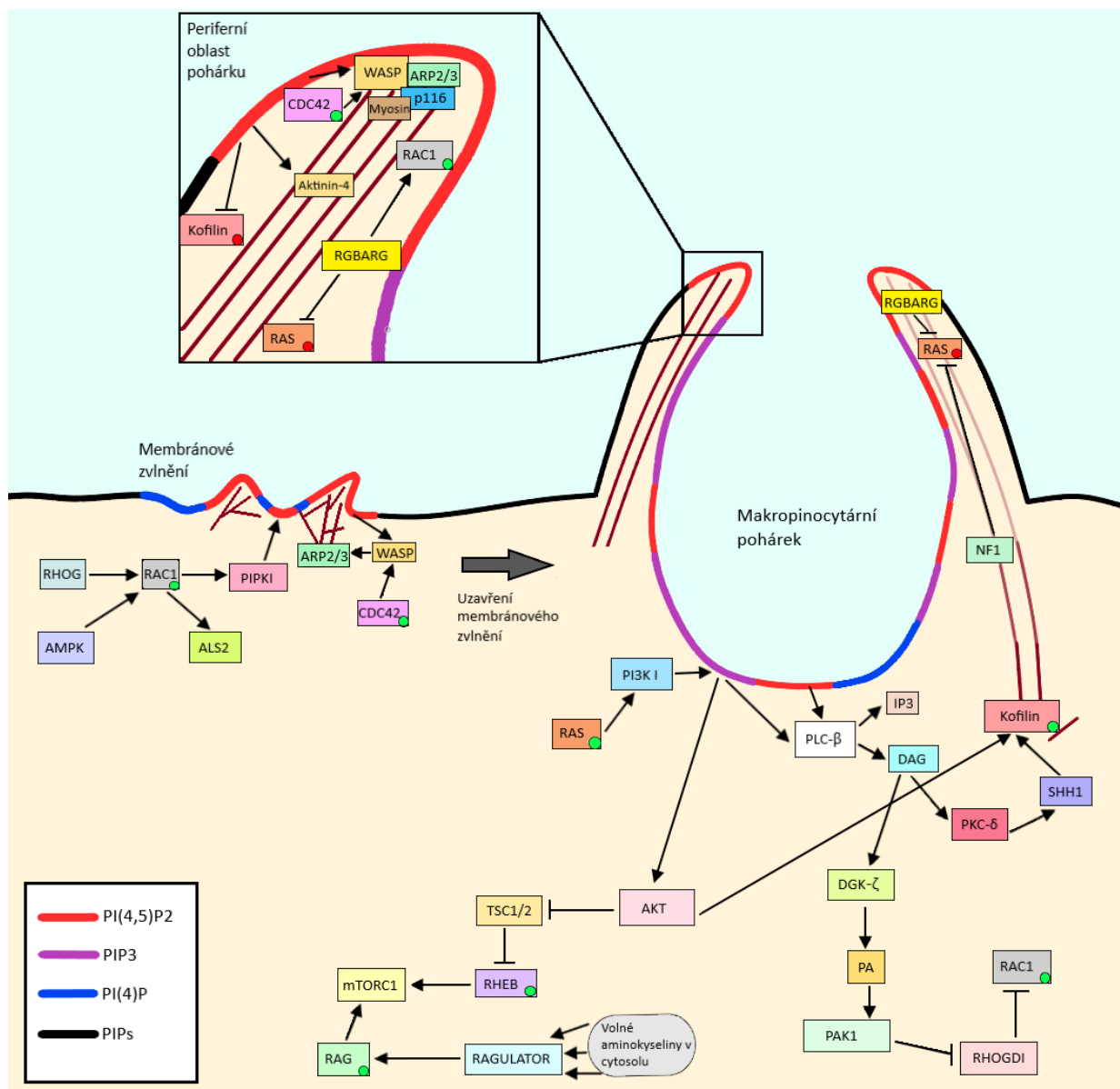
produktů PI(4,5)P₂ byla dobře popsána v remodelaci a polymeraci aktinu při fagocytických procesech [71,72]. Kinázy PIPKI mohou být aktivovány vícero různými faktory, jedním z možných faktorů je malá GTPáza RAC1 [72]. Podle novějších studií dochází k aktivaci RAC1 již v membránovém zvlnění, kde hraje důležitou roli při přestavbě aktinového cytoskeletu [73,74]. Jedním z možných faktorů, který během makropinocytózy může aktivovat RAC1 je AMPK [32]. Aktivita této malé GTPázy je též nezbytná pro vstup SARS-CoV-2 do hostitelských buněk a virus tak pravděpodobně indukuje makropinocytózu právě aktivací RAC1 [12].

V souhrnu, v membránovém zvlnění může být aktinový cytoskelet regulován aktivací a deaktivací RAC1 malé GTPázy přes produkci PI(4,5)P₂ [74] (Obr.2). Kromě toho by RAC1 mohla mít důležitou roli pro rekrutaci a aktivaci dalších faktorů nezbytných pro správný průběh makropinocytózy. Důležitým příkladem efektorové molekuly RAC1, který hraje roli v pozdějších fázích makropinocytózy je ALS2, klíčový aktivátor RAB5 malé GTPázy [65].

4.3.3 Role malých GTPáz během makropinocytózy

Kromě RAC1 je popsáno mnohem více malých GTPáz, které mají roli v různých fázích makropinocytózy. Například u hlenky *Dictyostelium* je RacG izoforma klíčová pro regulaci fagocytózy i pinocytózy a v kooperaci s Rac1 a dalšími GTPázami umožňuje aktinovou polymeraci [75]. Tento protein má rovněž v aktivní formě pozitivní vliv na tvorbu filopodií, úzkých cytoplazmatických výběžků, které jsou tvořené aktinovým skeletem [75]. U myších embryonálních fibroblastů má při tvorbě filopodií důležitou roli Cdc42, další GTPáza z Rho (Ras-homologické) rodiny [76]. Tyto GTPázy by se mohly podílet na tvorbě filopodiím podobným útvarům, které jsou označovány jako stanové tyče („tent poles“). Ty byly popsány jako nedílná součást membránového zvlnění u makrofágů a nejspíše se podílejí na uzavírání membrány do makropinocytózy [77]. CDC42 se neúčastní pouze tvorby filopodií, ale má důležitou roli i v samotném membránovém zvlnění. Při blokaci Cdc42 myších makrofágů RAW264 dochází k potlačení membránového zvlnění indukovaného CSF i PMA, ale celková morfologie buněk zůstává nezměněna [78]. Na druhou stranu, inhibicí Rac1 je potlačena tvorba zvlnění, které je indukováno CSF, nikoli však PMA [78]. RAC1 i CDC42 jsou při fagocytóze schopné přímé interakce s p21-aktivovanou kinázou (PAK1) [79]. Na rozdíl od RAC1, která se vyskytuje aktivní v celém fagocytárním pohárku, CDC42 je lokalizována pouze do jejich okrajů [79]. Podobným způsobem by se mohly vyskytovat obě GTPázy i v makropinocytárních pohárcích. Přestože je pro optimální makropinocytózu nezbytná aktivace obou těchto faktorů, RAC1 a CDC42 mají během těchto buněčných procesů pravděpodobně odlišnou funkci a regulaci [78–80]. U buněk epidermoidní linie A431 bylo zjištěno, že je aktivace RAC1 i CDC42 závislá na zvýšení cytosolického pH [80]. Amilorid (EIPA) je schopen blokovat Na⁺/H⁺ antiportér (NHE), který transportuje protony mimo buňku a zvyšuje tak cytosolické pH. V přítomnosti amiloridu tak nedochází k zvýšení pH, tím se neaktivují CDC42 a RAC1 GTPázy a inhibuje se makropinocytóza [80].

Z rodiny RHO GTPáz jistě stojí zmínit RHOG malou GTPázu, jejíž aktivita je nezbytná k formování komplexu aktivujícího RAC1 [81]. RHOG byla pozorována jako důležitý regulátor RAC1 aktivity již v membránovém vlnění a oba tyto faktory podporují správný průběh makropinocytózy [81,22]. V neposlední řadě důležitou rodinou malých GTPáz, která patří do nadrodiny RAS proteinů, jsou RAB GTPázy. Kupříkladu u myších fibroblastů se aktivní Rab13 GTPáza hromadí v membránovém zvlnění a pravděpodobně reguluje jejich vznik i formování makropinocytózy [77]. Nicméně RAB proteiny jsou obecně důležité pro membránový transport a účastní se spíše v pozdějších fázích makropinocytózy.



Obr. 2: Hypotetické schéma znázorňující signální kaskády během membránového zvlnění a po uzavření zvlnění v makropinocytárním pohárku. Šipky mezi jednotlivými molekulami označují vztah enzym-aktivátor, či vztah enzym-substrát. Šipky s plochým koncem představují vztah enzym-inhibitor. Pro lepší přehlednost jsou některé faktory, které jsou během makropinocytózy různě aktivní, označeny červeným či zeleným kolečkem. Červené kolečko představuje inaktivní protein, naopak zelené kolečko značí faktor v aktivním stavu. Barevný kód v obrázku

popisuje zastoupení fosfatidylinositolů v membránách. Vínově zbarvené pruhy představují aktinová vlákna pod CPM, odlišná matnost vláken je pouze z důvodu přehlednosti. Většina popsaných faktorů jsou integrální proteiny či lipidové molekuly, reakce se proto odehrávají v blízkosti membrán.

4.3.4 CDC42 a PI(4,5)P₂ aktivují polymeraci aktinových vláken

PI(4,5)P₂ se tedy nachází ve vyšší koncentraci v membránovém vlnění i v membráně pohárku v důsledku RAC1 aktivity a jsou rozpoznávány proteiny, které remodelují a polymerují aktin. Již bylo zmíněno, že nukleační faktory, jako je N-WASP jsou schopné svými doménami vázat PI(4,5)P₂, což může indukovat jejich aktivaci [42,82]. Nicméně N-WASP ke své plné aktivaci vyžaduje kromě vazby PI(4,5)P₂ i vazbu CDC42 malé GTPázy [83]. Obsahuje tedy vícero funkčně odlišných navzájem interagujících domén. Kromě domén vazajících PI(4,5)P₂ a CDC42 obsahuje i C-koncovou doménu schopnou vázat komplex ARP2/3 (s aktinem související protein 2/3) [83]. Do proteinové rodiny WASP patří také proteiny SCAR/WAVE komplexu, které rovněž aktivují ARP2/3 komplex, klíčový regulátor aktinové polymerizace [84]. ARP2/3 je svou strukturou schopen mimikovat rostoucí (+) konec aktinového filamentu (F-aktinu) a nukleovat tím jeho polymeraci. Zároveň je schopen se vázat na již existující vlákno a vytvářet větvenou aktinovou síť. Mutací SCAR dochází k rapidní redukci makropinocytózy a navození podobného fenotypu jako použitím inhibitoru aktinové polymerizace, cytochalasinu A [85]. Nicméně bylo rovněž pozorováno, že SCAR hraje roli i v pozdějších fázích endozomální dráhy a při cílení endocytických váčků [85].

4.3.5 Role RAS GTPáz během makropinocytózy

Důležitým faktorem indukujícím makropinocytózu jsou malé GTPázy RAS. Hypermutací Ras proteinů u některých typů rakovinných buněk hlodavců dochází k výraznému zvýšení makropinocytózy [31,33]. Tyto nádorové buňky mají permanentně aktivovanou PI3K, zvýšenou hladinu PIP3 a přidáním inhibitorů PI3K dochází k potlačení Ras indukované makropinocytózy [31]. Tato pozorování naznačují, že by PI3K mohla být efektoem RAS. Právě díky aktivaci PI3K prostřednictvím RAS se v makropinocytárním pohárku PIP3 domény překrývají s aktivní formou této GTPázy [70]. V dalších studiích byla prokázána přímá vazba RAS GTPázy s PI3K a následná RAS-řízená aktivace PI3K během makropinocytózy [86,87]. Rodina RAS proteinů obsahuje celou řadu GTPáz majících v buňkách různé role. Ras GTPázy významné pro makropinocytózu hlenky *Dictyostelium* jsou například RasS. RasS mutanti mají redukované množství makropinocytárních pohárků a pozměněný tvar buněk včetně abnormalní morfologii aktinového kortexu [88]. Rovněž mutant RasG izoformy představuje pro buňku *Dictyostelia* zhoršení příjmu tekutiny a k podobnému fenotypu dochází i nadprodukcí RasB [89]. To naznačuje, že RAS GTPázy mohou regulovat celý proces pozitivně i negativně. A jelikož dochází k indukci makropinocytózy okolo PIP3 domén nezávisle na jejich vzniku [70], RAS GTPázy by mohly aktivací PI3K a tvorbou PIP3 indukovat formování makropinocytárního pohárku. Zajímavé ovšem je, že maximální koncentrace RAS proteinu byla pozorována v membráně makropinocytozomu až po uzavření pohárku

[90]. Pro plné pochopení, jakým mechanismem dochází k uzavření membránového vlnění do makropinocytárního pohárku je dozajista potřeba dalších studií. Nicméně jak již bylo zmiňováno, většina makropinocytárních pohárků vzniká buď štěpením z již existujících, nebo zcela *de novo* [70]. Pohárky vzniklé z membránové zvlnění tak představují pouze malou část této množiny a pro komplexní pochopení tvorby makropinocytárního pohárku bude potřeba dalších experimentů.

4.4 Makropinocytární pohárek

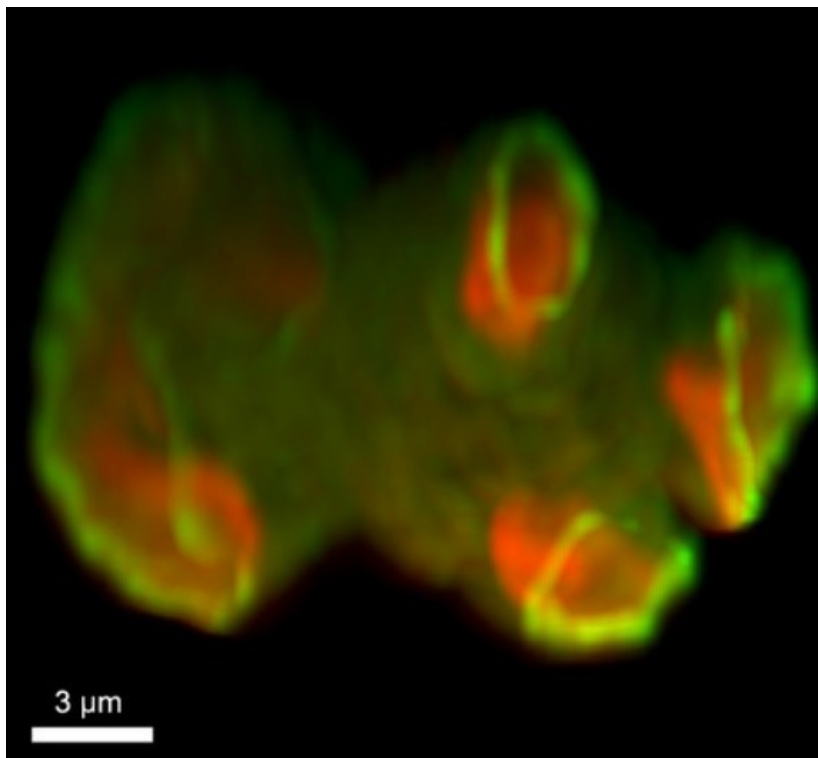
4.4.1 RAS GAP organizují velikost a tvar makropinocytárního pohárku

Makropinocytární pohárek je šálkovitě tvarovaný membránový útvar, který má ve svých stěnách bariéru bránící laterální difúzi [68]. Jeho membrána obsahuje nejvyšší koncentraci RAC1 [66], rostoucí koncentraci PI(4,5)P₂ [63] a vysokou koncentraci RAS, která se překrývá s PIP3 doménami [72]. Kinetika PIP3 domén závislých na aktivní RAS GTPáze je tak ovlivňována jejími aktivátory (GEFs) a inhibitory (GAPs) [72]. Příkladem GAP proteinu pro Ras/RAS, který hraje roli při makropinocytóze u *Dictyostelia* i u M-CSF indukované makropinocytózy savčích makrofágů, je neurofibromin 1 (NF1) [91,92]. Jeho mutací dochází k rapidnímu vzrůstu membránových zvlnění a předpokládá se tak, že omezuje expanzi makropinocytárně aktivních membránových domén [91]. Dalším Ras GAP důležitým během makropinocytózy u *Dictyostelia* je IqgC (IQGAP-příbuzný protein), který je lokalizován zejména na makropinocytárním pohárku, kde selektivně inaktivuje RasG [93]. Stejně jako NF1 negativně reguluje makropinocytózu a jeho mutací dochází k tvorbě větších makropinocytárních váčků [93]. Oproti tomu neselektivní vůči Ras izoformám je RGBARG (protein obsahující RCC1, RhoGEF, BAR a RasGAP domény), jehož nabožacení bylo pozorováno u *Dictyostelia* na periferii makropinocytárního pohárku, nikoliv uvnitř pohárku jako NF1 [94]. Jejich role jsou tak pravděpodobně odlišné, přičemž NF1 se podílí zejména na velikosti pohárku, ale RGBARG i na jeho tvaru [94]. RGBARG je multidoménový protein a pro jeho vazbu do membrány je klíčová BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs) doména, která v tomto případě váže všechny PIPs nezávisle na fosfátové konfiguraci [94]. Kromě těchto domén má i Rho GEF doménu, která aktivuje malé GTPázy z rodiny Rho, včetně Rac1 [94]. Díky těmto faktorům by v makropinocytárním pohárku mohla oblast s aktivním RAC1 přesahovat oblast s aktivní RAS GTPázou. Pokud by tedy RAC1 řízená polymerace aktinu byla inhibována RAS či PIP3, docházelo by k polymeraci aktinu pouze na periferii pohárku, což by významně pomáhalo růstu kruhového výčnělku na okraji pohárku během jeho formování [94].

4.4.2 Prstence nukleárních faktorů v periferii makropinocytárního pohárku

Nukleární faktory SCAR a WASP jsou nabožaceny v prstenec na okraji makropinocytárního pohárku. Tento prstenec ovšem nelze detekovat zobrazením aktinu, který je u hlenky *Dictyostelium* distribuován všude napříč pohárkem [70]. SCAR i WASP proteiny tak vytváří úzký pás na periferii pohárku, nikdy ale v centru pohárku, kde jsou lokalizované PIP3/Ras domény [70]. To odpovídá teorii, ve které díky

RGBARG aktivně oblast aktivního RAC1 přesahuje oblast aktivního RAS. RAS by poté mohla v centru pohárku přes PI3K umožnit tvorbu PIP3 a naopak by regulovala vazbu WASP do periferních oblastí s výlučně aktivním RAC1. SCAR bohatá oblast postupně roste směrem od centra buňky a umožňuje uzavření celého pohárku ve váček [95]. U *Dictyostelia* jsou za rekrutaci SCAR do periferie primárně zodpovědné Ras GTPázy, nikoliv však PIP3 domény. Tato rekrutace je tedy nezávislá na aktivitě PI3K, nicméně, pokud je PI3K inhibována, probíhá celý jev s menší účinností [70]. U myších embryonálních fibroblastů je makropinocytóza závislá na WAVE2 a bylo popsáno, že tento protein z WASP rodiny řídí aktinovou polymerizaci na vystupujících okrajích makropinocytárního pohárku [96]. WAVE2 je u těchto buněk rovněž aktivován prostřednictvím Rac1, ale regulován přítomností PIP3 domén [96]. Tyto poznatky rovněž naznačují přesahující oblast RAC1 oproti RAS/PIP3, která řídí tvorbu a růst aktinového pásu na periferii makropinocytárního pohárku během maturace pohárku (Obr. 2).



Obr. 3: 3D rekonstrukce buňky hlenky *Dictyostelium* s makropinocytárními pohárky. PIP3 byly vizualizovány prostřednictvím PH domény odvozené od CRAC proteinu (cytosolického regulátoru adenylát cyklázy), která měla navázaný červený fluorescenční protein (RFP). Červený signál lze pozorovat na bázi makropinocytárního pohárku. SCAR komplex je označen skrze podjednotku HSPC300-GFP (protein hematopoetických kmenových/progenitorových buněk 300 fúzovaný se zeleným fluorescenčním proteinem). Tento signál je pozorovatelný na periferii pohárků, kde tvoří prstence. Převzato [70].

4.4.3 Myosiny v makropinocytóze

Myosiny jsou molekulární motory, které jsou schopné za spotřeby ATP vykonávat jednosměrný pohyb po aktinovém vlákne. Nicméně se jednotliví zástupci této proteinové rodiny mohou podstatně lišit svou

strukturou i lokalizací. Některé formy myosinů byly popsány i v buněčných procesech jako je makropinocytóza. Kupříkladu u savčích buněk je klíčový těžký řetězec myosinu IIA, který prokazatelně asociuje s aktinem a jeho inhibicí dochází k potlačení makropinocytózy [97]. Myosin IIA je schopen provazovat aktinový cytoskelet s malou GTPázou z ARF rodiny, ARL13b (ADP-ribosylačnímu faktoru podobný protein 13b) [98]. Jak myosin IIA, tak ARL13b jsou u lidských fibroblastů nezbytné pro formování cirkulárních zvlnění během makropinocytózy [98]. U *Dictyostelia* byly popsány izoformy myosinu I, které se podílí na správném průběhu makropinocytózy. Mutací těchto myosinů dochází k defektům přestavby aktinového cytoskeletu a extenzi membrány v ranějších fázích makropinocytózy [99]. Isoformy MyoB, MyoE a MyoF jsou lokalizovány rovnoměrně již v membránovém zvlnění [100]. Nicméně při uzavírání pohárku je MyoB izoforma směřována do špiček makropinocytárních pohárků, naopak MyoF a MyoE jsou kolokalizovány v centru pohárků společně s PIP3 doménami a na okrajích chybí [100]. MyoB zde nemá funkci pouze jako mechanoenzym pro pohyb nákladu po cytoskeletu, ale je klíčový pro tvorbu a organizaci aktinového cytoskeletu [101]. Tato izoforma je schopna interagovat s Arp2/3 komplexem i krycím proteinem („capping protein“) a prostřednictvím adaptorového proteinu p116 tvořit komplex [101]. p116 je lokalizován na vybíhající okraje makropinocytárního pohárku a jeho mutací dochází k defektům v makropinocytóze [101]. Pozoruhodné je, že byly identifikovány p116 homologické proteiny i u mnohobuněčných živočichů včetně savců [101]. Na tvorbě vybíhajících okrajů makropinocytárního pohárku by se tak nemusely podílet pouze WASP proteiny, ale i myosiny a homology p116, které stejně tak aktivují ARP2/3 [101] (Obr.2), umožňují aktinovou polymeraci a tvorbu prstence na periferii pohárku.

4.4.4 Formin G reguluje aktin na bázi makropinocytárního pohárku

U hlenky *Dictyostelium* je aktin nahromaděn i v centru makropinocytárním pohárku, nejen na periferii v oblastech vybíhajícího pásu [70,95]. U těchto buněk je okraj s nabohacným SCAR popsán jako drsný s proměnlivou šířkou, naopak aktinový cytoskelet v centru jako tenký a hladký [95]. Nicméně u epidermoidních A431 buněk nedochází k vazbě aktinu na bázi makropinocytárního pohárku, naopak od těchto PIP3 bohatých oblastí disociuje [67]. Vysvětlením těchto rozdílů může být formin, konkrétně jeho izoforma G (ForG). ForG byl pozorován u *Dictyostelia*, kde efektivně prodlužuje aktinová vlákna, nicméně jako nukleační faktor je velice slabý a pravděpodobně spolupracuje s Arp2/3 komplexem [102]. Tato izoforma forminu je nabohacena pod cytoplazmatickou membránou pouze v oblastech formujících se makropinocytárních a fagocytárních pohárků a jeho inaktivací se výrazně redukuje aktin na bázi pohárků [102]. Hlavními regulačními faktory ForG v pohárku, podobně jako u rekrutace SCAR, jsou Ras GTPázy, konkrétně se jedná o RasG a RasB, nikoliv však PIP3 domény [102]. Naopak u makrofágů bylo pozorováno, že produkty PI3K aktivují AKT a tato dráha (PI3K/AKT) poté

způsobuje defosforylaci a aktivaci kofilinu, dalšího regulátoru aktinu [103]. Makropinocytóza by se tak u pozorovaných modelů mohla v těchto aspektech lišit.

4.4.5 PI(4,5)P₂ a jeho efektorové molekuly během makropinocytózy

U makropinocytózy savčích buněk se aktin hromadí pouze v oblastech bohatých na PI(4,5)P₂, naopak v oblastech s PIP₃ nakupen není a disociuje [67]. PI(4,5)P₂ by tak mohl být jedním z hlavních aktin remodelujících faktorů během formování makropinocytárního pohárku a to nejen skrze vazbu WASP, ale i díky interakcím s dalšími regulátory. Kupříkladu α -actinin, protein provazující vlákna aktinu do paralelních svazků, je schopen vázat PI(4,5)P₂ [104]. Jedna z izoform α -aktininu, aktinin-4, přispívá k vazbě aktinu mnohem podstatněji v oblastech s kruhovými zvlněními než ve zvlněních rovinných [105]. Inhibicí aktininu-4 protilátkami došlo k výrazné redukci příjmu tekuté fáze, což naznačuje, že se tento protein významně podílí na makropinocytóze [105]. PI(4,5)P₂ je rovněž schopen za běžných podmínek vázat kofilin, čímž dochází k jeho inhibici [106]. V neposlední řadě jsou PI(4,5)P₂ vazebnými proteiny takové, které zajišťují degradaci a přeměnu tohoto fosfatidylinositolu v jiné PIPs.

Koncentrace PI(4,5)P₂ v makropinocytárním pohárku z počátku roste, přibližně 20 sekund po uzavření membrány do makropinocytárního pohárku, nicméně se snižuje ve chvíli, kdy se začne hromadit PIP₃ [67,90]. PI(4,5)P₂ je v těchto okamžicích pravděpodobně odebírán pro syntézu PIP₃. To ovšem není jediný důvod, díky kterému dochází k depleci PI(4,5)P₂ z membrány pohárku. Při konstitutivní makropinocytóze transformovaných buněk byla pozorována nezbytná permanentní aktivita PI3K i fosfatidylinositol specifické fosfolipázy C (PI-PLC), která štěpí PI(4,5)P₂ na inositoltrisfosfát (IP₃) a diacylglycerol (DAG) [31]. Tranzice PI(4,5)P₂ prostřednictvím PI3K i PLC byla popsána i u EGF stimulované makropinocytózy A431 buněk [67]. Během této tranzice dochází v makropinocytárním pohárku k přestavbě aktinového cytoskeletu [67]. PLC obsahuje PH doménu, která je vysoce afinní zejména k PI(4,5)P₂ a často se používá k jeho vizualizaci [67]. Vrchol koncentrace DAG, produktu PLC, nastává krátce po vrcholu PIP₃ a trvá v makropinocytárním pohárku déle, což naznačuje, že by k aktivaci PLC mohlo docházet v důsledku vysoké koncentrace PIP₃ [107]. PLC je aktivována až po hromadění PI3K produktů v membráně a pravděpodobně tak leží v signální kaskádě za PI3K signalizací [31]. To odpovídá zjištění, že PIP₃ rekrutuje a alostericky reguluje aktivitu některých izoform PLC, kupříkladu PLC- β [108]. Právě izoforma PLC- β se pravděpodobně účastní hydrolýzy PI(4,5)P₂ během makropinocytózy [109].

4.4.6 Proteinkináza C a její role v makropinocytóze

Po hydrolýze PI(4,5)P₂ fosfolipázou C mohou vzniklé produkty, IP₃ a DAG, fungovat jako druzí poslí. Jedná se o malé molekuly, které váží a regulují aktivitu efektorových proteinů. DAG zůstává ukotven v membráně, kde může vázat a aktivovat proteinkinázu C (PKC). To bylo pozorováno během maturace makropinocytárního pohárku, kde po zvýšené koncentraci DAG následoval i vzrůst koncentrace aktivní

PKC [90]. Inhibicí PKC u myších makrofágů RAW 264 dochází k blokaci makropinocytózy [103]. Inaktivace PKC rovněž významně zabraňuje akumulaci cholesterolu v důsledku příjmu LDL částic makropinocytózou, což je klíčový faktor pro formování pěnových buněk [25]. Hlavní izoforma nezbytná pro PMA i M-CSF indukovanou makropinocytózu u makrofágů je PKC- δ [107,110]. PKC- δ byla dále pozorována během příjmu antigenů u dendritických buněk, kde její inhibicí došlo k výrazné redukci produkce polarizačních cytokinů, antigenní prezentace a celkové maturace buněk [111]. Aktivní PKC- δ je schopna aktivovat fosfatázu SHH1 (Slingshot homolog 1), která posléze defosforyluje kofilin [110]. Aktivita kofilinu je v buňkách regulována fosforylací prostřednictvím LIM kinázy (LIMK), jež kofilin inaktivuje a SHH1 fosfatázy, která kofilin aktivuje [112]. Zajímavé je, že u M-CSF stimulované makropinocytózy dochází k aktivaci PKC- δ i kofilinu, ale nedochází k ovlivnění SHH1 a LIMK [110]. Souhrnně, kofilin je neaktivní v přítomnosti PI(4,5)P₂, nicméně v přítomnosti aktivní PI3K dochází k aktivaci PLC/PKC i AKT signální dráhy a obě tyto signalizace vedou k aktivaci kofilinu (Obr. 2 a Obr. 4). Kofilin má pak vícero různých rolí v remodelaci F-aktinu. Obecně odštěpuje od aktinových vláken kratší úseky na rostoucím (+) konci a vytváří tak nové konce, čímž ovlivňuje poměr polymerace-depolymerace F-aktinu, větvení těchto vláken, migraci buněk a tvorbu výčnělků [113].

4.4.7 Diacylglycerol kináza a kyselina fosfatidová v makropinocytárním pohárku

Diacylglycerol může rovněž sloužit jako substrát pro Diacylglycerol kinázu (DGK), která DAG fosforyluje na kyselinu fosfatidovou (PA) [114]. Pro produkci PA diacylglycerol kinázou je tedy nezbytná aktivita PLC- β , přítomnost PI(4,5)P₂ jakožto substrátu pro PLC a aktivita PI3K, jelikož PIP3 domény rekrutují PLC- β do pohárku [108,109]. PA je nezbytná pro konstitutivní makropinocytózu APC, jelikož umožňuje vázat na membránu a tím aktivovat TIAM1 (T-lymfom invazi a metastázi indukující protein 1), GEF pro RAC1 [109]. K rekrutaci TIAM1 do membrány je kromě vazby kyseliny fosfatidové nezbytná PH doménou zprostředkovaná vazba PIP3 [109]. DGK, konkrétně izoforma ζ , je nezbytná i pro makropinocytózu indukovanou růstovými faktory a to rovněž tak, že poskytuje PA aktivující RAC1 GTPázu [114]. Nicméně i jiné izoformy DGK aktivují RAC1 a umožňují tím správný průběh makropinocytózy, například DGK- α v epiteliálních buňkách [115]. Aktivace RAC1 GTPázy prostřednictvím DGK spočívá ve vazbě PA na faktor, který umožní disociaci RAC1 od guanodinukleotid-disociačního inhibitoru (GDI), jenž brání vazbě malých GTPáz do cílových membrán [115,116]. Kupříkladu díky DGK- ζ signalizaci prostřednictvím PA dochází k fosforylaci p21-aktivované kinázy (PAK1), čímž se tato kináza aktivuje a umožňuje disociaci RAC1 od RHOGDI [116] (Obr. 2 a Obr. 4). Tyto poznatky mohou osvětlit několik již zmiňovaných jevů. Kupříkladu jsou v souladu s pozorováními, kde se překrývají vrcholové koncentrace PIP3/DAG/RAC1 [90]. To lze vysvětlit tím, že PIP3 domény umožňují tvorbu DAG, který ve fosforylované podobě umožňuje aktivaci RAC1.

4.4.8 AKT je důležitým aktivátorem mTORC1

Protein kináza B, neboli AKT je serin-threoninová kináza, která obsahuje PH doménu vážící s vysokou afinitou PIP3 a vrchol její aktivity se překrývá s vrcholem výskytu PIP3 [67,107,117]. Přidáním antagonistů PIP3 nedochází k vazbě a aktivaci AKT, což vyústí v buněčnou smrt [117]. Jedná se tak o schéma možné protinádorové terapie rakovin majících PTEN deficit, jako je rakovina prostaty, jelikož ztráta PTEN fosfatázy způsobuje hromadění PIP3, hyperaktivaci AKT a buněčný růst [32,117,118]. Cirkulární zvlnění vytváří membránové domény, ve kterých se hromadí aktivní PI3K i AKT a dochází tak k lokální amplifikaci těchto signálních molekul [119]. Nicméně u M-CSF indukované makropinocytózy inhibicí AKT nedochází k potlačení formování makropinocytárního pohárku ani makropinocytózy a AKT pravděpodobně není nezbytná pro celý tento proces [107]. Protein kináza B je ovšem schopna fosforylovat celou řadu cílových proteinů, jako například tuberin (TSC2), který je součástí komplexu tuberin-hamartin (TSC1/2) [120,121]. Po fosforylaci TSC1/2 komplexu dochází k jeho disociaci z lysozomální membrány, čímž se inhibuje jeho GAP aktivita vůči malé GTPáze zvané RHEB [121]. RHEB je v aktivní formě rovněž zakotvená do lysozomální membrány a aktivuje zde komplex mTOR1 [122]. Je ovšem nutné zmínit, že pro aktivaci, respektive lokalizaci mTORC1 do lysozomální membrány je nezbytná funkce více faktorů. Příkladem může být malá GTPáza RAG a její lokalizátor RAGULATOR, který je aktivován v přítomnosti dostatečného množství aminokyselin v cytosolu [122]. PI3K/AKT dráha a množství aminokyselin v buňce se tak nezávisle na sobě rozdílným způsobem podílejí na aktivaci mTOR1 komplexu [121,123]. Jak již bylo zmiňováno, mTORC1 funguje jako senzor dostatku volných aminokyselin v buňce a inhibuje jejich další přísun prostřednictvím makropinocytózy. Pozitivně ovlivňuje anabolismus aminokyselin a jeho inhibicí dochází k signalizaci nedostatku aminokyselin, což vede k zvýšené míře makropinocytózy [30,33,34]. Makropinocytární váčky během své maturace dopravují aminokyseliny do endolysozomálního systému, díky čemuž makropinocytóza nezajišťuje pouze cytosolickou cestu aktivace mTORC1 prostřednictvím PI3K/AKT signalizace, ale i cestu vezikulární, která zprostředkovává samotný příjem aminokyselin nezbytný pro lokalizaci a aktivaci tohoto komplexu [119,123] (Obr. 2).

4.5 Uzavírání makropinocytárního pohárku

4.5.1 Sekvenční defosforylace fosfatidylinositolů

Pro optimální průběh makropinocytózy a správné uzavření makropinocytárního pohárku je nezbytné sekvenční odbourávání PIP3 až na fosfatidylinositol [124] (Obr. 4). Během maturace pohárku je dynamika PIP3 domén pod kontrolou 5-fosfatázy SHIP2, která katalyzuje defosforylaci na PI(3,4)P₂ [124,125]. Tento PIP2 je pro makropinocytózu důležitý, jelikož je rovněž rozpoznáván příslušnými efektory, kupříkladu TAPP1 (tandemový protein obsahující PH doménu) s PI(3,4)P₂ specifickou PH doménou [125]. PI(3,4)P₂ se začíná hromadit v pozdních fázích formování makropinocytózy ve chvílích, kdy dochází k snižování množství PIP3 [124,125]. Nicméně jsou tyto fosfolipidy dále

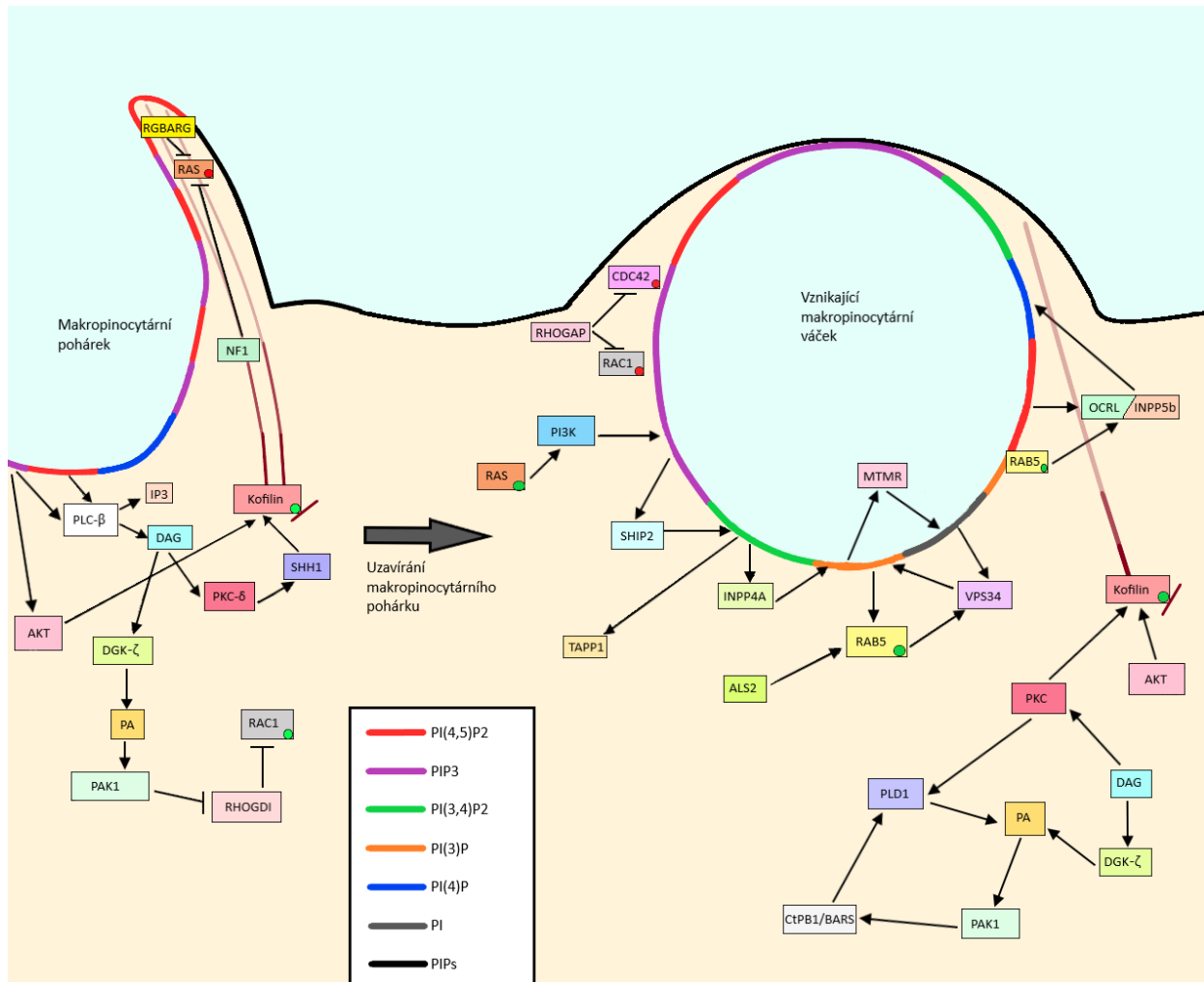
defosforylovány INPP4A fosfatázou na PI(3)P, který je poté pravděpodobně rychle konvertován na PI další fosfatázou, jež se nazývá MTMR (myotubularinu příbuzný protein) [124]. INPP4A, MTMR6 i MTMR9 byly popsány jako fosfatázy nezbytné pro makropinocytózu a jejich deplecí dochází k poškození tvorby makropinocytosomu, avšak tvorba makropinocytárního pohárku je nepoškozena [124].

PI(3)P se stejně jako malá GTPáza RAB5 začíná hromadit před uzavřením makropinocytárního pohárku a vrchol jeho koncentrace nastává velice krátce po odštěpení membrány váčku od CPM [66,90,126]. Jak již bylo diskutováno, PI(3)P rekrutuje RAB5 do membrán, čímž dochází k aktivaci PI3-kinázy třídy III zvané VPS34, která v rámci pozitivní zpětné vazby syntetizuje PI(3)P *de novo* z PI [62,63]. Nicméně přítomnost PI(3)P k aktivaci RAB5 nestačí a je vyžadována i přítomnost ALS2, RAC1 GTPázou aktivovaný GEF pro RAB5 [126]. RAB5 je při uzavírání pohárku důležitá pro rekrutaci inositol 5-fosfatáz, jako je INPP5b (inositol-1,4,5-trisfosfát 5-fosfatáza typu II) či OCRL (protein Loweho okulocerebrorenálního syndromu) do membrány [127]. Tyto fosfatázy mají jako substrát $P(4,5)P_2$ a slouží k jeho nezbytné finální depleci během uzavírání pohárku [127]. Inaktivací RAB5, či fosfatáz, které tato GTPáza aktivuje nedochází k degradaci $PI(4,5)P_2$, čímž se inhibuje uzavření pohárku a odštěpení makropinocytosomu od plazmatické membrány [127]. Tato pozorování rovněž objasňují, proč byla popsána nejvýraznější deplece $PI(4,5)P_2$ až během uzavírání pohárku [67].

4.5.2 Inaktivace RAC1 umožňuje uzavírání makropinocytárního pohárku

Při uzavírání pohárku dochází na membráně k výrazným změnám. Odlišným zastoupením fosfatidylinositolů se mění i zastoupení faktorů, které s membránou interagují. Kromě RAB5 malé GTPázy se v membráně hromadí PKC a RAS, které dosahují maximální koncentrace rovněž po uzavření makropinocytárního pohárku a překrývají se tak s RAB5 [90]. DAG, jehož vrchol předchází PKC/RAS, může oba tyto faktory aktivovat a jejich hromadění v membráně je pravděpodobně rovněž nezbytné pro uzavření pohárku [90,107]. Je třeba zmínit, že není nezbytná pouze aktivace a kumulace faktorů indukující uzavírání pohárku, ale je nutná i inaktivace faktorů, které řídili formování pohárku v předchozích fázích makropinocytózy. U myších makrofágů RAW264 dochází při fagocytóze k inaktivaci malých GTPáz Rac1 a Cdc42 PI3K řízenou akumulací RhoGAP [128]. Produkty PI3K rekrutují RhoGAP do pohárku, což způsobí inaktivaci Rac1 a rozpad F-aktinu, jehož depolymerace je nezbytná pro uzavření fagocytárního pohárku [128]. Podobné výsledky byly popsány i u makropinocytózy, kde je inaktivace Rac1 nezbytná pro uzavření makropinocytárního pohárku a trvale aktivní Rac1 uzavírání pohárku potlačuje [74]. V buňkách RAW264 buněčné linie s trvale aktivní Rac1 nevzrůstá koncentrace PI(3)P v membráně makropinocytárního pohárku a deaktivace Rac1 je nezbytná pro to, aby membrána získala identitu časného makropinocytosomu [74].

Souhrnně, během uzavírání makropinocytárního pohárku dochází k postupnému rozkládání PIP3 až na PI. Zároveň je nutná deaktivace CDC42 i RAC1 GTPáz a deplece PI(4,5)P₂, čímž dochází k přestavbě aktinového cytoskeletu. To umožňuje následný vzrůst koncentrace PI(3)P, aktivaci a amplifikaci RAB5 v pozitivní zpětné smyčce (Obr. 4).



Obr. 4: Hypotetické schéma znázorňující signální kaskády, které probíhají v období uzavírání makropinocytárního pohárku. Šipky mezi jednotlivými molekulami označují vztah enzym-aktivátor, či vztah enzym-substrát. Šipky s plochým koncem představují vztah enzym-inhibitor. Pro lepší přehlednost jsou některé faktory, které jsou během makropinocytózy různě aktivní, označeny červeným či zeleným kolečkem. Červené kolečko představuje inaktivní protein, naopak zelené kolečko značí faktor v aktivním stavu. Barevný kód v obrázku popisuje zastoupení fosfatidylinositolů v membránách. Vínově zbarvené pruhy představují aktinová vlákna pod CPM, odlišná matnost vláken je pouze z důvodu přehlednosti. Většina popsaných faktorů jsou integrální proteiny či lipidové molekuly, reakce se proto odehrávají v blízkosti membrán.

4.5.3 PAK1 umožňuje zakřivení membrány

Pro makropinocytózu indukovanou růstovými faktory je rovněž nezbytná aktivita p21-aktivované kinázy a konstitutivně aktivní PAK1 výrazně zesiluje míru takové makropinocytózy [129]. Významnou

funkcí PAK1 může být aktivace RAC1, jelikož se inhibicí PAK1 snižuje i aktivita RAC1 [129]. To se shoduje s již popsanými tvrzeními, že PA zajišťuje fosforylaci PAK1 a ta umožňuje disociaci RAC1 od RHOGDI [116]. Nicméně, inhibicí RAC1 nedochází k inhibici PAK1 indukované makropinocytózy, což naznačuje, že se PAK1 podílí na regulaci tohoto buněčného děje i jiným způsobem [129]. Bylo zjištěno, že PAK1 během makropinocytózy fosforyluje a tím aktivuje CtBP1/BARS (C-konec vazebný protein-1/brefeldinA-ADP ribosylovaný substrát) [130]. Aktivní CtBP1/BARS je rekrutován do makropinocytárního pohárku a přechodně se hromadí v krčku takového pohárku, kde zajišťuje jeho uzavření a odštěpení makropinocytosomu [130]. CtBP1/BARS jsou označovány jako fúzní proteiny a během makropinocytózy pravděpodobně aktivují fosfolipázu D (PLD) [131]. Konkrétně byla popsána izoforma PLD1 jako ta, která se účastní uzavírání pohárku do váčku a na její aktivaci se podílí například i PKC [131]. Produktem hydrolýzy PLD je fosfatidová kyselina, díky čemuž může vznikat pozitivní zpětná smyčka, která celý signál amplifikuje (Obr. 4). Zároveň může v důsledku nahromaděné PA docházet ke změnám fyzikálních vlastností membrány, což by mohlo umožňovat zakřivení této membrány během uzavírání pohárku [131].

5 Maturace makropinocytosomu

5.1 Cytoskelet během maturace

5.1.1 Únik z aktinového pláště

Po uzavření makropinocytárního pohárku se výrazně mění charakter membrány. Dochází k změnám v zastoupení fosfatidylinositolů v membráně, čímž se mění i signalizace a aktivují se nové efekторы. Pro nově vzniklý váček je důležitá přestavba aktinového cytoskeletu, který se kolem membrány nahromadil v předchozích fázích makropinocytózy. Již v první minutě po uzavření pohárku dochází ke ztrátě aktinového cytoskeletu, který tvoří kolem váčku plášť [132]. Jedním z důležitých proteinů, který by se mohl podílet na odstranění aktinového pláště z povrchu makropinocytosomu je PHAFIN2. Buňky, které mají deletovaný PHAFIN2 nedokáží odstranit svůj aktinový obal z povrchu váčku [133]. Tento protein obsahuje PH i FYVE vazebné domény, které v součinnosti rozpoznávají PI(3)P i PI(4)P a dokonce i přímo aktin [133]. Po vazbě PHAFIN2 se v aktinovém plášti začnou vytvářet otvory, kterými je nascentní váček vytlačen ze svého obalu směrem od povrchu buňky [133]. Byla popsána i role myosinů IIA, které jsou součástí aktinového pláště kolem nascentního makropinocytárního váčku a podílí se na jeho pohybu směrem od aktinového cytoskeletu pod cytoplazmatickou membránou do nitra buňky [134]. Po krátké době tak váček ztrácí aktinový plášť včetně myosinů a ostatních aktin vazebných a remodelujících proteinů. Stejně tak se z povrchu váčků ztrácí i PHAFIN2. Nicméně tento protein vykazuje dvě fáze lokalizace a po své prvotní depleci se na membráně makropinocytárního váčku začíná kumulovat znovu [133].

5.1.2 Mikrotubulární cytoskelet

Kromě aktinového cytoskeletu je pohyb směrem od povrchu buňky řízen i prostřednictvím mikrotubulárního aparátu a dyneinů. Dyneiny a kineziny jsou motorové proteiny, které se za spotřeby ATP mohou pohybovat po mikrotubulech a transportovat váčky či jiný materiál napříč buňkou. Inhibicí dyneinů ciliobrevinem dochází k zastavení pohybu již existujících makropinocytozomů, navíc se ovšem potlačuje uzavírání makropinocytárního pohárku [134]. Mikrotubuly tak prorůstají až k aktin-bohaté oblasti pod cytoplazmatickou membránou a uzavírání pohárku je přímo spojeno s jeho následným pohybem v buňce [134]. Dyneiny, které zajišťují buněčné pochody během makropinocytózy jsou pravděpodobně řízeny proteinem ARF6 (ADP-ribosylačním faktorem 6), který patří mezi malé GTPázy nadrodiny RAS [134]. ARF6 je pro makropinocytózu nezbytná GTPáza zejména díky tomu, že specificky aktivuje JIP 3 a 4 (protein interagující s Jun kinázou) [134]. JIP3, stejně jako jeho homolog JIP4, je adaptorový protein schopný vázat mikrotubulární motory a regulovat tím transport v buňkách [135]. ARF6 by tudíž mohl během makropinocytózy umožňovat rekrutaci JIP proteinů a tím i dyneinů, díky čemuž by mohl zajišťovat nejen uzavírání pohárku, ale i následný transport makropinocytozomu [134].

5.2 Časné fáze maturace makropinocytozomu

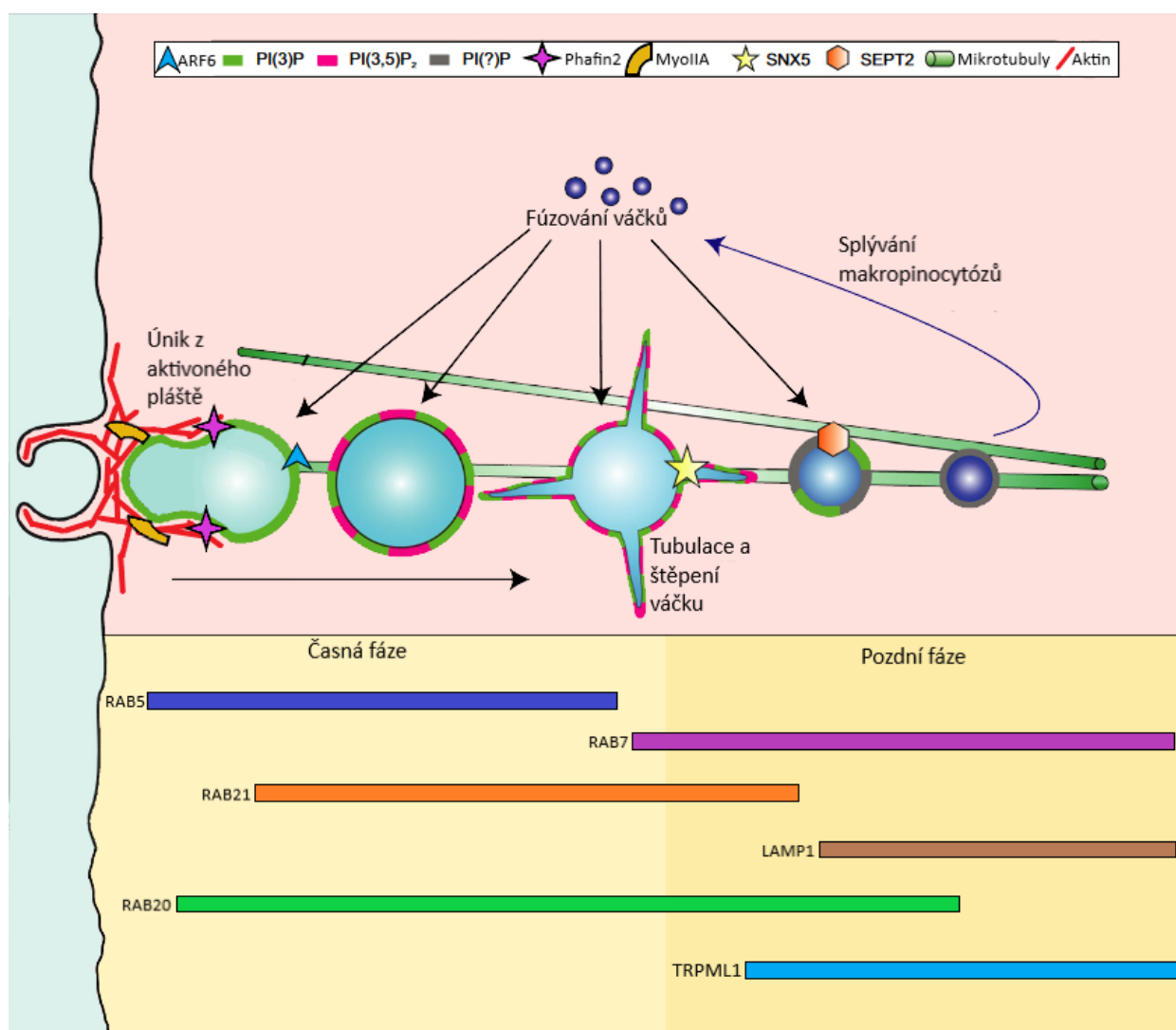
5.2.1 RAB5 a jeho konverze

Pro nascentní makropinocytární váček je typická vysoká koncentrace RAB5, jak bylo diskutováno dříve. RAB5 je jedním z faktorů, který je nezbytný pro maturaci makropinocytozomu [126]. V membráně je tato malá GTPáza schopna vázat svůj GEF zvaný RABEX5 a provazovat ho se svým efektem RABAPTINEM5 do komplexu, který vede k pozitivní zpětné smyčce rekrutace a aktivace RAB5 [62]. RAB5 následně umožňuje generování PI(3)P v další pozitivní zpětné smyčce díky čemuž vznikají na příslušné membráně vzory, jež napodobují membránu časných endozomů [62]. Nicméně RAB5 není v membráně vzniklého makropinocytozomu dlouho a její koncentrace z membrány váčku po několika minutách rychle klesá [126,136]. Zajímavé je, že RABEX5 nijak nereguluje aktivaci a deaktivaci RAB5 GTPázy v membránách [126]. Její aktivita je regulována zejména GEF proteinem ALS2, který je klíčový pro aktivaci RAB5 v době uzavírání pohárku, ale stejně tak umožňuje následnou deaktivaci této malé GTPázy [126]. Disociace ALS2 je závislá na RAB7 GTPáze, v důsledku čehož dochází i k deaktivaci a disociaci RAB5 [126]. Konverze RAB GTPáz byla popsána i v jiných studiích a pro váčky s nákladem pravděpodobně představuje přechod z časného do pozdního endozomu [137].

5.2.2 PI(3)P a jeho efekторы – třídící nexiny

S koncentrací RAB5 v membráně váčku úzce souvisí i přítomnost PI(3)P domén, které kromě rekrutace RAB5 dále interagují s celou řadou efektorových molekul. Příkladem takových proteinů mohou být třídící nexiny (SNX), které mají phox homologickou (PX) vazebnou doménu [138]. Pro makropinocytózu důležitý SNX5 váže specificky PI(3)P i PI(3,4)P₂, na druhou stranu SNX1 má kapacitu vázat PI(3)P a

PI(3,5)P₂ [138,139]. SNX proteinová rodina obsahuje kromě PX domény i BAR doménu, která je nezbytná pro zakřívování membrány a formování membránových subdomén označovaných jako tubuly [140]. SNX1 je schopen přímo zakřívovat membránu a dávat tím vzniknout tubulům. Naopak SNX5 nejspíše zakřívování schopen není a mohl by zajišťovat odštěpování příslušných tubulů od původní membrány [140]. Při prozkoumání struktury obou těchto třídících proteinů bylo zjištěno, že mají mnohem větší afinitu tvořit heterodimery (SNX1:SNX5) oproti homodimerům a heterodimery jsou následně schopné vytvářet oligomery, které umožňují expanzi vznikajícího tubulu [140]. Je třeba zmínit, že v makropinocytóze nehrají roli pouze SNX1 a SNX5, ale i další členové SNX proteinové rodiny. SNX9 a SNX18 jsou citlivé k hladině PIP3 a pravděpodobně zakřívují membránu již ve fázích makropinocytárního pohárku [141].



Obr. 5: Schéma postupné maturace makropinocytárního váčku v buňce. Barevný kód představuje molekuly, které jsou ve schématu znázorněny. Rovněž je zde zobrazeno časové období, ve kterém s membránou makropinocytozomu interagují příslušné faktory. Převzato [142] a upraveno [133,143].

5.2.3 Tubulace, proces fragmentace makropinocytozomů

Tubulace makropinocytozomu je důležitý, na mikrotubulárním cytoskeletu závislý jev odehrávající se v průběhu maturace váčku [144,145]. Tubuly, které mají velký poměr plochy membrány vůči objemu se oddělují od zbytku makropinocytárního váčku aniž by docházelo k významným ztrátám objemu takového váčku [144]. Odštěpováním původní membrány v podobě tubulů dochází k zvyšování tlaku zbylé membrány váčku, v důsledku čehož začnou faktory zajišťující zakřivování membrány selhávat a přestávají být schopné membránu vázat [144]. Výsledkem je snížení průměru, zvýšení kruhového tvaru membrány makropinocytozomu a stabilizace celé organely [144]. Již bylo popsáno, že dimer SNX1:SNX5 je jedním z klíčových faktorů pro tvorbu těchto protáhlých výčnělků u endozomů. Při pozorování makropinocytózy u makrofágů bylo zjištěno, že se SNX1 i SNX5 společně rekrutují do nově vytvořených makropinocytárních váčků [146]. Při sledování lokalizace SNX5 bylo popsáno, že se hromadí právě v oblastech rostoucích tubulů [144]. Zajímavé ovšem je, že k ovlivnění makropinocytózy dochází pouze mutací SNX5, nikoliv SNX1 a SNX5 je proto hlavní regulátor biogeneze makropinocytozomů [146]. Nicméně třídící nexiny nejsou jediné, které mají vliv na tubulaci a maturaci makropinocytózou vzniklých váčků. Kupříkladu, samotný RAB5, jeho GEF proteiny i RAB5 efektorové molekuly vykazují vliv na formování tubulárních výběžků [136,144]. Rovněž se míra SNX-zprostředkované tubulace postupně snižuje paralelně s konverzí RAB5 na RAB7 [144]. Dalším faktorem, který by se mohl podílet na formování tubulů je RAB21. Bylo popsáno, že se RAB21 hromadí v místech endozomální membrány, kde dochází k tubulaci a vzniklé RAB21-pozitivní tubuly jsou schopné dále růst a odštěpovat se od původní membrány [145]. Při pozorování M-CSF indukované makropinocytózy u myších makrofágů RAW264 byla Rab21 rekrutována do membrány po depleci PI(4,5)P₂ a PIP₃, chvíli po rekrutaci Rab5 [147]. Rab21 u těchto buněk významně kolokalizuje s Rab5, nicméně v určité fázi kolokalizuje i s Rab7 a začíná disociovat v době, kdy se zvyšuje hladina Rab7 v membráně [147]. To naznačuje, že by se RAB21 mohl nacházet na pomezí RAB5 a RAB7 v období, kdy na membráně makropinocytárního váčku dochází k tubulaci (Obr. 5).

5.3 Pozdější fáze makropinocytózy

5.3.1 PI(3,5)P₂ a jejich efekторы

Jedním z důležitých fosfatidylinositolů, který hraje roli ve váčkovém transportu je PI(3,5)P₂. Tento PIP₂ je lokalizován do kompartmentů majících pozdější úlohu v endocytóze, jako je pozdní endozom či lysozom, v nichž se často hromadí ve zvýšené míře před fúzní událostí [52,148]. PI(3,5)P₂ vzniká katalytickým působením fosfatidylinositol-3-fosfát 5-kinázy (PIKfyve), která jako substrát využívá PI(3)P. PIKfyve obsahuje C-koncovou katalytickou doménu i FYVE doménu, která je schopna vázat PI(3)P s mnohem vyšší afinitou než samostatná katalytická doména [149]. FYVE doména je tedy nezbytná pro lokalizaci PIKfyve do PI(3)P bohatých membrán, kde tento enzym prostřednictvím katalytické domény zajišťuje konverzi PI(3)P na PI(3,5)P₂ [149,150]. PIKfyve se váže již do časných

endozomů a výskyt PI(3,5)P₂ se alespoň částečně překrývá s PI(3)P [150]. Tato kináza byla popsána i u makropinocytózy jako faktor nezbytný pro maturaci makropinocytosomu v pozdějších fázích, kde řídí zmenšování tohoto váčku [151]. PIKfyve/PI(3,5)P₂ by mohli hrát roli během tubulace makropinocytárního váčku, jelikož PX doména SNX1 je schopna vázat kromě PI(3)P i PI(3,5)P₂ [138]. Nicméně je tento PIP2 schopen vázat a aktivovat i jinou efektorovou molekulu, která makropinocytózu zásadně ovlivňuje. Jedná se o již zmiňovaný TRPML1 (kationtový kanál přechodného receptorového potenciálu, mukolipin1) [152]. TRPML1 je v endolysosomálních membránách přímo a specificky vázán prostřednictvím PI(3,5)P₂, díky čemuž dochází ke konformační změně tohoto kanálu a jeho následnému otevření [152]. TRPML1 je poté schopen uvolňovat Ca²⁺ ionty z lumen kompartmentů, což koreluje s fúzí či štěpeními membrán příslušných kompartmentů a umožňuje tím regulovat jejich velikost [151,152]. Inhibicí TRPML1, či PIKfyve, dochází k výraznému zpomalení zmenšování makropinocytosomu v pozdější fázi maturace váčku [151].

Souhrnně, PI(3,5)P₂ se díky působení PIKfyve hromadí v membráně časných makropinocytárních váčků a má potenciál podílet se na SNX-řízené tubulaci. Nicméně PIKfyve/PI(3,5)P₂/TRPML1 dráha je významná v pozdějších fázích odehrávajících se po tubulaci, kdy dochází k dalším změnám velikosti a charakteru makropinocytosomu (Obr. 5). Navíc, při fagocytóze u makrofágů TRPML1 řízené uvolnění Ca²⁺ z lysosomálních zásob předchází následné fúzi lysosomu s fagozomem a inhibicí PIKfyve i TRPML1 k této fúzi nedochází [153]. To předkládá další možnou roli těchto faktorů během makropinocytózy.

5.3.2 Markery pozdního makropinocytosomu

Tím, jak makropinocytosom postupně prochází maturací a ztrácí identitu časného endozomu získává identitu pozdního. Dochází k přeměně PI(3)P na PI(3,5)P₂ a postupné konverzi RAB5 na RAB7, čímž se snižuje míra tubulace prostřednictvím SNX a RAB21. Kromě TRPML1, jenž má funkci ve fúzních procesech v pozdějších fázích, lze pozorovat několik dalších faktorů, jenž jsou součástí membrány makropinocytárního váčku. Jedním nezmiňovaným faktorem je Rab20 malá GTPáza, která se u myších makrofágů RAW264 lokalizuje do membrány makropinocytosomu již ve velmi raných fázích a kolokalizuje tak s Rab5 a Rab21 [143]. Nicméně tento faktor v membráně přetrvává i poté, co Rab5 i Rab21 disociují a v pozdějších stádiích makropinocytárního váčku kolokalizuje s Rab7 a Lamp1 (s lysozomem asociovaným membránovým glykoproteinem 1) [143] (Obr. 5). Lamp1 je marker pozdního endozomu a lysosomu a v membráně pozdního makropinocytárního váčku kolokalizuje s Rab7 [143]. Na rozdíl od Rab20, Rab21 disociuje ještě předtím, než se Lamp1 dostane do membrány makropinocytosomu [143,147]. Právě LAMP1 pozitivní váčky obsahují významný podíl PI(3,5)P₂ ve svých membránách [148]. S PI(3,5)P₂ bohatými a RAB7 pozitivními váčky poté asociují septiny typu 2 (SEPT2) [154]. SEPT2 je jedním z faktorů, který je nezbytný pro fúze makropinocytosomů či pro fúze makropinocytosomu s lysozomem [154]. Jedná se tedy o důležitý faktor zajišťující dopravení tekutiny

přijaté makropinocytózou do lysozomů [154]. Nicméně pozdní fáze maturace makropinocytosomu je jen velice málo prozkoumaná a bude potřeba dalších výzkumů pro plné objasnění a pochopení dějů, jenž se v tomto fascinujícím buněčném procesu odehrávají.

6 Závěr

Makropinocytóza je neselektivní a na aktinu závislý druh endocytózy. U mnohobuněčných organismů bývá tkáňově specifická a často umožňuje buňkám některé odvozené funkce. Například makropinocytózou zprostředkovaný nespecifický příjem extracelulární hmoty umožňuje antigen prezentujícím buňkám příjem antigenů z okolí pro jejich následné prezentování jiným buňkám imunitního systému. Cílem této práce bylo shrnout dosavadní poznatky o tomto unikátním buněčném procesu se zaměřením na roli fosfatidylinositolů jakožto neproteinových signálních molekul. Celý proces zahrnuje několik morfologických stádií. Může i nemusí začínat membránovým zvlněním, které se uzavírá do pohárku, jenž se rovněž uzavírá a dává vzniknout makropinocytárnímu váčku. Pro makropinocytózu charakteristické cirkulární zvlnění do tvaru pohárku představuje difúzní bariérou oddělenou subdoménu, kde se fosfatidylinositoly a proteiny s nimi interagující hromadí. Syntézy i degradace příslušných fosfatidylinositolů jsou v jednotlivých stádiích časoprostorově rozlišeny a vznikají tak signální kaskády, které zajišťují správný průběh celého procesu. Narušením takové signalizace na různých úrovních obvykle dochází k zablokování makropinocytózy. Pro makropinocytózu charakteristickou a esenciální je RAS/PI3K/PIP3(/AKT) signální kaskáda. Kromě fosfatidylinositolů jsou nezbytné i monomerní GTPázy, které s PIPs často interagují. Mimo RAS GTPázu jsou pro makropinocytózu nezbytné RAC1, CDC42 či celá paleta GTPáz z rodiny RAB. RAC1 je společně s PI(4,5)P₂ klíčový regulátor aktinového cytoskeletu během makropinocytózy. Jejich lokální akumulace v periferních oblastech umožňuje aktinem řízenou tvorbu výběžků. Při uzavírání pohárku je ovšem nezbytná inaktivace RAC1, deplece PI(4,5)P₂ a remodelace aktinového cytoskeletu poblíž membrány nascentního makropinocytosomu.

Plné pochopení mechanismu této endocytózy může být důležitým terapeutickým nástrojem kupříkladu v léčbě některých forem rakovin. Nádorové buňky jsou schopné přijímat prostřednictvím makropinocytózy živiny nezbytné k progresi. Rovněž i někteří intracelulární paraziti jsou při své internalizaci schopni indukovat v hostitelských buňkách makropinocytózu. V přítomnosti inhibitorů makropinocytózy dochází k potlačení vstupů těchto parazitů do buněk a u rakovinných buněk pak k zastavení progresu.

7 Použitá literatura

- [1] U. Hacker, R. Albrecht, a M. Maniak, „Fluid-phase uptake by macropinocytosis in *Dictyostelium*“, *J. Cell Sci.*, roč. 110, č. 2, s. 105–112, led. 1997, doi: 10.1242/jcs.110.2.105.
- [2] J. A. Swanson, „Phorbol esters stimulate macropinocytosis and solute flow through macrophages.“ *J Cell Sci.*, roč. 94, č. 1, s. 135-142, zář. 1989, doi: 10.1242/jcs.94.1.135.
- [3] J. Rejman, V. Oberle, I. S. Zuhorn, a D. Hoekstra, „Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis.“, *Biochem. J.*, roč. 377, č. 1, s. 159–169, led. 2004, doi: 10.1042/BJ20031253.
- [4] K. Saha et al., „Surface functionality of nanoparticles determines cellular uptake mechanisms in mammalian cells“, *Small Weinh. Bergstr. Ger.*, roč. 9, č. 2, s. 300–305, led. 2013, doi: 10.1002/sml.201201129.
- [5] H. Damke, T. Baba, D. E. Warnock, S. L. Schmid, „Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation“, *J Cell Biol.*, roč. 127, č. 4, s. 915–934, lis. 1994., doi: 10.1083/jcb.127.4.915.
- [6] L. J. Hewlett, A. R. Prescott, C. Watts, „The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. *J Cell Biol.*, roč. 124, č. 5, s. 689–703, bře. 1994. doi: 10.1083/jcb.124.5.689.
- [7] M. Maniak, R. Rauchenberger, R. Albrecht, J. Murphy, a G. Gerisch, „Coronin involved in phagocytosis: Dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein tag“, *Cell*, roč. 83, č. 6, s. 915–924, pro. 1995, doi: 10.1016/0092-8674(95)90207-4.
- [8] F. M. Griffin, J.A. Griffin, J. E. Leider, S. C. Silverstein, „Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane“, *J. Exp. Med.*, roč. 142, č. 5, s. 1263–1282, lis. 1975, doi: 10.1084/jem.142.5.1263.
- [9] H. Fares a I. Greenwald, „Genetic analysis of endocytosis in *Caenorhabditis elegans*: coelomocyte uptake defective mutants.“, *Genetics*, roč. 159, č. 1, s. 133–145, zář. 2001, doi: 10.1093/genetics/159.1.133.
- [10] N. Kim et al., „BMP-dependent synaptic development requires Abi-Abl-Rac signaling of BMP receptor macropinocytosis“, *Nat. Commun.*, roč. 10, s. 684, úno. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-08533-2.
- [11] P. Wei et al., „*Spiroplasma eriocheiris* Enters *Drosophila Schneider* 2 Cells and Relies on Clathrin-Mediated Endocytosis and Macropinocytosis“, *Infect. Immun.*, roč. 87, č. 11, s. e00233-19, říj. 2019, doi: 10.1128/IAI.00233-19.
- [12] Y.-Y. Zhang et al., „SARS-CoV-2 hijacks macropinocytosis to facilitate its entry and promote viral spike-mediated cell-to-cell fusion“, *J. Biol. Chem.*, roč. 298, č. 11, s. 102511, zář. 2022, doi: 10.1016/j.jbc.2022.102511.
- [13] C. Ford, A. Nans, E. Boucrot, a R. D. Hayward, „Chlamydia exploits filopodial capture and a macropinocytosis-like pathway for host cell entry“, *PLoS Pathog.*, roč. 14, č. 5, s. e1007051, kvě. 2018, doi: 10.1371/journal.ppat.1007051.

- [14] M. Manich et al., „Morphodynamics of the Actin-Rich Cytoskeleton in *Entamoeba histolytica*“, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, roč. 8, s. 179, kvě. 2018, doi: 10.3389/fcimb.2018.00179.
- [15] J. S. King, R. R. Kay, „The origins and evolution of macropinocytosis.“, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 4;374(1765):20180158., úno. 2019 doi: 10.1098/rstb.2018.0158. (*)
- [16] N. Araki, M. T. Johnson, J. A. Swanson, „A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages“, *J. Cell Biol.*, roč. 135, č. 5, s. 1249–1260, pro. 1996, doi: 10.1083/jcb.135.5.1249.
- [17] E. L. Racoosin, J. A. Swanson, „Macrophage colony-stimulating factor (rM-CSF) stimulates pinocytosis in bone marrow-derived macrophages“, *J. Exp. Med.*, roč. 170, č. 5, s. 1635–1648, lis. 1989, doi: 10.1084/jem.170.5.1635.
- [18] C. C. Norbury, L. J. Hewlett, A. R. Prescott, N. Shastri, a C. Watts, „Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages“, *Immunity*, roč. 3, č. 6, s. 783–791, pro. 1995, doi: 10.1016/1074-7613(95)90067-5.
- [19] A. von Delwig, D. M. Altmann, J. D. Isaacs, C. V. Harding, R. Holmdahl, N. McKie, J. H. Robinson, „The impact of glycosylation on HLA–DR1–restricted T cell recognition of type II collagen in a mouse model“, roč. 54, č. 2, s. 482-491, úno. 2006 doi: 10.1002/art.21565.
- [20] A. von Delwig et al., „Inhibition of macropinocytosis blocks antigen presentation of type II collagen in vitro and in vivo in HLA-DR1 transgenic mice“, *Arthritis Res. Ther.*, roč. 8, č. 4, s. R93, 2006, doi: 10.1186/ar1964.
- [21] J. Canton, D. Schlam, C. Breuer, M. Gütschow, M. Glogauer, a S. Grinstein, „Calcium-sensing receptors signal constitutive macropinocytosis and facilitate the uptake of NOD2 ligands in macrophages“, *Nat. Commun.*, roč. 7, s. 11284, dub. 2016, doi: 10.1038/ncomms11284.
- [22] D. S. Redka, M. Gütschow, S. Grinstein, a J. Canton, „Differential ability of proinflammatory and anti-inflammatory macrophages to perform macropinocytosis“, *Mol. Biol. Cell*, roč. 29, č. 1, s. 53–65, led. 2018, doi: 10.1091/mbc.E17-06-0419.
- [23] S. Mandrekar, Q. Jiang, C. Y. D. Lee, J. Koenigsnecht-Talboo, D. M. Holtzman, a G. E. Landreth, „Microglia Mediate the Clearance of Soluble A β through Fluid Phase Macropinocytosis“, *J. Neurosci.*, roč. 29, č. 13, s. 4252–4262, dub. 2009, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5572-08.2009.
- [24] W. Yao, K. Li, K. Liao, „Macropinocytosis contributes to the macrophage foam cell formation in RAW264.7 cells“, *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, s. 773–780, zář. 2009, doi: 10.1093/abbs/gmp066.
- [25] H. S. Kruth, W. Huang, I. Ishii, a W.-Y. Zhang, „Macrophage Foam Cell Formation with Native Low Density Lipoprotein“, *J. Biol. Chem.*, roč. 277, č. 37, s. 34573–34580, zář. 2002, doi: 10.1074/jbc.M205059200.
- [26] B. E. García-Pérez et al., „Macropinocytosis is responsible for the uptake of pathogenic and non-pathogenic mycobacteria by B lymphocytes (Raji cells)“, *BMC Microbiol.*, roč. 12, s. 246, říj. 2012, doi: 10.1186/1471-2180-12-246.
- [27] J. C. Charpentier et al., „Macropinocytosis drives T cell growth by sustaining the activation of mTORC1“, *Nat. Commun.*, roč. 11, s. 180, led. 2020, doi: 10.1038/s41467-019-13997-3.

- [28] D. Bonanomi et al., „Identification of a developmentally regulated pathway of membrane retrieval in neuronal growth cones ", J. Cell Sci., roč. 121, č. Pt 22, s. 3757–3769, lis. 2008, doi: 10.1242/jcs.033803.
- [29] R. M. Powers et al., „Growth cone macropinocytosis of neurotrophin receptor and neuritogenesis are regulated by neuron navigator 1", Mol. Biol. Cell, roč. 33, č. 7, s. ar64, kvě. 2022, doi: 10.1091/mbc.E21-12-0623.
- [30] X. Shao et al., „Placental trophoblast syncytialization potentiates macropinocytosis via mTOR signaling to adapt to reduced amino acid supply", Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., roč. 118, č. 3, s. e2017092118, led. 2021, doi: 10.1073/pnas.2017092118.
- [31] M. Amyere, B. Payraastre, U. Krause, P. V. D. Smissen, A. Veithen, a P. J. Courtoy, „Constitutive Macropinocytosis in Oncogene-transformed Fibroblasts Depends on Sequential Permanent Activation of Phosphoinositide 3-Kinase and Phospholipase C", Mol. Biol. Cell, roč. 11, č. 10, s. 3453–3467, říj. 2000, doi: 10.1091/mbc.11.10.3453.
- [32] S. M. Kim et al., „PTEN deficiency and AMPK activation promote nutrient scavenging and anabolism in prostate cancer cells", Cancer Discov., roč. 8, č. 7, s. 866–883, čvc. 2018, doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-1215.
- [33] W. Palm, Y. Park, K. Wright, N. N. Pavlova, D. A. Tuveson, a C. B. Thompson, „The Utilization of Extracellular Proteins as Nutrients Is Suppressed by mTORC1", Cell, roč. 162, č. 2, s. 259–270, čvc. 2015, doi: 10.1016/j.cell.2015.06.017.
- [34] S. Y. Kasitinon et al., „TRPML1 Promotes Protein Homeostasis in Melanoma Cells by Negatively Regulating MAPK and mTORC1 Signaling", Cell Rep., roč. 28, č. 9, s. 2293-2305.e9, srp. 2019, doi: 10.1016/j.celrep.2019.07.086.
- [35] X. Wang et al., „The phospholipid flippase ATP9A enhances macropinocytosis to promote nutrient starvation tolerance in hepatocellular carcinoma", J. Pathol., roč. 260, č. 1, s. 17–31, kvě. 2023, doi: 10.1002/path.6059.
- [36] J. J. Kamphorst et al., „Human pancreatic cancer tumors are nutrient poor and tumor cells actively scavenge extracellular protein", Cancer Res., roč. 75, č. 3, s. 544–553, úno. 2015, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2211.
- [37] C. Commisso et al., „Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells", Nature, roč. 497, č. 7451, s. 633–637, kvě. 2013, doi: 10.1038/nature12138.
- [38] V. Jayashankar a A. L. Edinger, „Macropinocytosis confers resistance to therapies targeting cancer anabolism", Nat. Commun., roč. 11, s. 1121, úno. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-14928-3.
- [39] C. Cui et al., „Eltrombopag binds SDC4 directly and enhances MAPK signaling and macropinocytosis in cancer cells", Am. J. Cancer Res., roč. 12, č. 6, s. 2697–2710, čer. 2022.
- [40] Y. Posor, W. Jang, a V. Haucke, „Phosphoinositides as membrane organizers", Nat. Rev. Mol. Cell Biol., roč. 23, č. 12, s. 797–816, kvě. 2022, doi: 10.1038/s41580-022-00490-x. (*)
- [41] G. R. V. Hammond et al., „PI4P And PI(4,5)P2 Are Essential But Independent Lipid Determinants Of Membrane Identity", Science, roč. 337, č. 6095, s. 727–730, srp. 2012, doi: 10.1126/science.1222483.

- [42] R. Zoncu et al., „Loss of endocytic clathrin-coated pits upon acute depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, roč. 104, č. 10, s. 3793–3798, bře. 2007, doi: 10.1073/pnas.0611733104.
- [43] G. Rohde, D. Wenzel, a V. Haucke, „A phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding site within μ 2-adaptin regulates clathrin-mediated endocytosis", *J. Cell Biol.*, roč. 158, č. 2, s. 209–214, čvc. 2002, doi: 10.1083/jcb.200203103.
- [44] K. A. Bethoney, M. C. King, J. E. Hinshaw, E. M. Ostap, a M. A. Lemmon, „A possible effector role for the pleckstrin homology (PH) domain of dynamin", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, roč. 106, č. 32, s. 13359–13364, srp. 2009, doi: 10.1073/pnas.0906945106.
- [45] Y. J. Wang et al., „Phosphatidylinositol 4 Phosphate Regulates Targeting of Clathrin Adaptor AP-1 Complexes to the Golgi", *Cell*, roč. 114, č. 3, s. 299–310, srp. 2003, doi: 10.1016/S0092-8674(03)00603-2.
- [46] H. Wang et al., „Phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate synthesis and turnover are spatially segregated in the endocytic pathway", *J. Biol. Chem.*, roč. 295, č. 4, s. 1091–1104, led. 2020, doi: 10.1074/jbc.RA119.011774.
- [47] Y. Posor et al., „Spatiotemporal control of endocytosis by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate", *Nature*, roč. 499, č. 7457, Art. č. 7457, čvc. 2013, doi: 10.1038/nature12360.
- [48] D. J. Gillooly et al., „Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells", *EMBO J.*, roč. 19, č. 17, s. 4577–4588, zář. 2000, doi: 10.1093/emboj/19.17.4577.
- [49] Ó. Lorenzo, S. Urbé, a M. J. Clague, „Analysis of phosphoinositide binding domain properties within the myotubularin-related protein MTMR3", *J. Cell Sci.*, roč. 118, č. 9, s. 2005–2012, kvě. 2005, doi: 10.1242/jcs.02325.
- [50] C. Raiborg, B. Bremnes, A. Mehlum, D. J. Gillooly, A. D'Arrigo, E. Stang, H. Stenmark, „FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes", *J Cell Sci.*, roč. 114, č. 12, s. 2255-2263, čer. 2001, doi: 10.1242/jcs.114.12.2255.
- [51] H. Kobayashi et al., „Hrs, a Mammalian Master Molecule in Vesicular Transport and Protein Sorting, Suppresses the Degradation of ESCRT Proteins Signal Transducing Adaptor Molecule 1 and 2", *J. Biol. Chem.*, roč. 280, č. 11, s. 10468–10477, bře. 2005, doi: 10.1074/jbc.M409969200.
- [52] L. Hicke, „PtdIns(3,5)P2 Finds a Partner", *Dev. Cell*, roč. 5, č. 3, s. 363–364, zář. 2003, doi: 10.1016/S1534-5807(03)00271-5.
- [53] N. H. Hong, A. Qi, a A. M. Weaver, „PI(3,5)P2 controls endosomal branched actin dynamics by regulating cortactin–actin interactions", *J. Cell Biol.*, roč. 210, č. 5, s. 753–769, srp. 2015, doi: 10.1083/jcb.201412127.
- [54] D. Cox, C.-C. Tseng, G. Bjekic, a S. Greenberg, „A Requirement for Phosphatidylinositol 3-Kinase in Pseudopod Extension", *J. Biol. Chem.*, roč. 274, č. 3, s. 1240–1247, led. 1999, doi: 10.1074/jbc.274.3.1240.
- [55] J. G. Marshall et al., „Restricted Accumulation of Phosphatidylinositol 3-Kinase Products in a Plasmalemmal Subdomain during Fc γ Receptor-Mediated Phagocytosis", *J. Cell Biol.*, roč. 153, č. 7, s. 1369–1380, čer. 2001, doi: 10.1083/jcb.153.7.1369.

- [56] G. A. Rodrigues, M. Falasca, Z. Zhang, S. H. Ong, a J. Schlessinger, „A Novel Positive Feedback Loop Mediated by the Docking Protein Gab1 and Phosphatidylinositol 3-Kinase in Epidermal Growth Factor Receptor Signaling", *Mol. Cell. Biol.*, roč. 20, č. 4, s. 1448–1459, úno. 2000, doi: 10.1128/MCB.20.4.1448-1459.2000.
- [57] L. A. Kamen, J. Levinsohn, a J. A. Swanson, „Differential Association of Phosphatidylinositol 3-Kinase, SHIP-1, and PTEN with Forming Phagosomes", *Mol. Biol. Cell*, roč. 18, č. 7, s. 2463–2472, čvc. 2007, doi: 10.1091/mbc.E07-01-0061.
- [58] O. V. Vieira et al., „Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation", *J. Cell Biol.*, roč. 155, č. 1, s. 19–26, řij. 2001, doi: 10.1083/jcb.200107069.
- [59] K. Nigorikawa et al., „Inositol Polyphosphate-4-Phosphatase Type I Negatively Regulates Phagocytosis via Dephosphorylation of Phagosomal PtdIns(3,4)P₂", *PLoS ONE*, roč. 10, č. 11, s. e0142091, lis. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0142091.
- [60] A. Zeigerer et al., „Rab5 is necessary for the biogenesis of the endolysosomal system in vivo", *Nature*, roč. 485, č. 7399, Art. č. 7399, kvě. 2012, doi: 10.1038/nature11133.
- [61] B. T. Kinsella a W. A. Maltese, „rab GTP-binding proteins with three different carboxyl-terminal cysteine motifs are modified in vivo by 20-carbon isoprenoids.", *J. Biol. Chem.*, roč. 267, č. 6, s. 3940–3945, úno. 1992, doi: 10.1016/S0021-9258(19)50616-0.
- [62] A. Cezanne, J. Lauer, A. Solomatina, I. F. Sbalzarini, a M. Zerial, „A non-linear system patterns Rab5 GTPase on the membrane", *eLife*, roč. 9, s. e54434, čer. 2020, doi: 10.7554/eLife.54434.
- [63] S. Tremel et al., „Structural basis for VPS34 kinase activation by Rab1 and Rab5 on membranes", *Nat. Commun.*, roč. 12, s. 1564, bře. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-21695-2.
- [64] C. Bucci et al., „The Small GTPase rab5 Functions as a Regulatory Factor in the Early Endocytic Pathway", *Cell*, roč. 70, č. 5, s. 715–728, zář. 1992, doi: 10.1016/0092-8674(92)90306-w.
- [65] R. Kunita, A. Otomo, H. Mizumura, K. Suzuki-Utsunomiya, S. Hadano, a J.-E. Ikeda, „The Rab5 Activator ALS2/alsin Acts as a Novel Rac1 Effector through Rac1-activated Endocytosis", *J. Biol. Chem.*, roč. 282, č. 22, s. 16599–16611, čer. 2007, doi: 10.1074/jbc.M610682200.
- [66] S. Yoshida, A. D. Hoppe, N. Araki, a J. A. Swanson, „Sequential signaling in plasma-membrane domains during macropinosome formation in macrophages", *J. Cell Sci.*, roč. 122, č. 18, s. 3250–3261, zář. 2009, doi: 10.1242/jcs.053207.
- [67] N. Araki, Y. Egami, Y. Watanabe, a T. Hatae, „Phosphoinositide metabolism during membrane ruffling and macropinosome formation in EGF-stimulated A431 cells", *Exp. Cell Res.*, roč. 313, č. 7, s. 1496–1507, dub. 2007, doi: 10.1016/j.yexcr.2007.02.012.
- [68] T. P. Welliver, S. L. Chang, J. J. Linderman, a J. A. Swanson, „Ruffles limit diffusion in the plasma membrane during macropinosome formation", *J. Cell Sci.*, roč. 124, č. 23, s. 4106–4114, pro. 2011, doi: 10.1242/jcs.091538.
- [69] J. Mercer a A. Helenius, „Virus entry by macropinocytosis", *Nat. Cell Biol.*, roč. 11, č. 5, Art. č. 5, kvě. 2009, doi: 10.1038/ncb0509-510. (*)
- [70] D. M. Veltman et al., „A plasma membrane template for macropinocytic cups", *eLife*, roč. 5, s. e20085, pro. 2016, doi: 10.7554/eLife.20085.

- [71] R. J. Botelho et al., „Localized Biphasic Changes in Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate at Sites of Phagocytosis", *J. Cell Biol.*, roč. 151, č. 7, s. 1353–1368, pro. 2000, doi: 10.1083/jcb.151.7.1353.
- [72] K. F. Talias, J. H. Hartwig, H. Ishihara, Y. Shibasaki, L. C. Cantley, a C. L. Carpenter, „Type I α phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase mediates Rac-dependent actin assembly", *Curr. Biol.*, roč. 10, č. 3, s. 153–156, úno. 2000, doi: 10.1016/S0960-9822(00)00315-8.
- [73] S. Grimmer, B. van Deurs, a K. Sandvig, „Membrane ruffling and macropinocytosis in A431 cells require cholesterol", *J. Cell Sci.*, roč. 115, č. 14, s. 2953–2962, čvc. 2002, doi: 10.1242/jcs.115.14.2953.
- [74] M. Fujii, K. Kawai, Y. Egami, a N. Araki, „Dissecting the roles of Rac1 activation and deactivation in macropinocytosis using microscopic photo-manipulation", *Sci. Rep.*, roč. 3, s. 2385, srp. 2013, doi: 10.1038/srep02385.
- [75] B. P. Somesh, G. Vlahou, M. Iijima, R. H. Insall, P. Devreotes, a F. Rivero, „RacG Regulates Morphology, Phagocytosis, and Chemotaxis", *Eukaryot. Cell*, roč. 5, č. 10, s. 1648–1663, říj. 2006, doi: 10.1128/EC.00221-06.
- [76] C. D. Nobes a A. Hall, „Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia", *Cell*, roč. 81, č. 1, s. 53–62, dub. 1995, doi: 10.1016/0092-8674(95)90370-4.
- [77] N. D. Condon et al., „Macropinosome formation by tent pole ruffling in macrophages", *J. Cell Biol.*, roč. 217, č. 11, s. 3873–3885, lis. 2018, doi: 10.1083/jcb.201804137.
- [78] D. Cox, P. Chang, Q. Zhang, P. G. Reddy, G. M. Bokoch, a S. Greenberg, „Requirements for Both Rac1 and Cdc42 in Membrane Ruffling and Phagocytosis in Leukocytes", *J. Exp. Med.*, roč. 186, č. 9, s. 1487–1494, lis. 1997, doi: 10.1084/jem.186.9.1487.
- [79] A. D. Hoppe a J. A. Swanson, „Cdc42, Rac1, and Rac2 Display Distinct Patterns of Activation during Phagocytosis", *Mol. Biol. Cell*, roč. 15, č. 8, s. 3509–3519, srp. 2004, doi: 10.1091/mbc.E03-11-0847.
- [80] M. Koivusalo et al., „Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling", *J. Cell Biol.*, roč. 188, č. 4, s. 547–563, úno. 2010, doi: 10.1083/jcb.200908086.
- [81] H. Katoh a M. Negishi, „RhoG activates Rac1 by direct interaction with the Dock180-binding protein Elmo", *Nature*, roč. 424, č. 6947, Art. č. 6947, čvc. 2003, doi: 10.1038/nature01817.
- [82] R. Rohatgi, P. Nollau, H.-Y. H. Ho, M. W. Kirschner, a B. J. Mayer, „Nck and Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Synergistically Activate Actin Polymerization through the N-WASP-Arp2/3 Pathway", *J. Biol. Chem.*, roč. 276, č. 28, s. 26448–26452, čvc. 2001, doi: 10.1074/jbc.M103856200.
- [83] R. Rohatgi, H. H. Ho, a M. W. Kirschner, „Mechanism of N-Wasp Activation by Cdc42 and Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate", *J. Cell Biol.*, roč. 150, č. 6, s. 1299–1310, zář. 2000, doi: 10.1083/jcb.150.6.1299.
- [84] L. M. Machesky et al., „Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, roč. 96, č. 7, s. 3739–3744, bře. 1999, doi: 10.1073/pnas.96.7.3739.

- [85] D. J. Seastone, E. Harris, L. A. Temesvari, J. E. Bear, C. L. Saxe, a J. Cardelli, „The WASp-like protein Scar regulates macropinocytosis, phagocytosis and endosomal membrane flow in *Dictyostelium*“, *J. Cell Sci.*, roč. 114, č. 14, s. 2673–2683, čvc. 2001, doi: 10.1242/jcs.114.14.2673.
- [86] O. Hoeller et al., „Two distinct functions for PI3-kinases in macropinocytosis“, *J. Cell Sci.*, roč. 126, č. 18, s. 4296–4307, zář. 2013, doi: 10.1242/jcs.134015.
- [87] P. Rodriguez-Viciano, P. H. Warne, B. Vanhaesebroeck, M. D. Waterfield, a J. Downward, „Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation.“, *EMBO J.*, roč. 15, č. 10, s. 2442–2451, kvě. 1996.
- [88] J. R. Chubb, A. Wilkins, G. M. Thomas, a R. H. Insall, „The *Dictyostelium* RasS protein is required for macropinocytosis, phagocytosis and the control of cell movement“, *J. Cell Sci.*, roč. 113, č. 4, s. 709–719, úno. 2000, doi: 10.1242/jcs.113.4.709.
- [89] M. Khosla, G. B. Spiegelman, R. Insall, a G. Weeks, „Functional overlap of the *dictyostelium* RasG, RasD and RasB proteins“, *J. Cell Sci.*, roč. 113, č. 8, s. 1427–1434, dub. 2000, doi: 10.1242/jcs.113.8.1427.
- [90] T. P. Welliver a J. A. Swanson, „A growth factor signaling cascade confined to circular ruffles in macrophages“, *Biol. Open*, roč. 1, č. 8, s. 754–760, čer. 2012, doi: 10.1242/bio.20121784.
- [91] G. Bloomfield, D. Traynor, S. P. Sander, D. M. Veltman, J. A. Pachebat, a R. R. Kay, „Neurofibromin controls macropinocytosis and phagocytosis in *Dictyostelium*“, *eLife*, roč. 4, s. e04940, doi: 10.7554/eLife.04940.
- [92] P. Ghoshal et al., „Loss of GTPase activating protein neurofibromin stimulates paracrine cell communication via macropinocytosis“, *Redox Biol.*, roč. 27, s. 101224, kvě. 2019, doi: 10.1016/j.redox.2019.101224.
- [93] M. Marinović et al., „IQGAP-related protein IqgC suppresses Ras signaling during large-scale endocytosis“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, roč. 116, č. 4, s. 1289–1298, led. 2019, doi: 10.1073/pnas.1810268116.
- [94] C. M. Buckley et al., „Coordinated Ras and Rac Activity Shapes Macropinocytic Cups and Enables Phagocytosis of Geometrically Diverse Bacteria“, *Curr. Biol.*, roč. 30, č. 15, s. 2912-2926.e5, srp. 2020, doi: 10.1016/j.cub.2020.05.049.
- [95] D. M. Veltman, M. G. Lemieux, D. A. Knecht, a R. H. Insall, „PIP3-dependent macropinocytosis is incompatible with chemotaxis“, *J. Cell Biol.*, roč. 204, č. 4, s. 497–505, úno. 2014, doi: 10.1083/jcb.201309081.
- [96] S. Suetsugu, D. Yamazaki, S. Kurisu, a T. Takenawa, „Differential Roles of WAVE1 and WAVE2 in Dorsal and Peripheral Ruffle Formation for Fibroblast Cell Migration“, *Dev. Cell*, roč. 5, č. 4, s. 595–609, říj. 2003, doi: 10.1016/S1534-5807(03)00297-1.
- [97] M. Valiya Veetil, S. Sadagopan, N. Kerur, S. Chakraborty, a B. Chandran, „Interaction of c-Cbl with Myosin IIA Regulates Bleb Associated Macropinocytosis of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus“, *PLoS Pathog.*, roč. 6, č. 12, s. e1001238, pro. 2010, doi: 10.1371/journal.ppat.1001238.
- [98] C. Casalou et al., „Arl13b and the non-muscle myosin heavy chain IIA are required for circular dorsal ruffle formation and cell migration“, *J. Cell Sci.*, roč. 127, č. 12, s. 2709–2722, čer. 2014, doi: 10.1242/jcs.143446.

- [99] K. D. Novak, M. D. Peterson, M. C. Reedy, M. A. Titus, „Dictyostelium myosin I double mutants exhibit conditional defects in pinocytosis", *J. Cell Biol.*, roč. 131, č. 5, s. 1205–1221, pro. 1995, doi: 10.1083/jcb.131.5.1205.
- [100] H. Brzeska, H. Koech, K. J. Pridham, E. D. Korn, a M. A. Titus, „Selective Localization of Myosin-I Proteins in Macropinosomes and Actin Waves", *Cytoskelet. Hoboken NJ*, roč. 73, č. 2, s. 68–82, úno. 2016, doi: 10.1002/cm.21275.
- [101] G. Jung, K. Remmert, X. Wu, J. M. Volosky, a J. A. H. III, „The Dictyostelium Carmil Protein Links Capping Protein and the Arp2/3 Complex to Type I Myosins through Their Sh3 Domains", *J. Cell Biol.*, roč. 153, č. 7, s. 1479–1498, čer. 2001.
- [102] A. Junemann et al., „A Diaphanous-related formin links Ras signaling directly to actin assembly in macropinocytosis and phagocytosis", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, roč. 113, č. 47, s. E7464–E7473, lis. 2016, doi: 10.1073/pnas.1611024113.
- [103] P. Ghoshal et al., „Nox2-Mediated PI3K and Cofilin Activation Confers Alternate Redox Control of Macrophage Pinocytosis", *Antioxid. Redox Signal.*, roč. 26, č. 16, s. 902–916, čer. 2017, doi: 10.1089/ars.2016.6639.
- [104] S. J. Full, M. L. Deinzer, P. S. Ho, a J. A. Greenwood, „Phosphoinositide binding regulates α -actinin CH2 domain structure: Analysis by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry", *Protein Sci. Publ. Protein Soc.*, roč. 16, č. 12, s. 2597–2604, pro. 2007, doi: 10.1110/ps.073146807.
- [105] N. Araki, T. Hatae, T. Yamada, S. Hirohashi, „Actinin-4 is preferentially involved in circular ruffling and macropinocytosis in mouse macrophages: analysis by fluorescence ratio imaging," *J Cell Sci.*, roč. 113, č. 18, s. 3329–3340, zář. 2000, doi: 10.1242/jcs.113.18.3329.
- [106] B. Schulte et al., „A Reducing Milieu Renders Cofilin Insensitive to Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate (PIP2) Inhibition", *J. Biol. Chem.*, roč. 288, č. 41, s. 29430–29439, říj. 2013, doi: 10.1074/jbc.M113.479766.
- [107] S. Yoshida et al., „Differential signaling during macropinocytosis in response to M-CSF and PMA in macrophages", *Front. Physiol.*, roč. 6, s. 8, led. 2015, doi: 10.3389/fphys.2015.00008.
- [108] Y. Zhang, S. H. Kwon, W. K. Vogel, a T. M. Filtz, „PI(3,4,5)P₃ potentiates phospholipase C- β activity", *J. Recept. Signal Transduct.*, roč. 29, č. 1, s. 52–62, úno. 2009, doi: 10.1080/10799890902729449.
- [109] M. Bohdanowicz et al., „Phosphatidic acid is required for the constitutive ruffling and macropinocytosis of phagocytes", *Mol. Biol. Cell*, roč. 24, č. 11, s. 1700–1712, čer. 2013, doi: 10.1091/mbc.E12-11-0789.
- [110] B. Singla, H.-P. Lin, P. Ghoshal, M. Cherian-Shaw, a G. Csányi, „PKC δ stimulates macropinocytosis via activation of SSH1-cofilin pathway", *Cell. Signal.*, roč. 53, s. 111–121, led. 2019, doi: 10.1016/j.cellsig.2018.09.018.
- [111] B. Singla, P. Ghoshal, H. Lin, Q. Wei, Z. Dong, a G. Csányi, „PKC δ -Mediated Nox2 Activation Promotes Fluid-Phase Pinocytosis of Antigens by Immature Dendritic Cells", *Front. Immunol.*, roč. 9, s. 537, bře. 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.00537.
- [112] J. Soosairajah et al., „Interplay between components of a novel LIM kinase–slingshot phosphatase complex regulates cofilin", *EMBO J.*, roč. 24, č. 3, s. 473–486, úno. 2005, doi: 10.1038/sj.emboj.7600543.

- [113] V. DesMarais, M. Ghosh, R. Eddy, a J. Condeelis, „Cofilin takes the lead", J. Cell Sci., roč. 118, č. 1, s. 19–26, led. 2005, doi: 10.1242/jcs.01631. (*)
- [114] R. Ard et al., „Regulation of Macropinocytosis by Diacylglycerol Kinase ζ ", PLoS ONE, roč. 10, č. 12, s. e0144942, pro. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0144942.
- [115] F. Chianale et al., „Diacylglycerol kinase α mediates HGF-induced Rac activation and membrane ruffling by regulating atypical PKC and RhoGDI", Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., roč. 107, č. 9, s. 4182–4187, bře. 2010, doi: 10.1073/pnas.0908326107.
- [116] H. Abramovici et al., „Diacylglycerol Kinase ζ Regulates Actin Cytoskeleton Reorganization through Dissociation of Rac1 from RhoGDI", Mol. Biol. Cell, roč. 20, č. 7, s. 2049–2059, dub. 2009, doi: 10.1091/mbc.E07-12-1248.
- [117] B. Miao et al., „Small molecule inhibition of phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) binding to pleckstrin homology domains", Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., roč. 107, č. 46, s. 20126–20131, lis. 2010, doi: 10.1073/pnas.1004522107.
- [118] X. Gao a D. Pan, „TSC1 and TSC2 tumor suppressors antagonize insulin signaling in cell growth", Genes Dev., roč. 15, č. 11, s. 1383–1392, čer. 2001, doi: 10.1101/gad.901101.
- [119] S. Yoshida, R. Pacitto, C. Sesì, L. Kotula, a J. A. Swanson, „Dorsal ruffles enhance activation of Akt by growth factors", J. Cell Sci., roč. 131, č. 22, s. jcs220517, lis. 2018, doi: 10.1242/jcs.220517.
- [120] B. D. Manning, A. R. Tee, M. N. Logsdon, J. Blenis, a L. C. Cantley, „Identification of the Tuberous Sclerosis Complex-2 Tumor Suppressor Gene Product Tuberin as a Target of the Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Pathway", Mol. Cell, roč. 10, č. 1, s. 151–162, čvc. 2002, doi: 10.1016/S1097-2765(02)00568-3.
- [121] S. Menon et al., „Spatial Control of the TSC Complex Integrates Insulin and Nutrient Regulation of mTORC1 at the Lysosome", Cell, roč. 156, č. 4, s. 771–785, úno. 2014, doi: 10.1016/j.cell.2013.11.049.
- [122] Y. Sancak, L. Bar-Peled, R. Zoncu, A. L. Markhard, S. Nada, a D. M. Sabatini, „Regulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids", Cell, roč. 141, č. 2, s. 290–303, dub. 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.02.024.
- [123] S. Yoshida, R. Pacitto, Y. Yao, K. Inoki, a J. A. Swanson, „Growth factor signaling to mTORC1 by amino acid-laden macropinosomes", J. Cell Biol., roč. 211, č. 1, s. 159–172, říj. 2015, doi: 10.1083/jcb.201504097.
- [124] M. Maekawa et al., „Sequential breakdown of 3-phosphorylated phosphoinositides is essential for the completion of macropinocytosis", Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., roč. 111, č. 11, s. E978–E987, bře. 2014, doi: 10.1073/pnas.1311029111.
- [125] J. Hasegawa et al., „SH3YL1 regulates dorsal ruffle formation by a novel phosphoinositide-binding domain", J. Cell Biol., roč. 193, č. 5, s. 901–916, kvě. 2011, doi: 10.1083/jcb.201012161.
- [126] S. Morishita, N. Wada, M. Fukuda, a T. Nakamura, „Rab5 activation on macropinosomes requires ALS2, and subsequent Rab5 inactivation through ALS2 detachment requires active Rab7", FEBS Lett., roč. 593, č. 2, s. 230–241, led. 2019, doi: 10.1002/1873-3468.13306.

- [127] M. E. Maxson, H. Sarantis, A. Volchuk, J. H. Brumell, a S. Grinstein, „Rab5 regulates macropinocytosis by recruiting the inositol 5-phosphatases OCRL and Inpp5b that hydrolyse PtdIns(4,5)P₂“, *J. Cell Sci.*, roč. 134, č. 7, s. jcs252411, dub. 2021, doi: 10.1242/jcs.252411.
- [128] D. Schlam et al., „Phosphoinositide 3-kinase enables phagocytosis of large particles by terminating actin assembly through Rac/Cdc42 GTPase-activating proteins“, *Nat. Commun.*, roč. 6, s. 8623, říj. 2015, doi: 10.1038/ncomms9623.
- [129] S. Dharmawardhane, A. Schürmann, M. A. Sells, J. Chernoff, S. L. Schmid, a G. M. Bokoch, „Regulation of Macropinocytosis by p21-activated Kinase-1“, *Mol. Biol. Cell*, roč. 11, č. 10, s. 3341–3352, říj. 2000, doi: 10.1091/mbc.11.10.3341.
- [130] P. Liberali et al., „The closure of Pak1-dependent macropinosomes requires the phosphorylation of CtBP1/BARS“, *EMBO J.*, roč. 27, č. 7, s. 970–981, dub. 2008, doi: 10.1038/emboj.2008.59.
- [131] Y. Haga, N. Miwa, S. Jahangeer, T. Okada, a S. Nakamura, „CtBP1/BARS is an activator of phospholipase D1 necessary for agonist-induced macropinocytosis“, *EMBO J.*, roč. 28, č. 9, s. 1197–1207, kvě. 2009, doi: 10.1038/emboj.2009.78.
- [132] E. Lee a D. A. Knecht, „Visualization of Actin Dynamics During Macropinocytosis and Exocytosis“, *Traffic*, roč. 3, č. 3, s. 186–192, 2002, doi: 10.1034/j.1600-0854.2002.030304.x.
- [133] K. O. Schink et al., „The phosphoinositide coincidence detector Phafin2 promotes macropinocytosis by coordinating actin organisation at forming macropinosomes“, *Nat. Commun.*, roč. 12, č. 1, s. 6577, pro. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-26775-x.
- [134] C. D. Williamson a J. G. Donaldson, „Arf6, JIP3, and dynein shape and mediate macropinocytosis“, *Mol. Biol. Cell*, roč. 30, č. 12, s. 1477–1489, čer. 2019, doi: 10.1091/mbc.E19-01-0022.
- [135] M. Fu a E. L. F. Holzbaur, „Integrated regulation of motor-driven organelle transport by scaffolding proteins“, *Trends Cell Biol.*, roč. 24, č. 10, s. 564–574, říj. 2014, doi: 10.1016/j.tcb.2014.05.002.
- [136] W. D. Feliciano, S. Yoshida, S. W. Straight, a J. A. Swanson, „Coordination of the Rab5 Cycle on Macropinosomes“, *Traffic Cph. Den.*, roč. 12, č. 12, s. 1911–1922, pro. 2011, doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01280.x.
- [137] J. Rink, E. Ghigo, Y. Kalaidzidis, a M. Zerial, „Rab Conversion as a Mechanism of Progression from Early to Late Endosomes“, *Cell*, roč. 122, č. 5, s. 735–749, zář. 2005, doi: 10.1016/j.cell.2005.06.043.
- [138] G. E. Cozier et al., „The Phox Homology (PX) Domain-dependent, 3-Phosphoinositide-mediated Association of Sorting Nexin-1 with an Early Sorting Endosomal Compartment Is Required for Its Ability to Regulate Epidermal Growth Factor Receptor Degradation“, *J. Biol. Chem.*, roč. 277, č. 50, s. 48730–48736, pro. 2002, doi: 10.1074/jbc.M206986200.
- [139] J. P. Lim, J. T. Wang, M. C. Kerr, R. D. Teasdale, a P. A. Gleeson, „A role for SNX5 in the regulation of macropinocytosis“, *BMC Cell Biol.*, roč. 9, s. 58, říj. 2008, doi: 10.1186/1471-2121-9-58.
- [140] J. R. T. van Weering et al., „Molecular basis for SNX-BAR-mediated assembly of distinct endosomal sorting tubules“, *EMBO J.*, roč. 31, č. 23, s. 4466–4480, lis. 2012, doi: 10.1038/emboj.2012.283.

- [141] J. T. H. Wang, M. C. Kerr, S. Karunaratne, A. Jeanes, A. S. Yap, a R. D. Teasdale, „The SNX-PX-BAR Family in Macropinocytosis: The Regulation of Macropinosome Formation by SNX-PX-BAR Proteins", *PLoS ONE*, roč. 5, č. 10, s. e13763, říj. 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0013763.
- [142] C. M. Buckley a J. S. King, „Drinking problems: mechanisms of macropinosome formation and maturation", *FEBS J.*, roč. 284, č. 22, s. 3778–3790, lis. 2017, doi: 10.1111/febs.14115. (*)
- [143] Y. Egami a N. Araki, „Spatiotemporal Localization of Rab20 in Live RAW264 Macrophages during Macropinocytosis", *Acta Histochem. Cytochem.*, roč. 45, č. 6, s. 317–323, pro. 2012, doi: 10.1267/ahc.12014.
- [144] M. C. Kerr et al., „Visualisation of macropinosome maturation by the recruitment of sorting nexins", *J. Cell Sci.*, roč. 119, č. 19, s. 3967–3980, říj. 2006, doi: 10.1242/jcs.03167.
- [145] Y. Egami a N. Araki, „Characterization of Rab21-positive tubular endosomes induced by PI3K inhibitors", *Exp. Cell Res.*, roč. 314, č. 4, s. 729–737, úno. 2008, doi: 10.1016/j.yexcr.2007.11.018.
- [146] J. P. Lim, R. D. Teasdale, a P. A. Gleeson, „SNX5 is essential for efficient macropinocytosis and antigen processing in primary macrophages", *Biol. Open*, roč. 1, č. 9, s. 904–914, čvc. 2012, doi: 10.1242/bio.20122204.
- [147] Y. Egami a N. Araki, „Dynamic Changes in the Spatiotemporal Localization of Rab21 in Live RAW264 Cells during Macropinocytosis", *PLoS ONE*, roč. 4, č. 8, s. e6689, srp. 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0006689.
- [148] X. Li et al., „Genetically encoded fluorescent probe to visualize intracellular phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate localization and dynamics", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, roč. 110, č. 52, s. 21165–21170, pro. 2013, doi: 10.1073/pnas.1311864110.
- [149] D. Sbrissa, O. C. Ikonov, a A. Shisheva, „Phosphatidylinositol 3-Phosphate-interacting Domains in PIKfyve: BINDING SPECIFICITY AND ROLE IN PIKfyve ENDOMEMBRANE LOCALIZATION", *J. Biol. Chem.*, roč. 277, č. 8, s. 6073–6079, úno. 2002, doi: 10.1074/jbc.M110194200.
- [150] A. Cabezas, K. Pattni, a H. Stenmark, „Cloning and subcellular localization of a human phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase, PIKfyve/Fab1", *Gene*, roč. 371, č. 1, s. 34–41, dub. 2006, doi: 10.1016/j.gene.2005.11.009.
- [151] S. Krishna et al., „PIKfyve regulates vacuole maturation and nutrient recovery following engulfment", *Dev. Cell*, roč. 38, č. 5, s. 536–547, zář. 2016, doi: 10.1016/j.devcel.2016.08.001.
- [152] X. Dong et al., „PI(3,5)P2 Controls Membrane Traffic by Direct Activation of Mucolipin Ca²⁺ Release Channels in the Endolysosome", *Nat. Commun.*, roč. 1, č. 4, s. 38, čvc. 2010, doi: 10.1038/ncomms1037.
- [153] R. M. Dayam, A. Saric, R. E. Shilliday, a R. J. Botelho, „The Phosphoinositide-Gated Lysosomal Ca²⁺ Channel, TRPML1, Is Required for Phagosome Maturation", *Traffic*, roč. 16, č. 9, s. 1010–1026, 2015, doi: 10.1111/tra.12303.
- [154] L. Dolat a E. T. Spiliotis, „Septins promote macropinosome maturation and traffic to the lysosome by facilitating membrane fusion", *J. Cell Biol.*, roč. 214, č. 5, s. 517–527, srp. 2016, doi: 10.1083/jcb.201603030.

Přehledové články jsou označeny: (*).